

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Marcadores Moleculares en Cabras del Altiplano
de la Ciudad de México**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

MARIA ESTHER REVUELTA MIRANDA

Directores:

Dr. Ricardo Santiago Díaz

QFI. Gilda Flores Rosales

México, D. F.

1982



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.

I N D I C E

	Página
I.- INTRODUCCION	... 1
1.- Polimorfismo	... 2
2.- Antecedentes	... 4
3.- Especie caprina	... 10
a) Lactosa	... 12
b) Albúmina	... 17
OBJETIVO	... 19
II.- METODOS	... 20
1.- Colección de muestras	... 21
2.- Extracción de Sero Albúmina	... 22
3.- Electroforesis	... 22
a) Generalidades	... 22
b) Técnica Electroforética	... 26

	Página
4.- Cuantificación de Proteínas	... 33
5.- Identificación de Albúmina	... 36
6.- Determinación de Actividad de Galactosa-1-Fosfato Uridil Transferasa	... 38
III.- RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO	... 41
1.- Fórmulas	... 45
2.- Histogramas de Frecuencia	... 46
3.- Prueba de X^2 , para Galactosa-1- Fosfato Uridil Transferasa	... 52
IV.- DISCUSION	... 55
1.- Albúmina	... 56
2.- Galactosa-1-Fosfato Uridil Transferasa	... 60
3.- Generalidades	... 61
V.- CONCLUSION	... 64
VI.- RESUMEN	... 66
VII.- BIBLIOGRAFIA	... 68

F I G U R A S

1.- Síntesis de Lactosa	...	16
2.- Membrana de Acetato de Celulosa Beckman	...	28
3.- Célula Electroforética Beckman Microzone Modelo R-101	...	30
4.- Membrana Revelada con Ponceau-S, con 6 muestras de suero	...	31
5.- Membrana, con 8 muestras diferen- tes de suero Albúmina caprina	...	32
6.- Curva Estandar de Albúmina Bovina Fracción V.	...	35
7.- Discos de Papel Filtro con gotas de muestra incubada en reactivo de Beutler.	...	40
8.- Histograma (proteínas totales)	...	47
9.- Histograma (Albúmina)	...	50

T A B L A S

1.- Registro Caprino y Resultados	...
-----------------------------------	-----

C A P I T U L O I
I N T R O D U C C I O N

I.- INTRODUCCION

El reto extraordinario y atractivo para el hombre de establecer y representar las estructuras y funciones de las moléculas biológicas ha motivado la investigación en el campo de la Bioquímica.

El conocimiento de las moléculas ha dado paso a la manipulación de ellas; explicando sus estados de agregación y la importancia de las asociaciones con otras moléculas, tal es el caso de las proteínas.

De ellas nos interesa las diferentes manifestaciones que se pueden observar electroforéticamente, así como de actividad sobre un sustrato dado.

El establecimiento de características moleculares - así como el estudio polimórfico en la especie caprina está dirigido a un conocimiento mayor, no solo desde el punto de vista productivo, sino también desde el molecular, cuestión que permite filosofar un poco en cuanto a por qué la especie posee un fenotipo dado.

1.- POLIMORFISMO.

Todas aquellas estructuras que se presentan en diferentes formas sin cambiar de naturaleza son polimórficas. (56)

El polimorfismo proteico equivale a las manifestaciones morfológicas diferentes de una proteína; las cuales poseen las mismas funciones. El polimorfismo proteico está dado por loci-génicos, sobre los cuales han actuado diversas causas como son los cambios evolutivos (56). Estos cambios han sido básicamente mutaciones, que ocurren continuamente en una población biológica con un rango de efectos desde leves hasta letales. Existen mutaciones que no manifiestan cambios fenotípicos detectables así también aquellas que ocasionan un cambio fenotípico detectable.

El resultado de mutaciones tolerables en la población da como consecuencia el polimorfismo molecular, básicamente proteico (24, 56). Se han detectado polimorfismos de proteínas electroforéticamente, por ejemplo: Albúmina (3, 10, 42, 48, 49), Globulinas (42), Hemoglobinas (62), Transferrina (10, 61), Prealbúmina (10, 11, 12, 36, 60), Esterasas (10), -- fosfatasa alcalina (46), Galactosa-1-fosfato-Uridil-transferasa (16), etc.

Evidentemente las variantes proteicas sugieren que poseen cambios en su estructura molecular que las hace diferentes entre sí; ese cambio puede ser la incursión de un aminoácido por otro ocasionando diferentes cargas netas de la proteína, diferente conformación, enrollamiento, etc. (10, 11, 12, 13, 35, 63).

Es considerable establecer que así como una muta---

ción puede inducir un cambio detectable en una proteína, no -
debe descartarse la posibilidad de que esta no conduzca a cambi
bio alguno y que por tanto no sea posible identificarla por -
los métodos básicos.

Mediante la técnica electroforética, es posible compr
probar y diferenciar si existen cambios moleculares en una --
misma proteína bien sea de carga o conformación (37, 42).

2.- ANTECEDENTES.

El polimorfismo molecular forma parte de una nueva
fase de la biología moderna.

En la década de 1960-1970, se publican los primeros
estudios de polimorfismo en proteínas, siendo realizados en -
humano.

En las poblaciones que habitamos la Tierra, de las
diferentes especies; la cantidad de variación genética relativ
vamente grande se mantiene como una consecuencia de la selec-
ción natural y esto ha sido potencialmente importante para la
promoción del polimorfismo genético. Un alelo se encuentra -
favorecido en un microhabitat y el alelo alternativo en otro;
sin embargo los efectos drásticos de la selección son los que
permiten que se mantengan los alelos en las poblaciones (32).

Existen evidencias de que en el transcurso de la --
evolución de las proteínas algunos aminoácidos se han susti--

tuido, llevando esto nuevamente a establecer la presencia de mutaciones con efectos 'neutros', los que son apreciados varias generaciones después debido a diferentes grados de detección o de manifestación y a influencias de selección natural. Aunque hay también sustituciones radicales que ocasionan cambios químicos de suma importancia alterando la función biológica (17).

En ratones caseros, se hizo un estudio polimórfico, en electroforesis sobre papel; básicamente se estudiaron albúmina, transferrina, prealbúmina y una serie enzimática. Todas excepto albúmina y prealbúmina poseían polimorfismo, resultando ser monomórficas, ya que no presentaron movilidad electroforética. Esto condujo a la conclusión de que solo había un alelo en el locus para ellas (52).

Se ha detectado en ratas, la ausencia de albúmina en plasma; la ausencia de esta proteína es debida a la presencia de genes autosómicos recesivos en el locus de ella, encontrándose fenotípicamente 2 variantes: la normal (AA, Aa) y a la analbuminemia (aa), no aclarándose si existe alguna diferencia entre los homocigotos y heterocigotos al gen dominante (41).

En el género humano, la hemoglobina es una de las proteínas que manifiesta polimorfismo: 18 hemoglobinas diferentes se han descrito ya en la especie (A, S, C, F, D, E, G, H, I, J, K, A², M, L₁B, L₂B, L, Dunham, Galvestone) (62). Existiendo varian-

tes por ejemplo aún en la hemoglobina M y que han sido localizadas en diferentes habitat. La presencia de algunas de estas variantes se han relacionado con transtornos patológicos, hereditarios; e incluso poseen diferentes frecuencias en las razas (42,56).

Las globulinas beta, también poseen polimorfismo en humanos considerando a las variantes como anormales y presentes en casos patológicos como son las macroglobulinemias (42).

En cuanto a las diferentes formas moleculares de enzimas o isoenzimas; las que se caracterizan por la afinidad a un mismo sustrato y por catalizar la misma reacción, también se han identificado variantes electroforéticas por ejemplo:- LDH (Lactico deshidrogenasa)(42), Galactosa-1-fosfato-uridil-transferasa (16).

En peces (*Fundulus heteroclitus*), mediante electroforesis horizontal en geles de almidón, se detectó polimorfismo proteico; manifestándose que los individuos heterocigotos para un locus eran todos aquellos que poseían mayor viabilidad. Dicha heterogenicidad de loci estudiados indica que es debida a adaptaciones naturales o bien dada por pequeñas migraciones del ambiente original. En estos se concluyó que el polimorfismo proteico se manifiesta como una respuesta adaptativa de las especies; dichas causas han sido sobre todo de tipo termal (38).

En la mayoría de los trabajos, se estudia la albúmi-
na, se sabe que la evolución de la albúmina de plasma o suero
es un reflejo de la actividad metabólica del animal y de la -
eficacia de la cantidad de agua en el medio (59). Esto esta
relacionado con estudios realizados en serpientes (59), en --
las que la evolución de albúmina es nula, debido a que estos
animales consumen una cantidad de agua relativamente baja. -
Esta aseveración hace pensar que entre mayor función osmótica
posea la albúmina, mayor será su evolución.

La significancia a nivel adaptativo que poseen las
poblaciones naturales debe ser dado a todo nivel y en todas -
las especies que poblamos la tierra, ya que todas sufrimos se
lección natural (32,58).

Los caballos árabes han sido bastante estudiados, -
Stormont & Suzuki, analizan los diferentes fenotipos de albú-
mina, existiendo 3 fenotipos diferentes de ella, los que son
controlados por un par de alelos codominantes autosómicos.

Braend & Stormont (13), observan 16 fenotipos de --
Hemoglobina y transferrina al correr electroforesis en geles
de almidón. Seis alelos autosomales codominantes son los cau-
santes de esa variabilidad. Ashton (3), encuentra tres tipos
de prealbúminas en caballos. Braend (11,12), en la zona de -
la prealbúmina, observa variantes electroforéticas, pero no -
propone clasificación.

Bo Gahne (10), estudia las transferrinas, albúmina, prealbúmina y esterases plasmáticas. De 4 sementales, 36 yeguas y potros hijos de ambos. En transferrina se tienen 6 -- alelos, que concuerdan con lo propuesto por Braend y Stormont, existiendo un fenotipo exclusivo en la raza Salermiton y hay a su vez 2 variantes de otro de los fenotipos. Para la albúmina se encuentran 3 fenotipos dados por 2 alelos. Hay 8 fenotipos para la prealbúmina determinados por 4 alelos codominantes autosómicos. Para esterases 7 fenotipos y 4 alelos (3 condominantes y un recesivo).

La secuencia de trabajos que existen en búsqueda de marcadores moleculares y de polimorfismo molecular, ha permitido establecer perfiles electroforéticos estandares en humano, los que se utilizan para identificar las diferentes proteínas (42). En caballos que ha sido una especie bastante estudiada, se tienen ya perfiles electroforéticos de sero proteínas que se utilizan para identificar en ellos las proteínas, así como la manifestación de algún nuevo alelo (3,10,11, 12,13,60).

Ann Trommershausen-Smith y colaboradores (60); realizaron un experimento con caballos, encontrando aparte de -- los alelos ya establecidos, un nuevo alelo para la prealbúmina, al cual lo designaron como Pr°. Quizá la manifestación de este nuevo alelo sea una consecuencia del proceso evolutivo en el cual intervienen como moderadores los efectos ambien

tales, nutricionales, mutacionales y migratorios.

La postulación de polimorfismo proteico en varias especies ha permitido establecer los alelos responsables de su herencia y con ellos es posible actualmente predecir utilizando lo que concierne a Herencia Mendeliana los genotipos y fenotipos posibles de la descendencia. Una vez postulados los alelos responsables de la herencia o de la transmisión de un fenotipo dado en una proteína, se ha facilitado también el cálculo de frecuencias génicas y genotípicas en las poblaciones ya sea de humanos o de cualquier otra especie animal. El conocimiento de polimorfismo molecular permite ir estableciendo parámetros característicos de las diversas especies, que hacen y permiten fijar aspectos bioquímicos de ellas. Posiblemente en el futuro se podrá conocer gran número de estas moléculas involucradas en los aspectos fisiológicos y metabólicos de los organismos y ello permita establecer las características que nos diferencian entre las especies.

La especie más estudiada a la fecha es la humana, en segundo término los caballos, siendo recientemente las especies de laboratorio de las más estudiadas, aunque se ha logrado controlar muchos factores (nutricionales, ambientales, de cruces) no se ha obtenido resultados rápidos, existiendo trabajos que aún no se han concluido; en aves es relativamente poco lo que se ha realizado; con gansos, utilizando suero y la yema del huevo de estos, Valenta & Stail (61), encuen---

tran polimorfismo en transferrina y en conalbúmina al reali--
zar electroforesis horizontal en geles de almidón. Se fija -
una herencia dada por un locus con 2 alelos codominantes - --
(T_f^a y T_f^b) para la transferrina. Los autores hacen un cálcu
lo de frecuencias fenotípicas y genotípicas utilizando el ---
equilibrio de Hardy-Weinberg, observando que la distribución
de la población cumple con el equilibrio.

