

204
24

**DETERMINACION DE LOS MARCADORES BIOQUIMICOS
SANGUINEOS EN EL CONEJO NUEVA ZELANDA BLANCO
EMPLEADO EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA
EN LA PRUEBA DE PIROGENOS.**

**Trabajo Final Escrito del IV Seminario de Titulación
en el área de:
CUNICULTURA**

**Presentado ante la División de Estudios Profesionales
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la**

**Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
por**

**Angélica María Pérez González
Asesor: M.V.Z. Francisco Javier Basurto Alcántara**

México D.F., 7 de Mayo de 1992

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

CONTENIDO

	Página
Resumen.	1
Introducción	3
Hipótesis	7
Objetivos	7
Material y métodos	8
Resultados	13
Discusión y Conclusiones.	14
Literatura Citada	17

RESUMEN:

PEREZ GONZALEZ ANGELICA MARIA. Determinación de los Marcadores Bioquímicos Sanguíneos en el conejo Nueva Zelanda Blanco empleado en la Industria Farmacéutica en la Prueba de Pirógenos: IV Seminario de titulación en el área de Cunicultura. (bajo la supervisión de: M.V.Z. Francisco Javier Basurto Alcántara)

Las Características anfóteras de las proteínas permiten su separación por métodos electroforéticos pudiendo así identificar variantes fenotípicas como polimorfismos bioquímicos eritrocíticos y séricos. Esto marcadores permiten determinar relaciones genéticas de líneas y razas, comprobación de paternidad, correlación de caracteres productivos, etc. La prueba de pirógenos requiere la utilización de animales de raza Nueva Zelanda Blancos puros, por lo que se necesita una prueba de control de calidad para la determinación de pureza de raza de dichos animales. En el presente trabajo se tomaron muestras sanguíneas de 9 conejos de raza NZB utilizados en la prueba de pirógenos, 6 conejos de raza NZB puros de registro y 3 conejos de raza Chinchilla. Se realizaron pruebas electroforéticas para comparar sus fenotipos, observando el polimorfismo de cada muestra para así determinar la pureza de raza de los conejos NZB utilizados en la Industria Farmacéutica en la prueba de Pirógenos. No se encontró polimorfismo en los fenotipos de Hb de ninguna de las muestras analizadas pero se observó que migran más lento en comparación con las proteínas de bovino. Se puede concluir que los patrones fenotípicos obtenidos en la determinación de Hb por electroforesis en gel de almidón hidrolizado de papa no se pueden utilizar como prueba de constatación de razas de conejos. En los patrones electroforéticos obtenidos de la migración de Albúminas se observó que las razas estudiadas son monomórficas, pero no se logró identificar ningún fenotipo por no tener ninguna muestra de referencia. Al igual que Hemoglobina se puede concluir que el empleo de este marcador bioquímico electroforético no se puede utilizar en pruebas de constatación de razas de conejos. En la determinación de Transferrina sí se encontró polimorfismo existiendo una diferencia significativa entre conejos de raza Nueva Zelanda Blancos (AA) y los conejos de raza Chinchilla (AC)($P > 0.005$). Comparando los

fenotipos de los conejos NZB puros con los conejos NZB utilizados en la industria farmacéutica se observó una diferencia no significativa ($P < 0.05$). Se identificaron 4 fenotipos diferentes AA, AB, AC y AD. Se concluye que la determinación de Tf puede ser utilizada en el control de calidad de los animales empleados en la investigación y en la industria, así como una herramienta auxiliar en la selección genética.

DETERMINACION DE LOS MARCADORES BIOQUIMICOS SANGUINEOS EN EL CONEJO NUEVA ZELANDA BLANCO EMPLEADO EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA EN LA PRUEBA DE PIROGENOS.

