



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EVALUACION DE LA VARIACION GENICA EN
UNA LINEA DE CONEJOS NUEVA ZELANDA**

Oryctolagus cuniculus

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
(**BIOLOGIA CELULAR**)
P R E S E N T A
NILZA VELASCO PALOMINO

DIRECTOR DE TESIS

DR. JAIME MARTINEZ MEDELLIN (†)

0000000000
MEXICO, D. F.



1995

BIBLIOTECA
CENTRO DE ESTUDIOS



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.

A mis padres, a mis hermanos y demás familiares por brindarme el cariño y el apoyo necesarios para alcanzar esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Respeto, cariño y profundo reconocimiento a todas las personas e instituciones que de una u otra manera contribuyeron a la feliz realización de esta investigación.

- Deseo resaltar los nombres del **Dr. Jaime Martínez Medellín†** por su acertada dirección tutorial; a la **Dra. Alejandra Mainero del Paso** porque con su dedicación magisterial y su claridad investigativa posibilitó la culminación exitosa de esta tesis y a la **M. en C. Nidia Pérez Nasser** por su oportuna asesoría e introducción en la técnica de la electroforesis, base de este estudio.

Así mismo, agradezco a todos y cada uno de los miembros del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias y a los miembros del laboratorio de Genética y Evolución del Centro de Ecología.

Para todos: ¡ Gracias !

Gracias a los integrantes del jurado:

Dr. Jaime Martínez Medellín †
Dra. Alejandra Mainero del Paso
M. en C. Nidia Pérez Nasser
M. en C. Georgina Garza Ramos
Dr. Luis Eguiarte Fruns
M. en C. Luisa Alba Lois
Dr. José Pedraza Chaverri
Dr. Adrian Montes de Oca

Por su valiosa revisión y corrección del texto final de la tesis.

INDICE

	Páginas
Resumen	1
I. Introducción	2
1.0. Organismos isogénicos	2
1.1. Anemia experimental	4
1.2. Evolución	5
1.3. Medición de los niveles de variación genética	7
1.4. Isoenzimas	9
II. Objetivos	11
III. Materiales y Métodos	12
1.0. Análisis de los parámetros hematológicos	12
1.1. Determinación de hierro	13
1.2. Determinación de la concentración de la transferrina	13
1.3. Actividad de la ceruloplasmina	14
1.4. Albúmina	15
1.5. Proteína total	15
2.0. Variación genética	17
2.1. Electroforesis	17
2.2. Preparación del gel	17
2.3. Sistema de amortiguador	17
2.4. Aplicación de las muestras y corrimiento del gel	18
2.5. Tinciones de la actividad enzimática	20
2.6. Interpretación de geles	20
2.7. Análisis de datos	21
IV. Resultados	24
1.0. Colonia de conejos	24
1.1. Parámetros hematológicos	26
2.0. Sistemas enzimáticos	27
2.1. Variación genética enzimática	33
2.2. Frecuencias alélicas y heterocigosis	34
2.3. Índices de fijación F	40
V. Discusión	42
1.0. Parámetros hematológicos	42
2.0. Variación genética	44
VI. Conclusiones	47
Bibliografía	48
Apéndice	55

RESUMEN

Existen pocos trabajos sobre la variabilidad genética en las poblaciones de conejos *Oryctolagus cuniculus*. Aquí reportamos un estudio sobre dicha variabilidad en dos colonias de conejos Nueva Zelanda: una abierta, establecida con fines comerciales, y otra de nuestro laboratorio (Biología Molecular), emparentada entre sí durante más de 10 años. La finalidad fue determinar el grado de consanguinidad en esta población para saber si se trataba de organismos endogámicos.

La colonia cerrada es el resultado de la selección de los conejos más resistentes a un proceso de anemia experimental. Se determinaron y compararon en ambas colonias los parámetros hematológicos, así como los valores séricos de la transferrina, ceruloplasmina, niveles de hierro, proteína total y albúmina.

Se determinaron los patrones de actividad para 20 isoenzimas presentes en hemolizados de 10 individuos diferentes para cada una de las colonias, por electroforesis en geles horizontales de almidón. Los zimogramas fueron interpretados y sus correspondientes genotipos fueron analizados por medio del programa Biosys para variación genética.

Los resultados de este estudio muestran que en la colonia cerrada hay una disminución significativa en el número de loci polimórficos en relación con la abierta. La heterocigosis observada con respecto a la esperada y el análisis del árbol genealógico nos llevan a concluir que la colonia cerrada presenta un coeficiente de endogamia cercano al 50.00%.

La colonia abierta presenta un grado mayor de variación génica con respecto a la cerrada, aun cuando debido a las restricciones de apareamiento entre ellos por tratarse de una línea comercial, tiene un cierto grado de consanguinidad 20.00%.

I. INTRODUCCION

1.0. ORGANISMOS ISOGENICOS

Los mejores animales para la mayoría de las investigaciones biomédicas son las cepas endogámicas o consanguíneas, es decir, los animales producto de más de veinte generaciones de cruces entre hermanos. La uniformidad de características que se logra, debido a la homogeneidad genética (isogenia), permite el uso de menor número de animales para cada experimento, pues presentan poca variabilidad entre ellos y brindan una alta reproducibilidad (Festing 1972; Lyon 1978; Castillo 1985).

El efecto teórico primario de la endogamia es la tendencia hacia la fijación al azar en cada línea de una combinación de genes que son heteroalélicos en la población original; la diferenciación entre líneas es una consecuencia inmediata (Wright 1977).

Actualmente, se sabe que en las diversas cepas isogénicas para alcanzar la consanguinidad deben aparearse hermanos con hermanas o hijos con sus progenitores (retrocruzas); el cruce de hermanos verdaderos da lugar en la misma generación a un coeficiente de consanguinidad del 25 %; esta velocidad aumenta en las generaciones subsiguientes, debido a que la heterocigosis va siendo menor a través de las generaciones. Esto significa que al cabo de 20 generaciones se obtiene el 98.4 % de consanguinidad y es teóricamente cuando se considera a los organismos homocigóticos (Festing 1979; Castillo 1985; Falconer 1986). Sin embargo, una vez alcanzado este grado de consanguinidad (homocigosis) con las características propias de una línea isogénica de animales, éstas deben mantenerse estables y uniformes pues puede ocurrir variación fenotípica de origen genético.

Las principales características de las cepas endogámicas que las convierten en instrumentos valiosos para la investigación son:

1. **Estabilidad genética a largo plazo:** las cepas isogénicas permanecen constantes genéticamente durante largos periodos de tiempo. A pesar de que pueden ocurrir cambios genéticos como resultado de las mutaciones, la probabilidad es mucho menor que en la cepa abierta.
2. **Isogenicidad:** todos los individuos de una cepa son genéticamente idénticos. Así, injertos de piel y tumores pueden ser transplantados dentro de una cepa sin rechazo inmunológico, similarmente los polimorfismos bioquímicos e inmunológicos determinados pueden ser estudiados en un solo animal para caracterizar a toda la cepa.
3. **Homocigosidad:** los animales endogámicos son homocigóticos en prácticamente todos los loci.
4. **Distribución internacional:** muchas de las cepas endogámicas de ratas y ratones tienen una distribución internacional, de tal manera que pueden hacerse comparaciones de los resultados de las investigaciones al utilizar animales genéticamente idénticos.
5. **Identificabilidad:** Muchas cepas endogámicas pueden ser identificadas por sus características inmunológicas y bioquímicas reduciendo así la posibilidad de contaminación genética no controlada.
6. **Uniformidad:** La eliminación de variación genética que ocurre durante la endogamia significa que para muchos caracteres poligénicos heredados, las cepas endogámicas son más uniformes que las poblaciones abiertas. Esto significa que se necesitan menos animales endogámicos en un experimento para lograr la precisión estadística deseada.

7. Individualidad: Cada cepa endogámica representa un genotipo único que a menudo lleva a un fenotipo de interés biomédico. Cada cepa tiene patrones de desarrollo, conducta, repuesta a infecciones, antígenos y toxinas así como algunas enfermedades espontáneas.

Desde principios del siglo se iniciaron estudios sobre la endogamia en diferentes grupos de animales, los experimentos más antiguos se iniciaron en 1906 con cobayos por G.M. Rommel. Se iniciaron con 35 líneas, pero exclusivamente se mantuvieron 23 con apareamiento entre hermanos. Fue en 1915 cuando Wright se hizo cargo del análisis de los resultados y la continuación de los experimentos. Después de 1917 nuevos apareamientos se hicieron en las 5 líneas más vigorosas para llevar a cabo un intenso estudio; los caracteres vitales estudiados consistieron en dos componentes de fecundidad (crias por camada y camadas por año) y dos componentes de viabilidad perinatal (porcentaje nacido vivo y porcentaje que alcanzó 33 días). Algunas de estas líneas se utilizaron para el estudio de resistencia a la tuberculosis y se han seguido utilizando estos animales para hacer diferentes comparaciones tales como el color, algunas características morfológicas y el temperamento de los animales (Wright 1977).

Helen D.King (1918-1919), poco tiempo después, inició los experimentos con ratas trabajos que se desarrollaron mucho más rápido que con los cobayos debido al intervalo más corto entre generaciones. Se iniciaron 2 líneas que se mantuvieron cuando menos 92 y 106 generaciones entre hermanos. No se encontró evidencias (generación 25) de deterioro de los animales en fertilidad, longevidad o cualquier otro aspecto de vigor constitutivo. Con estas primeras líneas se llevaron a cabo experimentos sobre transplante y hoy en día se conservan líneas de ratas usadas en la investigación (Wright 1977).

Castle en 1901, desarrolló cruza de ratones obteniendo características que iban de acuerdo a la coloración del pelaje y no es, sino hasta 1909, cuando Little obtuvo la primera cepa consanguínea. Años más tarde Snell (1941) contribuyó a la obtención de sublíneas de la cepa obtenida por Little y Tyzzer (1916 en Morse, 1981).

El más extenso uso de animales endogámicos ha sido con ratones. En el Laboratorio Memorial de Jackson se desarrolló un considerable número de cepas, mantenidas exclusivamente por apareamiento de hermanos, las cuales son suficientemente vigorosas en todos aspectos para ser indefinidamente multiplicadas. Cada una de estas cepas tiene una combinación única, de características con respecto al color, morfología y fisiología (Wright 1977).

Con el curso de los años, la utilización de ratones isogénicos en las investigaciones biomédicas ha ido en aumento, ya que la constitución genética es uno de los elementos más importantes a ser considerados en la elección de animales para este estudio. En la actualidad, probablemente, se usan más ratones isogénicos en las investigaciones relacionadas con el cáncer que en cualquier otro tipo de investigaciones (Staats 1976; Foster, Small y Fox 1981).

Los intentos de generar líneas endogámicas en conejos ha sido menos exitosa que en cobayos, ratas o ratones. Chai (1969) reportó 2 líneas en la generación 20, 2 en la 12 y una que desapareció en la catorceava generación. Estas fueron mantenidas principalmente por apareamientos de hermanos, pero tuvieron que hacerse apareamientos ocasionales entre padres con las crías y entre medios hermanos u otros parientes cercanos. Hubo disminución en la conducta de apareamiento, una

disminución en el tamaño promedio de crías por camada en todas las líneas de alrededor de 8 a menos de 4, un incremento en la mortalidad en el nacimiento y disminución en el peso al destete (Wright 1977). No se encuentran descritas líneas endogámicas de conejos, ni estudios a nivel de variación genética. Existe un reporte que presenta la variación de 4 isoenzimas en diferentes poblaciones de conejos relacionados con su organización social (Mykytowycz y Fullager 1973). No solamente se ha tratado de tener líneas endogámicas de los animales utilizados frecuentemente en la experimentación, sino también en ganado, en *Drosophila* e inclusive se ha estudiado en humanos (Wright 1977).

