

166
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**DETERMINACION DE LOS TIPOS DE HEMOGLOBINA Y
SU FRECUENCIA GENICA EN UN HATO DE OVINOS,
EN EL MUNICIPIO DE TELOYUCAN, ESTADO DE
MEXICO.**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

p r e s e n t a

CESAR VAZQUEZ OCHOA

**Asesoras: M.V.Z. ADRIANA MARTINEZ MARTINEZ
M.V.Z. ARCELIA RITA DEL CASTILLO R.**

**Asesores: M.V.Z. FRANCISCO AYALA BECERRIL
M.V.Z. ANGEL RETANA REYES**



V N A M

Cuautitlán Izcalli, Estado de Méx. 1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Capítulo		Pág.
I.	Introducción	I
2.	Revisión de literatura	2
2.1	Generalidades de la hemoglobina ...	2
2.2	Distribución de las frecuencias --- génicas de los tipos de hemoglobina	4
2.3	Síntesis de la hemoglobina	6
2.4	Degradación de la hemoglobina	7
2.5	Antecedentes históricos de la tipi- ficación de la hemoglobina	8
2.6	Correlaciones de la tipificación de la hemoglobina	14
2.7	Migración de la hemoglobina sobre - un campo eléctrico	18
3.	Material y métodos	19
3.1	Material experimental	19
3.2	Manejo	19
3.3	Caracteres evaluados	20
3.4	Recolección y envío de muestras al laboratorio	21

Capítulo		Pág.
3.5	Técnica de electroforesis zonal con gel de almidón hidrolizado	21
4.	Resultados	24
5.	Discusión	28
6.	Conclusiones	31
7.	Resumen	32
8.	Bibliografía	33

I. INTRODUCCION

Como es de nuestro conocimiento, los datos de investigación sobre los tipos de hemoglobina (Hb) en los ovinos son muy importantes como ayuda para el progreso de esta rama de la industria pecuaria; ya que por medio de ellos podemos realizar programas de selección con el fin de mejorar los parámetros tanto productivos como reproductivos.

Desgraciadamente en nuestro país, carecemos de esta información y por ende nuestros parámetros no están establecidos. Tan solo para podernos dar una idea de la importancia de este tema cabe decir que gracias a la frecuencia génica de ciertos tipos de Hb, es posible que se transmita el carácter de resistencia hacia cierto tipo de parasitosis, que en algunas regiones se reportan como una de las principales causas de enfermedad en corderos. Por otra parte, un tipo de Hb repercute en un mejor rendimiento productivo como es el caso de incrementar la fertilidad y prolificidad de las borregas; el número de corderos nacidos por hembra; número total de corderos destetados; kilogramos totales de corderos destetados, etc., (Obst y Seamark, 1971, Arora y col., 1971; Arora y Acharya, 1972; Altaif y Dargie, -- 1978; Walker y col., 1979; Dally y col., 1980).

Este panorama superficial que contemplamos nos da una idea clara y objetiva de la importancia que acarrea el tipificar y observar la repetibilidad de los genes que marcan los tipos de hemoglobina que existen en nuestros ovinos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES DE LA HEMOGLOBINA

La Hb es la proteína vital que transporta oxígeno desde los pulmones a los tejidos y a su vez facilita que el bióxido de carbono se libere desde los tejidos a los pulmones (Perutz, -- 1979).

Químicamente, la Hb es un complejo compuesto orgánico, formado por cuatro pigmentos rojos de porfirina llamados hemes, -- cada uno de los cuales contiene un átomo de hierro, a su vez -- unidos a una porción de una proteína globular constituida por cuatro cadenas de aminoácidos (Frandsen, 1974).

Una molécula de Hb está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, de las cuales dos son cadenas alfa de 141 aminoácidos -- cada una y dos cadenas beta de 146 aminoácidos cada una (Pe -- rutz, 1979).

Los grupos hem son la porción funcional de la molécula de -- Hb y su peso molecular es de aproximadamente 66,000. El eritrocito contiene en el ovino una concentración de Hb de 9.5 a 11.0 g/100 dl de sangre (Breazile, 1971).

Desde el punto de vista fisiológico, en la Hb normal adulta, comúnmente conocida como Hb A, la proteína globina consiste en dos pares de cadenas de polipéptidos idénticos; los alfa y otros dos pares, los beta. Las estructuras secundarias y terciarias -- (forma espacial o tridimensional), de las cadenas alfa y beta -- son bastante similares, sin embargo la estructura primaria (secuencia de los aminoácidos) de ambas cadenas son diferentes. Esta secuencia está dada genéticamente.

Además de las Hb's de los adultos, fisiológicamente hablando existe otra Hb en los eritrocitos de los fetos y de los recién nacidos llamada Hb Fetal (F). Esta Hb F comprende el 90% de la Hb en el feto y el 20% en los recién nacidos.

Aunque su concentración decrece rápidamente en los primeros 4 a 6 meses de vida, la fracción de Hb F puede permanecer hasta un 2 a 3% en animales inmaduros y adultos. La diferencia funcional entre ambas Hb's, A y F, parece radicar en la habilidad para --unirse al oxígeno. A una tensión de oxígeno dada, la Hb F se --une a una mayor cantidad de oxígeno que la Hb A. Esto hace que la Hb F adquiera un nivel de oxígeno mayor a partir de la circulación placentaria que la que pudiera obtener la Hb A si estu--viera presente en la circulación fetal. Esta incrementada afinidad fetal hacia el oxígeno puede deberse en parte a las diferencias en acidez de la sangre fetal y adulta. Evidencias de experimientos sugieren que existen dos Hb's embrionarias (Breazile, 1971).

El polimorfismo de la Hb, desde el punto de vista genético --se encuentra presente en el ovino. Según Schalm (1975), existen dos tipos de Hb's normales en los ovinos. Los dos tipos principalmente que prevalecen en el adulto son llamados Hb A y Hb B. La Hb A es electroforéticamente más rápida y tiene una afinidad al oxígeno superior a la Hb B. Los borregos que poseen la Hb A pueden cambiar a una Hb llamada C en respuesta a la anemia. El hecho de que exista el tipo C es porque hay un cambio en la estrutura en las cadenas polipeptídicas beta (Kitchen y col., --1968).

El 3^{er} tipo de hemoglobina, Hb C, fue encontrado por Blunt y Evans (1963), Braend, Efremov y Helle (1964). Este Hb solamente ha sido demostrada en asociación con el gene de Hb A, y nunca se ha presentado en ovinos homocigóticos para Hb B.

Efremov y Braend (1966), demostraron su existencia en borregos anémicos.