INTRODUCCION

Las características genéticas del ADN provee a las proteínas que difieran en secuencia y composición de aminoácidos, por lo que cada una posee propiedades ácido-básicas características. Manifiestan una acción anfótera porque sus radicales se disocian como iones positivos y iones negativos, lo cual permite la separación y análisis de mezclas de las mismas por medio de métodos electroforéticos (15,16,20). Estos consisten en someter a las proteínas a la acción de un campo eléctrico en un medio de soporte, la rapidez de desplazamiento depende de la magnitud de la carga de los radicales de cada partícula, de la viscosidad del medio, del voltaje del campo eléctrico y de otros factores. Si el pH se encuentra por arriba del punto isoeléctrico de la proteína posee carga eléctrica negativa y se desplaza hacia el ánodo, su carga negativa crece a medida que el pH aumenta y viceversa (7,14,15,16).

En 1957 Smithies desarrolló el primer sistema de electroforesis en un medio semisólido al cual denominó electroforesis zonal.

La electroforesis de zona se lleva a cabo en un medio como el gel del amidón, agar o poliacrilamida; el gel actúa como un tamiz por el que migran las proteínas según su tamaño molecular y carga eléctrica; los principales componentes proteícos se separan en distintas zonas o bandas. Este método ha permitido la separación de proteínas séricas y eritrocíticas. Algunos investigadores lo han utilizado para determinar variantes genéticas en diversos sistemas proteínicos (polimorfismos bioquímicos eritrocíticos y séricos)(5,16,23).

Cada individuo posee un fenotipo, el cual es el conjunto de caracteres resultantes de la interacción del medio y el genotipo. Este último se encuentra constituido por una serie de genes que ocupan una posición específica en un cromosoma (locus del gen) (13).

Las variaciones en el patrón electroforético de las proteínas es representativo de las variaciones a nivel genómico del ADN, es decir que los cambios que manifiesten las proteínas a nivel fenotípico seguramente se deben a cambios genotípicos (19).

En la mayoría de las especies animales y vegetales se observa una variabilidad genética, lo cual da lugar a diferencias entre los fenotipos de proteínas, a esta variabilidad se le denomina polimorfismo bioquímico, el cual se llega a correlacionar con algunos rasgos o características externas como forma, color, fin zootécnico, etc. (19).

El estudio del polimorfismo bioquímico de proteínas séricas ha sido analizado con mayor énfasis durante las tres últimas décadas en distintas especies animales y vegetales, encontrándose un gran beneficio ya que permite hacer una selección genética previa con lo que se logra hacer un mejoramiento genético que se manifiesta en un incremento en los niveles de producción de alimentos (19,23).

La determinación de los sistemas bioquímicos en animales se puede dividir en dos grandes grupos:

- 1.-Los sistemas de marcadores bioquímicos eritrocíticos (hemoglobinas, glucosa-6-P- deshidrogenasa, esterasas 1,2 y 3 etc.).
- 2.-Los sistemas bioquímicos plasmáticos y séricos (Transferrinas, prealbúminas, albúminas, postalbúminas, ceruloplasmina, hemopexina, haptoglobulinas, fosfatasa ácida, alfa-2-macroglobulina, esterasas séricas etc.) (23).

Cada uno de estos marcadores se les ha logrado correlacionar con diversas características zootécnicas como producción de leche, resistencia a las parasitosis, identificación de razas equinas, así mismo se han empleado para la identificación

de individuos, determinación de paternidad, estudios de la estructura genética de poblaciones, creación y caracterización de líneas o razas de animales etc.

Los sistemas más empleados son las Transferrinas (Tf), albúminas (Alb) y hemoglobinas (Hb), por estar asociados a una gran variedad de características fenotípicas.

Las transferrinas también se les conoce como siderofilinas, es una glicoproteína con peso molecular de 90,000 y un coeficiente de difusión de 5.2. Normalmente no se encuentra saturada de hierro, el cual participa en la carga eléctrica para la migración electroforética. Cada especie presenta un patrón diferente de Tf, las cuales se manifiestan según la especie, de 2 a 6 variedades diferentes y se heredan por alelos codominantes, por lo que llegan a ser de gran utilidad en las pruebas de paternidad (12,16,24).

El polimorfismo de Tf ha sido observado en la mayoría de las especies mamíferas. En conejos la heterogeneidad electroforética de Tf fué encontrada asociada a su contenido de hierro (4,24). Sus moléculas están compuestas por cadenas simples de polipéptidos con 2 sitios de ligadura, lo que influye en la migración electroforética (24).