Con la ayuda de estas líneas de animales se ha obtenido y se obtiene, actualmente, mucha información en investigaciones inmunológicas y en estudios sobre la herencia del cáncer y sobre crecimiento y trasplante de tumores. Los ratones isogénicos son usados en las investigaciones de los procesos malignos, así como en el campo de la toxicología, quimioterapia, inmunoterapia y estomatología, en aquellos casos donde se estudia la influencia de suplementos alimenticios sobre una posible acción cancerígena, en la farmacología y en el estudio de algunas enfermedades hereditarias que padece el hombre (Billingham y Silvers 1959; Festing 1972, 1979; Festing y Staats 1973)

Muchas de estas investigaciones han dependido primero de la disponibilidad de la cepa isogénica y muy recientemente del uso generalizado de líneas congénicas y coisogénicas. El término congénico se usa hoy en día para designar cepas producidas por la introducción de un gen en una línea endogámica. Las líneas coisogénicas han sido desarrolladas por retrocruzadas de una mutante o variante, tales como el haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad, en una línea endogámica. Los avances recientes en el entendimiento de los mecanismos del complejo mayor de histocompatibilidad de ratas y ratones habría sido imposible sin el uso de cepas endogámicas y congénicas. Estas cepas endogámicas también han sido usadas en otras disciplinas, aunque en muchos casos su uso no se ha extendido. Esto se debe, principalmente, a que los investigadores no conocen los beneficios del uso de tales animales.

1.1. ANEMIA EXPERIMENTAL

La eritropoyesis en los vertebrados es un proceso bien regulado acoplado a las necesidades fisiológicas del organismo. La eritropoyesis puede incrementar su producción habitual varias veces para compensar la pérdida o destrucción de eritrocitos, o bien puede inhibirse por un exceso de células rojas en la sangre.

La mayoría de estudios que se han hecho para el conocimiento de la dinámica de la eritropoyesis utilizan ratas o ratones y pocos se han hecho en el conejo. En el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, UNAM donde se llevó a cabo esta tesis, se ha desarrollado un modelo de anemia crónica inducido por la remoción diaria de un volumen constante de sangre (Martínez *et al.* 1991). Este modelo presenta las siguientes ventajas:

- 1) Es reproducible y permite el seguimiento diario de diferentes parámetros tales como la producción de células rojas.

2) Involucra la expansión del sistema productor de sangre y por lo tanto los niveles de los factores reguladores tales como la eritropoyetina y la prostaglandina E₁, también deben estar elevadas en la sangre.

3) Pueden tomarse muestras sanguíneas sin alteraciones en las características generales del sistema ya que la remoción de sangre es necesaria para el equilibrio.

En condiciones normales, la producción de células sanguíneas se encuentra balanceada con su destrucción por mecanismos reguladores complejos; sin embargo, cuando la pérdida de células se incrementa por sangrado crónico, deben ser varios los procesos que se activan, ya que el sistema hematopoyético es capaz de incrementar el aporte de células fisiológicamente activas.

Al inducir un estado de anemia por sangrado diario, los mecanismos productores de células sanguíneas se ven amplificados lo cual nos permite estudiar la cinética de aparición de las células, y nos ayuda a entender los mecanismos generales reguladores de la hematopoyesis.

Este sistema de anemia experimental alcanza el equilibrio después de 11 días de sangrado cuando el número de eritrocitos removidos iguala al de eritrocitos formados cada 24 horas. En la población de células rojas en la etapa de equilibrio durante la anemia crónica, el contenido corpuscular medio de hemoglobina es mayor (MCH), la concentración corpuscular de hemoglobina (MCHC) es menor y el volumen corpuscular es mayor (MCV) que en la población de células rojas en condiciones de control o no normales. La anemia es caracterizada como macrocítica y ligeramente hipocrómica, aunque los eritrocitos contienen más hemoglobina por célula. Sin embargo, los tamaños de las células de cada etapa de maduración de los precursores eritroides en la médula ósea aumentan significativamente a partir del 4^o día de sangrado (Mayani 1984). Así, el carácter macrocítico de la anemia es debido no solamente al incremento en el número de reticulocitos, los cuales son mayores que los eritrocitos, sino también a la aparición de reticulocitos y eritrocitos macrocíticos en la circulación. Estas células son más grandes como resultado de la presencia de las células precursoras de eritrocitos macrocíticos en la médula ósea durante la anemia (Martínez *et al.* 1991).

En los trabajos realizados anteriormente se utilizaron conejos obtenidos de un bioterio los cuales se sangraban durante 21 días, para inducir una anemia crónica experimental. A partir de 1981 se escogió de los conejos sobrevivientes a la anemia crónica a un macho y a dos hembras que se utilizaron como pie de cría; los descendientes de estas primeras cruza fueron utilizados para experimentos de anemia crónica y entre ellos se seleccionó a los que mejor respondían al sangrado considerando el número de células rojas alcanzadas en el equilibrio, para cruzarlos entre sí.

Actualmente, después de 13 generaciones los conejos muestran una disminución notable en el número de gazapos por camada (2-5), así como, ocasionalmente, deformaciones en la cintura pélvica y en las extremidades. Con esta colonia de conejos se trató de dilucidar si se tenía una colonia endogámica o no.

Por lo anterior, se estudió la variación genética de esta colonia y se comparó con una colonia comercial, más abierta. Dado que la colonia establecida en el laboratorio había sido seleccionada, parcialmente, por su capacidad de respuesta a la anemia crónica y porque los caracteres hematológicos son hereditarios se compararon ciertos parámetros de la sangre de las dos colonias

para ver si alguno de ellos había variado, lo que indicaría un posible efecto de esta selección en la colonia cerrada.

1.2. EVOLUCION

El cambio evolutivo se produce en las poblaciones, no en los individuos. El individuo nace, crece y, finalmente, muere. Desde el punto de vista evolutivo, el individuo es efímero; sólo la población es continua; la continuidad deriva del mecanismo de la herencia biológica. Los organismos individuales pueden cambiar a lo largo de su vida, pero la constitución genética permanece por lo general constante. Por el contrario la constitución genética de una población puede cambiar de una generación a otra, y así sucede por lo general. La evolución consiste en cambios en la constitución genética de las poblaciones (Ayala 1980).

Los niveles y patrones de variación genética juegan un papel muy importante para determinar el potencial evolutivo de una especie o población. Estos patrones de variación genética están determinados por el efecto de cinco procesos evolutivos fundamentales: 1. deriva génica, 2. migración (flujo génico), 3. sistemas de apareamiento, 4. mutación y 5. selección natural.

Los estudios de variación genética involucran dos aspectos principalmente: el primero se refiere a la descripción de los niveles de variación mantenida dentro de las poblaciones; el segundo, concierne a la manera como está repartida la variación entre las poblaciones y tiene particular importancia para la conservación de recursos genéticos.

La mutación es la fuente última de toda la variación genética. La migración o flujo génico de una población a otra de la misma especie puede aumentar la variación genética en las poblaciones locales. Por otro lado, las poblaciones se diferencian dependiendo de la magnitud y direccionalidad del movimiento de genes. Los niveles altos de flujo génico aumentan el tamaño efectivo de las poblaciones y reducen la diferenciación local por deriva génica o selección natural. Si por el contrario el flujo de genes es limitado, se reduce el tamaño efectivo de las poblaciones y aumenta la diferenciación entre subpoblaciones.

La selección natural puede simplemente definirse como la reproducción diferencial de variantes genéticas alternativas. Los organismos que poseen características genéticas útiles para sus portadores, como son las adaptaciones al ambiente, es probable que dejen más progenie que los organismos con características genéticas alternativas, menos adaptativas. Las características con mayor adaptación aumentarán la frecuencia a través de las generaciones, mientras que las de menor adaptación disminuirán de frecuencia.

La mutación, migración y deriva genética son procesos al azar respecto a la selección; y las frecuencias génicas cambian independientemente de si son útiles a sus portadores como adaptaciones. La selección natural es el único proceso evolutivo que es direccional respecto a la adaptación. La naturaleza adaptativa de los organismos y de sus estructuras, fisiología y comportamiento es debida a la selección natural.

El potencial evolutivo de una población está determinado por el grado de variación genética que existe en la población. Así la selección natural al igual que la deriva genética, solamente, pueden tener lugar en poblaciones que posean variabilidad genética. A mayor variación genética en una población, mayor será la oportunidad para que opere la selección natural. Por consiguiente, un requisito para entender la biología evolutiva de una especie es el conocimiento de su variación genética (Lewontin 1967; Endler 1973; Slatkin 1980).

1.3. MEDICION DE LOS NIVELES DE VARIACION GENETICA

Actualmente, son muy numerosos los estudios que se han hecho en plantas y animales sobre los niveles de variación genética. Los niveles de variación genética juegan un papel muy importante al determinar el potencial evolutivo de una especie o población y en la mayoría de las poblaciones naturales se manifiesta a través de alelos múltiples en un cierto número de loci. Los estudios de variación genética involucran la aplicación de técnicas bioquímicas, principalmente electroforesis, para obtener índices de variación genética. Estos índices son generalmente cuantificados en términos de porcentaje de loci polimórficos por población, número efectivo de alelos por locus, proporción promedio de loci heterocigos por individuo y la heterocigosidad o frecuencia promedio de individuos heterocigotos en un número representativo de loci, por lo general 10 como mínimo (Crow y Kimura 1970; Hartl 1980; Ayala 1980; Hedrick 1983; Futuyma 1986; Hamrick y Loveless 1986; Nei 1987).

Utilizando marcadores enzimáticos se ha encontrado que los vertebrados presentan menor variación que los invertebrados (Nevo 1978); y que las poblaciones de plantas tienen altos niveles de variación similares a las de los invertebrados (Hamrick, Linhart y Mitton 1979).

La combinación de la electroforesis en geles de almidón (Murphy R. W. *et al.* 1990) con métodos de tinción histoquímicos (Hunter y Markert 1957) proporcionó una poderosa técnica para la investigación de la distribución genética en poblaciones naturales. Su aplicación pronto condujo al importante descubrimiento de las isoenzimas o formas moleculares múltiples de una enzima (Markert y Mollert 1959). La técnica del zimograma fue introducida en la biología de poblaciones cuando Lewontin y Hubby (1966) y Harris (1966) intentaron medir sistemáticamente la variación genética en poblaciones naturales seleccionando muestras de proteínas elegidas al azar para encontrar las aloenzimas, que son variantes genéticas para un mismo locus de algunas de las isoenzimas.

Dicha técnica ha servido para estudiar las frecuencias alélicas para numerosos loci controlados enzimáticamente, y otras proteínas en poblaciones silvestres del ratón casero *Mus musculus*, una especie que en su forma domesticada, ha sido prominente en las investigaciones de las bases genéticas del polimorfismo de proteínas (Lush 1967; Selander *et al.* 1969).