Un 4^o tipo de hemoglobina, Hb D, fue reportado primeramente por Vaskov y Efremov (1967) en 3 borregos aparentemente sanos con Hb AB. Por su parte Tucker (1981) ratificó este hallazgo en tres razas de ovinos alemanes (Kempische Heide, Velluws Heide y Merge Hand) encontrando dos fenotipos, Hb DAB y Hb DB.

2.2. Distribución de las frecuencias génicas de los tipos de hemoglobina

Las frecuencias génicas para los tipos de hemoglobina de acuerdo a las razas ovinas existentes en nuestro país se presentan en el Cuadro I. Algunos de estos trabajos sustentan la hipótesis de que los caracteres polimorficos de la Hb y K --- (potasio) tienen alguna significancia adaptativa (Evans, 1961; Agar y col., 1969b; Agar y Seth, 1971; Wiener y col., 1973; -- Schilhorn van Veen y Folaranni, 1978; Bhat y col., 1981). Esta hipótesis es difícil de probar, debido a que el movimiento de ovinos que ha hecho el hombre, de un habitat a otro, y más frecuentemente, dentro de ambientes totalmente diferentes, -- tiende a complicar este asunto.

DIATRIBUCION Y FRECUENCIAS GENICAS DE LOS TIPOS DE HEMOGLOBINA EXISTENTES EN
MEXICO

RAZA	LOCALIZACION	No. de animales	Frec. génica de:		Referencia
			A	B	
Corriedale	E.U.A.	25	0.16	0.84	Stormont y col., 1968
Dorset Down	Reino Unido	38	0.01	0.99	Evans y col., 1958b
Dorset Horn	Reino Unido	82	0.09	0.91	Evans y col., 1958b
Hampshire Down	Reino Unido	116	0.06	0.94	Evans y col., 1958b
Lincoln	Reino Unido	12	0.00	1.00	Evans y col., 1958b
Merino	Terr. norte Australia	37	0.38	0.62	Evans y col., 1958a
Merino	E.U.A.	39	0.12	0.88	Stormont y col., 1968
Rambouillet	Francia	19	0.79	0.21	Evans y col., 1958a
Rambouillet	E.U.A.	100	0.02	0.98	Stormont y col., 1968
Rambouillet	India	161	0.168	0.832	Singh y col., 1976
Romney Marsh	Reino Unido	137	0.09	0.91	Evans y col., 1958b
Romney Marsh	Australia	456	0.44	0.56	Evans y Blunt, 1961
Suffolk	E.U.A.	2133	0.10	0.90	Fésus y Rasmussen, 1971

Evans y Blunt (1961) muestran que el movimiento de una raza desde su medio original provoca a través de los años un cambio en las frecuencias génicas, en este caso para tipo de hemoglobina y potasio.

2.3. Síntesis de la Hemoglobina

La biosíntesis de la Hb se inicia en el eritroblasto y continúa a todo lo largo de los subsiguientes estadios del desarrollo celular. Mientras persista material nuclear en la célula, estén las células en la médula ósea o en la sangre circulante, puede continuar la formación de Hb (Dukes y Swenson, 1981).

La porción hem de la Hb es sintetizada principalmente a partir de ácido acético y glucocola, la mayor parte de ésta síntesis se realiza en las mitocondrias (Guyton, 1977).

Breazile, en 1971, mencionó que el grupo hem se sintetiza de la condensación original de la glicina (como lo informa Dukes y Swenson, 1981) y de succinil Co A para formar ácido delta aminolevulínico, seguido de la activación de glicina con -- fosfato de piridoxal. Dos moléculas de ácido delta aminolevulínico se condensan para formar porfobilinógeno; cuatro moléculas de porfobilinógeno se combinan para formar series de tetrapirroles para llegar a protoporfirina IX. La unión de hierro a la protoporfirina IX, dentro del reticulocito, forma una molécula hem. A su vez, cuatro moléculas hem, junto con la globina forman la hemoglobina.

El color rojo de la hemoglobina se debe al hemo, como se mencionó anteriormente, que es un compuesto metálico con un átomo de hierro en el centro de la molécula de porfirina (Fig. I).

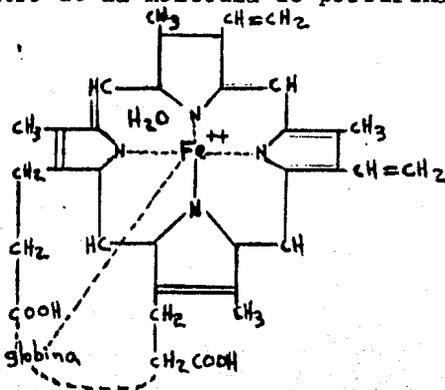


Fig. I. Fórmula estructural del hemo y su combinación con la globina para formar hemoglobina.

(Dukes y Swenson, 1981)

El hierro en el plasma está unido a una proteína plasmática conocida como transferrina, la cual transfiere hierro desde el tracto gastrointestinal y desde los depósitos de hierro corporales hasta los tejidos eritropoyéticos (Breazile, 1971).

2.4. Degradación de la Hemoglobina

La Hb es liberada de las células que se rompen, al ser viejas, la vida media de los glóbulos rojos de los ovinos es de 70-153 días (Benjamin, 1975).

La Hb es fagocitada y digerida casi inmediatamente por las células reticuloendoteliales, liberando hierro que va a pasar nuevamente a la sangre y es transportado dicho hierro por la transferrina hacia la médula ósea para producir Hb nueva, al hígado u otros tejidos para ser almacenado en forma de ferritina.

La porción hem de la molécula de Hb se convierte en el pigmento biliar bilirrubina, dicha conversión se lleva a cabo en la célula del sistema reticuloendotelial, pasando por una serie de etapas; este nuevo pigmento bilirrubina llega a la sangre, es más tarde conjugado por el hígado hacia la bilis y de ahí por heces o por orina (Guyton, 1977).

2.5. Antecedentes históricos de la tipificación de la hemoglobina

En el año de 1955, Harris y Warren, y en 1956 Evans y col. separaron dos tipos de Hb electroforéticamente. La primera fracción se movió rápido dando Hb A; la segunda fracción se desplazó lentamente denominándose Hb B (citados por Evans, 1961).

En 1957, Huisman y col., publicaron reportes sobre dos Hb's diferentes en los ovinos, llamados Hb I y Hb II. Encontrando que ambas Hb's se diferenciaban por: a) comportamiento electroforético; b) comportamiento cromatográfico; c) la Hb II resistía la desnaturalización por álcalis; d) por la composición de sus aminoácidos. Existe una hipótesis de que la Hb II se originó de ovinos que vivieron en altitudes elevadas, como el muflón. La Hb I se piensa que se originó de especies desconocidas que vivieron al nivel del mar. Así mismo, estos autores encontraron que la selección para uno u otro tipo de Hb esta dado por las diferentes frecuencias génicas presentes en las poblaciones ovinas (citados por Huisman y col., 1958).