En México, se tienen antecedentes en trabajos de te
sis realizados con bovinos de diferentes razas: Cebú (51); -
ganado de lidia (46).

En los cuales se efectuó electroforesis en geles de
almidón y no se estableció variante alguna en cuanto a las --
proteínas en estudio (hemoglobina, albúmina, transferrina, --
fosfatasa alcalina, prealbúmina, etc.)

La especie de interés particular para este trabajo
la constituyen las cabras, de ellas en el país no se tienen -
antecedentes de algún trabajo en cuanto a marcadores bioquími
cos, específicamente proteínas. En Francia se han estudiado
cabras, de diferentes razas; en las que ha sido posible esta-
blecer sistema de grupos sanguíneos, así como variantes elec-
troforéticas, no existiendo claridad en los reportes, ni una
asociación con los alelos responsables del polimorfismo (43).

3.- ESPECIE CAPRINA.

La especie caprina en el país, no ha sido explotada

adecuadamente, la población de ellas en comparación con los -
bovinos es reducida.

Conclusiones tales como: "Causan grandes daños en los espacios vegetales de rápido desarrollo y forestales" (49); "Animal merodeador que parece desear particularmente las yemas vegetales frescas, la corteza del árbol recién plantado, los botones florales del jardín o los sarmientos de la parra que alcanza levantándose sobre sus patas posteriores" (8). -- "Algunos la acusan de ser uno de los factores esenciales de la desertización de las regiones donde causa estragos el nomadismo y ven en ella, esencialmente la causa de la extensión de desiertos en Africa del norte" (49). Contienen las razones por las cuales, esta especie se encuentra un tanto olvidada como animales productivos en gran proporción.

La cabra (*capra hircus*), es un animal con instinto natural muy inquieto; siendo esta la razón por la cual, cuando no se tiene cuidado con la vegetación de los lugares donde pastan se obtienen los resultados mencionados. El hombre es el responsable de estos sucesos, ya que él es quien debe tener cuidado en las zonas de pastoreo para que no terminen --- siendo desiertos, confinarlas en espacios en los que sean --- atendidas y con ello reducir notablemente esos problemas (8).

Así como existen detractores de esta especie hay defensores; le han dado el nombre de la "vaca del pobre" (8,49).

Se le considera como "la madre adoptiva del género humano" (8).

En base a que a nivel mundial más personas consumen leche de cabra que de vaca (8), además de que cuando las lecherías comerciales se vuelven antieconómicas, la cabra viene a ser la solución ya que en cuanto a manutención no es nada exigente y a pesar de conformarse con hierbas que sabe encontrar en terrenos áridos y abruptos, es un animal productivo.

Resulta más económico criar una cabra que una vaca, es más fácil de alojar y cuidar, es una "máquina de leche" -- que trabaja con una fuente de energía relativamente barata, -- de su leche se obtienen buenos quesos, su carne es buena, sus pieles son útiles en la industria talabartera, así como su estiércol es estimable y utilizado como abono (8,49)

De los productos que se obtienen de la cabra, la leche viene a ser el punto de nuestro interés. Esta leche posee la siguiente composición química: (47)

Sólidos totales	-	13.18%
Grasas	-	4.24%
Proteína cruda	-	3.70%
Caseína	-	2.80%
Lactosa	-	4.51-5.0%
Cenizas	-	0.78%

De estos componentes, uno de ellos recibe un enfo--

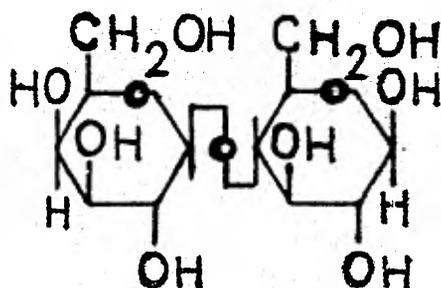
que especial en este trabajo; la lactosa, además de una proteína plasmática, que por la función de actuar como una molécula acarreadora de lípidos ha sido estudiada en este trabajo; la albúmina

3.a.- LACTOSA.

Disacarido, que existe en los mamíferos, encontrándose en mayor abundancia en la leche 5% (7,33,34,47).

Se conoce como el carbohidrato característico de ella (7,47).

Su estructura es 4-0-beta-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa.



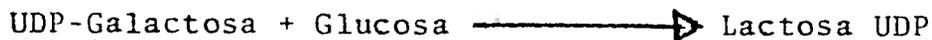
Beta lactosa

Por hidrolisis da una mezcla equimolecular de glucosa y galactosa.

"Puesto que en los tejidos de los mamíferos o en otros fluidos del cuerpo no se encuentra galactosa libre en cantidad apreciable, es evidente que esta se forma en las ---

glándulas mamarias a partir de la glucosa de la sangre" (63).

La lactosa en glándulas mamarias se produce mediante la reacción general: (27)



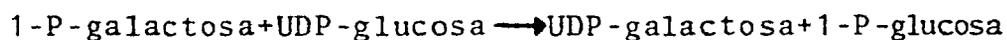
Alfa-lactalbumina

Uno de los 2 componentes de la
sintetasa de lactosa (27)

La importancia que posee para nosotros la lactosa radica en el interés particular de conocer un marcador molecular que intervenga en el proceso de biosíntesis de este disacárido.

Se produce mediante una secuencia de reacciones catalizadas por enzimas diferentes. La ausencia de una enzima ocasiona el bloqueo metabólico en esa vía; así como la poca actividad ocasionaría una síntesis lenta y probablemente, una super actividad, un proceso acelerado.

Es menester participar que la enzima o marcador en estudio es Galactosa-1-fosfato-uridil-transferasa (transferasa de la uridil fosfogalactosa); la cual interviene en la vía metabólica específicamente en el paso de:



En el hombre la deficiencia de esta enzima provoca

galactosemia, que es un trastorno hereditario debido a la incapacidad de metabolizar galactosa (9,16,20,54,56).

Nos interesa estudiar básicamente las variantes de actividad de esta enzima en las cabras, con objeto de asociar la y de conocer una de las etapas bioquímicas que intervienen en la síntesis del carbohidrato de la leche, así como establecer a nivel genético un control de variantes.

En este trabajo, se marcará una pauta para esclarecer las variantes de actividad de la enzima en esta especie y que mediante posteriores estudios se analicen los otros pasos de la vía. Por ahora solo una es la que se estudia, debido al fácil montaje de laboratorio de la técnica.

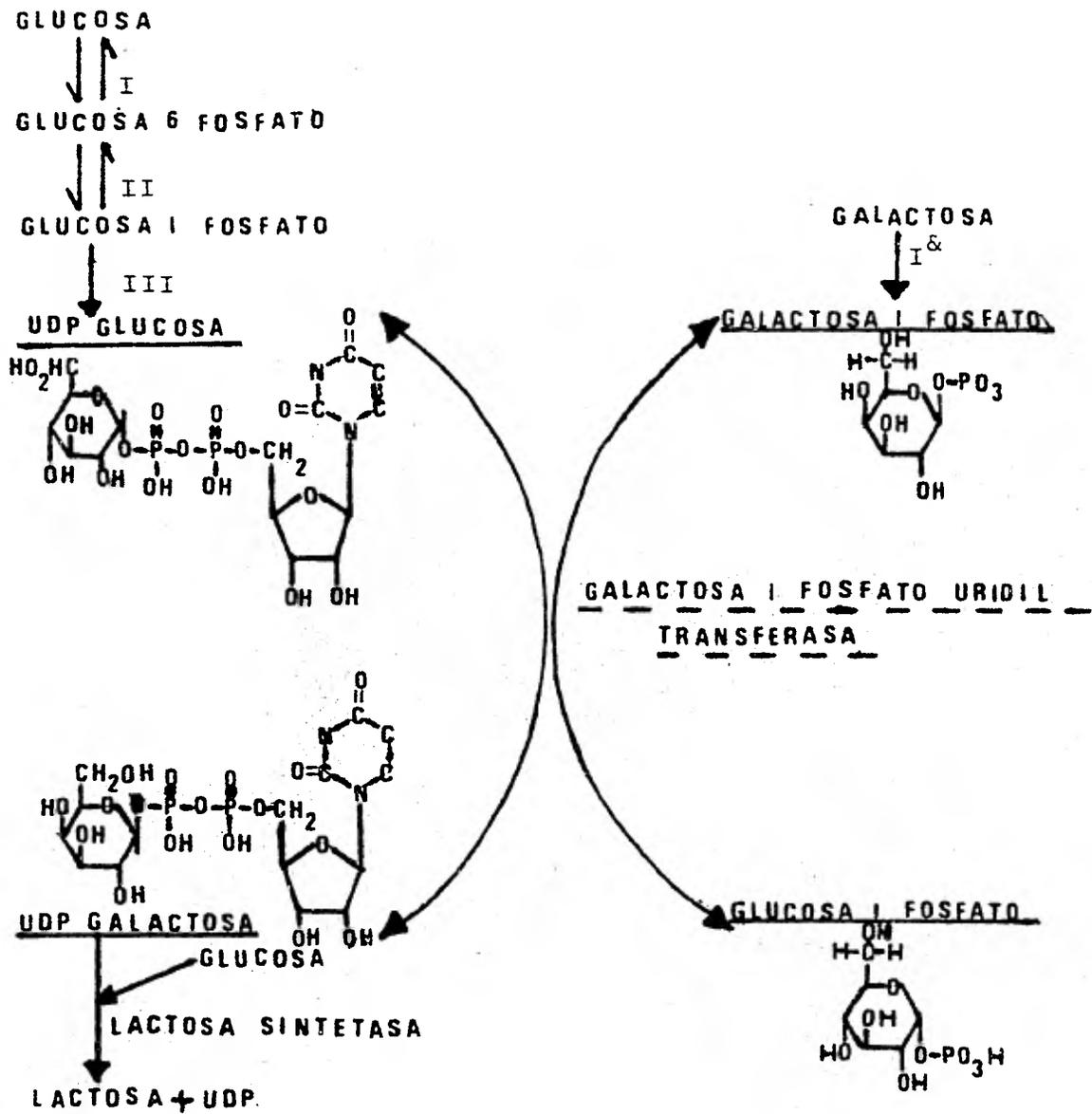


FIGURA I

SINTESIS DE LACTOSA	
ENZIMAS:	
I.-	GLUCOQUINASA, ATP, Mg
II.-	FOSFOGLUCOMUTASA
III.-	PIROFOSFOROLISA UTP
I&.-	GALACTO QUINASA, ATP

3.b.- ALBUMINA.

La sero albúmina es la proteína más abundante de -- suero o plasma; y es también la más pequeña, ya que posee un peso molecular entre 65 000 - 70 000 Daltons (7,30,34).

Es una proteína perteneciente al grupo de las globu- lares; se caracteriza por ser soluble en agua, adquiriendo -- una asimetría elipsoidal con un diámetro de 38 Angström y una longitud de 150 Angström (45). Además de su gran solubilidad en agua, también es soluble en medios acuosos que contienen - sales, ácidos, bases o etanol (33,34,45,48,63).

Cuando se somete al calor, se coagula fácilmente, - siendo esto característico para ella (34,45,48,50).

Es una proteína que posee grupos básicos y ácidos - titulables variando en cantidades dependiendo de la especie - de la cual se extraiga (63).

Cuando se disuelve en soluciones amortiguadoras a - pH 4.7 posee una carga neta de cero y este pH equivale al pun- to isoeléctrico PI de ella (30,34,42,45,48).

Esta proteína es sintetizada en el hígado; organo - considerado como el centro principal de síntesis de proteínas plasmáticas; la velocidad de síntesis registrada en ratas es de 10 a 20 mg/hora, siendo renovado diariamente un 25% de la proteína plasmática total en circulación (63) y posee una vi-

da media de 4 semanas (63).

La albúmina tiene a su cargo algunas funciones, como:

1.- Regulación osmótica.- Se trata de una proteína de transporte debido a su tamaño se le considera la proteína más activa osmóticamente, ya que interviene en la regulación osmótica y define el comportamiento intravascular (6,19,45,50,57,63).

Sustancias tales como: bilirrubina, cortisol, tiroxina, ácidos grasos, se unen a la albúmina y esto ocasiona su solubilidad y además su distribución en el organismo (34,63).