Los principales objetivos en la investigación de proteínas por medios electroforéticos para la especie de ratón casero han sido: 1. cuantificar la proporción de loci polimórficos en la reserva de genes de poblaciones silvestres. 2. comparar las subespecies y grupos de subespecies del ratón casero con respecto al carácter genético total. 3. determinar los efectos de la estructura de población sobre los patrones de variación genética. 4. medir la variación interpoblacional de las frecuencias alélicas en diferentes loci, y al describir los patrones geográficos de variación dotar de una base para investigaciones futuras sobre posibles factores de selección, responsables del mantenimiento de los

polimorfismos de proteínas. Así los métodos electroforéticos permiten estudiar la variación entre organismos y establecer relaciones evolutivas (King y Wilson 1975; O'Brien *et al.* 1983).

Las investigaciones en ratón casero van en forma paralela con aquellas relacionadas con el polimorfismo de proteínas en humano (Harris 1966, 1967; Harris *et al.* 1968; Lush 1967) y en poblaciones de *Drosophila* (Lewontin y Hubby 1966; Johnson *et al.* 1966; Hubby y Throckmorton 1968; Selander, Yang y Hunt 1969; Selander y Yang 1969).

Se han hecho estudios comparativos entre el hombre y varios géneros de mono utilizando medios electroforéticos basados en los procedimientos de Ayala *et al.* (1972) y Bruce y Ayala (1979). Estas técnicas electroforéticas proporcionan menos información para cada proteína que la secuenciación de proteínas o aún la inmunología, pero esta desventaja queda más que compensada por el estudio de un gran número de proteínas.

Selander, *et al.* (1971) estudiaron el polimorfismo de las proteínas en el ratón de campo *Peromyscus polionotus*, para analizar los patrones geográficos de variación en las frecuencias de alelos; determinar los niveles de heterocigosidad génica y las relaciones genéticas de poblaciones definidas como subespecies por criterios sistemáticos convencionales.

También se ha estudiado la variación genética en proteínas de dos subespecies europeas de ratones silvestres *Mus musculus*, como un medio para valorar la proporción de loci polimórficos en el genoma total. De los 40 loci que controlan las 35 enzimas y proteínas no enzimáticas estudiadas el 30 % fueron polimórficos, una proporción muy similar a la obtenida para *Drosophila* y humano (Petras y Biddle 1967, Selander *et al.* 1969).

En estudios de variación de aloenzimas en dos poblaciones de rata canguro *Dipodomys spectabilis* para analizar la heterogeneidad génica intra e interpoblacionalmente, pues se han encontrado niveles desusualmente bajos de variabilidad en estas poblaciones (Hamilton *et al.* 1987; Selander 1970; Johnson y Selander 1971; Elliott *et al.* 1989). Todos los individuos fueron examinados para 27 loci y dieron resultados registrables, ya que estas ratas exhiben niveles de variación genética comparables a los de otras especies de roedores (Nevo 1978; Maruyama y Kimura 1980).

El conejo silvestre *Oryctolagus cuniculus* también ha sido una especie ideal para el estudio de las influencias de la organización social en la estructura genética de la población por cuatro razones: 1. es relativamente fácil observar la organización social de sus poblaciones. 2. presentan marcadores genéticos convenientes. 3. se conoce con detalle la ecología del conejo. 4. su organización social en poblaciones pequeñas está bien descrita (Myers y Poole 1962; Mykytowycz y Fullager 1973; Richardson *et al.* 1980). En el trabajo de Daly (1981) se examinaron 4 enzimas polimórficas en el conejo: adenosina deaminasa (ADA), anhidrasa carbónica (CA), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD) y esterasa (EST) en 1300 muestras de sangre de conejos. Tanto para los gazapos como para los jóvenes y adultos no se encontraron desviaciones a las proporciones de Hardy-Weinberg ni en los valores de H excepto para la esterasa que presentó una deficiencia de heterocigos.

También se reporta en este estudio que la estructura social de los conejos en las poblaciones afecta la frecuencia génica. El principal factor es el comportamiento sedentario de los adultos, que los

aisla en un hábitat favorable en donde pueden tener una mayor reproducción y pueden contribuir más a la reserva de genes de las siguientes generaciones. Como resultado de esto, la heterogeneidad en el medio ambiente puede conducir a diferentes tasas reproductivas entre grupos sociales. Así la heterogeneidad del medio en una área pequeña del hábitat de los conejos parece ser importante porque amortigua a la población contra las irregularidades climáticas.

Los resultados se compararon con los obtenidos para otros mamíferos pequeños y aves donde la organización social no tiene las consecuencias esperadas. Esto cuestiona el postulado de que la organización social es importante para dirigir los cambios evolutivos en algunas poblaciones de mamíferos.

1.4. ISOENZIMAS

Las isoenzimas son formas moleculares múltiples de una enzima dada, están presentes en uno o varios individuos de la misma especie, comparten cuando menos un sustrato en común y han resultado ser excelentes indicadores de la variación genética en un grupo de organismos (Markert 1968).

Entre las ventajas de estas moléculas como marcadores genéticos se encuentran: a) El análisis puede efectuarse con un gran número de individuos pues se requieren pequeños volúmenes de muestra de tejido, b) las isoenzimas alélicas (aloenzimas), se expresan de manera codominante, es decir, ambos alelos se manifiestan fenotípicamente en los heterocigotos, c) además pueden variar en los diferentes tejidos (tejido-específico) y en diferentes etapas del ciclo de vida de los organismos (Brewer 1970; Harris y Hopkinson 1976; Rider y Taylor 1980).

La electroforesis de proteínas hoy en día se encuentra entre los métodos más eficientes para la investigación de fenómenos genéticos a nivel molecular. Usando métodos electroforéticos puede obtenerse simultáneamente datos acerca de las enzimas: las isoenzimas y las aloenzimas. Ambas son importantes en la sistemática molecular, e involucran proteínas que pueden ser separadas en función de su carga neta y tamaño. A pesar de que existen otros métodos para la electroforesis de proteínas, el uso de los geles horizontales de almidón se ha ido extendiendo para la obtención de datos que permitan entender la variación genética en las poblaciones naturales así como las relaciones filogenéticas.

La utilización correcta de los datos de isoenzimas requieren que los patrones de bandeo observados en los geles sean interpretados correctamente. La suposición básica que los biólogos evolutivos hacen al utilizar los datos de isoenzimas es que los cambios en la movilidad de las enzimas en un campo eléctrico refleja cambios en la secuencia de DNA que los codifica. Para interpretar el patrón de bandas también debe tenerse información de la estructura de la enzima (número de subunidades) así como de la compartimentalización de las enzimas.

La distribución de las isoenzimas puede predecirse, pueden identificarse individuos homocigóticos y heterocigóticos, y sacarse conclusiones acerca del polimorfismo genético, el sistema de apareamiento de los individuos y la estructura de la población.

El estudio de las isoenzimas nos permite determinar el grado de relación que existe en diferentes poblaciones así como determinar el grado de homocigosis que hay en una población (Ayala *et al.*: 1972). Teniendo una colonia de conejos seleccionados por su resistencia a la inducción de una anemia crónica experimental, se decidió utilizar la electroforesis en geles de almidón de isoenzimas para determinar la variación genética en esta colonia cerrada.

II. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es determinar si la colonia de conejos Nueva Zelanda *Oryctolagus cuniculus* del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, UNAM es una colonia endogámica.

Los objetivos particulares son:

- a) Comparar los parámetros hematológicos de dos colonias de conejos: una comercial y la otra de nuestro laboratorio, para determinar si la selección de los animales más resistentes al sangrado que se utilizaron para generar la colonia cerrada produjo alguna modificación hereditaria.
- b) Determinar los niveles de variación genética en las mismas colonias de conejos, utilizando la técnica de electroforesis de almidón, usando diferentes isoenzimas de la sangre.

III. MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se realizó en dos partes básicamente. La primera parte corresponde al análisis de parámetros hematológicos, datos que proporcionan una información directa acerca de las características de las células rojas circulantes y de su entorno. La segunda parte se refiere al estudio de la variabilidad genética a través del análisis electroforético de las isoenzimas de las células rojas. Para este trabajo se utilizaron 20 conejos Nueva Zelanda *Oryctolagus cuniculus*.

En el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, UNAM, se tiene un modelo experimental en conejos de inducción de anemia crónica por sangrado. Tratando de lograr animales más resistentes al sangrado, se inició la cruce de los mejores organismos sobrevivientes en los experimentos eligiéndose inicialmente un macho y dos hembras en 1981, obteniéndose hasta la fecha trece generaciones. 64 camadas (2-5 crías por camada provenientes de cruces entre los mismos individuos). De esta colonia se trabajó con 10 conejos alimentados *ad libitum* con una dieta de conejina (Purina de México) suplementada con lechuga y zanahorias, los cuales se denominaron colonia cerrada por estar cercanamente emparentados y además relacionados por su capacidad para resistir la anemia experimental. Sus edades fluctúan entre siete meses y tres y medio años, y tiene aproximadamente 3-4 Kg de peso cada uno. Otros 10 conejos denominados colonia abierta son individuos ajenos a la colonia de conejos, procedentes de un criadero (TEPOSPIXCA, Granja de Cunicultura) independiente al laboratorio, con una edad de ocho meses más o menos y un peso similar al de los conejos de la colonia cerrada.

1.0. ANALISIS DE PARAMETROS HEMATOLÓGICOS

Se sangró a los 20 conejos, removiéndoseles por punción cardíaca un volumen de 10 ml/kg peso. La sangre se recolectó con jeringas de vidrio enjuagadas con una solución de NaCl 0.9% p/v, y se tomó una alícuota de 2 ml que se transfirió a un tubo enjuagado con ácido etilendinitrilo tetracético sal disódica (Titriplex III, Merck de México) al 20% en NaCl 0.15 M pH 7.4 como anticoagulante. La sangre restante se transfirió a matraces de vidrio que contenían ácido ϵ amino capríico 2 M como inhibidor de la plasmina, para dar una concentración final en la sangre de 0.02 M y perlas de vidrio. Se agitó hasta la formación del coágulo y se centrifugó en una centrifuga clínica (Clay Adams) a 2,000 rpm durante 15 minutos. Se separó el suero y se guardó por separado para cada uno de los conejos manteniéndose dicha muestra en congelación a -20°C hasta su utilización. Las células rojas se lavaron tres veces con una solución isotónica de NaCl 0.15 M y luego se hemolizaron añadiendo 1 ml gota a gota de agua destilada helada y agitando en el vórtex después de cada adición. Estas células fueron separadas en cuatro alícuotas para cada muestra de sangre de conejo y congeladas en un ultracongelador (Revco de -70 °C) para el análisis de isoenzimas.

Con la alícuota de sangre se determinó: número de células rojas (RBC), volumen corpuscular medio de células rojas (MCV), número de células blancas (WBC), hematocrito (Ht) y la concentración de hemoglobina (Hb). Con estos datos se calculó la concentración media de hemoglobina (MCH) y la concentración corpuscular media de la hemoglobina (MCHC). Estas determinaciones se hicieron en el Coulter Counter modelo ZF y en un Hemoglobímetro (Coulter Electronics, Inc. Hialeah, Fla).

1.1. DETERMINACION DE HIERRO

La concentración de hierro sérico se determinó espectrofotométricamente haciendo uso del ácido batofenantrolin sulfónico el cual reacciona con el hierro libre dando un compuesto de color rosa. La técnica empleada es una variante del método de Shade elaborada por los laboratorios Merck de México, (Merckotest para hierro, Shade *et al.*, 1954); por lo cual se usó el juego de reactivos correspondiente.