La frecuencia de un gen, en su sentido mas general, significa el grado de su rareza o abundancia (Warwick, 1979).

Según Evans y col., (1958) los ovinos se pueden clasificar en tres tipos: A, B o AB según si poseen uno, otro o la mezcla de las dos Hb 's distintas.

Blunt y Evans en 1963 encontraron la presencia de una nueva Hb en ovinos con Hb A, después que perdían gran cantidad de sangre (citados por Braend y col., 1964).

Braend y col., en 1964 reportaron que en corderos altamente anémicos se presentaba una nueva Hb a la que ellos llamaron -- Hb N. (la misma Hb que en 1963 reportaron Blunt y Evans).

Posteriormente, Braend y Efremov en 1965 presentaron resultados de este fenómeno por electroforesis en gel de almidón a pH 9 y observaron que la Hb ϵ se encontró en corderos, ovejas y carneros que habían tenido Hb A o Hb AB pero nunca en ovinos Hb B y concluyeron que aunque la Hb N no se detecta en forma regular, su presencia fue normal.

Van Vliet y Huisman en 1964 describieron los cambios ocurridos en ovinos que les producían abundante hemorragia y concluyeron que la Hb A era reemplazada por una variante a la que -- ellos nombraron Hb C. (Hb N de Braend y Efremov).

Van Vliet y Huisman en ese mismo año observaron que después de la recuperación de la anemia, la Hb C desaparece y surge nuevamente la Hb A a su proporción inicial. Estos autores concluyeron que se trata posiblemente de la misma Hb (citados por Braend y Efremov, 1966).

En reportes previos (Braend y Efremov, 1965a) postularon -- una hipótesis en donde se sugirió que uno de los genes estructurales que controlan la Hb ϵ está fuertemente ligado a uno de los genes estructurales que controlan la Hb A. Por lo que debería apoyarse mas al control genético de las Hb's de los ovinos.

Van der Helm y Huisman (1957) encontraron diferencias considerables en los aminoácidos de las Hb's A y B. En trabajos posteriores mostraron que había por lo menos 13 aminoácidos que diferían entre dichas Hb's. Muller (1961) encontró que había diferencias en varios péptidos entre los tipos de Hb A y Hb B. Los resultados de Muller concordaron con los de van der Helm y col., (1957) por lo que Muller asumió que -- los 2 tipos de Hb A y B habían evolucionado independiente-- mente "cada tipo adaptándose por sí mismo a través de una -- serie de mutaciones sucesivas". van Vliet y Huisman (1964) en sus estudios sobre la Hb C encontraron que tenían las -- mismas cadenas alfa como las de las Hb A y Hb B, aunque di-- ferían en las cadenas que no eran alfa. Schreffler y Vino-- grand (1962) también explicaron estos resultados en térmi-- nos de 2 locus que controlan la Hb A y Hb B y sugirieron -- que la diferencia residió en únicamente una de las cadenas polipeptídicas. Aunque para Braend y Efremov (1966) la teo-- ría genética no da explicaciones suficientes para las varia-- ciones tan considerables sobre la Hb C., por lo que los auto-- res citados encontraron mas razonable la existencia de genes operadores y/o reguladores como ya los había señalado Jacob y Monod (1961) en las bacterias. Baglioni (1963) ---- también sugirió un mecanismo similar que opera en el con-- trol genético de las hemoglobinas humanas.

Braend y Efremov (1966) no observaron ninguna Hb C en ovi -- nos con fenotipo BB --ni en jóvenes ni en adultos, al provo-- carles anemia durante sangrados experimentales. Por lo que estos autores mencionaron que los ovinos Hb BB no son capa-- ces de producir Hb C. Este argumento se puede explicar por

la falta de genes estructurales especiales que controlan una de las cadenas polipéptidas de la Hb C o por un efecto inhibitorio o epistático en animales homocigóticos BB o por otro mecanismo no conocido.

En el experimento de Braend y Efremov (1966), que trabajaron con ovinos Spael, casi todos, al sangrarlos, tuvieron Hb N - aunque hubo diferencias muy marcadas en la Hb A de diferentes razas; lo que no se sabe si estas diferencias sean del tipo "todo o nada" o por diferencias cuantitativas.

La diferencia más marcada fue entre animales jóvenes (corderos) y adultos, al presentarse en los primeros anemia. Sin embargo se ha mostrado que existe más Hb C en los reticulocitos que en los eritrocitos maduros (Blunt y Evans, 1963; van Vliet y Huisman, 1964). El alto nivel de Hb N en corderos --- puede, por lo tanto, explicarse por el alto número de reticulocitos en esos animales. Ullrey, Miller, Long y Vincent --- (1965) encontraron en corderos de 14 días de nacidos 0.72% - de reticulocitos y los niveles más bajos de hemoglobina ---- (citados por Efremov y Braend, 1966).

Apoyando la tesis de Blunt y Evans, (1963); van Vliet y Huisman, (1964); Beale y col., en 1966 coincidieron también que el proceso por el cual la Hb C forma la mayor proporción de la hemoglobina en ovinos anémicos con Hb A es debido a un incremento en la síntesis más que en la activación de un nuevo gen. También observaron que el aumento en el nivel de la Hb C durante el sangrado coincide con una reticulocitosis. Posiblemente la Hb C es sintetizada primeramente por los reticulocitos, mientras que la Hb A es sintetizada por los eritroblastos (Citados por Beale y col., 1966).

Como se señaló anteriormente, Vaskov y Efremov en 1967 descubrieron un nuevo tipo de Hb llamado D. Esta Hb D se encontró sólo en animales que portaban los genes AB. La Hb D tiene la movilidad electroforética más rápida que las otras Hb's en ovinos. Estos autores encontraron que la Hb D es una variante de la cadena alfa.

Tucker (1971); Huisman y col., (1969) y Thurmon y col., en 1970 explicaron que se realiza la transferencia de Hb A a Hb C en respuesta a anemia, hipoxia o por inyección de eritropoyetina, en animales in vivo.

Adamson y col., en 1973 dijeron que ese fenómeno se presentó también in vitro en cultivos de tejido en presencia de eritropoyetina (citados por Nienhuis y Bunn, 1974).

Gabuzda y col., (1968) mostraron que la activación en la síntesis de la cadena beta se detecta en la médula de 3 a 5 días después de la inyección de eritropoyetina en la misma célula sanguínea (citados por Nienhuis y Bunn, 1974).