Las hemoglobinas son proteínas eritrocíticas que constituye el 90% de la proteína global del eritrocito y se encuentran concentradas en el citoplasma. Presenta 4 subunidades unidas al grupo hem. En la mayoría de las especies domésticas presenta un polimorfismo que se ha asociado a dos alelos que son codominantes por lo que presenta tres fenotipos diferentes A, AB, y B. Se le ha asociado con resistencia a parasitosis, niveles de fijación de oxígeno, etc. (12,16).

Las albúminas son proteínas plasmáticas que se encuentran abundantemente en el suero, tiene un peso molecular de 69,000 y un coeficiente de difusión de 6.1, intervienen en la regulación osmótica y transporte de ácidos grasos. Al igual que las hemoglobinas, en la mayoría de las especies presenta tres fenotipos diferentes asociados a dos alelos codominantes identificados como R, RL y L (rápida, rápida-lenta y lenta) (12,16).

La prueba de pirógenos consiste en el registro de los aumentos de la temperatura del conejo como respuesta a la presencia de agentes pirogénicos (endotoxinas) los cuales pueden encontrarse en una solución inyectable (20).

Los protocolos de la prueba de pirógenos establecen el empleo del conejo Nueva Zelanda Blanco puro, lo que indica que se debe excluir todo animal con contaminación genética de otras razas (20,21).

JUSTIFICACION

En el presente trabajo se pretende determinar si existe un polimorfismo bioquímico de los sistemas de Tf, Alb y Hb y si estos se asocian a las razas de conejos, con la finalidad de tener una prueba de control de calidad de los conejos que se emplean en las pruebas de pirógenos y lograr así la total confiabilidad del control de los fármacos.

HIPOTESIS

Si los conejos empleados en la industria farmacéutica en las pruebas de pirógenos son de la raza Nueva Zelanda Blanco, entonces no deberán observarse cambios en los patrones electroforéticos en los fenotipos de Tf, Alb y Hb con relación a conejos Nueva Zelanda Blancos de registro, y serán diferentes a los fenotipos de marcadores bioquímicos sanguíneos que presenten los conejos de raza Chinchilla.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si existen variaciones en los fenotipos de marcadores bioquímicos sanguíneos en conejos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- a) Determinar si existe un polimorfismo bioquímico entre los fenotipos electroforéticos de Tf, Alb y Hb de conejos Nueva Zelanda Blanco de registro y los conejos empleados en la industria farmacéutica en las pruebas de pirógenos así como con conejos de la raza Chinchilla.
- b) Determinar si la electroforesis de marcadores bioquímicos sanguíneos se puede establecer como prueba de control de calidad de razas de animales empleados en pruebas de constatación.
- c) Determinar si la electroforesis de marcadores bioquímicos sanguíneos es útil en la selección de conejos para mejoramiento genético.

PROCEDIMIENTO.

MATERIAL Y METODO:

MUESTRAS SANGUINEAS.

Se tomaron muestras sanguíneas de 6 conejos de raza Nueva Zelanda Blanco con registro provenientes del Bioterio del Centro Nacional de Salud Pública, (los cuales se utilizaron como controles absolutos positivos de la prueba), 9 conejos de raza Nueva Zelanda Blancos (experimentales) producidos en una granja de producción cuyos animales se comercializan para el desarrollo de la prueba de pirógenos en la industria farmacéutica y para consumo de carne y 3 conejos de raza Chinchilla (control negativo) provenientes del C.E.I.E.P.A. de la F.M.V.Z.

Fueron muestreados por punción auricular y/o punción cardiaca obteniendo 6 ml por conejo, 3 ml de los cuales se colocaron con anticoagulante (EDTA al 1.5% en una relación de 1:10) para obtener eritrocitos y los otros 3 ml se dejaron para que se formara el coágulo y obtener el suero.

Para la obtención de eritrocitos en la determinación de hemoglobina las muestras sanguíneas con EDTA se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm.