Esta técnica se basa en remover el hierro unido a proteínas siderófilas, principalmente el ligado por la transferrina, a través de un cambio en el pH del suero. Para este propósito se utilizó HCl 1 N. Una vez liberado el hierro, las proteínas se precipitan con ácido tricloroacético al 20% p/v, se centrifuga y se toma el sobrenadante en el cual se encuentra el hierro libre y se le agrega ascorbato de sodio para reducir el hierro y una solución de acetato de sodio al 30% para obtener un pH 5.5, y en estas condiciones el hierro puede reaccionar con la batofenantrolina. El producto de esta reacción es un compuesto color rosa cuya concentración puede determinarse espectrofotométricamente, leyendo la absorbancia a 535 nm y comparando la variación de color de la muestra problema con el de una solución patrón de hierro cuya concentración es de 1 µg/ml de Fe.

Para la determinación de hierro se lavó el material de vidrio calentándolo en una solución de Extrán al 5% a 95°C durante una hora. Después se enjuagó con agua destilada y con agua desionizada, para evitar residuos de hierro. Para esta determinación se pipeteó 0.5 ml del suero y 0.5 ml de agua desionizada y 0.5 ml de HCl 1 N y se agitó en un vórtex.

Las muestras se dejaron por 45 minutos a temperatura ambiente y se agregó 0.5 ml de ácido tricloroacético al 20% y se centrifugó durante 30 minutos a 2,500 rpm a 4°C. Se tomó 1 ml del sobrenadante al que se agregó 0.5 ml de acetato de sodio al 30% y 5 mg de ascorbato de sodio.

Esta mezcla se agitó para disolver completamente las sustancias, luego se añadió 0.5 ml del reactivo de coloración y se leyó la extinción de la mezcla a 535 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II contra el blanco y un patrón que contenía 1 µg de Fe/ml; la determinación se hizo en todas las muestras por duplicado.

La concentración de hierro se expresa como µg de hierro/ml y se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Hierro en suero} = \text{Absorbancia del suero} / \text{Absorbancia patrón}$$

1.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE TRANSFERRINA

Este parámetro fue calculado utilizando la técnica de inmunodifusión radial de Mancini, Carbonara y Heremans (1965) que permite obtener datos cuantitativos acerca de la concentración de esta proteína en diferentes muestras de plasma o suero de conejo.

Para esta determinación, se utilizó anticuerpos de borrego contra la transferrina de conejo. Estos anticuerpos se obtuvieron inmunizando a un borrego con la transferrina de conejo purificada a

través de columnas de intercambio iónico. Del suero inmune se obtuvo la fracción de inmunoglobulinas y se liofilizó. Se preparó una solución de agar al 3% p/v en un amortiguador de Tris-barbituratos pH 8.5 y se dejó fundir el agar a 70°C hasta obtener una solución translúcida, la cual se pasó a una probeta y se colocó a baño María a 57°C durante 10 minutos, luego se le agregó una solución concentrada de anticuerpo antitransferrina para obtener una concentración final de 3 mg/ml. Se mezcla bien y se deja por 10 minutos. En una superficie nivelada, se colocaron 6 placas de plástico 2 de las cuales se utilizaron como curvas patrón y 4 para las muestras de suero de conejo. A cada placa se le vació 4 ml de la solución y se dejó solidificar la mezcla agar-anticuerpo.

Cuando solidificó el gel, se perforaron en cada placa 10 pozos, donde se colocaron 5 µl de muestra ya sea de suero o de las diluciones de transferrina de la curva patrón. Las placas se colocaron en una cámara húmeda por 24 horas, tiempo requerido para que se establezca la reacción, después se lavan con NaCl 0.85% tres veces. Se tiñeron con amido negro 10B 0.5% en metanol ácido acético glacial 9:1 durante 10 minutos. Luego se destiñen con ácido acético al 7%. Se leyeron los halos de las placas con el disco de inmunodifusión radial.

1.3. ACTIVIDAD DE LA CERULOPLASMINA

La técnica se basa en la capacidad de la ceruloplasmina para oxidar compuestos aminados tales como la N,N-dimetil-parafenilendiamina (DPD), dando un compuesto colorido. La ceruloplasmina a través de una reacción oxidativa convierte al DPD en una base de Brandowski, último producto de oxidación que puede detectarse en el espectrofotómetro.

Curzon (1961) y Curzon y O'Reilly (1960) utilizaron esta característica como base para establecer un método de cuantificación de la actividad de la ceruloplasmina en el cual puede utilizarse muestras de suero.

Para esta prueba el material debe estar libre de hierro, por lo tanto se hirvió a 95°C durante una hora en Extran al 5% (Merck de México), enjuagando después con agua desionizada.

Para determinar la actividad de la ceruloplasmina se utilizó el suero de cada conejo. Se incubó 15 minutos a 37°C, tomando como tiempo cero cuando se agrega el sustrato (DPD) a la mezcla de incubación. La reacción se para agregando 2 ml de azida de sodio 0.3 mM en NaCl 10% en frío. Se leyó la absorbancia a 550 nm lo más rápido posible en el espectrofotómetro ZEIS PMQ II restándole a cada lectura la absorbancia del tubo blanco el cual no contiene el suero.

La mezcla de incubación consiste de:

1. 2 ml de amortiguador de acetatos 0.2 M pH 5.5 ortofenantroina 1 mM
2. 1 ml de agua desionizada
3. 1 ml de la dilución de suero 1:10 en cloruro de sodio 0.1 M
4. 1 ml de cloruro de N,N-dimetil parafenilendiamina(DPD) 1.7 mM

1.4. ALBUMINA

La determinación de la albúmina se realizó utilizando el método de unión de colorantes basados en la capacidad de la albúmina para formar complejos coloridos. (Louderback, Mealey y Taylor 1968; Hill y Wells 1983). Uno de los colorantes que ha demostrado una buena especificidad por la albúmina es el púrpura de bromo cresol (BCP). El BCP se une rápidamente a la albúmina sérica humana para producir un color que se detecta espectrofotométricamente a 600 nm y es estable cuando menos 30 minutos.

La determinación se hizo por duplicado, todos los tubos contenían 2 ml del reactivo BCP, el blanco contenía 20 μ l de NaCl 0.85% y el patrón con 20 μ l de estándar de albúmina que contiene 50 mg/ml, y los tubos problema de conejo contenían 20 μ l de suero. Se agitan en un vórtex. La lectura de los tubos se hizo en el espectrofotómetro Zeiss PMQ II a 600 nm contra el blanco de reactivos. La concentración de albúmina (g/100 ml) se calcula con la siguiente expresión :

$$\text{Albúmina} = \text{Albúmina problema} / \text{Albúmina estándar} \times \text{concentración del estándar.}$$

1.5. PROTEINA TOTAL

La concentración de la proteína total en el suero se determinó utilizando el reactivo de Microbiuret de Goa. Se preparó una solución de citrato de sodio (Merck) 86.5 g y 50 g de carbonato de sodio en 250 ml de agua destilada. Se disolvieron 8.65 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 ml de agua destilada. Se unieron tanto el sulfato de cobre como el carbonato de sodio y se aforaron a 500 ml con agua destilada.

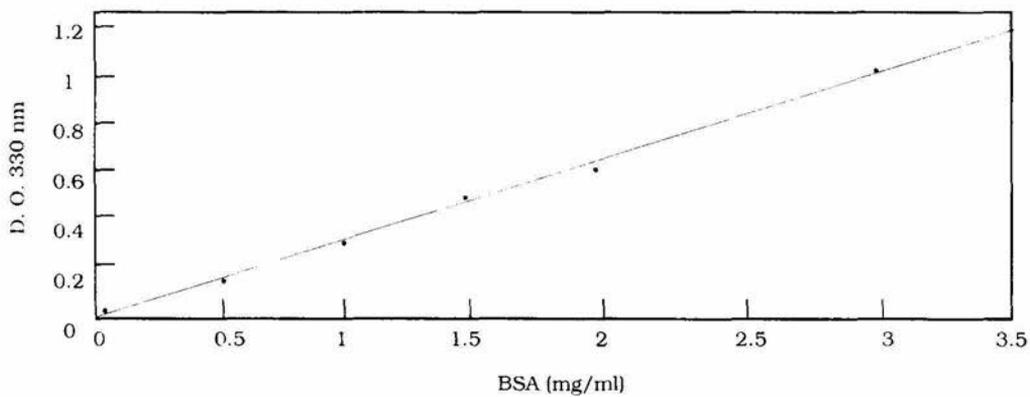
Se realizaron diluciones del suero de 1:40, las muestras contenían 2 ml de la dilución de suero y 2 ml de NaOH 6% a las cuales se les agrega 0.2 ml de Biuret y toda la mezcla se agita en un vórtex. Se dejó transcurrir la reacción por 15 minutos; después de este tiempo se leyeron a 330 nm contra un blanco de 4 ml de NaOH 3% (p/v) y se restó este valor a todas las lecturas.

Para la determinación de la concentración de proteína se realizó una curva patrón con albúmina de suero de bovino (BSA), haciendo diluciones a partir de una solución con una concentración de 10 mg/ml (Tabla 1, Figura 1).

Tabla 1. CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PROTEINA

TUBO	BSA (ml)	NaOH 3% (ml)	CONCENTRACION (mg/ml)
1	0.01	3.99	0.1
2	0.05	3.95	0.5
3	0.10	3.90	1.0
4	0.15	3.85	1.5
5	0.20	3.80	2.0
6	0.30	3.70	3.0

Figura 1. CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PROTEINA



2.0. VARIACION GENETICA

2.1. ELECTROFORESIS

Las isoenzimas son las formas moleculares múltiples de una enzima dada, están presentes en uno o varios individuos de la misma especie, han resultado ser excelentes indicadores de la variación genética en un grupo de organismos. Así para esta parte del estudio se utilizaron los 20 ejemplares de conejos tanto la colonia abierta como la cerrada. El análisis de las isoenzimas de las dos colonias se llevó a cabo mediante los procedimientos descritos por Murphy R. W. *et al.* (1990); Sites *et al.* (1986); para la electroforesis en geles de almidón horizontal y los de Selander *et al.* (1971); y Harris y Hopkinson (1976) para las tinciones enzimáticas.

Se realizaron electroforesis en geles de almidón horizontal. La electroforesis permite la separación de proteínas extraídas del tejido de los organismos, bajo la influencia de un carga eléctrica.

La separación de las enzimas resulta de la interacción de la corriente eléctrica, pH del gel y el pH del amortiguador del electrodo del recipiente Gottlieb (1977), Richardson *et al.* (1986).

A continuación, se detalla la metodología de la electroforesis en geles de almidón horizontal tomada y modificada ligeramente de las técnicas empleadas por: Piñero (1982), Soltis *et al.* (1983), Richardson *et al.* (1986), y Piñero y Eguiarte (1988).

2.2. PREPARACION DEL GEL

Los geles fueron preparados con almidón hidrolizado especial para electroforesis (Sigma N° S-4501). Para cada gel se usaron 60 g de almidón disuelto en 500 ml de amortiguador del gel (12 %). Se mezclan vigorosamente e inmediatamente después se pone a hervir sin dejar de agitar. Se deja hervir durante 3-5 minutos, después se aplicó el vacío por un minuto para quitar las burbujas de aire, luego se vierte esta mezcla a un molde de acrílico de 20 x 20 cm y de una altura de 5 cm, se deja por 30 minutos a temperatura ambiente, 30 minutos en el refrigerador y, posteriormente, a temperatura ambiente tapado con plástico delgado "Egapack" para evitar la desecación.