Kitchen y Brett en 1974 dijeron que las investigaciones en el control de la activación en la síntesis de Hb F a Hb Adulta en ovinos normales han sido obstaculizadas por la falta de animales apropiados ya que ninguno de los animales de laboratorio estudiados tienen una Hb F verdadera (citados por Wood y col., 1976).

Kleihauer y col., en 1968 encontraron que debido a cambios en el desarrollo de la Hb en ovinos, dos Hb's embrionarias son reemplazadas al inicio de la gestación por una Hb F única la cual, según Bard y col., (1972) y Wood (1976), es a su vez reemplazada por dos Hb's adultas. Las Hb's A y B se determi--

nan por pares de alelos de sus cadenas beta respectivas --- (citados por Wood y col., 1976).

Schalm reportó que la Hb, a través de las diferentes etapas de crecimiento del ovino, se inicia a partir de una Hb embrionaria, la cual es reemplazada por dos Hb's fetales (a diferencia de Kitchen y Brett (1974) que dijeron solamente es reemplazada por una sola Hb fetal), entre el 40^{avo} a 50^{avo} día de vida fetal, éstas a su vez son substituidas, ya en la vida extra uterina por una a cuatro Hb's adultas (Schalm --- 1975).

John y John en 1977 obtuvieron una nueva Hb a partir de la cadena beta, llamada Hb E, que no se puede diferenciar de de las demás Hb's sino electroforéticamente con un disco de gel de poliacrilamida-urea. Encontraron también que esta Hb E tiene una movilidad más lenta que la Hb B.

Mencionan igualmente estos autores que las Hb's de los ovinos adultos se clasifican en ocho categorías, según la composición de sus subunidades en:

AA, AB, AE, AC, ABC, LBB, BE y EE.

Se demostró que la eritropoyetina ejerce una influencia sobre la diferenciación eritrocítica lo que conduce a la -- producción de macrócitos y a la activación de una Hb a otra (Mohandas y col., 1980).

Mc.Leod y col., (1974); Gregory y col., (1977) y Papayannopoulou y col., (1977), mencionaron que los estudios in vitro han ayudado en la identificación del origen de las células eritrocíticas y mostraron evidencias de que los progenitores eritrocíticos tempranos (BFU-E) requieren de niveles altos de eritropoyetina para su diferenciación y así poder

sintetizar la hemoglobina fetal. Mientras que los progenitores eritrocíticos tardíos (CFU-E) requieren de niveles bajos de eritropoyetina para su diferenciación y poder sintetizar únicamente hemoglobina adulta (citados por Mohandas y col., 1980).

2.6. Correlaciones de la tipificación de la hemoglobina

Es importante el señalar estas correlaciones porque también están íntimamente relacionados con los parámetros productivos y reproductivos en los ovinos.

La primera correlación es sobre la concentración de potasio intraeritrocítico, en Hb A.

Evans (1956), y Evans y Mounib (1957), establecieron que la concentración de potasio puede ser de dos formas: una concentración alta denominada HK (High=alto; K=potasio) con un valor aproximado de 35 m Equiv/l y una concentración baja denominada LK (Low=bajo; K=potasio) de 12 m Equiv/l -- aproximadamente; a su vez Evans (1957) clasificó al HK en base también a la concentración de K^+ intraeritrocítico en tres subtipos: $K e \beta$; $K e \gamma$; $K e \delta$. Esta correlación es importante porque Evans en 1957 sugirió que los ovinos con LK tienen más probabilidades de sobrevivir en regiones áridas que los animales con tipo de H. K (Evans, 1961).

Otra correlación que cabe mencionar es la de los valores del hematocrito sobre los tipos de Hb. Según la tesis propuesta por Dawson (1964), el tipo de Hb esta correlacionado con los valores del hematocrito y con el volumen sanguíneo. Whitlock en 1961 y en 1963 mostró que los valores máximos del hematocrito en una época estacional, en ovinos normales, están dados bajo un control genético. Así como también es -

hereditario el sistema de tipificación AB por un par de alelos (Evans y Whitlock, 1964).

La interacción tipo de Hb con la fertilidad de borregas - que pastan sobre trébol estrogénico es de considerable interés ya que según estudios realizados por Evans y Turner en - 1965 encontraron que las ovejas con Hb BB y Hb AB fueron ligeramente más fértiles que las ovejas con Hb AA. Por el contrario Obst en 1968 y en 1970 encontró que las borregas con Hb AA produjeron más corderos y sobrevivieron satisfactoriamente que los corderos nacidos de ovejas Hb BB y Hb AB. Se ha visto que los tréboles contienen estrógenos que aca - rrean problemas de infertilidad que pueden llegar hasta alcanzar un 75% con la consecuente pérdida de corderos debido a distocias, según Moule y col., (1963); Bennets, (1946) y - Maxwell en 1970 (citados por Obst y Seamarck, 1971).

Aunque Walker y col., en 1979 no están de acuerdo con la teoría de Obst y Seamarck (1971) en el sentido de que el -- gen para Hb AA sea superior en fertilidad, y sí están de -- acuerdo con Evans y Turner, (1965) de que el gen para Hb BB está asociado a un rendimiento reproductivo superior ----- (Walker y col., 1979).

En otros experimentos realizados, se llegó a la conclusión de que los carneros con Hb BB mostraron superioridad - tanto en porcentaje de corderos nacidos como porcentaje de corderos destetados, corroborando así los resultados similares a los de Evans y Turner en 1965 (citados por Arora y col., 1971).

Por otra parte, en relación con peso corporal a diferentes edades, los ovinos con HK fueron ligera pero no significativamente superiores a aquellos con LK, tanto al nacimiento, 3, 6 meses y 1 año de edad, aunque tuvieron bajo peso -- del vellón (Arora y Acharya, 1972).

Walker y col., encontraron que la incidencia de distocias fué solo ligeramente más alta en borregas con Hb AA --- (2.9%) que en las ovejas Hb BB (2.6%) pero sin variar el --- tiempo aproximado de gestación (Walker y col., 1977).

En lo que respecta a resistencia a la parasitosis interna (Haemonchus contortus), se ha llegado a la conclusión de que los ovinos con Hb AA son más resistentes a dichos helmin_{tos} que los que poseen el genotipo Hb BB (Altaif y Dargie, - 1978). Así mismo, las ovejas con Hb AA presentaron los con_{teos} más bajos de huevos de parásitos; de igual manera las - borregas Hb AA mostraron incidencias de mastitis más bajas. En otros estudios realizados por Dally y col., en 1980 encon_{traron} que las ovejas Hb AB tuvieron las más bajas inciden_{cias} en problemas de pododermatitis infecciosa (citados por Dally y col., 1980).