El estudio de esta proteína nos interesa desde el punto de vista polimórfico. Considerando que en esta especie, se carece del conocimiento de variantes electroforéticas, se pretende efectuar cierta metodología que conduzca a establecer las características de esta proteína de suero, polimórficamente, siendo precisamente ella la elegida por la función que posee en transporte de ácidos grasos necesarios para la síntesis de leche.

OBJETIVO

Estudio de albúmina (extracción, cuantificación, -- análisis electroforético) de 100 individuos de sexo variable y edad, con la finalidad de establecer las características de esta proteína en la especie caprina; así como la determina--- ción de actividad de la enzima Galactosa-1-fosfato-uridil---- transferasa, que interviene en un paso de la vía de biosínte- sis de lactosa.

C A P I T U L O I I

M E T O D O S

1.- COLECCION DE MUESTRAS

La toma de muestras se realizó en el Municipio de Texcoco, Edo. de México; enumerando y registrando cada animal con objeto de rotular y clasificar las muestras.

El número total de cabras muestreadas fueron 100, de diferentes edades y sexo.

a.- OBTENCION DE SUERO

Extracción de sangre sin anticoagulante mediante punción en yugular, localizándola y desinfectando el área previamente con etanol al 70%.

Las muestras de sangre se vertieron lentamente y tocando las paredes en tubos de ensaye, que se rotularon, taparon y fueron trasladadas en una gradilla a la FES-C inmediatamente.

En el laboratorio se introdujeron los tubos de ensaye a baño de agua a 37°C durante 15 minutos, se centrifugaron 10 minutos a 2000 revoluciones por minuto y con pipeta Pasteur se extrajo la capa superior que corresponde al suero. Este se depositó en frascos de ampolleta de 5 ml., limpios y estériles, congelándose hasta su determinación.

b.- OBTENCION DE ERITROCITOS.

En trozos de papel filtro Watman No. 1, se dejó caer gotas de sangre de cada cabra, con objeto de impregnarlos. -
Trasladándose dentro de una caja evitando el contacto entre -
ellos. Trabajándose el mismo día.

2.- EXTRACCION DE SERO ALBUMINA

De las 100 muestras de suero, se extrajo Albúmina, -
siguiendo una modificación del proceso descrito por Reinhold-
Kingsley (50) ($\text{Na}_2 \text{SO}_4$, $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$, 1 ml. H_2SO_4 en agua destila-
da a pH 7.5).

El cuál consiste en añadir a 0.5 ml. de suero descon-
gelado 0.75 ml. del reactivo para precipitar globulinas, mez-
clando por inversión y separando la fase acuosa de las globuli-
nas con 1 ml. de éter etílico, invirtiendo y centrifugando; --
con una pipeta Pasteur se extrae la capa acuosa, en la que se
encontraba la albúmina.

METODOS.

3.- ELECTROFORESIS

a.- GENERALIDADES

Técnica analítica poderosa, de la que se dispone ac-
tualmente en la investigación Bioquímica (42); en la que se ha
ce uso de la propiedad de las partículas o moléculas de poseer

carga eléctrica parcial con objeto de hacerlas migrar en un -- campo eléctrico.

Las proteínas pueden migrar en un campo eléctrico debido a que son macromoléculas compuestas de aminoácidos y por tanto poseen grupos carboxilo y grupos amino. Si las proteínas poseen más grupos amino (básicos) tendrán una carga positiva. Aquellas que posean mayor número de grupos carboxilo tendrán carga negativa.

Si el número de grupos amino y carboxilo son equivalentes o iguales, la carga neta de la proteína será cero y por tanto neutras.

La carga neta de una proteína depende de sus propiedades ácido-base y del pH del medio acuoso en el que esten disueltas. Al pH en el cual una proteína no posee carga eléctrica se le llama punto isoeléctrico PI y para esta técnica resulta muy útil ya que nos permite predecir o establecer hacia qué polo va a migrar la proteína que coloquemos a un pH conocido.

Cuando la solución amortiguadora posee un pH más ácido que el PI de la proteína, los grupos carboxilo (negativos) se van neutralizando progresivamente por el ácido empleado, -- los grupos $-NH_3$ predominan dando una carga neta positiva a la proteína, migrando hacia el cátodo (polo negativo).

Ahora bien, si el pH de la solución amortiguadora es más básico que el PI, ocurre lo inverso y finalmente posee una

carga negativa, por lo que migra hacia el anodo (polo positivo). Si el pH de la solución amortiguadora es igual al PI, - la proteína no migra, quedándose en la posición en la que fue aplicada. En la práctica se usan soluciones amortiguadoras - de ionicidad entre 0.025 y 0.75 (42) para el veronal.

Para realizar electroforesis se requiere de:

Celda electroforética y fuente de poder.

La función de la celda electroforética es poseer la tina en la que se va a depositar el tampon; poseer los 2 electrodos (2 alambres de platino); un puente en el que va a estar el medio de soporte y una tapa que evite la vaporización.

La fuente alimentadora se usa para tener un flujo - de corriente continua, es decir, voltaje e intensidad constantes.

Los medios de soporte que se utilizan son:

- 1.- Papel filtro.
- 2.- Acetato de celulosa
- 3.- Geles de agar, agarosa, almidón y poliacrilamida.

El papel filtro como medio de soporte ha sido usado desde 1937 en un proceso que lleva aproximadamente 16 horas - de corrimiento para proteínas, que requiere de una tinción de licada y sobre todo no posee una buena resolución.

En 1957, J. Kohn introduce el acetato de celulosa - como medio de soporte electroforético (42), teniendo un poder de resolución mayor.

Un fácil manejo y sobre todo que el tiempo que se - invierte en el proceso es mínimo (2 horas) debido a la reducción del tiempo, este soporte reemplazó al papel.

Los geles más usados en electroforesis son el agar, almidón y acrilamida. La velocidad de migración de una proteína en estos depende de la carga, de las dimensiones moleculares y del grosor de la malla del gel.

El poder de resolución de los geles está dado por - el tamaño de los poros formados por las partículas del gel correspondiente al crear un efecto tamizante. Con geles de almidón y de acrilamida se obtienen alrededor de 20 bandas al - correr una muestra de suero, cuestión que le da un gran poder de resolución.

Mediante el uso del acetato de celulosa, se obtienen alrededor de 5 zonas: Albúmina, globulina alfa 1, globulina alfa 2, Beta globulina y Gama Globulinas.

Las proteínas después de migrar electroforéticamente se tiñen con colorantes para proteínas como: Rojo de Ponceau, Azul de bromofenol, Azocarmín, Negro de amido, etc. Todas estas sustancias son colorantes aniónicos que reaccionan con los grupos aminados básicos de las proteínas en solución

ácida. Estos colorantes son cuantitativos, es decir, hay cierta afinidad de las fracciones proteicas en el proceso de teñido. Se ha observado que la Albúmina es la fracción proteica de suero más abundante y la que más liga colorante.

En este trabajo, se usan membranas de acetato de celulosa y es debido a que la proteína que se desea estudiar y separar es la albúmina. En geles de almidón y de acrilamida la albúmina no se separa de una fracción de globulina alfa --- (42).

b.- TECNICA ELECTROFORETICA.

Se realizó electroforesis con las 100 muestras de -- suero, los 100 extractos de albúmina y con albumina bovina --- fracción V comercial (como marcador).

Se usó como soporte acetato de celulosa (membranas) (figura No. 2), en una celda Microzone-Beckman para 8 mues---- tras (figura No. 3) y un bufer de veronal a pH 8.8.

Las condiciones de operación son:

100 Volts

1.25 miliampers

150 minutos

ánodo-cátodo

Las proteínas se revelaron con Ponceau-S, 10 minutos y eliminando el exceso de colorante con ácido acético al

5% (41, 42).

Las membranas con objeto de preservarlas se trataron con metanol al 25,50,75 y absoluto durante 10 minutos con cada uno y con una mezcla de ácido acético al 20% en metanol. Llevándolas sobre un vidrio a 100 grados centígrados; despegándolas y guardándolas en bolsas de celofán (41). Mediante el proceso se hicieron transparentes, facilitándose así la observación de las bandas de proteína. (Figura No. 4 y 5).

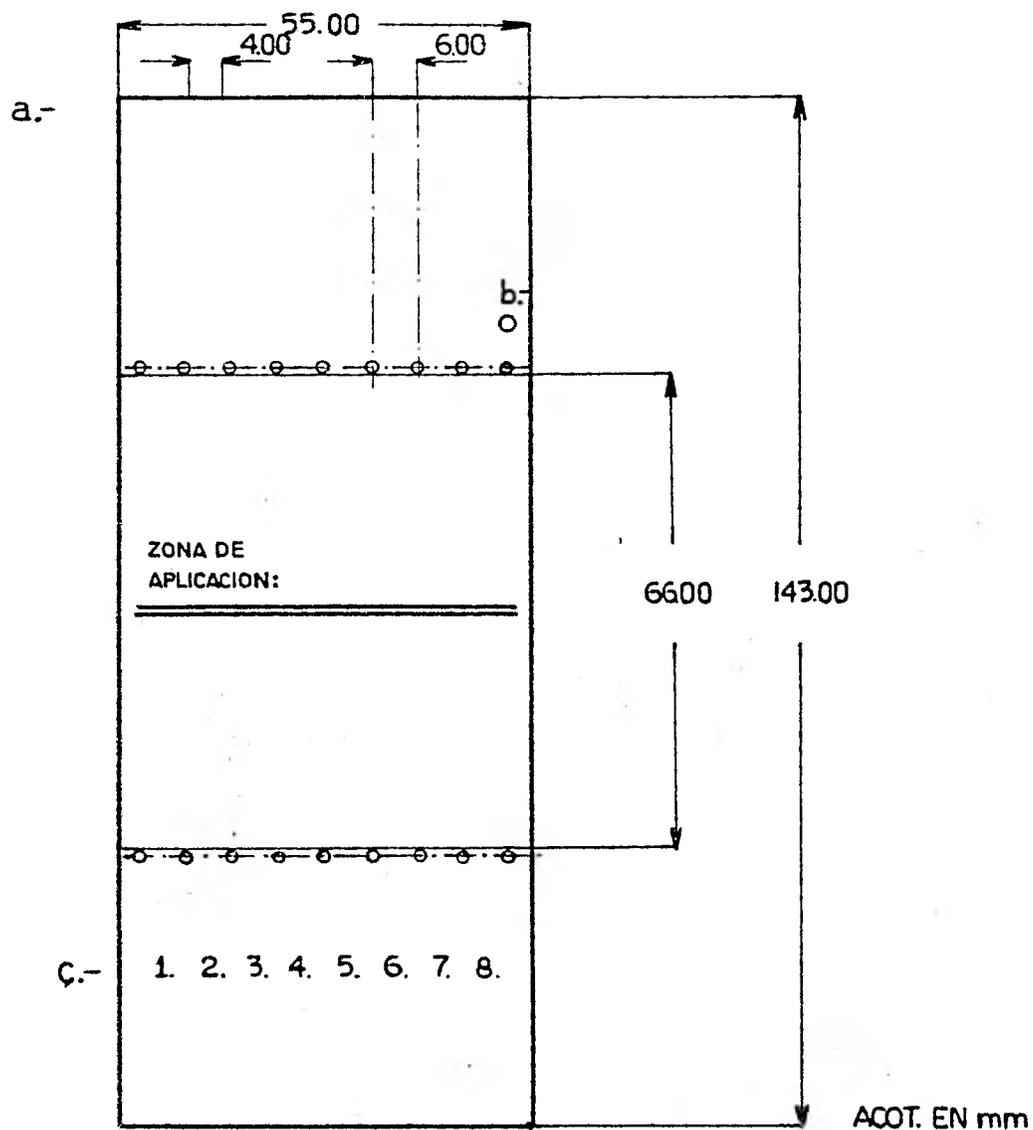


FIGURA 2.

MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSA BECKMAN.

a.- Dimensiones: 14.3 cm. de largo, 5.5 cm. de ancho.

6.6 cm. de longitud en la zona de las muestras.

0.6 cm. de distancia para aplicar una muestra.

0.4 x 0.1 cm. área en que se apli

ca la muestra.

b.- Orificio de referencia que indica hacia qué lado se encuentra el electrodo negativo (catódo).

c.- Número de muestras aplicadas en una membrana.

Posiciones.