2.3. SISTEMA DE AMORTIGUADOR

Se usaron cuatro sistemas de amortiguadores para los geles y las charolas (electrodos). El sistema I (Histidina), Hakim-Elahi (1982), es un sistema continuo donde el pH del amortiguador del gel es igual al pH del amortiguador de la charola (pH = 7.0). Para este amortiguador se usa una corriente constante de 45 miliamperios por un tiempo de 4 horas. El sistema II (Litio), Soltis *et al.* (1983), es un sistema discontinuo donde el pH del amortiguador del gel es diferente del pH del amortiguador de charola, el pH del gel es de 7.6 y el pH de la charola 8.0. Para este amortiguador se usa una corriente constante de 225 voltios por un tiempo de 7 horas. El sistema III (Tris-citrato), Selander *et al.* (1971), es un sistema donde se prepara una solución madre y se hace una dilución 1:29 tanto para el amortiguador del gel como el de la charola, (pH = 8.0). Para este amortiguador se usa

una corriente constante de 100 miliamperios por un tiempo de 17 horas. El sistema IV TEMM (Anh. Maleico, EDTA, Tris, MgCl), Brewer (1970) y Selander *et al.* (1971), es un sistema donde se prepara una solución madre y se hace una dilución 1:10 para el amortiguador del gel y la charola (pH = 7.4). Para este amortiguador se usa una corriente constante de 35 miliamperios por un tiempo de 12 horas. En el apéndice 1. se detalla la composición de los amortiguadores usados.

2.4. APLICACION DE LAS MUESTRAS Y CORRIMIENTO DEL GEL

Al día siguiente de la preparación del gel éstos se refrigeraron por media hora y, posteriormente, se sacaron los geles del refrigerador y se removió la cubierta de plástico. Se hizo un corte aproximadamente a 4 cm del origen del borde catódico. Las dos porciones del gel se separaron y se colocaron las 20 muestras empezando con las muestras de la colonia cerrada, seguidas por las muestras de la colonia abierta; éstas se colocaron con unas pinzas de tal manera que no quedarán muy pegadas entre ellas. Cada muestra fue embebida en un papel (wick) para cromatografía Whatman N° 3 de 12 mm por 3 mm. Después, se unieron las dos porciones del gel. Para seguir la migración de las muestras en el gel se agregaron en los extremos de éste, dos wicks con una solución de amaranto o negro de amido (colorante) que sirven como indicadores.

Los geles se colocaron en las charolas que contenían el amortiguador de charola. El gel se colocó de tal manera que el origen quedó hacia el lado de la conexión catódica. Se pusieron las esponjas en contacto en la superficie del gel y con el electrodo, una a cada lado. Estas charolas se colocaron dentro del refrigerador que está a 4°C y se conectaron a las fuentes de poder para dejar pasar la corriente durante 15-20 minutos. La cantidad de corriente depende del sistema que se esté trabajando. Posteriormente, se apagaron las fuentes de poder y se removieron las muestras. Se unieron bien las dos porciones del gel, sin dejar pasar burbujas de aire entre ellas, se colocaron las esponjas, el plástico delgado y, por último, una bolsa con hielo para evitar que se sobrecalentaran y resecaran los geles. Se dejó correr hasta que la muestra de amaranto o negro de amido (colorante) migró 9 cm a partir del origen, los tiempos variaron dependiendo del sistema de amortiguador.

La nomenclatura y la numeración utilizadas, siguen las normas establecidas por la I.U.B. (International Union Of Biochemists, 1981) y el número de la Comisión de Enzimas (E.C.). La designación de las isoenzimas ensayadas, así como las abreviaturas se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Nomenclatura de las enzimas utilizadas. Para cada enzima se da el nombre coloquial, el nombre sistemático (I.U.B.) (International Union of Biochemists, 1981), y el número de la comisión de enzimas (E.C.)

Nombre	Número E.C.	I.U.B.
Aconitasa	4.2.1.3	ACO
Adenilato cinasa	2.7.4.3	ADK
Creatina cinasa	2.7.3.2	CK
Diaforasa	1.6.99	DIA
Enzima málica	1.1.1.40	ME
Esterasa	3.1.1.-	EST
Fosfatasa ácida	3.1.3.2	ACPH
Fosfatasa alcalina	3.1.3.1	ALP
Fosfoglucomutasa	2.7.5.1	PGM
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	1.1.1.44	6-PGD
Fosfoglucosa isomerasa	5.3.1.9	PGI
Fumarasa	4.2.1.2	FUM
Glutamato deshidrogenasa	1.4.1.3	GDH
Glutamato oxaloacetato transaminasa	2.6.1.1	GOT
Hexocinasa	2.7.1.1	HEX
Isocitrato deshidrogenasa	1.1.1.42	IDH
Lactato deshidrogenasa	1.1.1.27	LDH
Leucina amino peptidasa	3.4.11.1	LAP
Malato deshidrogenasa	1.1.1.37	MDH
Peroxidasa anódica	1.11.1.7	(PRX)APX
Peroxidasa catódica	1.11.1.7	(PRX)CPX
Piruvato cinasa	2.7.1.40	PK
Shikimato deshidrogenasa	1.1.1.25	SDH
Superóxido dismutasa	1.15.1.1	SOD

2.5. TINCIONES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las tinciones son usadas para localizar la posición relativa de las formas múltiples de las enzimas con una actividad catalítica común después de que ellas han sido resueltas por medio de electroforesis en una matriz sólida como el gel de almidón horizontal.

El éxito de la tinción depende, principalmente, de las propiedades de la mezcla de reacción y de las condiciones de incubación.

Una vez transcurrido el tiempo de electroforesis, se procedió a cortar el gel en rebanadas de 1 mm de grosor, con un rebanador (segueta) presionando hacia abajo y paralelamente en forma suave. Cada una de las rebanadas fueron colocadas en una charola de plástico, ahí se añadieron los sustratos y reactivos adecuados para obtener la reacción enzima-sustrato.

Esta consistió en una reacción de óxido reducción y otra de acoplamiento que dió como resultado la formación de un compuesto con color, el tiempo que deben permanecer los geles con las soluciones y condiciones de luz, oscuridad y temperatura, dependen de los requerimientos de cada enzima.

Cuando aparecen las bandas coloridas en el gel, se desechan los reactivos añadidos y se incuban los geles en una solución fijadora preparada con alcohol etílico al 50% en agua destilada por 12 horas en el refrigerador.

2.6. INTERPRETACION DE GELES

Se realizaron las lecturas de las bandas (fenotipos) de cada uno de los individuos para cada uno de los loci resultantes y se infirió su genotipo de la siguiente manera: Se observaba si había muestras con diferentes desplazamientos (Electromorfos). Se asignó el número 1 al loci que tuvo una migración más cercana al origen, número 2 al siguiente por arriba del primero y así sucesivamente. Para identificar los alelos el criterio fue el mismo, esto es, alelo 1 a la banda que está más cerca del origen y así sucesivamente.

Cada banda producida por un individuo en un gel teñido para una enzima dada, representa una isoenzima. Los fenotipos de las isoenzimas pueden ser consideradas como alternativas para un loci (aloenzima). El número de bandas varía entre individuos homocigos y heterocigos y también varía dependiendo de la estructura cuaternaria de la enzima, es decir si es monomérica los individuos homocigos presentan una banda (esto porque consiste de una sola subunidad polipeptídica) y los heterocigos dos bandas; si es dimerica los heterocigos presentan tres bandas (dos polipéptidos diferentes); si es tetramérica entonces los heterocigos tienen cinco bandas.

2.7. ANALISIS DE DATOS

La variación genética se evaluó con las medidas generalmente usadas para tal propósito: 1. proporción de loci polimórficos (P), 2. heterocigosis promedio esperada por locus individual (He), 3. heterocigosis promedio total por loci (Ho), 4. número de alelos por locus, 5. índice de fijación (F), 6. estadísticos F de Wright y 7. coeficiente de endogamia (F), Hedrick (1983); Futuyma (1986), Nei (1987).

Los genotipos registrados para cada individuo, en los zimogramas para cada uno de los loci detectados, fueron procesados con el programa Biosys-1 de Swofford y Selander(1981).

1) **Proporción de loci polimórficos (P)**. Generalmente, un locus se considera polimórfico cuando el alelo más común presenta una frecuencia menor a 0.95 Nevo (1978); Brown y Moran, (1981); Hamrick *et al.* (1981); Hedrick (1983); Futuyma (1986); Nei (1987). Si toma valores de 0, ningún loci es polimórfico y si toma los valores de 1 todos los loci son polimórficos. Se obtiene de la siguiente manera:

$$P = x/m$$

donde, x es el número de loci polimórficos y m es el número total de loci muestreados.

2) **Heterocigosis o diversidad genética**. Es la heterocigosis promedio esperada en equilibrio Hardy-Weinberg, se calcula de la siguiente manera:

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

Donde p_i es el promedio de las frecuencias alélicas para ese locus (Hedrick, 1983). Toma valores de 0 (cuando se tiene un número infinito de alelos por loci). Es el más utilizado ya que se conoce mejor su estadística. La heterocigosis promedio multilocus (H) para n locus, es el promedio de heterocigosis por locus sencillo y se calcula:

$$H = \frac{\sum_{j=1}^n h_j}{n}$$

donde, h_j es la heterocigosis para el J -ésimo locus (Nei, 1987). Cuando el tamaño de la población es pequeño, se usa una ecuación corregida (Nei, 1987):

$$H = \frac{\sum_i 2N(1 - p_i^2)}{2N - 1}$$

En el caso de multilocus sería:

$$H = \frac{\sum_{j=1}^r h_j}{r}$$

donde h_j es la diversidad genética para el J -ésimo locus y r es el número de loci.

3) **Número promedio de alelos por locus.** Es el promedio simple de alelos por locus.

4) **Frecuencias Alélicas** Se calcularon las frecuencias alélicas para cada locus, para cada colonia (Hedrick 1983).

$$p = \frac{(a_{11} + 1/2 a_{12})}{N}$$

$$q = \frac{(1/2 a_{12} + a_{22})}{N}$$

Donde a_{11} son los genotipos A_1A_1 , a_{12} son los genotipos A_1A_2 , a_2 son los genotipos A_2A_2 y N es el total de la muestra.

5) **Índice de fijación (F).** El índice de fijación, propuesto por Wright, examina si las frecuencias alélicas de un locus se desvían de las esperadas. Esto se hace calculando la desviación de la frecuencia observada de los heterócigos esperados en Hardy-Weinberg, Hedrick (1983):

$$F = (2pq - H)/2pq = 1 - H/2pq$$

Donde H es la proporción de heterócigos observados y $2pq$ es la proporción de heterócigos esperados. Si el valor es de 0 entonces la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg. Los valores positivos indican una deficiencia de heterócigos, mientras que los valores negativos indican un exceso.

6) **Estadísticos F de Wright** Wright desarrolló un método para describir el arreglo de la variación genética en poblaciones subdivididas. Este método consta de tres diferentes coeficientes F de correlación.

F_{is} es la medida de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg en una subpoblación. Toma valores de -1 a +1 y se expresa como:

$$F_{is} = \frac{(H_e - H_o)}{H_e}$$

donde H_o es la proporción de heterocigos observados promedio dentro de una subpoblación y H_e es la proporción de heterocigos esperada promedio a nivel de subpoblaciones (Hartl y Clark, 1989).

7) **Coefficiente de endogamia F.** Tiene una interpretación en términos de probabilidad y es útil para calcular la F en el árbol genealógico. El coeficiente de endogamia F es la probabilidad que los dos alelos de un gen en un individuo sean idénticos por descendencia (autocigos). Se expresa como:

$$F = \sum (1/2)^i (1 + F_A)$$

donde i es el número de individuos en cualquier camino de parentesco contando los progenitores, el ancestro común y todos los individuos en el camino que los conectan y $F_A=0$ corresponde al ancestro común.