Como hemos visto, estos datos sobre los tipos de hemoglo_{bina} y su frecuencia génica son importantes para un mejor -- rendimiento productivo y por ende una rentabilidad próspera.

El presente trabajo tuvo como objetivo el de valorar los diferentes tipos de hemoglobina y estimar la frecuencia génica de los mismos.

Nuestra hipótesis de trabajo planteada es de que los animales a muestrear estén dentro de los valores reportados -- por Evans y col., (1958b) y por Rondand y Ebaugh (1957); -- que en la raza Hampshire es de 80 hasta un 95% para el tipo de hemoglobina BB.

La importancia de valorar los diferentes tipos de hemoglobina es como lo mencionaron Evans y Turner en 1965; Seth en 1968 y Arora y col., en 1971, de que el gen para el tipo de hemoglobina BB está asociado con un rendimiento reproductivo superior.

2.7. Migración de la hemoglobina sobre un campo eléctrico (Electroforesis)

La electroforesis es un método de separación de iones que se basa en las propiedades eléctricas de los componentes de una mezcla, generalmente de alto peso molecular, en este caso de proteínas como la hemoglobina.

Dicho de otra manera, la electroforesis es el movimiento de un ión o grupo iónico hacia uno de los electrodos cuando se le suministra una corriente eléctrica. De tal caso que un ión cargado positivamente emigrará hacia el cátodo (polo negativo) y un ión cargado negativamente emigrará hacia el ánodo (polo positivo) (Olivan, 1983).

En la Fig. 2 se muestran las migraciones de las diferentes bandas. Es importante que para poder determinar el alelo a -- que corresponde cada banda, los controles utilizados para este efecto se han establecido internacionalmente (consultar -- bibliografía extensa), consistiendo dichos controles en el corrimiento de las bandas de todos los alelos que existan de -- determinada especie animal y así compararlos con las bandas -- de los alelos de hemoglobina problema. Sabiendo de antemano -- que todos los alelos migran en promedio 3 cm a partir del sitio donde se colocaron, el criterio utilizado para determinar la identificación de cada alelo es en base a la cantidad de -- bandas presentes y su posición que guardan entre ellas (se -- recomienda consultar Kitchen y col., 1968) (Retana, 1984).[†]

(comunicación personal)[†]

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Material experimental

El presente estudio se realizó en la explotación ovina "El Alamo", situada en el Municipio de Teoloyucan, Edo., de México; el cual se localiza a una altitud de 2,400 metros - sobre el nivel del mar; entre las coordenadas $99^{\circ} 10'$ longitud Oeste y 19° latitud Norte.

El clima de la región es templado con lluvias en verano. La temperatura media anual oscila entre 12 y 18°C . La precipitación media anual es de aproximadamente 200 mm.

Los ovinos sujetos a observación fueron 84 de la raza Hampshire down, cuyos antecesores provinieron de los E.U.A., y 14 ovinos criollos y criollos encastados.

3.2 Manejo

De los animales a estudiar, para fines prácticos, los dividimos en seis grupos que fueron los siguientes:

(Los grupos A a D pertenecieron a la raza Hampshire)

Grupo A.- 50 hembras cuyas edades fluctuaron de 3 a 7 años y con un peso promedio aproximado de 55 Kg.

Grupo B.- 5 sementales con edad y peso promedios de 1 año y 90 Kg., respectivamente.

Grupo C.- 10 corderos con edades de 6 a 8 meses y peso promedio de 35 Kg.

Grupo D.- 19 hembras de reemplazo de 3 años de edad en promedio y peso aproximado de 45 Kg.

Los otros dos grupos restantes pertenecieron a ovinos criollos.

Grupo E.- 7 ovinos criollos con características fenotípicas to talmente diferentes a los de la raza Hampshire, y -- que fueron escogidos al azar. La edad y peso prome-- dio fue de 8 meses y 25 Kg., respectivamente.

Grupo F.- 7 ovinos criollos encastados con las razas Hampshire y Suffolk. Sus características fenotípicas guardan -- cierta pero no total relación con las de la raza --- Hampshire; con un peso promedio de 25 Kg., y edad -- promedio de 9 meses.

3.3. Caracteres evaluados

Los caracteres que se midieron son:

tipo de hemoglobina y su frecuencia génica.

La determinación de la frecuencia génica se obtuvo mediante las 2 fórmulas siguientes:

$$\text{Para calcular la Hb AA} \quad \text{Hb AA} = \frac{A + I/2 AB}{N}$$

$$\text{Para calcular la Hb BB} \quad \text{Hb BB} = \frac{B + I/2 AB}{N}$$

donde

A = Hb AA

B = Hb BB

AB = Hb AB

N = número total de animales muestreados

3.4. Recolección y envío de muestras al laboratorio

La sangre extraída a todos los ovinos se obtuvo tanto de las venas yugular externa como de la radial, previa depila -- ción y desinfección de la región anatómica practicada, la can -- tidad de sangre fue de 5 ml aproximadamente, utilizando para ello agujas de toma simple de calibre 20 con tubos "vacutai -- ner" conteniendo como anticoagulante el ácido etilen diamino -- tetraacético (E.D.T.A.) al 16 %.

Una vez recolectada e identificada adecuadamente la san -- gre, ésta se conservó en refrigeración hasta su procesamiento a las 24 horas siguientes.

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Ciudad Universitaria, y se utilizó la técnica de Electrofo -- resis zonal con gel de almidón hidrolizado.

3.5. Técnica de electroforesis zonal con gel de almidón hidro -- lizado

Dicha técnica se dividió en dos partes:

Primera parte. -- Lavado y lisado de los glóbulos rojos

Segunda parte. -- Preparación del amortiguador de la hemoglobina y del gel de almidón hidrolizado

Primera parte. -- Se centrifugaron las muestras a 2,500 rpm duran -- te 20 minutos con el propósito de separar el -- plasma del paquete celular (P.C.)

El P. C. se lavó con solución salina isotónica (S.S.I.) al 0.9% para eliminar otras proteínas y procesar la hemoglobina.

Se centrifugó nuevamente a las mismas revolucio --

nes y tiempo previamente añadiendo nueva - S.S.I., repitiéndose esta operación dos ve - ces más, para que finalmente dejar en ul - tracongelación de -70°C a los glóbulos ro - jos para provocar la lisis de los glóbulos rojos pero no la destrucción de la hemoglo - bina.

Segunda parte.- En un frasco limpio y seco de color ambar se le añadió 500 ml de agua destilada; se - virtió el contenido de este frasco a una - probeta de 500 ml, en el frasco ámbar ya - vacío se le agregó el amortiguador de hemo - globina cuya presentación es en polvo de - color blanco. Se pasó el agua destilada -- contenida en la probeta hacia el frasco -- donde estaba el amortiguador de hemoglobi - na, se agitó vigorosamente hasta obtener - una solución homogénea y así se preparó el el amortiguador de hemoglobina.