Para la obtención de suero se deja reposar la sangre coagulada en refrigeración a 5° C, el suero se obtuvo mediante el centrifugado de la muestra durante 20 minutos a 3000 rpm.

Tanto los eritrocitos como el suero se congelaron hasta su utilización.

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS:

Soluciones Amortiguadoras para la determinación de Hemoglobinas:

Solución amortiguadora para el gel:

0.6M de Tris (22.2g/lit), 0.3M EDTA (2g/lit), 0.01M Acido Bórico (1.5g/lit) para obtener un ph de 8.7.

Solución amortiguadora para electrodos:

Se emplea el mismo que el utilizado para el gel

Solución Amortiguadora para la determinación de Transferrinas.

Solución amortiguadora de electrodos:

0.3M Acido Bórico (18.55g/lt), 0.1M Hidróxido de Sodio (4gr/lt), para obtener un ph de 8.9.

Solución Amortiguadora para la determinación de Albúminas.

Solución amortiguadora del gel:

14ml de solución A, 9 ml de solución B cbp 250ml de agua destilada. El ph debe de ser de 6.3.

Solución amortiguadora de electrodos:

0.3M Acido Bórico (18.55g/lt), 0.1M Hidróxido de Sodio (4g/lt) para obtener un ph de 8.9

PREPARACION DE GELES:

- 1.- Se prepara el gel de almidón de papa utilizando una cantidad preestablecida de almidón hidrolizado con 250 ml de solución amortiguadora (solución Buffer del gel).
- 2.- Se suspende el almidón en 12 ml de la solución amortiguadora, la cual se diluye previamente en una proporción de 1:30 con agua destilada. Esto es con la finalidad de producir una suspensión homogénea del almidón y facilitar el gelificado.

- 3.- Se le agrega el resto de la solución amortiguadora en ebullición, se mezcla y se pone a fuego para concluir la hidrólisis y permitir así una mejor gelificación.
- 4.- La mezcla se desgasifica para evitar la formación de burbujas al vaciarlo en el molde.
- 5.- Se deja gelificar por 4 a 8 horas

DETERMINACION DE HEMOGLOBINAS

Las muestras de eritrocitos centrifugados se lavan 3 veces con solución salina fisiológica y después se lisan con agua destilada a una dilución 1:50 (14,17).

En el gel se traza una línea a 2.5 cm del borde y se corta con un bisturí donde se depositan las muestras en pequeños papeles filtro embebidos con el producto del lisado de eritrocitos.

El gel se coloca sobre una cámara de electroforesis con la solución amortiguadora de electrodos y se conectan estos al gel.

El voltaje utilizado fué de 150-200 volts y con 15 a 25 miliAmperes. La muestra puede correr de 3.5 a 13cm. Una vez que migraron se divide el gel longitudinalmente en dos capas, se separan y se tiñen con amido negro al 0.1% durante 1 minuto, luego se enjuagan con agua corriente (suavemente) y se pasa a la solución lavadora (50% de agua destilada, 50% methanol, 10% ácido acético glacial) para eliminar el exceso de colorante.

La lectura se realiza al día siguiente mediante la observación de las bandas de migración electroforética e interpretandolas de acuerdo a los patrones electroforéticos establecidos que determinan un polimorfismo genético de HbA y HbB. (2,9).

DETERMINACION DE TRANSFERRINAS.

Se utilizó un gel de poliacrilamida, este se prepara en dos porciones: un gel de separación y un gel de inserción o empaque. El primero se elabora con 7.5 ml. de poliacrilamida, 2.5 ml de agua destilada, 5 ml de solución A (ácido cítrico), 5 ml de solución B (Tris) y 10 ml de persulfato de amonio. La solución preparada se desgasifica durante 10 minutos y luego se le aplican 30 microlitros de TEMED y se deposita en las placas de vidrio previamente preparadas.

Una vez gelificada se le adiciona el gel de inserción al 4% preparado con 1.3 ml de poliacrilamida, 3.89 ml de solución A, 3.89 ml de solución B y 0.87ml de persulfato de amonio., se desgasifica durante 5 minutos y luego se le aplican 10 microlitros de TEMED. El gel se mantiene 24 hrs. en refrigeración para un mejor gelificado.