Si $F=1$ representa una completa endogamia y la población consiste únicamente de homocigos. Cuando $F=0$ no hay endogamia y las frecuencias génicas se presentan en las proporciones Hardy-Weinberg (Hartl y Clark, 1989).

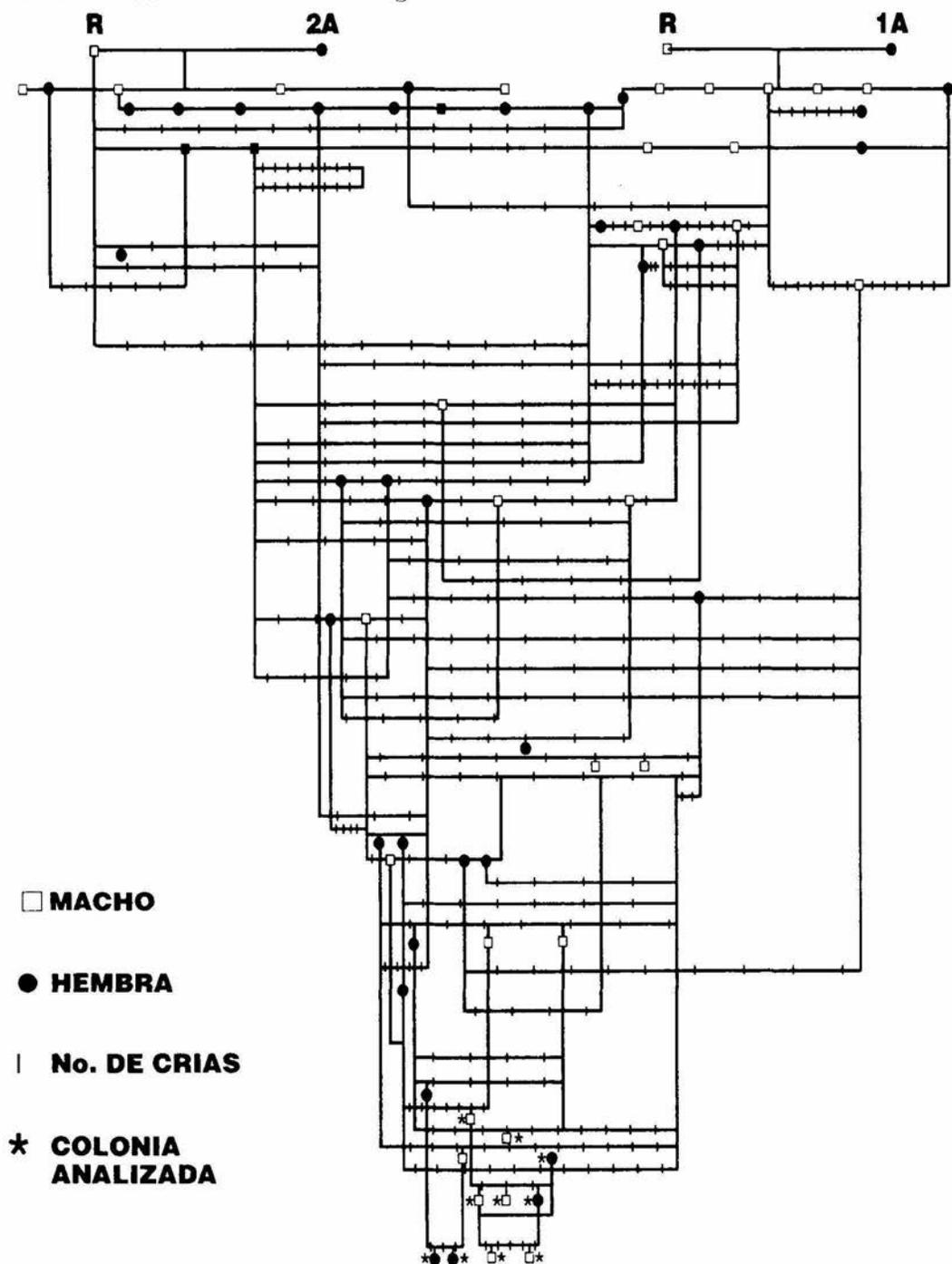
IV. RESULTADOS

1.0. COLONIAS DE CONEJOS

El primer paso fue hacer el árbol genealógico de los conejos partiendo de dos hembras (1A y 2A) y un macho (R) y siguiendo los cruzamientos realizados hasta llegar a los individuos que se muestrearon. El árbol genealógico obtenido se muestra en la Figura 2 que nos indica que existen 13 generaciones entre los organismos originales y los de trabajo. En esta misma figura se marca con un asterisco a los conejos analizados en este estudio que corresponden a individuos de las camadas 60-64.

Con el árbol genealógico se dibujó para cada uno de los individuos estudiados, los diferentes "senderos" que los relacionan con los ancestros comunes de la colonia. Con estos datos se utilizó la fórmula para el coeficiente de endogamia F de cada uno de los individuos. El valor de dicho coeficiente para la colonia estudiada, resultó de 0.4935.

Figura 2. Arbol genealógico de la colonia cerrada de conejos Nueva Zelanda *Oryctolagus cuniculus* iniciada en 1981 en el laboratorio de Biología Molecular.



1.1. PARAMETROS HEMATOLOGICOS

Las muestras de sangre de los 20 conejos se trabajaron como se describe en Materiales y Métodos. En la Tabla 3 se muestra el valor de cada uno de los parámetros estudiados. Como puede observarse no existen diferencias significativas entre las dos colonias en los parámetros hematológicos estudiados, a excepción de la proteína total que es significativamente más alta en la colonia abierta. Podemos observar que existen diferencias muy pequeñas entre las dos colonias y pensamos que si se aumentara considerablemente el tamaño de la muestra nos ayudaría a definir si realmente estos parámetros no presentan variación genética, ó, si existen diferencias que no se detectaron debido al rango de variación de estos valores en una muestra de sólo 10 conejos.

Tabla 3. Parámetros hematológicos analizados en las colonias abierta y cerrada en sangre de conejo *Oryctolagus cuniculus*.

PARAMETRO	CERRADA	ABIERTA
Células rojas (RBC X 10 ⁶ /mm ³)	6.408 ± 0.046	5.99 ± 0.52
Hematocrito (%)	42.910 ± 3.790	41.30 ± 2.33
Volumen celular Promedio (MCV, μ ³)	67.290 ± 1.480	69.40 ± 3.80
Células blancas (WBC x 10 ³ /mm ³)	8.254 ± 1.740	8.92 ± 2.88
Hemoglobina (g/100 ml)	15.250 ± 1.240	14.47 ± 1.23
Hemoglobina corpuscular media (MCH pg/célula)	23.790 ± 0.520	24.17 ± 1.17
Concentración media corpuscular de hemoglobina (MCHC, %)	35.31 ± 1.140	35.03 ± 2.89
Transferrina (mg/ml)	2.0613 ± 0.370	1.9886 ± 0.32
Ceruloplasmina:		
Actividad (OD/ml)	1.0045 ± 0.300	1.0615 ± 0.410
Concentración (mg/ml)	0.1594 ± 0.046	0.168 ± 0.066
Hierro (μg/ml)	1.1564 ± 0.250	1.1036 ± 0.190
Albumina (g/100ml)	5.5700 ± 0.560	5.8000 ± 0.500
Proteína total (mg/ml)	61.780 ± 4.450	71.420 ± 5.300*

* P < 0.001 comparado con el valor de la colonia cerrada usando la prueba de t de Student para muestras no pareadas. Se muestra el promedio con su desviación estándar. El tamaño de la muestra, (N) = 10 para cada colonia.

2.0. SISTEMAS ENZIMATICOS

Los análisis genéticos se llevaron a cabo con los datos de las electroforesis de las muestras de sangre de las dos colonias de conejos abierta y cerrada. Se ensayaron un total de 24 enzimas, de las cuales 4 no presentaron actividad (ALP, ACO, HEX, y SDH). De las 20 enzimas con actividad (ver apéndice) se eligieron 17 por su mejor resolución. De las 17 enzimas elegidas se registraron un total de 31 loci, de los cuales 15 fueron polimórficas para uno o dos locus, usando el criterio de que la frecuencia del alelo más común no exceda el 95%. Esto se observó para las dos colonias. En la Tabla 4 se presentan los datos del número total de loci monomórficos y polimórficos para cada enzima, así como la estructura cuaternaria y el amortiguador donde se observó mejor resolución de las enzimas.

El amortiguador de Histidina (sistema continuo pH 7.0) fue el más adecuado para 8 de las enzimas: AK, CK, ACPH, PGM, 6-PGD, GOT, MDH y PK. Con el amortiguador de TEMM, Lítio y Tris-citrato presentaron mejor resolución las demás enzimas (DIA, PGI, FUM, GDH, IDH, LDH, LAP, APX y CPX).

A continuación presento los resultados con los diferentes patrones de bandas para cada una de las 17 enzimas:

Tabla 4. Sistemas enzimáticos ensayados en sangre de conejos *Oryctolagus cuniculus*. Se presenta el número de loci total por enzima y el número de loci polimórficos y los amortiguadores de Histidina, TEMM, Litio, y Tris -citrato respectivamente.

ENZIMA	ESTRUCTURA CUATERNARIA	SISTEMA DE AMORTIGUADOR	NO. DE LOCI TOTAL	NO. DE LOCI POLIMORFICOS
AK	MONOMERO	HISTIDINA	3	2
CK	DIMERO	HISTIDINA	3	1
DIA	MON-DIMERO	TEMM	1	0
ACPH	MON-DIMERO	HISTIDINA	1	1
PGM	MONOMERO	HISTIDINA	2	1
6PGD	DIMERO	HISTIDINA	1	1
PGI	DIMERO	TEMM	3	2
FUM	TETRAMERO	TRIS-CITRATO	1	1
GDH	DIMERO	LITIO	1	0
GOT	DIMERO	HISTIDINA	1	1
IDH	DIMERO	TEMM	1	0
LDH	TETRAMERO	TEMM	3	1
LAP	MONOMERO	LITIO	2	0
MDH	DIMERO	HISTIDINA	2	0
APX	MONOMERO	TRIS-CITRATO	1	1
CPX	MONOMERO	TRIS-CITRATO	2	2
PK	TETRAMERO	HISTIDINA	3	1

Adenilato cinasa (AK). E.C. 2.7.4.3

Creatina cinasa (CK). E.C. 2.7.3.2

Diaforasa (DIA). E.C. 1.6.99-

Fosfatasa ácida (ACPH). E.C. 3.1.3.2

Fosfoglucomutasa (PGM). E.C. 2.7.5.1

6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD). E.C. 1.1.1.44

Fosfoglucosa isomerasa (PGI). E.C. 5.3.1.9

Fumarasa (FUM). E.C. 4.2.1.2

Glutamato deshidrogenasa (GDH). E.C. 1.4.1.3

Glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT). E.C. 2.6.1.1

Isocitrato deshidrogenasa (IDH). E.C. 1.1.1.42

Lactato deshidrogenasa (LDH). E.C. 1.1.27

Leucina amino peptidasa (LAP). E.C. 3.4.11.1

Malato deshidrogenasa (MDH). E.C. 1.1.1.37

Peroxidasa anódica (APX). E.C. 1.11.1.7

Peroxidasa catódica (CPX). E.C. 1.11.1.7

Piruvato cinasa (PK). E.C. 2.7.1.40

Total de loci: 31

Loci polimórficos: 15

Proporción de loci polimórficos (P): 0.48387

Heterocigosis total de la colonia cerrada: 0.028

Heterocigosis total de la colonia abierta: 0.145

Adenilato Cinasa (AK)

En el zimograma de la enzima adenilato cinasa es ilustrado en la Figura 3. Se observaron 3 loci (AK-1, AK-2, AK-3). El locus AK-1 presentó una sola banda con idéntica migración para todos los individuos, es decir, fue monomórfico, mientras que los loci AK-2 y AK-3 mostraron variación, en cada locus se expresaron 2 alelos considerándose polimórfico. En estos loci se encontraron 3 genotipos: A_1A_1 , A_1A_2 y A_2A_2 .