Preparación del gel de almidón

Se pesaron 36 g de almidón hidrolizado. -- Por otra parte, del amortiguador de hemo - globina que ya estaba preparado se virtie - ron 190 ml a un matraz se calentó hasta -- llegar a temperatura de ebullición, mien - tras tanto, en otro matraz se agregó 60 ml del amortiguador de hemoglobina (en frío), en este mismo matraz se añadió los 36 g de almidón hidrolizado; una vez que estuvo en punto de ebullición los 190 ml, se mezcla-

ron con los 60 ml y el almidón. Rápidamente se agitó y desgasificó hasta que la cantidad de burbujas fué mínima, para verterlo - sobre una superficie de vidrio y dejar que se enfriara para posteriormente cubrirlo y así quedó listo para usarse el gel de almidón hidrolizado (Ayala y Retana, 1984)⁺

Reactivos utilizados en la preparación del amortiguador
solución concentrada de

0.6 M tris
(Hidroximetilaminometano)

0.3 M E.D.T.A.

0.01M H_3BO_3

pH 8.7

Tinción.- Amido negro

Tiempo total promedio: 90 min

Temperatura: ambiente

Fuente de poder: Gelman Co. 300 volts

50 a 55 miliamperes

(Kristjansson, 1963)

4. RESULTADOS

De los 84 ovinos Hampshire muestreados se encontró que 71 mostraron el genotipo Hb BB, y 17 ovinos presentaron el genotipo heterocigótico AB, y sus frecuencias génicas fueron: para el genotipo Hb BB fue de 92.2%; y para Hb AA fue de 7.7%

La frecuencia génica por grupos fue de la siguiente ----- manera:

Grupo A.- De las 50 borregas adultas, 41 presentaron Hb BB y las 9 restantes presentaron Hb AB. La frecuencia génica para Hb BB fue de 91% y la frecuencia génica correspondiente a Hb AA fue de 9%.

Grupo B.- Los 5 sementales presentaron Hb BB por lo que su frecuencia génica fue de 100%. Ninguno de este grupo tuvo Hb AB ni Hb AA.

Grupo C.- De los 10 corderos, 8 poseen Hb BB y los otros 2 con Hb AB. La frecuencia génica para Hb BB fue de 90% y la correspondiente a Hb AA de 10%.

Grupo D.- De las 19 hembras de reemplazo, 17 mostraron el tipo Hb BB y las 2 restantes, Hb AB. Con frecuencia génica para Hb BB de 94.73% y para Hb AA de 5.26%.

Grupo E.- De los 7 ovinos criollos, 5 presentaron Hb BB y 2 Hb AB, la frecuencia génica para Hb BB fue de 85.7% mientras que para Hb AA fue de 14.2%.

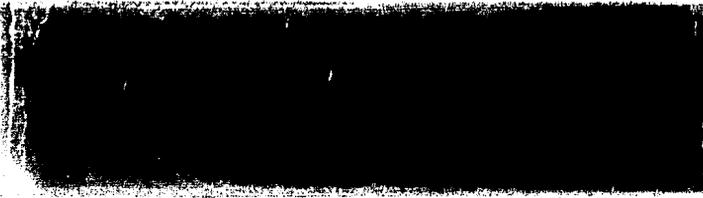
Grupo F.- De los 7 ovinos criollos encastados 5 mostraron Hb BB y 2 fueron Hb AB, las frecuencias génicas para -

Hb BB y Hb AA fueron de 85.7 y 14.2%, respectivamente. Lo interesante en estos 2 últimos grupos (E y F), fue de que ambos tuvieron exactamente las mismas frecuencias génicas tanto para Hb AA como para Hb BB. (ver Cuadro 2):

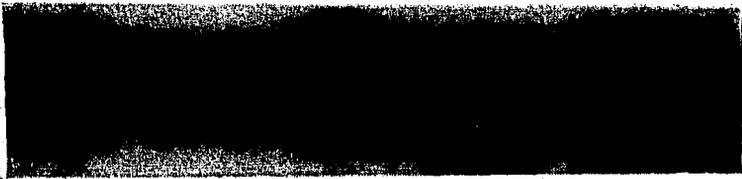
TIPIFICACION DE LA HEMOGLOBINA Y SU FRECUENCIA GENICA EN UN HATO DE OVINOS
DEL ESTADO DE MEXICO

GRUPO	# TOTAL DE ANIMALES POR GRUPO	# DE ANIMALES CON Hb AA	FRECUENCIA GENICA DE Hb AA * (%)	#DE ANIMALES CON Hb BB	FRECUENCIA GENICA DE Hb BB (%)	#DE ANIMALES CON Hb AB
A	50	0	9	41	91	9
B	5	0	1	5	99	0
C	10	0	10	8	90	2
D	19	0	5	17	94	2
E	7	0	14	5	85	2
F	7	0	14	5	85	2

* Aunque no hubo ningún animal con Hb AA, según la fórmula aplicada y que aparece en el capítulo de material y métodos, éstos fueron los valores que obtuvieron.



Resultados de la electroforesis en gel de --
almidón de las hemoglobinas polimorficas de --
ovinos de la raza Hampshire. Las migraciones
con una sola banda correspondieron al genoti-
po homocigótico Hb BB, y los que presentaron
dos bandas pertenecieron al genotipo heteroci-
gótico Hb AB. (fig. 2)



Acercamientos de las bandas de hemoglobina
de ovinos Hampshire. (Figs. 3 y 4)

5. DISCUSION

El presente trabajo tuvo como objetivo el de valorar los diferentes tipos de hemoglobina y estimar la frecuencia génica de los mismos.

Las frecuencias génicas obtenidas fueron, para la Hb tipo B 92.2% y para la Hb A 7.7% de la población Hampshire - total muestreada. Estos valores coinciden con los reportados por Evans y col., (1958b) que son 94% y 6% para Hb B y A respectivamente.

Examinando los resultados de frecuencias génicas observamos que el alelo tipo B tuvo una mayor presentación que el alelo A en todos los grupos Hampshire estudiados, independientemente del peso, edad y sexo, esta alta frecuencia -- del alelo B se observa también en otras razas (autores ver) (Cuadro 2).

Estos resultados tienen una gran importancia para el hato, ya que el alelo para Hb B esta asociado con un rendimiento reproductivo superior entre otras cualidades ya mencionadas en la introducción (Evans y Turner en 1965; Seth en 1968 y Arora y col., en 1971).