CELULA ELECTROFORETICA

BECKMAN MICROZONE MODELO R-101

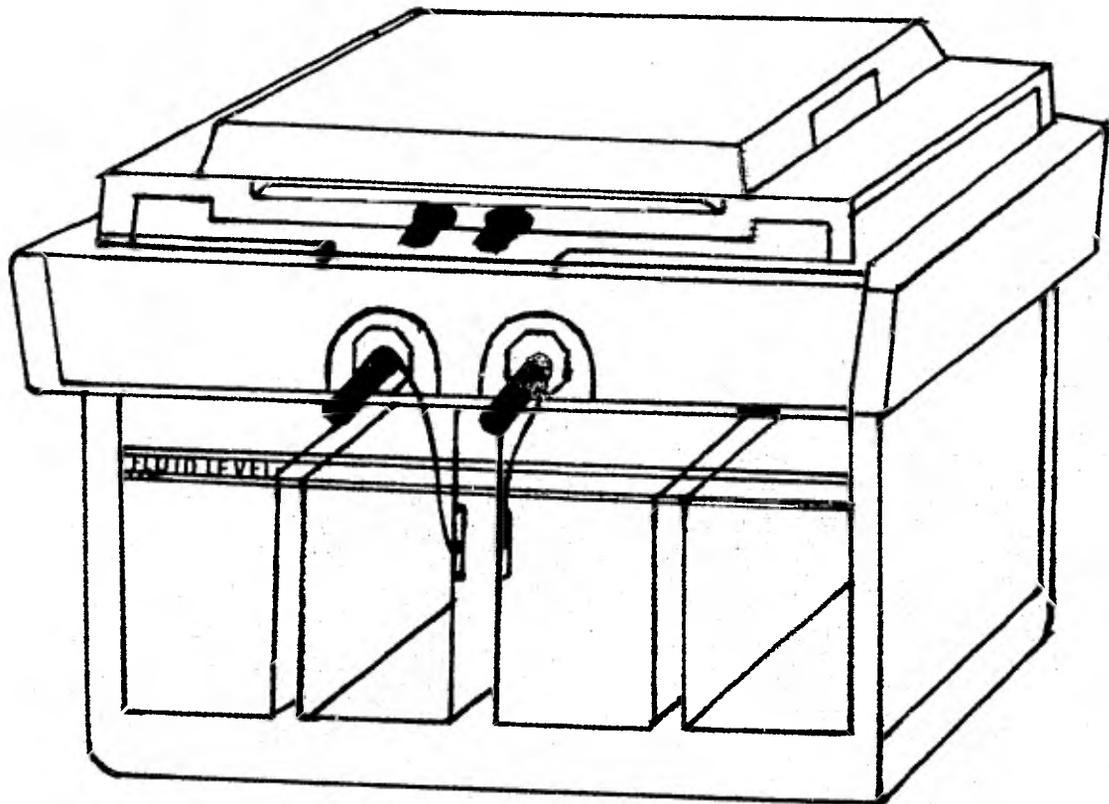


FIGURA 3

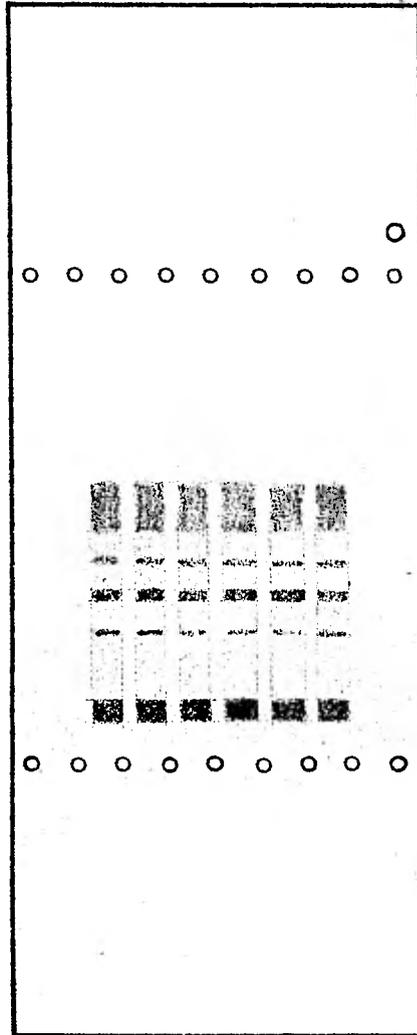


FIGURA 4

MEMBRANA REVELADA CON Ponceau-S, en la que se colocaron 6 muestras diferentes de suero caprino.

Condiciones de operación:

100 volts

1.25 miliampers

150 minutos

pH: 8.8

Zona de aplicación: c

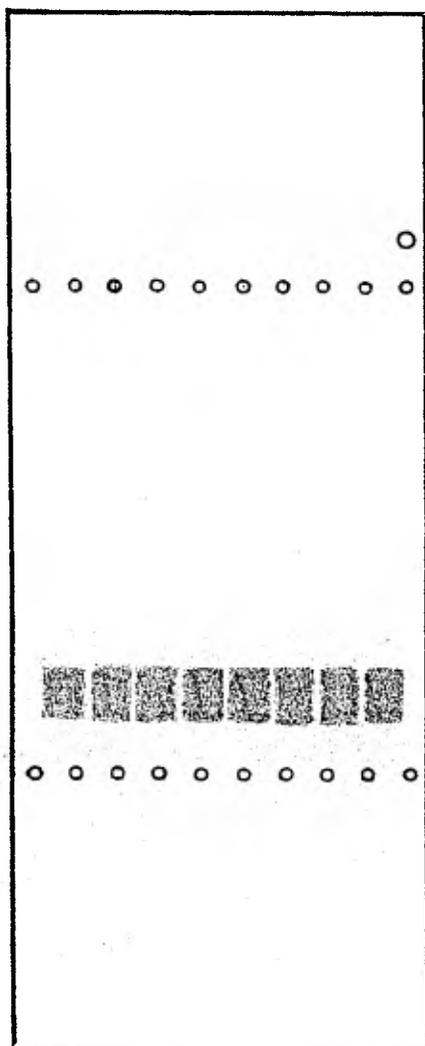


FIGURA 5

MEMBRANA, con 8 muestras diferentes de sero albúmi-
na caprina.

Condiciones de operación:

100 volts.

1.25 miliampers

150 minutos

pH: 8.8

Zona de aplicación: c

4.- CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Para cuantificar proteínas totales de suero caprino y de los extractos de albúmina, se utilizó un método colorimétrico conocido como Microlowry (21.30).

a.- Reactivos.

Solución A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 Normal.

Solución B: CuSO_4 al 1%

Solución C: Tartrato doble de sodio y potasio al --
2%.

Solución D: Mezcla de 50 ml de A
0.5 ml de C
0.5 ml de B

Solución E: Reactivo de Folin Ciocalteu 1 Normal.

b.- Curva Estandar de Albúmina bovina fracción V.

FIGURA 6

c.- Cuantificación

Dilución de sueros de cabra descongelados 1:100 v/v

Dilución de extractos de albúminas 1:100 v/v

A 200 microlitros de las diluciones por duplicado se les adicionó 1 ml. del reactivo D, agitando y dejando reposar 10 minutos, posteriormnete se añadieron 0.1 ml. del reactivo - de Folin-Ciocalteu, agitando y dejándose en reposo por 30 minutos.

Dependiendo de la intensidad del tono se realizaron lecturas al espectrofotometro a 500 nm y 750 nm (tono bajo de color y tono alto de color, respectivamente).

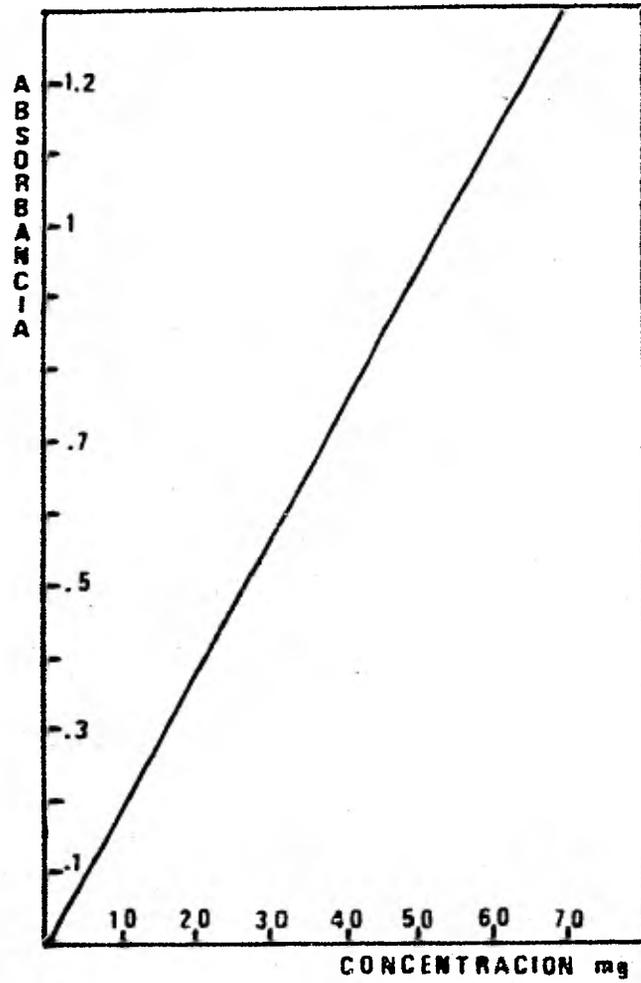


FIGURA 6
CURVA ESTANDAR
DE ALBUMINA

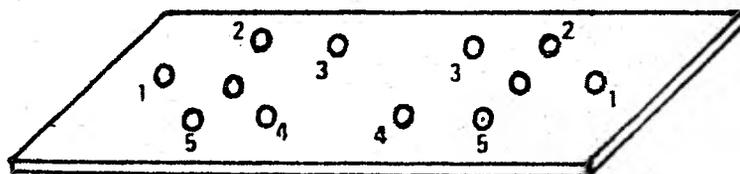
5.- IDENTIFICACION DE ALBUMINA

a.- Inmunoprecipitación.

Tubos capilares, se llenaron hasta la mitad de albúmina bovina fracción V y de muestras de extracto de albúmina caprina; se adicionó antialbúmina, sellándose y dejándolos en posición vertical 15 minutos, observando la banda de precipitación.

b.- Inmunodifusión (59).

En agar noble sobre portaobjeto se hicieron orificios, de acuerdo al siguiente esquema:



colocándose:

Albúmina bovina fracción V (posición 1)

Albúmina extraída (posición 2)

Bufer de boratos pH 8.6 (posición 3)

Suero de cabra (posición 4)

Antialbúmina (posición 5)

Antialbúmina (orificio central)

Se dejó en ambiente húmedo 48 horas, en refrigeración.

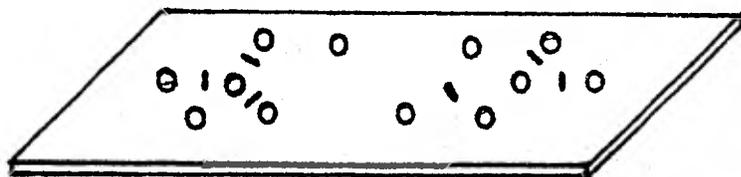
Observándose una banda de precipitación entre:

Albúmina extraída y antialbúmina

Albúmina y suero de cabra

Antialbúmina y albúmina bovina fracción V.

Según esquema:



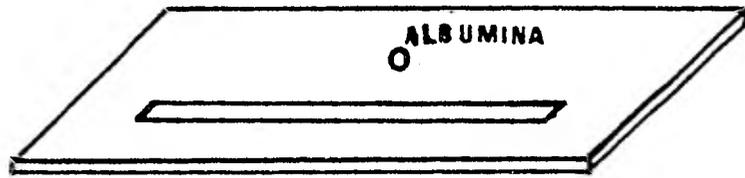
c.- Inmunoelectroforesis (28.42).

Se realiza sobre un agar noble (L 1.5%), en bufer de boratos a pH 8.6; en un voltaje de 150 volts; 11 miliampers y durante 90 minutos, la inmunoelectroforesis albúmina extraída (en unos casos) y antialbúmina en otros casos.

En la ranura se adicionó antialbúmina para las laminillas en las que se corrió albumina extraída. Albumina extraída en aquellas en las que se hizo migrar el antisuero.

Se dejaron 48 horas en ambiente húmedo y refrigeración observando después de éste, una sola banda de precipitación en todos los casos. La inmunoelectroforesis se efectuó con 10 muestras tomadas al azar de los extractos de albúmina, repitiéndose 5 veces para cada uno.

Figura No. 6.- Inmunoelectroforesis.



ELECTROFORESIS
+
Ac centre ALB.