Creatina Cinasa (CK)

En el zimograma de esta enzima se observaron tres loci (CK-1, CK-2 y CK-3). El locus CK-1 fue polimórfico con dos alelos. En este locus se encontraron 2 genotipos A_1A_1 y A_1A_2 . Los loci CK-2 y CK-3 presentaron una sola banda, fueron monomórficas (Figura 3.).

Diaforasa (DIA)

Esta enzima presentó un sólo locus DIA-1 con una sola banda, por lo tanto, fue monomórfico.

Fosfatasa Acida (ACPH)

Se presentó un sólo locus ACPH-1 con un alelo, monomórfico.

Fosfoglucomutasa (PGM)

Se observó dos loci PGM-1 y PGM-2. El locus PGM-1 polimórfico con dos alelos y con 2 genotipos: A_1A_1 y A_1A_2 .

6-Fosfogluconato Deshidrogenasa (6-PGD)

Presentó un sólo locus 6-PGD-1 polimórfico con dos alelos y con los genotipos A_1A_1 y A_1A_2 (Figura 3.).

Fosfoglucosa Isomerasa (PGI)

Se observaron tres loci (PGI-1, PGI-2 y PGI-3). Los loci PGI-1 y PGI-3 son polimórficos, con dos alelos y con dos genotipos A_1A_1 y A_1A_2 . El locus PGI-2 fue monomórfico (Figura 3.).

Fumarasa (FUM)

Se observó el locus FUM-1 polimórfico, con dos alelos y con dos genotipos A_1A_1 y A_1A_2 .

Glutamato Deshidrogenasa (GDH)

Presentó un locus monomórfico (GDH-1) por lo tanto con un alelo.

Glutamato-Oxaloacetato Transaminasa (GOT)

El zimograma de esta enzima presentó un locus GOT-1. El locus GOT-1 es polimórfico con dos alelos y los genotipos A_1A_1 y A_1A_2 .

Isocitrato Deshidrogenasa (IDH)

Presentó un locus monomórfico IDH-1 con un alelo.

Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Se observaron tres loci (LDH-1, LDH-2 y LDH-3) siendo el locus LDH-1 polimórfico con dos alelos y genotipos A_1A_1 y A_1A_2 (figura 3.).

Leucina Amino-peptidasa(LAP)

En el zimograma de esta enzima se observaron 2 loci (LAP-2, y LAP-3). Presentaron una sola banda con idéntica migración considerándose monomórficos.

Malato Deshidrogenasa (MDH)

Se observaron 2 loci monomórficos (MDH-1 y MDH-2).

Peroxidasa Anódica (APX)

Se observó un solo locus APX-1 que presentó variación, considerándose polimórfico con dos alelos y los genotipos A_1A_1 , A_1A_2 y A_2A_2 (figura 3.).

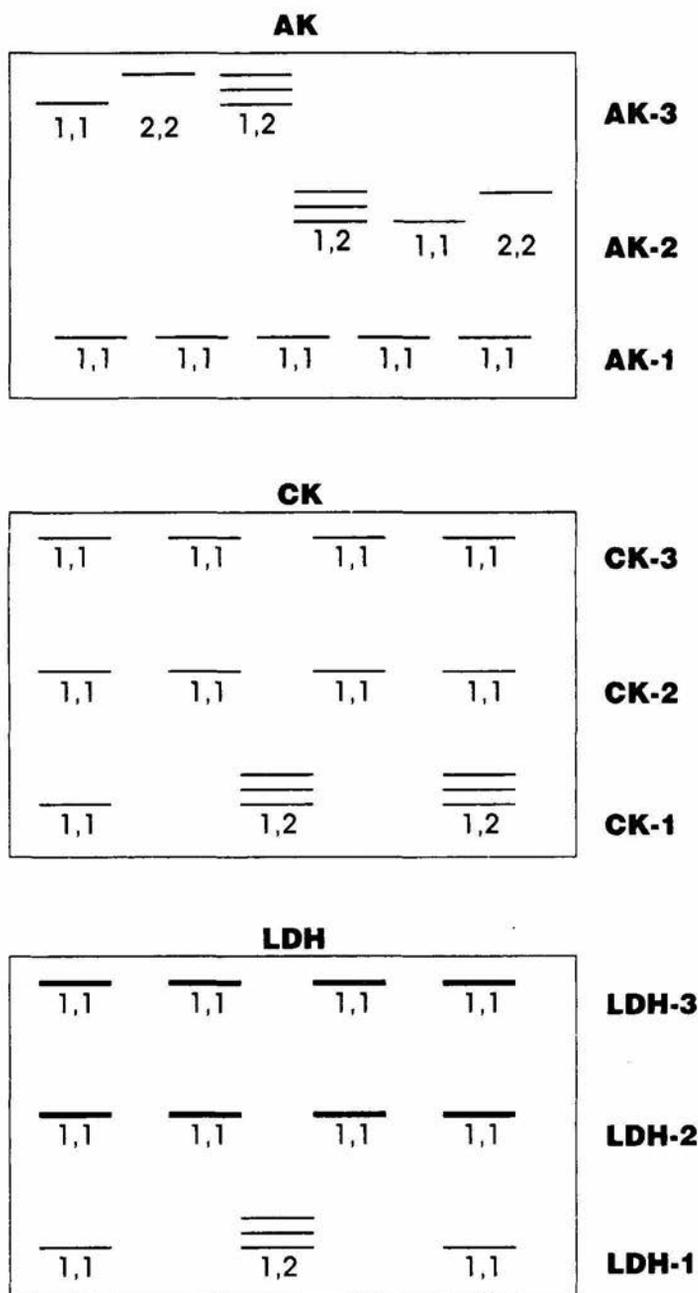
Peroxidasa Catódica (CPX)

Se observaron dos loci (CPX-1 y CPX-2) polimórficos cada uno con dos alelos y los genotipos: A_1A_1 , A_1A_2 y A_2A_2 .

Piruvato Cinasa (PK)

Se observaron tres loci (PK-1, PK-2 y PK-3). Los loci PK-2 y PK-3 presentaron una sola banda, es decir, son monomórficos. El locus PK-1 mostró variación, por lo tanto es polimórfico con 3 alelos y los genotipos A_1A_1 , A_1A_2 , A_2A_2 y A_1A_3 (figura 3.).

Figura 3. Zimogramas de los patrones de variación de las enzimas ensayadas en sangre de conejo *Oryctolagus cuniculus*. Adenilato cinasa (AK), Creatina cinasa (CK), Lactato deshidrogenasa (LDH), Piruvato cinasa (PK), Fosfoglucoasa isomerasa (P6I), 6 - Fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH).



PK

<u>1,1</u>	<u>1,1</u>	<u>1,1</u>	<u>1,1</u>
<u>1,1</u>	<u>1,1</u>	<u>1,1</u>	<u>1,1</u>
<u>1,1</u>	<u><u>1,2</u></u>	<u>2,2</u>	<u><u>1,3</u></u>

PK-3

PK-2

PK-1

PGI

<u>1,1</u>	<u><u>1,2</u></u>	<u>1,1</u>	
<u>1,1</u>	<u>1,1</u>	<u>1,1</u>	<u>1,1</u>
<u>1,1</u>	<u><u>1,2</u></u>	<u><u>1,2</u></u>	

PGI-3

PGI-2

PGI-1

<u>1,1</u>	<u><u>1,2</u></u>	<u>1,1</u>
------------	-------------------	------------

6 - PGD - 1

HOMOCIGO

A₁ A₁; A₂ A₂; A₃ A₃

HETEROCIGO

A₁ A₂; A₁ A₃

2.1. VARIACIÓN GENÉTICA ENZIMÁTICA

Se detectaron un total de 31 loci (ver Tabla 4), de los cuales, 15 fueron polimórficos. El índice de polimorfismo (P) fue de 26.84% para la colonia cerrada y 45.62% para la colonia abierta. El número promedio de alelos (A) fue de 1.2 para la colonia cerrada y 1.5 para la colonia abierta. La heterocigosis total (H) para la colonia cerrada fue de 0.028 y para la colonia abierta fue de 0.145; y la heterocigosis promedio esperada (He) fue para la colonia cerrada de 0.038 y para la colonia abierta de 0.152 (Tabla 5).

Tabla 5. Variación genética del total de los loci analizados en la colonia cerrada y abierta de conejos *Oryctolagus cuniculus*. El número entre paréntesis indica el error estándar.

COLONIA	Tamaño de la muestra (N)	No. de alelos promedio (A)	Proporción de loci polimórficos (P)	Heterocigosis promedio observada (Ho)	Heterocigosis promedio esperada (He)
CERRADA	10	1.26 (0.1)	26.84	0.028 (0.011)	0.038 (0.0145)
ABIERTA	10	1.51 (0.1)	45.62	0.145 (0.054)	0.152 (0.0445)

Con los datos de la Tabla 5 se calculó la Fis para cada una de las colonias. Para la colonia cerrada Fis=0.26 y para la colonia abierta Fis=0.04. Al comparar las Fis con los índices de fijación F locus por locus observamos que aunque sus valores no resultan idénticos son muy parecidos en signo y magnitud. Si comparamos ahora la media del índice de fijación F de la colonia cerrada con la Fis para esta misma colonia nuevamente observamos una tendencia hacia la homocigosis mientras que para la colonia abierta la tendencia es hacia las proporciones de Hardy-Weinberg.

2.2. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y HETEROCIGOSIS

En la Tabla 6 se muestran las frecuencias alélicas con los valores de chi-cuadrada, la heterocigosis observada (H_o) y la heterocigosis esperada (H_e) para cada enzima y para cada colonia de conejos *Oryctolagus cuniculus* estudiada, en muestras de sangre. Estos parámetros fueron calculados de 15 loci polimórficos. Se observa que el número de alelos en los loci polimórficos fue de 2 en la mayoría, con excepción del locus PK-1 que presentó 3 alelos. Los loci ACPH-1, PGM-1, GOT-1 y PGI-3 presentaron sólo 1 alelo en la colonia cerrada. De los 31 loci registrados, 16 presentaron un sólo alelo tanto en la colonia cerrada como en la abierta.

Al analizar con la prueba de chi-cuadrada las frecuencias genotípicas de cada locus para cada colonia, para ver lo esperado en el equilibrio Hardy-Weinberg, se encontraron 5 chi-cuadradas significativas. En la colonia cerrada 2 enzimas, APX-1 ($\chi^2 = 12.800$, $P < 0.001$) y CPX-2 ($\chi^2 = 6.720$, $p < 0.01$) mostraron diferencias. En la colonia abierta 3 enzimas mostraron diferencias significativas y son: PGM-1 ($\chi^2 = 5.891$, $P < 0.01$); PK-1 ($\chi^2 = 19.231$, $P < 0.001$) y PGI-3 ($\chi^2 = 11.631$, $P < 0.001$). Estas diferencias indican que los genotipos posibles de estos locus tienen una frecuencia diferente a lo esperado en Hardy -Weinberg.