También es importante notar que ninguno de los ovinos de la población muestreada, lleva consigo el alelo homocigótico A en sus glóbulos rojos. Pero en cambio, sí hubo ovinos heterocigóticos AB dentro del hato.

El diseño experimental del presente trabajo fue de caracter observacional, por lo que los animales criollos muestreados no se les puede denominar grupo control pues no --

existen en dichos ovinos criollos un patrón fijo donde es tablezca su tipificación de la hemoglobina ya que no hay literatura que demuestre lo contrario.

Así como también es curioso notar, como ya lo señalamos, que los dos grupos de criollos tuvieron exactamente los mismos valores en sus genotipos tanto para Hb AA como para Hb BB y para Hb AB, no obstante de que el grupo de criollos encastados está formado con sangre de raza Hampshire.

Esto dá la pauta para posteriores estudios que nos permitan esclarecer si de alguna manera los individuos de raza influyen genotípicamente sobre los criollos.

Durante el desarrollo del presente estudio, cabe señalar que la electroforesis con gel de almidón hidrolizado puede estar sujeta a discusiones ya que los errores técnicos por parte del operador, en un momento dado y de alguna manera puede repercutir en resultados falsos, especialmente si el operador no cuenta con experiencia en el manejo de esta técnica. En el laboratorio donde trabajamos -- esta técnica tiene ya muchos años de practicarse, aunque existen otras técnicas como por ejemplo la electroforesis en gel de poliacrilamida, gel de sílice, etc. En el caso del gel de poliacrilamida su lectura es más rápida, es igual de laboriosa pero es más costosa que la de almidón.

Queda a discusión y para posteriores estudios el realizar una comparación entre las dos técnicas mencionadas -- para evaluar la eficiencia, utilidad, facilidad en su ---

manejo y costo de operación. (Retana, 1984)[†]

De igual manera, una vez que se tiene el tipo de hemoglobina, la frecuencia génica se puede relacionar con los índices productivos: fertilidad, prolificidad, kilogramos de corderos producidos, peso del vellón, ganancia de peso antes y después del destete y también sacar la relación -- con resistencia a parásitos, como lo mencionan (Obst y Searmark, 1971; Arora y col., 1971; Arora y Acharya, 1972; Altaif y Dargie, 1978; Walker y col., 1979; Dally y col., -- 1980; Evans y Turner, 1965 y Seth, 1968).

(comunicación personal)[†]

6. CONCLUSIONES

La frecuencia génica obtenida en estos ovinos Hampshire fue de 92.2% para el tipo de Hb BB, lo que concuerda con lo que mencionan Evans y Turner (1965), Seth (1968) y Aro-ra y col., (1971). Esto nos confirma hasta cierto punto la pureza de la raza de estos ovinos.

La frecuencia génica de 7.7% para el tipo de Hb AA fue también la esperada, ya que concuerda con lo reportado por Evans y col., en 1958 que fue de 6%.

Es interesante mencionar en este estudio, que ninguno de los animales presentó el tipo de Hb AA, aunque si tuvieran su frecuencia génica, como aparece arriba, lo que nos indica que el genotipo homocigótico BB predomina sobre el genotipo homocigótico AA en esta raza; pero sí hubo heterocigóticos AB.

Los ovinos criollos muestreados presentaron Hb BB con una frecuencia génica de 85.7%; ésta es más baja en relación a los Hampshire (92.2%); lo que indica una mayor variación en sus orígenes. Sin embargo no hay patrones establecidos para los ovinos criollos aquí en México.

Es de esperarse que en estos animales ante un estímulo de hipoxia, sólo aquellos con Hb AB puedan presentar Hb C.

7. RESUMEN

El estudio se realizó con 98 ovinos (84 de la raza Hampshire y 14 criollos y criollos encastados), en el rancho "El Alamo", Municipio de Teoloyucan, Edo., de México. El trabajo se realizó con los objetivos siguientes:

Determinar los tipos de hemoglobina del rebaño con énfasis sobre los de raza Hampshire ya que existen patrones establecidos para ellos y observar si concuerdan.

Obtener la frecuencia génica de los tipos de hemoglobina presentes en estos ovinos.

Se encontró solo 2 tipos de hemoglobina (Hb BB y Hb AB) más no así el genotipo Hb AA.

De los 84 Hampshire muestreados, 71 mostraron el genotipo homocigótico Hb BB y los 17 restantes presentaron el genotipo heterocigótico Hb AB. Sus frecuencias génicas fueron para el genotipo Hb BB de 92.2% y para la Hb AA fue de 7.7%.

De los 14 ovinos criollos y criollos encastados -- con Hampshire y Suffolk, 10 presentaron el genotipo Hb BB y 4 el genotipo Hb AB. Las frecuencias génicas para Hb BB y Hb AA fueron 85.7% y 14.2%, respectivamente.

Los ovinos con alelo Hb B son los que predominan en la población estudiada.

- Agar, N.S.; Evans, J.V. and Roberts, J. 1972 Haemoglobin polymorphism and potassium in the erythrocytes in sheep. Anim. Breeding Abs. 40 No.3 407-431.
- Agar, N.S.; J.S. Rawat and A. Roy. 1969b. Blood potassium and haemoglobin polymorphism in Indian sheep. J. Agric. Sci., Camb. 73:197-202.
- Agar, N.S. and O.N. Seth. 1971. Hemoglobin polymorphism in some sheep breeds in Himalayan region. Am. J. Vet Res. 32:361-362.
- Altaif, K.I., and J.D. Dargie. 1978a Genetic resistance to helminths the influence of breed and haemoglobin type on the response of sheep to primary infections with Haemonchus contortus. Parasitology, 77 761.
- Arora, C.L., R.M. Acharya and S.N. Kakar. 1971. A note on the association of haemoglobin types with ewe and ram fertility and lamb mortality in Indian sheep. Anim. Prod., 13:371-373.
- Arora, C.L., and R.M. Acharya. 1972. A note on haemoglobin and potassium types in Nali breed of Indian sheep and their relationship with body weights and wool yield. Anim. Prod. 15:95.
- Ayala, F. y A. Retana. 1984. Comunicación personal. Depto. de Virología, Lab. de Biología Molecular, F.M.V.Z. U.N.A.M. México.
- Beale, D., H. Lehmann, A. Drury and E.M. Tucker. 1966. Haemoglobins of sheep. Nature, Lond. 209:1099-1102.
- Benjamin, M.M. 1975 Outline of Veterinary Clinical Pathology 3rd Ed. The Iowa State Univ. Press. pp.56-57.
- Bhat, P.P.; B.U. Khant, T.C. Santiago and K.L. Sahni. 1981 Potassium and haemoglobin polymorphism in Muzaffarnagari breed of sheep. Indian J. Anim. Sci. 51: 1147-1150.