6.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GALACTOSA-1-
FOSFATO-URIDIL TRANSFERASA. (54)

REACTIVO DE BEUTLER	SOL. STOCK	VOL. PARA 6 ml. DE MEDIO REACCIONANTE
UDP G	9.5×10^{-3}	0.2 ml
Gal-1-P	2.7×10^{-3}	0.4 ml
NADP	6.6×10^{-3}	0.6 ml
Tris-acetato.		
Bufer pH 8	0.75 M	2.0 ml
Saponina	1%	0.8 ml
EDTA	$4.05 \times 10^{-4} M$	<u>2.0 ml</u>
		6.0 ml

b.- Medición de actividad.

Se recortan 2 discos de 0.5 mm de diámetro de cada una de las muestras de sangre impregnadas en papel filtro.

Se colocan en un tubo de ensaye pequeño con 0.1 ml. de reactivo de Beutler con sustrato (galactosa-1-P).

En otro tubo, se colocan otros 2 discos, ahora con reactivo de Beutler sin sustrato.

De ambos tubos se toma una gota con capilar y se deposita en un disco de papel filtro Watman No. 1 impregnado -- con solución de sulfato de amonio sobresaturado (un disco por

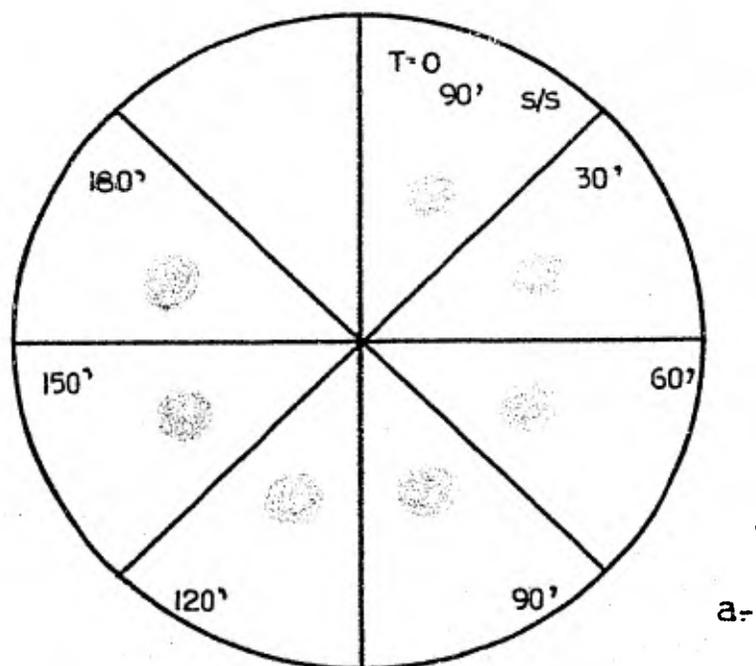
tubo). Rotulándose cada papel filtro: No. de la cabra, C/S, -- S/S, tiempo.

A tiempo cero, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos - se saca una gota y se deposita sobre el papel. Los tubos se mantienen a partir del tiempo cero en incubación en baño de - agua a 37°C.

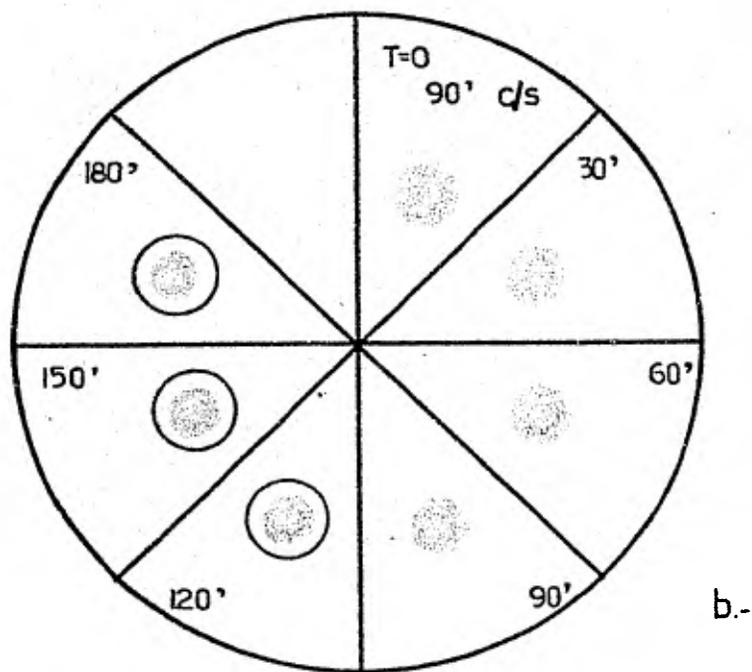
Una vez transcurrida la incubación, se observa bajo luz ultravioleta cada par de discos de papel filtro de cada - cabra, el S/S (sin sustrato) se usa como referencia para no-- tar cambios de fluorescencia en el C/S (con sustrato).

Se marcó con un lápiz las zonas de fluorescencia.

Figura No. 7.



a.-



b.-

FIGURA 7

DISCOS DE PAPEL FILTRO IMPREGNADOS DE SULFATO -
 DE AMONIO CON GOTAS DE MUESTRA INCUBADA EN REAC
 TIVO DE BEUTLER.

a.- Sin sustrato

b.- Con sustrato

C A P I T U L O I I I

RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO

REGISTRO CAPRINO Y RESULTADOS

No.	SEXO	EDAD	COLOR PELO.	CUER- NOS	ARETES	OJOS	BARBA	ALTURA	TORAX	PESO	EDO. PROD.	RAZA	PROCEDENCIA	(PROT) SUERO	(ALBUMINA) SUERO	ACTIVIDAD: GALACTOSA-1- P- URIDIL TRANSFE- RASA.	DISTANCIA ALBUMINA (ELECT).
1	FEMENINO	1 AÑO	CAFE	SI	NO	CAFE	NO	60 cm	70 cm	25 K	LACTANTE	CRIOJOLA	EDO.MEX.	81 mg/ml	48.5 mg/ml.	(-)	2.7 mm
2	"	15 MESES	CAFE	"	"	MIEL	"	70 cm	74 cm	28 K	LACTANTE	"	"	75	48.5	(+)	2.7 mm
3	"	2 AÑOS	PINTA	"	"	CAFE	"	70 cm	70 cm	41 K	LACTANTE	"	"	73	46.0	(+)	2.7 mm
4	"	2 AÑOS	PINTA	"	"	"	"	69 cm	69 cm	40 K	LACTANTE	"	"	76.2	46.2	(+)	2.7 mm
5	"	18 MESES	CAFE	"	"	MIEL	"	60 cm	68 cm	32 K	LACTANTE	"	"	76.5	42.0	(+)	2.7 mm
6	"	4 AÑOS	VENADA	NO	NO	AZUL	NO	70 cm	70 cm	42 K	LACTANTE	"	"	81	41.5	(+)	2.7 mm
7	"	3 AÑOS	CAFE	"	"	"	"	65 cm	68 cm	30 K	LACTANTE	"	"	79.5	47.75	(+)	2.7 mm
8	"	35 AÑOS	PINTA	"	"	MIEL	SI	80 cm	82 cm	50 K	LACTANTE	"	"	80	47.0	(-)	2.7 mm
9	"	1.5 AÑO	BEIGE	"	"	CAFE	NO	65 cm	66 cm	40 K	LACTANTE	"	"	81	43.0	(+)	2.7 mm
10	"	1 AÑO	NEGRA	"	"	CAFE	"	65 cm	64 cm	38 K	LACTANTE	"	"	81	44.0	(+)	2.7 mm
11	"	2 AÑOS	PINTA	"	"	"	"	70 cm	78 cm	52 K	PREÑADA	"	"	75	45.0	(-)	2.7 mm
12	"	3 AÑOS	CAFE	"	SI	AZUL	"	68 cm	80 cm	48 K	PREÑADA	"	"	81	46.0	(+)	2.7 mm
13	"	1 AÑO	PINTA	SI	SI	"	"	68 cm	80 cm	55 K	LACTANTE	"	"	79.2	47.75	(+)	2.7 mm
14	"	3 AÑOS	BEIGE	"	"	CAFE	"	70 cm	97 cm	57 K	PREÑADA	"	"	80	45.0	(-)	2.7 mm
15	"	3 AÑOS	"	"	"	"	"	71 cm	98 cm	55 K	PREÑADA	"	"	91	47.0	(+)	2.7 mm
16	"	3 AÑOS	"	"	"	"	"	70 cm	95 cm	56 K	PREÑADA	"	"	77	47.0	(+)	2.7 mm
17	MACHO	8 MESES	PINTA	"	NO	AZUL	"	60 cm	72 cm	27 K	ENTERO	"	"	75	47.75	(-)	2.7 mm
18	"	8 MESES	"	"	"	CAFE	"	60 cm	70 cm	28 K	ENTERO	"	"	81	48.5	(+)	2.7 mm
19	HEMBRA	4 AÑOS	CANELA	NO	"	MIEL	"	77 cm	96 cm	62 K	LACTANTE	"	"	70	41.5	(+)	2.7 mm
20	"	4 AÑOS	CAFE	"	"	CAFE	"	76 cm	95 cm	61 K	LACTANTE	"	"	75	43.5	(+)	2.7 mm
21	"	8 MESES	PINTA	SI	SI	"	"	60 cm	60 cm	26 K	-	"	"	86.2	42.0	(-)	2.7 mm
22	"	3 AÑOS	NEGRO	SI	NO	MIEL	"	78 cm	89 cm	28 K	LACTANTE	"	"	83.0	41.5	(-)	2.7 mm
23	"	1 AÑO	PINTA	NO	"	"	"	60 cm	60 cm	27 K	LACTANTE	"	"	80.0	44.7	(-)	2.7 mm
24	"	2 AÑOS	"	SI	"	CAFE	"	70 cm	72 cm	30 K	LACTANTE	"	"	80.0	47.0	(+)	2.7 mm
25	"	2 AÑOS	"	"	"	"	"	71 cm	75 cm	33 K	LACTANTE	"	"	75.0	43.0	(+)	2.7 mm
26	"	8 MESES	"	"	"	"	"	50 cm	48 cm	25 K	-	"	"	83.5	45.0	(+)	2.7 mm
27	MACHO	8 MESES	PINJO	"	SI	AZUL	SI	65 cm	60 cm	25 K	ENTERO	"	"	81.0	43.5	(+)	2.7 mm
28	"	8 MESES	"	"	"	"	"	63 cm	61 cm	27 K	ENTERO	"	"	82.0	42.0	(+)	2.7 mm
29	"	8 MESES	NEGRO	NO	NO	CAFE	NO	55 cm	53 cm	23 K	ENTERO	"	"	75.0	40.25	(+)	2.7 mm
30	"	8 MESES	N/C	"	"	"	"	57 cm	54 cm	25 K	ENTERO	"	"	82.0	41.5	(+)	2.7 mm
31	"	2 AÑOS	BEIGE	SI	"	MIEL	"	80 cm	80 cm	56 K	CASTRADO	"	"	79.0	50.0	(+)	2.7 mm
32	"	2 AÑOS	PINTO	"	"	"	"	75 cm	79 cm	56 K	CASTRADO	"	"	80.0	46.5	(+)	2.7 mm
33	HEMBRA	3 MESES	PINTA	"	"	CAFE	"	50 cm	45 cm	25 K	-	"	"	75.0	45.5	(+)	2.7 mm
34	"	4 MESES	"	NO	"	"	"	52 cm	43 cm	15 K	-	"	"	64.5	42.0	(+)	2.7 mm