Las muestras se preparan en viales con 2 microlitros de suero, 5 microlitros de azul de bromofenol y 20 microlitros de glucosa.

Una vez colocados los geles en la cámara de electroforesis se aplican las muestras por medio de micropipetas en los pozos del gel de inserción.

La electroforesis se realizó en una fuente de poder CAMAG con un voltaje de 100-200 v. y 50-60 mA. Al terminar de migrar las muestras se retira el gel , se le separa de las placas de vidrio y se le aplica ácido tricloro acético al 12.5% para fijar las proteínas, después se le aplica azul de Coomasie al 0.01% durante 24 hrs para teñir el gel y luego se pasa a solución lavadora para retirar el exceso de colorante y realizar la lectura adecuadamente.

DETERMINACION DE ALBUMINAS.

El gel de almidón se prepara disolviendo 30g almidón hidrolizado en 250 mililitros de solución amortiguadora.

Se sigue el mismo procedimiento que en la determinación de hemoglobinas para realizar la electroforesis.

La electroforesis se realizó a 250-300 volts y 17-20 mA. Las muestras deben migrar 13cm. El gel se divide en 2 partes cortándolo longitudinalmente, se separan y se tiñen con amido negro durante 1 minuto para luego pasarse a la solución lavadora durante 24 hrs.

INTERPRETACION

Se compara el bandeo de las proteínas con los patrones reportados por Andersson et. al. (2) para los fenotipos de Hemoglobinas, Ferrand et. al. (8,9) para los fenotipos de Transferrinas y Ferrand et. al. (12) para los fenotipos de Albúminas.

EVALUACION

La frecuencia de los fenotipos se evaluaran mediante tablas de contingencia para calcular χ^2 a un $\alpha=0.05$.

RESULTADOS

DETERMINACION DE LOS FENOTIPOS DE HEMOGLOBINAS

No se observó polimorfismo en los fenotipos de hemoglobinas en las poblaciones de conejos estudiadas. Solo se observó que su corrimiento electroforético fué más lento que el de las hemoglobinas de bovino.

DETERMINACION DE LOS FENOTIPOS DE TRANSFERRINAS

Se observaron diferentes fenotipos de transferrinas de las tres poblaciones de conejos (figura 1 y 2).

Se logró identificar 4 fenotipos diferentes para las razas de conejo estudiadas, las cuales son: AA, AB, AC, AD (cuadro 1).

Al analizar estadísticamente con la prueba de X^2 se observó diferencias significativas con la raza chinchilla, sin embargo entre los conejos Nueva Zelanda Blanco Puros y los empleados en la industria farmacéutica no hubo diferencias significativas.

DETERMINACION DE LOS FENOTIPOS DE ALBUMINAS

No se logró observar polimorfismo bioquímico de los fenotipos de albúminas en las muestras estudiadas.

FENOTIPOS DE TRANSFERRINAS IDENTIFICADOS EN CONEJOS

RAZA \ TF	AA	AB	AC	AD
NZB PUROS	5	1	-	-
NZB FARMA	6	-	-	3
CHINCHILLA	-	-	3*	-

* = $P > 0.005$

CUADRO 1 . Fenotipos encontrados en los conejos NZB puros, NZB utilizados en la industria farmacéutica y Chinchilla.

FENOTIPOS IDENTIFICADOS EN LOS CONEJOS NZB PUROS Y CHINCHILLA

TF									
FENOTIPO	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AC	AC	AC
No. DE MUESTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9

FIGURA 1. Se ilustran los diferentes fenotipos identificados entre los conejos NZB puros y los conejos chinchilla.

FENOTIPOS IDENTIFICADOS EN LOS CONEJOS NZB FARMACEUTICA

TF

FENOTIPO	AD	AD	AD	AA	AA	AA	AA	AA	AA
No. DE MUESTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9

FIGURA 2. Se ilustran los diferentes fenotipos identificados entre los conejos NZB utilizados en la industria farmacéutica.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La constitución genética es uno de los elementos más importantes a considerar en la selección de un modelo animal para uso en la investigación tomando en cuenta el sexo, raza edad, etc. La electroforesis de marcadores bioquímicos sanguíneos se utiliza como una gran ayuda para la selección genética de animales (1,6).