- Braend, M.; G. Efremov and O. Helle. 1964 Abnormal haemoglobin in sheep. Nature, Lond. 204:700.
- Breazile, J.E.; 1971 Veterinary Physiology, textbook of. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A. pp.209-212.
- Dally, M.R.; W. Hohenboken, D.L. Thomas and A.M. Craig. - 1980. Relationship between hemoglobin type and - reproduction, lamb, wool and milk production and health-related traits in crossbred ewes. J. Anim. Sci. 50:418-426.
- Dukes, H.H.; Swenson, M.J. 1981 Fisiología de los animales domésticos. Tomo I. Edit. Aguilar, S.A. pp. - 49-53.
- Efremov, G., and M. Braend. 1966 Haemoglobin N of sheep age, breed and seasonal distribution. Anim. Prod. 8 part. 2:161-169.
- Evans, J.V.; J.W.B. King, B.L. Cohen, H. Harris and F.L. -- Warren. 1956. Genetics of haemoglobin and blood potassium differences in sheep. Nature, Lond. 178-849.
- Evans, J.V.; H. Harris and F.L. Warren. 1958a. Haemoglobin and potassium blood types in some non-British ---- breeds of sheep and in certain rare British breeds. Nature, Lond. 182:320.
- Evans, J.V.; H. Harris and F.L. Warren. 1958b. The distribution of haemoglobin and blood potassium types in - British breeds of sheep. Proc. R. Soc. Ser. B. -- 149:249.
- Evans, J.V., 1961. Differences in the concentration of potassium and the type of haemoglobin between strains and sexes of Merino sheep. Aust. J. biol. Sci. 14 274-287.
- Evans, J.V.; M.H. Blunt and W.H. Southcott. 1963. The effects of infection with Hemonchus contortus on the sodium and potassium concentrations in the erythrocytes and plasma, in sheep of different haemoglobin

- types. Aust. J. Agric. Res. 14:540-548.
- Evans, J.V.; and J.H. Whitlock. 1964. Genetic relationship between maximum hematocrit values and hemoglobin type in sheep. Science, 145:318.
- Fesus, L. and B.A. Rasmusen. 1971. The distribution of transferrin and haemoglobin types in families of Suffolk and Targehee sheep. Anim. Blood Grps. Biochem genet. 10:115.
- Frandsen, R.D., 1976. Anatomía y Fisiología de los animales domésticos. 2^a Ed., Interamericana. pp- -163.
- Guyton, A., 1977 Fisiología Médica, tratado de. 5^a Ed.- Interamericana pp.60, 61 y 63.
- Huisman, T.H.J.; G. van Vliet and T. Sebens. 1958b. --- Sheep haemoglobins. Haemoglobin types in different species of sheep. Nature, Lond. 182:172-174.
- King, J.W.B.; J.V. Evans, H. Harris and F.L. Warren. --- 1958. The performance of sheep with differing haemoglobin and potassium blood types. J. Agric. Sci. 51:342.
- Kitchen, H.; J.W. Eaton and W.J. Taylor. 1968. Rapid -- production of a hemoglobin by induced hemolysis in sheep: hemoglobin C. Am. J. Vet. Res. 29:--281-289.
- Kristjansson, F.K. 1963. Genetic control of two prealbumin in pigs. Genetics 48:1059.
- Mohandas, N.; M.R. Clark, J.L. Wyatt, J.F. Garcia, P.D. - Eisenberg and S.B. Shohet. 1980. Erythropoietic stress, macrocytosis and hemoglobin switching in Hb AA sheep. Blood, 55. No. 5:757-761.
- Nienhuis, A.W.; and H.F. Bunn. 1974. Hemoglobin switching in sheep and goats; occurrence of hemoglobins A and C in the same red cell. Science, --185:946-948.

- Obst, J.M.; R.F. Seamark and C.J. Mc. Gowan 1971 Haemoglobin type and fertility of Merino ewes grazing oestrogenic (Yarloop clover) pastures. Nature, Lond. 232:497-498.
- Olivan, T.J., 1983 Relación entre caracteres de producción y polimorfismos genéticos asociados con caracteres de sanidad en ovinos Corriedale. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Méx.
- Perutz, M.F., 1979. La estructura de la hemoglobina y el transporte respiratorio. Investigación y Ciencia, edición en español de Scientific American. 29:40-55.
- Schalm, O.W.; N.C. Jains and E.J. Carroll. 1975 Veterinary Hematology, Lea & Febiger. pp. 150, 378 and 381.
- Schillhorn van Veen, T.W. and D.O.B. Folaranmi. 1978. - The haemoglobin types of northern Nigerian sheep. Res. Vet. Sci., 25:397-398.
- Singh, L.B.; Mohan Sing, P.K. Dwarknath and Amrit Lal. - 1976 Haemoglobin variants of the indigenous, exotic and cross-bred sheep. Indian Vet. J. 53 766.
- Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels; Group variations in the serum proteins of normal Human adults. Biochem. J. 61:629.
- Stormont, T.C.; Y. Susuki, G.E. Bradford and P. King. -- 1968. A survey of hemoglobins, transferrins and certain red cell antigens in nine breeds of sheep. Genetics. 60:363.
- Tucker, E.M., 1981. Haemoglobin D in three rare Dutch breeds of sheep. Anim. Blood Grps. and Bio. Genetics, 12:107-112.

- Walker, S.K.; J.M. Obst, D.H. Smith, G.P. Hall and P.F. Flavel. 1979a. Influence of haemoglobin type and selenium status on peripheral plasma progesterone and corticoesteroid concentration in ewes grazing oestrogenic pastures. - Aust. J. Biol. Sci. 32:221-229.
- Walker, S.K.; J.M. Obst, D.H. Smith, G.P. Hall, P.F. -- Flavel and R.W. Ponzoni. 1979b. Haemoglobin type and reproductive performance of --- sheep grazing oestrogenic pastures. Anim. -- Prod. 29:271-276.
- Warwick, E.J., y J.E. Legates. 1979 Cría y mejora del ganado. 3^a Ed., Mc. Graw Hill. pp.171.
- Wiener, G.; J.G. Hall and Susan Hayter. 1973 An association between the concentration of cooper in whole blood and haemoglobin type in sheep. Anim. Prod., 17:1-7.
- Wood, W.G.; K. Pierce, J.B. Clegg, D.J. Weatherall, J.S. Robinson, G.D. Thorburn and G.S. Dawes. 1976 Switch from foetal to adult haemoglobin synthesis in normal and hypophysectomised sheep. Nature, Lond., 264:799-800.