REGISTRO CAPRINO Y RESULTADOS

No.	SEXO	EDAD	COLOR PELO	CUER-NOS	ARETES	OJOS	BARBA	ALTURA	TORAX	PESO	EDO.PROD.	RAZA	PROCEDENCIA	(PROT) SUERO	(ALBUMINA) SUERO	ACTIVIDAD: GALACTOSA-1- P- URIDIL TRANSFE-RASA	DISTANCIA ALBUMINA (ELECT).
35	HEMBRA	2 AÑOS	CAFE	SI	NO	CAFE	NO	70 cm	68 cm	42 K	LACTANTE	CRIOLLA	EDO.MEX.	70.0 mg/ml	43.0 mg/ml	(-)	2.7 mm
36	"	2 AÑOS	"	NO	"	MIEL	"	68 cm	69 cm	43 K	LACTANTE	"	"	83.0	41.5	(+)	2.7 mm
37	"	2 AÑOS	NEGRA	SI	"	CAFE	"	59 cm	60 cm	39 K	LACTANTE	"	"	71.0	44.7	(+)	2.7 mm
38	"	3 AÑOS	CAFE	NO	"	MIEL	"	74 cm	80 cm	54 K	SECA	"	"	70.5	47.75	(+)	2.7 mm
39	"	1.5 AÑOS	"	SI	"	AZUL	"	58 cm	60 cm	37 K	LACTANTE	"	"	70.0	48.5	(-)	2.7 mm
40	"	2 AÑOS	"	"	"	"	"	68 cm	70 cm	42 K	LACTANTE	"	"	70.0	40.5	(+)	2.7 mm
41	"	1.5 AÑOS	PINTA	"	"	CAFE	"	66 cm	80 cm	36 K	LACTANTE	"	"	75.0	41.5	(+)	2.7 mm
42	"	2 AÑOS	ROSILLA	NO	NO	MIEL	"	67 cm	88 cm	40 K	LACTANTE	"	"	74.5	42.0	(-)	2.7 mm
43	"	2 AÑOS	PINTA	SI	"	"	SI	77 cm	69 cm	30 K	SECA	"	"	74.0	45.0	(+)	2.7 mm
44	"	3 AÑOS	BLANCA	NO	"	"	"	80 cm	85 cm	55 K	LACTANTE	"	"	81.0	43.5	(+)	2.7 mm
45	"	6 MESES	CAFE	"	"	"	NO	62 cm	62 cm	20 K	-	"	"	75.0	44.0	(+)	2.7 mm
46	"	10 MESES	PINTA	"	"	"	"	75 cm	85 cm	40 K	LACTANTE	"	"	77.0	44.7	(+)	2.7 mm
47	"	10 MESES	CAFE	"	"	"	"	74 cm	82 cm	38 K	PREÑADA	"	"	81.0	45.0	(-)	2.7 mm
48	"	13 MESES	PINTA	"	"	CAFE	"	64 cm	86 cm	36 K	PREÑADA	"	"	74.0	47.0	(-)	2.7 mm
49	"	15 MESES	"	"	"	"	"	71 cm	80 cm	35 K	PREÑADA	"	"	70.0	46.2	(+)	2.7 mm
50	"	2 AÑOS	BLANCA	"	"	"	SI	76 cm	86 cm	45 K	LACTANTE	"	"	79.0	44.75	(-)	2.7 mm
51	"	2 AÑOS	"	"	"	"	"	74 cm	85 cm	44 K	LACTANTE	"	"	81.0	49.5	(-)	2.7 mm
52	"	1.5 AÑOS	NEGRA	SI	"	MIEL	"	71 cm	85 cm	38 K	LACTANTE	"	"	81.0	48.5	(+)	2.7 mm
53	"	1 AÑO	PINTA	"	"	"	"	73 cm	78 cm	40 K	PREÑADA	"	"	64.5	49.0	(+)	2.7 mm
54	"	1 AÑO	"	"	"	"	"	74 cm	77 cm	38 K	PREÑADA	"	"	81.0	47.75	(-)	2.7 mm
55	"	8 MESES	N/C	"	SI	"	NO	61 cm	71 cm	40 K	PREÑADA	"	"	74.0	47.75	(+)	2.7 mm
56	"	2 AÑOS	N/B	"	NO	"	SI	73 cm	76 cm	42 K	PREÑADA	"	"	81.0	43	(+)	2.7 mm
57	"	1 AÑO	"	NO	"	"	NO	76 cm	82 cm	43 K	PREÑADA	"	"	81.0	46	(+)	2.7 mm
58	"	1 AÑO	"	"	"	"	"	77 cm	83 cm	48 K	PREÑADA	"	"	92.0	43	(+)	2.7 mm
59	"	1 AÑO	C/B	"	"	"	SI	71 cm	76 cm	38 K	PREÑADA	"	"	81.0	49	(+)	2.7 mm
60	"	1.5 AÑOS	CAFE	"	"	"	"	71 cm	81 cm	42 K	LACTANTE	"	"	91.0	50.5	(+)	2.7 mm
61	MACHO	3 AÑOS	BLANCO	SI	"	"	"	86 cm	100 cm	70 K	SEMENTAL	"	"	77.0	47.5	(+)	2.7 mm
62	"	3 AÑOS	"	"	"	"	"	86 cm	100 cm	60 K	ENTERO	"	"	72.0	46.2	(+)	2.7 mm
63	"	2 AÑOS	"	"	"	"	"	78 cm	93 cm	60 K	ENTERO	"	"	73.0	47.75	(+)	2.7 mm
64	"	2 AÑOS	"	"	"	"	"	77 cm	94 cm	63 K	ENTERO	"	"	75.0	47.0	(+)	2.7 mm
65	HEMBRA	2 AÑOS	C/B	"	"	"	"	86 cm	95 cm	50 K	LACTANTE	"	"	90.0	47.75	(+)	2.7 mm
66	"	2 AÑOS	CAFE	NO	"	"	NO	72 cm	78 cm	41 K	LACTANTE	"	"	97.0	50.0	(+)	2.7 mm
67	"	2 AÑOS	NEGRA	SI	"	"	SI	71 cm	77 cm	39 K	LACTANTE	"	"	75.0	49.0	(+)	2.7 mm
68	MACHO	1 AÑO	BLANCO	NO	SI	"	"	80 cm	90 cm	60 K	CASTRADO	"	"	86.0	47.0	(+)	2.7 mm

ANALISIS ESTADISTICO.

FORMULAS UTILIZADAS.

1.- Media muestral.

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^k \frac{fx}{n}$$

2.- Varianza.

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2 f_i$$

3.- Desviación estandar de la muestra.

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2 f_i}$$

4.- Coeficiente de variacion.

$$CV = \frac{S}{\bar{X}}$$

De donde:

n - 100 (No. de muestras)

x_i - Punto medio (marca de clase) de la clase i

f_i - No. de observaciones de la clase i

k - No. de clases.

Proteínas totales y Albúmina

HISTOGRAMAS DE FRECUENCIA.

- Número de intervalos: $N = 7$

- Marca de clase para cada intervalo: $x = \frac{L_1 - L_2}{2}$

L_1 - Límite inferior

L_2 - Límite superior

- Rango: $R = \text{Máximo} - \text{Mínimo}$.

- Amplitud del intervalo : $A = \frac{R}{N}$

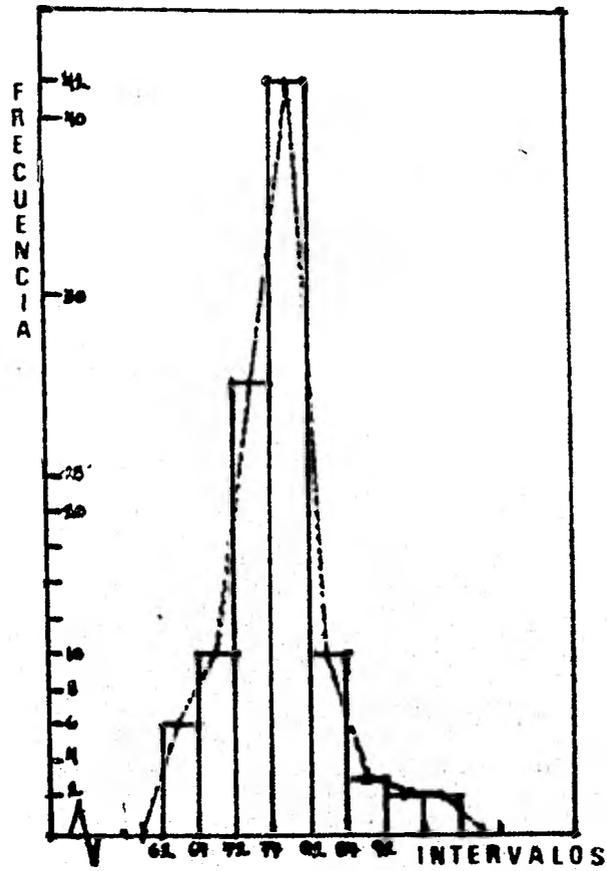
1.- PROTEINAS TOTALES

$$N = 7$$

$$R = 97.0 - 62 = 35.0$$

$$A = \frac{35}{7} = 5$$

Intervalos	Frecuencia	
62 - 67	6	
67 - 72	10	
72 - 77	25	$\bar{X} = 77.64$
77 - 82	42	$S = 6.41$
82 - 87	10	$S^2 = 41.18$
87 - 92	3	$C.V = 0.082$
92 - 97	2	
97 - 102	<u>2</u>	
	100	

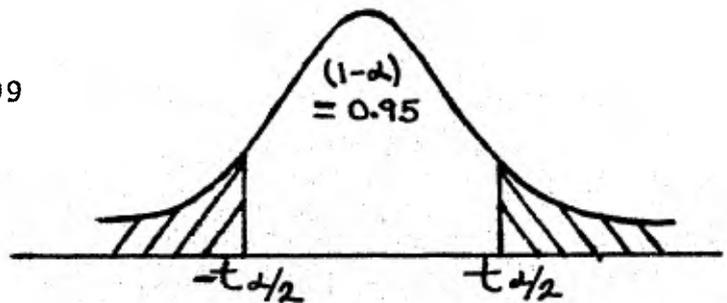


HISTOGRAMA
[PROTEINAS]

En la tesis se determinó la concentración total de proteínas se tiene la media igual a : 77.646, con una desviación estandar de 6.41. Esta variable se distribuye normal---mente.

Mediante un intervalo de confianza de 95%. ¿Cuál es el valor de la concentración promedio de proteínas: partiendo de las 100 cabras con las que se realizó el experimento?.

$$\begin{aligned}
 n &= 100 \\
 \text{g.l.} &= 100 - 1 = 99 \\
 \bar{X} &= 77.64 \\
 S &= 6.41 \\
 (1-\alpha) &= 0.95
 \end{aligned}$$



$$(1 - \alpha) \% = 0.95 \Rightarrow t_{\alpha/2} = 2$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\alpha/2 = 0.025$$

$$\begin{array}{c}
 0.025 \\
 | \\
 t = 2.27 \\
 n-1=99
 \end{array}$$

$$M = \bar{X} \pm (t/2, n-1) (S_{\bar{X}})$$

$$S_{\bar{X}} = \frac{S_x}{\sqrt{n}} = 0.64$$

$$\mu = 77.64 \pm (2.27) (0.64)$$

$$\mu = 77.64 \pm 1.46$$

INTERVALO } (76.18 mg/ml , 79.10 mg/ml)

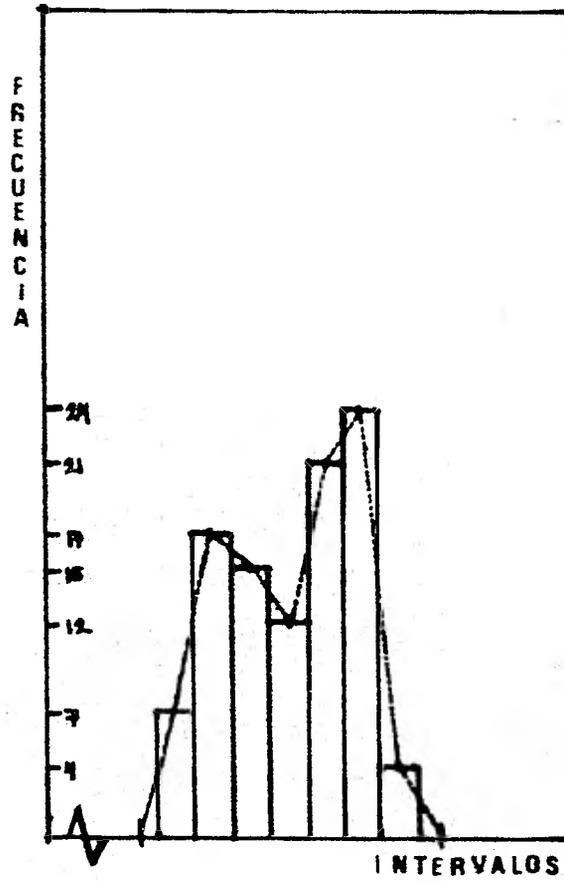
2.- ALBUMINA

$$N = 7$$

$$R = 50.5 - 39.6 = 10.9$$

$$A = \frac{10.9}{7} = 1.557 - 1.6$$

Intervalos	Frecuencia	
39.6 - 41.2	7	
41.2 - 42.8	17	
42.8 - 44.4	15	$\bar{X} = 44.23$
44.4 - 46.0	12	$S = 6.40$
46.0 - 47.6	21	$S^2 = 41.04$
47.6 - 49.2	24	$C.V = 0.144$
49.2 - 50.8	<u>4</u>	
	100	

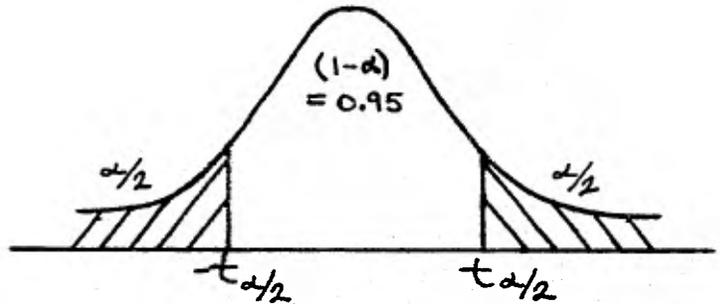


HISTOGRAMA
[ALBUMINA]

ALBUMINA.