ALBUMINAS

Se ha encontrado marcado polimorfismo en conejos silvestres, se menciona que los loci que codifican para las albúminas polimórficas en el conejo silvestre son monomórficas en el conejo doméstico (3).

Ferrand y Rocha encontraron la presencia de 3 alelos comunes (Alb 1, Alb 2, Alb 3) en conejos silvestres portugueses. En la población inglesa de conejos silvestres se detectó solo la presencia de 2 alelos (Alb 1, Alb 2) (11).

En el presente trabajo se observó que las razas estudiadas son monomórficas, sin embargo no se logró identificar los fenotipos de albúminas por no tener una muestra de referencia. Por lo anterior se puede concluir que el empleo de este marcador no se puede utilizar como prueba de constatación de razas de conejos.

Al realizar la electroforesis de transferrinas se observó un polimorfismo en las bandas de post-albúminas por lo que se propone continuar el estudio con estos marcadores para determinar si es empleable en las pruebas de constatación de razas de conejos.

HEMOGLOBINA.

Estudios en la secuencia y composición de péptidos de aminoácidos han revelado polimorfismo genético en la hemoglobina, encontrándose HbA y HbB (2).

En hemolisados de muestras sanguíneas conejos de raza Chinchilla, Beliers se encontraron 2 variantes de Hemoglobina (HbA, HbB) controlados por 2 alelos codominantes autosómicos (2).

En HbA se han observado 3 alelos codominantes en un locus autosómico (HbA 1, HbA 2, HbA 3) (8).

En HbB también se observó un polimorfismo controlados por alelos de un locus autosómico (HbB1, HbB 2) (9).

Se ha encontrado una relación genética entre animales albinos y la presencia del loci HbB en conejos, ratas y ratones (18).

Al igual que en las albúminas se observó que en los conejos estudiados no se presentó un polimorfismo en estas proteínas y al no tener una proteína patrón de referencia no se pudo identificar el fenotipo, sin embargo por los estudios realizados por Sandberg consideramos que el fenotipo correspondiente es el "B" para todas las razas estudiadas.

Por todo lo anterior concluimos que por medio de la determinación de Hb como marcador bioquímico sanguíneo no es posible utilizarse como prueba de control de calidad para razas de conejos.

TRANSFERRINAS

En conejos silvestres se observó la presencia de 2 alelos en el locus de Tf (TfA, TfB) (10). En 1987 se encontró la presencia de 2 nuevos alelos (TfC y TfD) en el mismo locus (10).

En el presente trabajo se observaron los cuatro fenotipos de transferrina descritos, los cuales se asociaron todos con el alelo A.

El análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas entre las dos poblaciones de conejos Nueva Zelanda Blanco, sin embargo si las hubo con relación a los conejos de raza Chinchilla (cuadro 1).

Debido al gran polimorfismo que presentan los conejos y las variaciones entre raza podemos concluir que el sistema de transferrinas puede ser ideal para el control de calidad de las razas de conejos empleados en la industria farmacéutica así como una excelente herramienta en la selección genética, sin embargo consideramos

que se requiere una mayor muestra de sueros para determinar las frecuencias de fenotipos y así concluir si existe una correlación entre fenotipo y raza.

También se observó que la mayoría de los conejos NZB presentaban el fenotipo AA y solo unos pocos los fenotipos AB y AD (cuadro 1), por lo que se considera importante incluir otras razas blancas como los conejos de raza California para descartar la posibilidad de que el loci AA de Tf esté asociado con color y no con la raza.

Se propone continuar el presente trabajo empleando otros marcadores bioquímicos sanguíneos para normalizar las pruebas de control de calidad de los animales empleados en investigación así como en la industria.

LITERATURA CITADA:

- 1.- Allen R.C., Watson D:F: Paper Electrophoretic Analysis of rabbit, serum asi an Aid in the selection of experimental rabbits, Animal Journal Veterinary Research, Virginia 1001-1003 (1958).
- 2.- Andersson L., S. Vengtsson, et al.: Genetic variation of Haemoglobin A and B chains in rabbits detected by isoelectric focusing and reversed phase chromatography, Animal Blood Groups Biochemical Genetics, Vol. 16, No. 1, 41-50 (1985).
- 3.- Arana A., et al. : Blood Biochemical polymorphisms asi markers for genetics characteristics of wild Spanish and Domestic rabbits, Genetica, Vol. 79, No. 1, 1-9 (1989).
- 4.- Arana A. et al.: Evidence for transferrin polymorphism in Spanish wild rabbits, Animal Genetics, Vol. 18, 125-131 (1987).
- 5.- Basurto Alcántara Francisco J.: Elaboración y estandarización del almidón hidrolizado de papa (Solanum tuberosum) para determinar marcadores bioquímicos sanguíneos en animales, Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M, (1984).
- 6.- C. Max Lang : The Importance of Animal Genetics, Healt and the Environmet in Biomedical Research, Ed. Academic Press INC, USA,1983.
- 7.- Castagnino Juan M.: Electroforesis de proteínas, Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Vol.22, No. 1, 33-49 (1988).
- 8.- Ferrand,N.: Biochemical and genetic studies on rabbit hemoglobin I, electrophoretic polymorphism of the B-chain , Biochemical Genetics, Vol 27 (1989).

- 9.- Ferrand, N.: Biochemical and genetics studies on rabbits hemoglobin II, electrophoretic polymorphism of the A-chain, *Biochemical Genetics*, Vol 27, No.11-12, 673-678 (1989).
- 10.- Ferrand, et. al.: Transferrin (Tf) polymorphism in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics*, Vol 19, 295-300 (1988).
- 11.- Ferrand, N., Rocha J.: Genetic polymorphism of serum albumin in wild rabbits populations, *Animal Genetics*, Vol. 19, 36 (1992).
- 12.- Ganong, W. : *Fisiología Médica*, 10a. edición, ed. El Manual Moderno, México D.F. 1986.
- 13.- Gardner Eldon J.: *Principios de Genética*, 5a. edición, Ed. Limusa, México 1979.
- 14.- Gordon A. H.: *Electroforesis de Proteínas en geles de poliacrilamida y de almidón*, Ed. El Manual Moderno, México 1975.
- 15.- Laguna José *Bioquímica*, 2a. edición, Ed. La Prensa Médica Mexicana, México 1977.
- 16.- Lehninger Albert L.: *Bioquímica*, 2a. edición, Ed. Omega, Barcelona 1991.
- 17.- Morilla A. G. y Bautista C. R.: *Manual de Inmunología*, Ed. Diana, México 1986.
- 18.- Sandberg K., Andersson L.: Linkage of albino and hemoglobin B chain loci in the rabbit, *J. Hered* Vol 78, no.2, 124-125 (1987).
- 19.- Santiago Cuetos José Salim: *Determinación de marcadores bioquímicos sanguíneos (TF, Hb, alb séricas) en Codorniz común, Faisan doméstico, Ganso común, Paloma doméstica y Pato pekin*, Tesis de Licenciatura, Fac. Med. Vet. Zoot., U.N.A.M. (1986).

- 20.- Secretaría de Salud : Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a. ed., Secretaría de Salud, México D.F., 1988.
- 21.- U S P XXII NF XVII, United States Pharmacopeia the National Formulary, 22a revisión, Enero, 1990.
- 22.- Watson James D.: Biología Molecular del Gen, Ed. Fondo Educativo Interamericano, España 1978.
- 23.- Zaragoza, M.P., Arana, A.: Marcadores genéticos en cunicultura I, Estudios electroforéticos en conejos II, Facultad de Veterinaria Zaragoza, España, 1987.
- 24.- Zaragoza, P. , Arana, A.: Relationship between rabbit transferrin electrophoretic patterns and plasma iron concentrations, Animal Genetics, Vol. 18, 51-60 (1987).