Con una media de 44.23 y con desviación estandar - -
 igual a 6.40. Se desea establecer mediante un intervalo de - -
 confianza de 95%, cuál es el valor de la concentración de al-
 búmina promedio.

$$\begin{aligned} n &= 100 \\ \text{g.l.} &= 100 - 1 = 99 \\ \bar{X} &= 44.23 \\ S &= 6.40 \\ (1 - \alpha) &= 95\% \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} (1 - \alpha)\% &= 0.95 \Rightarrow t_{\alpha/2} = 2 \\ \alpha &= 0.05 \\ \alpha/2 &= 0.025 \end{aligned}$$

$$\begin{array}{c} 0.025 \\ | \\ t = 2.276 \\ | \\ n-1=99 \end{array}$$

$$\bar{X} \pm (t_{\alpha/2}, n-1) (S_{\bar{X}})$$

$$S_{\bar{X}} = \frac{S_x}{\sqrt{n}} = 0.64$$

$$\mu = 44.23 \pm (2.27) (0.64)$$

$$\mu = 44.23 \pm 1.45$$

$$\text{INTERVALO. } \mu \left\{ \begin{array}{l} (42.77 \text{ mg/ml} , 45.68 \text{ mg/ml}) \\ \text{de suero} \quad \quad \quad \text{de suero} \end{array} \right.$$

ACTIVIDAD DE GALACTOSA - 1 - FOSFATO-URIDIL-TRANSFERASA.

Utilizando la prueba de χ^2 , se pretende comparar el conjunto de una distribución de frecuencias experimentales -- con una distribución teórica, consecuencia de una ley conocida previamente.

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{frecuencia observada} - \text{frecuencia esperada})^2}{\text{frecuencia esperada}}$$

Hipotesis;

La actividad de la enzima galactosa-1-fosfato-uridil-transferasa esta dada por la expresión de un gen dominante -- presente en el locus de esa enzima.

La ausencia de actividad, es consecuencia de la expresión de su alelo recesivo.

Los genotipos para actividad serán el homocigoto dominante y el heterocigoto. Así como la ausencia tendrá por -- genotipo al homocigoto para el alelo recesivo.

La razón en proporciones que se espera es 3:1 (3 -- dominantes, 1 recesivo); aplicando herencia Mendeliana.

Comprobar que la herencia del gen, está determinada por un par de alelos (dominante y recesivo).

Ho : 3:1 se cumple

Hi : 3:1 no se cumple

- Número de muestras que resultaron activas en un intervalo de tiempo comprendido entre 0 - 180 minutos : 78

- Número de muestras que en el intervalo de tiempo 0 - 180 minutos no fueron activas: 22

N = 100

Frecuencia observada	Frecuencia esperada	
78	75	ACTIVIDAD
<u>22</u>	<u>25</u>	NO ACTIVIDAD
100	100	

$$\chi^2 = \frac{(78 - 75)^2}{75} + \frac{(22 - 25)^2}{25} = 0.48$$

Valor de χ^2 de tablas:

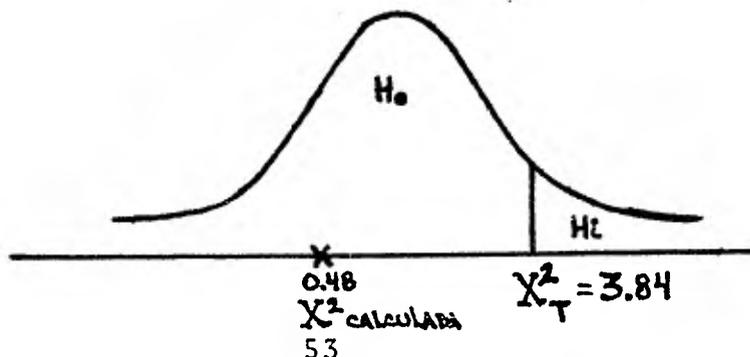
$$n - 1 = 1$$

Grados de libertad

$$2 - 1 = 1$$

$$\alpha = 5\% ; 0.05$$

$$\chi^2_T = 3.84$$



Ho se acepta: Se trata de un par de alelos -
(dominante y recesivo) los - -
responsables de esta herencia.

C A P I T U L O I V .

D I S C U S I O N

Esta sección del trabajo, va a estar dividida en tres partes. La primera en la que se discutirá sobre Albúmina, la segunda tratará de Galactosa-1-Fosfato-uridil-transferasa y la tercera en la que se agrupará todo.

I.- ALBUMINA.

Mediante la electroforesis horizontal en acetato de celulosa, se logró identificar un solo tipo de proteína en la zona equivalente a las albúminas.

Al comparar las cintas o membranas, en las cuales se hizo migrar suero, con las que se corrió electroforéticamente la albúmina extraída por el método de Reinhold-Kingsley (50), se observa que la superficie de las zonas en que se ubican las albúminas es diferente. En esto intervino el solvente que se utiliza en el método con la finalidad de extraer las globulinas que se precipitan con la solución salina. Este solvente - el éter etílico, no se evaporó suficientemente de la muestra ocasionando difusión de ella en cuanto se aplica sobre el medio de soporte.

Aún esto, las diferentes muestras de albúmina extraída mediante el proceso poseen un desplazamiento idéntico.

La utilización de albúmina bovina fracción V como un estándar es una de las consideraciones que permitió ubicar y reconocer la zona en la cuál se encuentra después del proceso electroforético, las albúminas.

Todas las determinaciones, se compararon inicialmente con la albúmina bovina fracción V y con Gama Globulina humana comercial, de tal manera que de las muestras de suero pudimos identificar primeramente la albúmina y las Gama Globulinas; y así reconocer que la fracción proteica extraída era albúmina.

De la bibliografía citada (42, 63) en la introducción sabemos que mediante el proceso electroforético y en las condiciones de operación se logran separar 5 fracciones proteicas equivalentes a:

- Albúmina.
- Alfa₁ Globulina.
- Alfa₂ Globulina.
- Beta Globulina.
- Gama Globulina.

De las muestras de suero, se identificaron estas, haciendo incapie en la zona de albúmina, por ser la proteína que se estudió básicamente en el trabajo.

La identificación de esta zona se hizo y corroboró -- además mediante inmunodifusión, inmunoprecipitación e inmunoelectroforesis; con los sueros así como con las albúminas de ellos.

Dichas metodologías dieron la pauta para tener la -- certeza de que la proteína extraída por el método Reinhold- -

Kingsley era albúmina y además por la electroforesis en acetato de celulosa se pudo considerar que el extracto es bastante-puro; ya que solo se aprecia una banda definida.

Siguiendo el método de micro Lowry se cuantificaron-proteínas totales en las 100 muestras de suero y también se -cuantificó albúmina extraída por el método ya citado de cada-una de las 100 muestras. Del análisis estadístico; se tiene -una concentración de proteínas totales en suero de origen ca-prino comprendida en el rango:

(76.18 , 79.10)

mg/ml de suero.

Dato correspondiente a la población de cabras mues-treadas.

Por otra parte la cuantificación de albúmina de es--tas muestras dió un promedio comprendido en el rango:

(42.77 , 45.68)

mg/ml de suero

De la bibliografía sabemos que la albúmina es la pro-teína más abundante de suero. En esta especie y mediante los-datos encontrados experimentalmente, el porcentaje de ella --en suero es:

$\bar{X} = 77.64$ mg / ml, de proteínas totales en suero.

$\bar{X} = 44.23$ mg / ml, de albúmina en suero.

77.64 mg / ml _____ 100 %

44.23 mg / ml _____ z

Z= 56.96 %

Con este porcentaje, se corroborará que la albúmina en esta especie es la proteína más abundante en suero, este porcentaje se realizó considerando que la población muestreada es homogénea; es decir, tiene la misma alimentación, el mismo medio ambiente, el mismo estado nutricional, así como en condiciones de salud.

De la comparación de las membranas de acetato de celulosa con las 100 muestras de suero se observa que la distancia de desplazamiento de la albúmina en relación con la zona de aplicación de la muestra es de 2.7 cm y que esa banda posee un grosor de 3 mm.

Las membranas con las albúminas extraídas de las 100 muestras de suero; poseen una distancia de desplazamiento de 2.7 milímetros y el grosor de ellas es de 0.55 mm (debidos al éter).

De esta forma la seroalbúmina caprina es una proteína monomórfica; es decir que solo presenta una forma de acuerdo a nuestro método trabajado.

En vista de que es monomórfica, se propone que existe solamente un alelo o gen responsable de esta herencia y -- que como los resultados no varían relacionados con el sexo,

es autosómico.

Simbolizaremos este alelo como Alb^C . El genotipo de las cabras será $Alb^C Alb^C$; cuya expresión fenotípica será la albúmina cuyo desplazamiento electroforético es 2.7 mm.

II.- Galactosa-1-fosfato-uridil-transferasa.

Para la determinación de actividad de esta enzima, se consideran factores tales como: cantidad de sangre impregnada en los discos de papel filtro, temperatura, volumen y concentración de sustrato, tipo de luz bajo la cual se realizaron las lecturas, en condiciones homogéneas, es decir, se tiene la certeza de que para todas las muestras las condiciones fueron las mismas.

Del trabajo experimental, se tuvo como resultados animales que no mostraron actividad enzimática. Dentro de la población que manifestó actividad en el período de tiempo comprendido entre 0 y 180 minutos de incubación a 37 °C.

El análisis estadístico ha sido realizado considerando el número de muestras activas y el número de muestras no activas.

Con estos datos y mediante la prueba de X^2 , es posible proponer que la herencia o bien la expresión de esos fenotipos (considerando factores ambientales, nutricionales, etc. constantes), es debida a un par de alelos autosómicos, simbolizados por:

O^{GAL} y O^{gal}

y que expresando los genotipos, tenemos:

$O^{GAL} O^{GAL}$

$O^{GAL} O^{gal}$

$O^{gal} O^{gal}$

De los cuales los dos primeros (el homocigoto al alelo O^{GAL} y el heterocigoto) se expresarán fenotípicamente con actividad enzimática.

El tercer genotipo, el homocigoto al alelo O^{gal} , es el que al expresarse, no manifiesta actividad.

De la prueba de X^2 , es posible establecer la existencia de estos alelos, ya que la hipótesis de 3: 1 es aceptada.

III.- GENERALIDADES.

Considerando que las dos proteínas estudiadas han dado margen a proponer los alelos responsables de su herencia y utilizando las teorías evolutivas que establecen la existencia de un tronco común del cuál parte la diversificación de especies que poblamos la Tierra, resulta interesante concluir esta discusión indicando que:

La especie caprina, específicamente la población - - muestreada para este trabajo, es híbrida (es decir surgió - -

mediante el cruzamiento de diversas razas) cuestión que permite intercambiar genes así como expresarlos en variantes fenotípicas.

La albúmina solo mostró por el método descrito un solo tipo por lo que es de suponer que solamente existe un alelo y que entre la especie caprina, los efectos de selección natural (ya que otro tipo de selección no se practica específicamente con este hato) se han dado en la misma proporción, ya sea que han evolucionado en la misma forma o bien que todas las mutaciones que deben haber surgido han sido constantes para toda la población. Solamente se podría decir si efectivamente es un tipo de sero albúmina la que posee la especie, si se trabajara con diferentes hatos de diversas regiones geográficas, de diversas razas y con animales en los que aspectos nutricionales y fisiológicos fuesen variables. Tomando en consideración por supuesto que todos estos factores son determinantes para la diversificación tanto de especies como de géneros.

En cuanto a la galactosa-1-fosfato-uridil transferasa, encontramos dos variantes (activas y no activas) y ya propuestos los alelos responsables de esta herencia, asociando la presencia de ellos; diremos que la selección natural ha desempeñado un papel muy importante, dando origen a estos alelos que expresan los 2 fenotipos propuestos. La diversificación de actividad de esta enzima está dada indudablemente por

aspectos evolutivos, siendo el medio en el cuál se desarrollan determinante para su aparición y manutención en el habitat.

Trabajos recientes sugieren que durante la evolución de proteínas (moléculas de nuestro interés) algunos aminoácidos se han sustituido; por lo cuál han tenido que ocurrir mutaciones como consecuencia de la selección natural (17).

Finalmente la presencia de polimorfismo proteico es una consecuencia de la evolución, que está dada sobre todos los organismos que poblamos la tierra.

C A P I T U L O V .

C O N C L U S I O N

Se estudió Albúmina, estableciéndose solo una forma electroforética de ella (mediante el método descrito), fijando la presencia en el genoma de solo un alelo responsable de esta herencia. En el estudio de esta proteína se comprobó que en cabras es la más abundante del suero (56.96%); así como que las concentraciones promedio de ella oscilan entre 42.7 y 45.6 mg / ml de suero.

La enzima Galactosa-1-fosfato-uridil-transferasa, que interviene en el ciclo metabólico de síntesis de lactosa, en esta especie, posee 2 variantes de actividad; determinadas por un par de alelos (dominante y recesivo).

MARCADORES MOLECULARES EN CABRAS DEL
ALTIPLANO DE LA CIUDAD DE MEXICO.

R E S U M E N

Revuelta Miranda María Esther.

ASESORES:

D.C. Ricardo Santiago Díaz.

QFI. Gilda Flores Rosales.

Este trabajo ha sido realizado en cabras; existiendo interés por conocer y establecer 2 marcadores moleculares en ellas.

Se han estudiado:

Albúmina, que es la proteína más abundante en plasma, encontrándose en una concentración de 44.23 mg/ml como promedio en suero, determinándola por el método de Micro Lowry en comparación con la concentración total de proteínas en suero resultando ser: 77.64 mg/ml.

Esta proteína se hizo desplazar electroforéticamente sobre acetato de celulosa, identificando solo un tipo de polimorfismo, por lo que se establece un solo alelo responsable de esta herencia.

El otro marcador molecular estudiado es la enzima - Galactosa-1-fosfato-uridil transferasa, detectando las variantes de actividad que presenta sobre su sustrato, resultando - ser 2; por lo que se establece una herencia autosómica dada - por un par de alelos Dominante y Recesivo, que son segregados en las proporciones esperadas según la teoría Mendeliana.

VII.- B I B L I O G R A F I A

- 1.- Anfinsen, C.B. Jr., and Bailey, Keneth. (1959) Advances in protein Chemistry. Academic Press inc. Publishers. New York. Vol. XIV.
- 2.- Anson, M.L., Edsall, T. John. (1948). Advances in protein Chemistry. Academic Press inc. - - - Publishers. New York. Vol. IV.
- 3.- Ashton, G.C. (1958). Serum protein variations - in horses. Nature. 182: 1029-1030.
- 4.- Ayala, J. Francisco. (1978). Mecanismos de la - evolución. Scientific American (Edición en es- pañol). (26): 18-33.
- 5.- Baker, Erica., Snaw, D.C., and Morgan, E.H. --- (1968). Isolation and Characterization of - - - rabbit serum and milk transferrins. Biochemis--

try. 7.(4): 1371-1378.

- 6.- Bard, Plilip. (1966). Fisiología médica. Prensa médica mexicana. Primera edición. México.
- 7.- Bohinski, Robert C. (1974). Modern concepts in Biochemistry. Allyn and Bacon Inc. Boston.
- 8.- Belanger, Jerry. (1980). Cría moderna de cabras lecheras. C.E.C.S.A., Primera edición, México.
- 9.- Beutler, Ernest., Baluda, Marellen C. y Col. -- (1965). A new genetics abnormality resulting in Galactose-1-Phosphate uridyltransferase deficiency. The Lancet. February 13: 353-354.
- 10.- Bo. Gahne. (1966). Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, prealbumins, and plasma esterases of horses Genetics. 53 : 681-694.
- 11.- Braend, M. (1967). Variations of horse prealbumins in a acidis Starch gels. Acta vet. scand. - 8 : 193-194.
- 12.- Braend, M. (1970). Genetics of horse acidic --- prealbumins. Genetics. 68 : 495-503.
- 13.- Braend, M. and Stormont, C. (1964). Studies on hemoglobins and transferrin types of horses. --

Nord. vet. med. 16 : 31-37.

- 14.- Braverman, J.B.S. (1980). Introducción a la bioquímica de alimentos. Omega, S.A., Tercera edición. Barcelona.
- 15.- Brown, A.H.D. (1980). Genetics basis of alcohol dehydrogenase polymorphism in *Hordeum spontaneum*. The Journal of Heredity. 71.(2) : 127.
- 16.- Claramma, K. Mathai., Beutler, Ernest. (1966). Electrophoretic variation of galactose-1-phosphate uridyl transferase. Science. 154 : 1179-1180.
- 17.- Clarke, Bryan. (1970). Biological sciences: selective constraints on amino-acid substitutions during the evolution of proteins. Nature. 228 : 159-160.
- 18.- Colowick, Sidney P. (Separation of proteins by use of absorbents. Methods in enzymology. Academic Press Inc. Vol. I. London.
- 19.- Davidson, Israel., John, Bernard Henry. (1978). Todd-Sandford. Diagnóstico clínico por el laboratorio. Salvat Editores, S.A., Sexta edición. Barcelona, España.

- 20.- Dikens, F., Randle, P.J., Whelan, W.J. (1968). Carbohydrate metabolism and its disorders. Academic Press. Vol. I. London., N.Y.
- 21.- Ennis, Layne. Espectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in enzymology. Academic Press Inc. Vol. III. - London.
- 22.- Gomori, G. (1957). Preparation of buffers for use in Enzyme Studies. Methods in Enzymology. - Academic Press. Inc. Vol. I. London.
- 23.- Hayslett, Jr. M.S. (1980). Estadística simplificada. Compañía general de Ediciones, S.A. Séptima edición. México.
- 24.- Harris, H.C. Genetics of man. Enzyme polymorphism in man. Department of Biochemistry and M.R.C. Human Biochemical Genetics Research Unit, King's College. Strand. London.
- 25.- Hauptli, H. and Jan., S.K. (1980). Genetic polymorphism and yield components in a population of amaranth. Journal of heredity. 71(4):290-292.
- 26.- Hedgecock, K. Nelson., Shlessor, R.A. and Tracey, M.L. (1975). Biochemical genetics of lobsters (Homarus). II. Inheritance of allozymes in H. -

- Americanus. The Journal of Heredity. 66 : 114-118.
- 27.- Hill, R.L., Barker, R., Olsen, K.W., et. al. -- (1972). Lactose synthetase: structure and function. Metabolic Interconversion of Enzymes. --- Berlin-New York.
- 28.- Grabar, Pierre. (1958). The use of immunochemical methods in studies on proteins. Advances in protein Chemistry. Academic Press Inc. Vol. --- XIII. New York, N.Y.
- 29.- Gurd, F.R.N. (1960). Association of lipides --- with proteins in lipide chemistry. Academic --- Press-New York.
- 30.- Gutman, Alexander B. (1944). The plasma Pro----teins in Disease. Advances in protein Chemistry. Academic Press. Vol. I. New York, N.Y.
- 31.- Jones, J.S. and Probert, R.F. (1980). Habitat - selection maintains a deleterious allele in a - heterogeneous environment. Nature. 287 : 632- - 633.
- 32.- Kalinov, Adolfo y Colaboradores. (1975). El laboratorio y su interpretación semiológica. López librerías editores. Buenos Aires. Argentina.

- 33.- Lehninger, Albert L. (1978). Biochemistry. Omega. Segunda Edición. Barcelona, España.
- 34.- Mahler, Henry R. (1971). Química Biológica. Omega. Barcelona, España.
- 35.- Mayr, Ernst. (1978). La evolución. Scientific - American (edición en español). (26) : 6-16.
- 36.- Milcox, F.H. (1975). Genetics variation in plasma prealbumin of the house mouse. The Journal of Heredity. 66(1) : 19-22.
- 37.- Milner, Max., Scrimshaw, Navin S., Wang, Daniel I.C. (1978). Protein Resources and Technology. AVI-Publishing Company Inc. Westport Connecticut. USA.
- 38.- Mitton, Jeffry and Koehn, Richard K. (1974). Genetics organization and adaptative response of allozymes to ecological variables in fundulus heteroclitus.
- 39.- Montgomery, Rex., Dryer, Robert L., Conway, -- Thomas W., Speclar a Arthur. (1974). Biochemistry. The C V Mosby Company. Saint Louis USA.
- 40.- Morgan, E.H. (1964). Passage of transferrin, albumin and gamma globulin from maternal plasma to foetus in the rat and rabbit. J. Physiol. --

171 : 26-41.

- 41.- Nagase, Sumi and Shimamune, Kane. (1979). Albumin-Deficient rat mutant. Science. 205 : 590---591.
- 42.- Nerenberg S.T. (1968). Electroforesis (Manual - práctico de laboratorio). Ed. Jims. Barcelona, - España.
- 43.- Nguyen, T.C. Boulange, Anne et Raynaud, - - - - Colette. Les groupes sanguins ey le polymor----phisms des proteines du sang en espece caprine. C.N.R.Z.-I.N.R.- Laboratoire de Génétique Bio--chimique 78350 JOUY-EN-JOSAS.
- 44.- Oparin, Alexander. (1979). El origen de la vida. Ed. Epoca, S.A.
- 45.- Plasma Albumin. Bibliography. (1973). Research Division Miles Laboratoires, Inc. USA. Segunda edición.
- 46.- Pijoan, Aguade, Carlos. (1969). Polimorfismo genético de Albúmina, Transferrinas, fosfatasa alcalina y hemoglobina del ganado de lidia mexicana. Tesis. México, D. F.
- 47.- Potter, N. Norman. (1978). Food Science. AVI Publishing Company Ing. Third edition. Westport -

Connecticut. USA.

- 48.- Putnam, F.W., Foster, J.T. (1960). Plasma albumin in the plasma protein. Academic Press. Vol. I. New York.
- 49.- Quittet, E. (1978). La cabra. Ediciones mundi - prensa. Madrid, España.
- 50.- Reinhold, J.G. (1953). Total protein, albumin, and globulin. En. Standar Methods of clinical chemistry. D. Seligson, dir. Academic Press, -- Inc. Vol. I. New York. pp 88.
- 51.- Roaro, Trujillo, Gilda. (1970). Polimorfismo genético de albúminas en bovinos de las razas Gyr, Indobrasil y Braham en México. Tesis. México, - D.F.
- 52.- Selander, Robert K. and Suh, Y. Yang. (1969). - Protein polymorphism and genic heterozygosity - in a wild population of the house mouse, (MUS- MUSCULUS).
- 53.- Sidney, P. Colowick. (1957). Separation of proteins by use of adsorbents. Methods in Enzymology. Academic Press Inc. Vol. I. Pag : 91-113. - London.

- 54.- Scherz, R. Pflugshaupt and Beutler, B. (1972).
Improved method of Mass-screening for galactosemia. Clinica Chimica acta. 39 : 109-114.
- 55.- Stormont, Clyde and Suzuki, Yoshiko. (1964). --
Genetics Systems of blood groups in horses. --
Genetics. 50 : 915-929.
- 56.- Thompson, J.S. and Thompson, M.W. (1977). Salvat Editores, S.A. Segunda Edición. Barcelona, España.
- 57.- Tietz, Norbert. (1972). Química clínica moderna. Interamericana. Primera edición. México.
- 58.- Tomoko, Otha. (1974). Mutational pressure as --
the main cause of molecular evolution and polymorphism. Nature. 252 : 351-353.
- 59.- Treffers, Henry P. (1944). Some contributions --
of immunology to the study of proteins. Advances in Protein Chemistry. Academic Press. Vol. I. pag : 69-115. New York, N.Y.
- 60.- Trommershausen-Smith and Suzuki, Yoshiko. (1978).
A new allele in the prealbumin system of horse --
serum markers. Anim. Blood. Grps. biochem. Genet. 9 : 97-104.

- 61.- Valenta, M. and Strail, A. (1978). Polymor-----
phisms of transferrin and conalbumin in the do-
mestic goose (*Anser anser*). *Anim. Blood. Grps.*
biochem. Genet. 9 : 129-132.
- 62.- Vella, F. (1980). Human Haemoglobins and molecula
disease. *Biochemical Education.* 8(2):41-53.
- 63.- White-Handler-Smith. (1970). *Principios de bio-*
química. Mc. Graw-Hill. México.
- 64.- Wright, C.A. (1974). *Biochemical and inmunological*
taxonomy of animals. Academic Press. London
New York.