En la colonia abierta de conejos la heterocigosis observada fue mayor para casi todas las enzimas; el rango de variación fue de 0.0 - 0.9. En la colonia cerrada, el rango de variación de heterocigosis observada fue de 0.0 - 0.4. La heterocigosis promedio esperada para la colonia cerrada fue de 0.038 y para la colonia abierta fue de 0.152.

Tabla 6. Frecuencias alélicas (alelos 1, 2 y 3), heterocigosis observada (Ho) y heterocigosis esperada (He) para cada una de las enzimas examinadas en células rojas de conejo *Oryctolagus cuniculus* tanto para la colonia abierta como para la colonia cerrada. El número entre paréntesis es el intervalo de confianza al 95%.

ENZIMA/LOCUS	ALELO	COLONIA CERRADA	COLONIA ABIERTA
AK-1	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
AK-2	1	.950 (0.096)	.500 (0.222)
	2	.050 (0.096)	.500 (0.222)
	Ho	.100	.600
	He	.100	.526
AK-3	1	.900 (0.134)	.600 (0.218)
	2	.100 (0.134)	.400 (0.218)
	Ho	.200	.600
	He	.189	.505
CK-1	1	.950 (0.096)	.850 (0.058)
	2	.050 (0.096)	.150 (0.058)
	Ho	.100	.300
	He	.100	.268
CK-2	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
CK-3	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000

Tabla 6 (continuación)

ENZIMA/LOCUS	ALELO	COLONIA CERRADA	COLONIA ABIERTA
DIA-1	1	.000	.000
	2	1.000	1.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
ACPH-1	1	1.000	.900 (0.134)
	2	.000	.100 (0.134)
	Ho	.000	.200
	He	.000	.189
PGM-1	1	1.000	.550 (0.222)
	2	.000	.450 (0.222)
	Ho	.000	.900
	He	.000	.521 (a)
PGM-2	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
6-PGD-1	1	.950 (0.096)	.150 (0.159)
	2	.050 (0.096)	.850 (0.159)
	Ho	.100	.300
	He	.100	.268
PGI-1	1	.950 (0.096)	.850 (0.159)
	2	.050 (0.096)	.150 (0.159)
	Ho	.100	.300
	He	.100	.268
PGI-2	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000

Tabla 6. (Continuación)

ENZIMA/LOCUS	ALELO	COLONIA CERRADA	COLONIA ABIERTA
PGI-3	1	1.000	.700 (0.021)
	2	.000	.300 (0.021)
	Ho	.000	.000
	He	.000	.442 (b)
FUM-1	1	.900 (0.134)	.850 (0.159)
	2	.100 (0.134)	.150 (0.159)
	Ho	.200	.300
	He	.189	.268
GDH-1	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
GOT-1	1	1.000	.850 (0.159)
	2	.000	.150 (0.159)
	Ho	.000	.300
	He	.000	.268
IDH-1	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
LDH-1	1	1.000	.950 (0.096)
	2	.000	.050 (0.096)
	Ho	.000	.100
	He	.000	.100
LDH-2	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000

Tabla 6. (Continuación)

ENZIMA/LOCUS	ALELO	COLONIA CERRADA	COLONIA ABIERTA
LDH-3	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
LAP-2	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
LAP-3	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
MDH-1	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
MDH-2	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
APX-1	1	.800 (0.178)	.900 (0.096)
	2	.200 (0.178)	.100 (0.096)
	Ho	.000	.200
	He	.337 (c)	.189
CPX-1	1	.050 (0.096)	.100 (0.134)
	2	.950 (0.096)	.900 (0.134)
	Ho	.100	.200
	He	.100	.189

Tabla 6. (Continuación)

ENZIMA/LOCUS	ALELO	COLONIA CERRADA	COLONIA ABIERTA
CPX-2	1	.250 (0.180)	.200 (0.164)
	2	.750 (0.180)	.800 (0.164)
	Ho	.395	.200
	He	.100 (d)	.337
PK-1	1	.950 (0.096)	.150 (0.158)
	2	.050 (0.096)	.700 (0.204)
	3	.000	.150 (0.158)
	Ho	.100	.300
	He	.100	.489 (e)
PK-2	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000
PK-3	1	1.000	1.000
	2	.000	.000
	Ho	.000	.000
	He	.000	.000

(n= 2; d.f.=1)

chi-cuadrada: a) 5.891 (P<0.01)
 b) 11.631 (P<0.001)
 c) 12.800 (P<0.001)
 d) 6.720 (P<0.01)
 e) 19.231 (P<0.001)

2.3. INDICES DE FIJACIÓN F

Los índices de fijación F por locus por colonia, se muestran en la Tabla 7. Ocho loci presentan un índice de fijación negativo y uno positivo en la colonia cerrada. El único índice de fijación significativo y positivo diferente a uno fue el de CPX-2 indicando que hay un exceso de homocigos en este locus. En la colonia abierta, la F fue negativa para doce loci y positiva sólo para dos loci. Presentó sólo un locus significativo y cercano a menos uno que es PGM-1.

La media del índice de fijación para la colonia cerrada fue positivo (0.021) y negativo para la colonia abierta (-0.127). Los datos de la Tabla 7 nos permiten calcular el grado de homocigosis (endogamia) en las colonias, que fue para la colonia cerrada de 0.466 y para la colonia abierta de 0.200.

Tabla 7. Índices de fijación F para los diferentes loci analizados en las colonias abierta y cerrada de conejo *Oryctolagus cuniculus*.

N=10 Individuos por colonia.

COLONIA		
LOCUS	I.F. CERRADA	I.F. ABIERTA
AK -2	-0.053	-0.200
AK -3	-0.111	-0.250
CK -1	-0.053	-0.176
ACPH-1	----	-0.111
PGM -1	----	-0.818**
PGD -1	-0.053	-0.176
PGI -1	-0.053	-0.176
PGI -3	----	----
FUM -1	-0.111	-0.176
GOT -1	----	-0.176
LDH -1	----	-0.053
APX -1	----	-0.111
CPX -1	-0.053	-0.111
CPX -2	0.733*	0.375
PK -1	-0.053	0.355
Promedio	0.021	-0.127

$X^2 = F^2 N$ Ho: $F=0$ * = $P < 0.025$

** = $P < 0.01$

g.l. = $k-1$ k = número de alelos.

V. DISCUSION

1.0. PARAMETROS HEMATOLOGICOS

Los datos hematológicos nos proporcionan una información directa acerca de las características de las células rojas circulantes y el volumen y la cantidad de hemoglobina que contiene en promedio cada célula, y que además podemos comparar con los tipos celulares existentes en la sangre de los conejos, después de que han sido sometidos a una anemia crónica.

Estudios hechos anteriormente en este laboratorio (Martínez *et al.* 1991; Alba *et al.* 1992.) han mostrado que en el curso de la anemia inducida, se provoca un desequilibrio en algunas de las poblaciones celulares que componen el tejido sanguíneo; una de las poblaciones más afectadas es la de las células rojas, que sufre un decremento pronunciado en su número durante los primeros días de sangrado, disminución que va siendo menor, a medida que el organismo logra reponer el número de células rojas removidas.

La remoción diaria de sangre, para la inducción de anemia, provoca que se incrementen las concentraciones de ciertos factores séricos involucrados en la eritropoyesis, específicamente, la eritropoyetina y la transferrina, esta última es la proteína que transporta hierro a las células de la línea roja para la síntesis de hemoglobina. Ambas actúan a nivel de las células eritroides de la médula ósea; la eritropoyetina promueve un incremento en la capacidad proliferativa y de autorrenovación de células como las BFU-E y CFU-E, y actúa también a nivel de los precursores eritroides reconocibles morfológicamente, acelerando su maduración y diferenciación. Por su parte la transferrina actúa básicamente sobre éstos últimos acelerando el suministro de hierro (Mayani 1984).

En este modelo, la transferrina presenta un aumento significativo y aproximadamente constante, independiente de la cantidad de sangre extraída por peso. La cantidad de proteína sérica no se ve drásticamente afectada, ya que en términos generales se mantiene constante.

Con la población de conejos *Oryctolagus cuniculus* variedad Nueva Zelanda con que se cuenta en el laboratorio se observa por lo general que los conejos aparecen totalmente normales en su morfología y fisiología, no así en su conducta relacionada con la impregnación y la cría de los gazapos. Al mismo tiempo han aparecido defectos congénitos recesivos en la población, como ciertas deformaciones de la cintura pélvica presente en algunos individuos, mismos que fueron eliminados.

Una de las consecuencias observadas de la endogamia es la reducción del valor fenotípico medio mostrado por caracteres conectados con la capacidad reproductiva o la eficiencia fisiológica, fenómeno conocido como depresión endogámica. Los caracteres que están sujetos a ella son: el rendimiento de leche, peso corporal al año, tamaño de la camada y los efectos maternos que están entre las características más sensibles a la depresión endogámica. Muchos estudios realizados en mamíferos y plantas han generalizado que la endogamia tiende a reducir la aptitud. Así, los caracteres que forman un importante componente de la aptitud tales como el tamaño de la camada o la lactancia en mamíferos, muestran una reducción bajo endogamia; mientras que los caracteres que no están estrechamente ligados con la aptitud muestran poco o ningún cambio. Conforme procede la

endogamia y se deteriora la capacidad reproductiva, pronto llega a ser imposible evitar la pérdida de algunos individuos o de líneas completas (Falconer 1981).

Todos estos antecedentes, nos llevaron a realizar esta parte del estudio con el fin de conocer si los parámetros hematológicos de esta población de conejos, que se denominó cerrada, habían sido afectados por el proceso de selección realizado.

Los valores de los parámetros hematológicos clásicos de la sangre como hematocrito, células rojas, volumen celular promedio, células blancas, hemoglobina y concentración media corpuscular de hemoglobina de la colonia cerrada de conejos, individuos descendientes de progenitores resistentes al sangrado crónico, comparados con la colonia abierta, no muestran diferencias significativas. Este hecho era esperado ya que para cada especie se encuentra un equilibrio característico en estos parámetros, que si son modificados señalan una patología en el individuo.

En cuanto a los valores de las diferentes proteínas séricas, esperábamos encontrar algunas modificaciones ya que en nuestro modelo de anemia experimental se incrementa la concentración de algunas proteínas (Transferrina y Ceruloplasmina) en respuesta al sangrado. Debido a que la colonia cerrada proviene de una selección de animales por su capacidad hematopoyética, se pensó que estas proteínas involucradas directamente en la producción de células rojas hubieran sufrido algún cambio.

Al comparar los valores de la colonia cerrada Tabla 3 con los obtenidos en estudios anteriores (Pulido, 1982 y Mainero 1993) se observa que la transferrina tiende a aumentar de 1.85 mg/ml a 2.48 mg/ml en los conejos de la colonia conforme se avanzó en las cruces. En las siguientes generaciones (datos de este trabajo) parece no haber nuevos cambios en la concentración sérica de esta proteína.

Si comparamos ahora los valores de la transferrina en las colonias cerrada y abierta podemos observar que no existe cambio en la transferrina en condiciones normales (no sangrado).

Estudios de Velázquez (1984) y Mainero (1993) demostraron que la ceruloplasmina aumenta en los conejos con la inducción de anemia tanto en la actividad como en concentración desde el inicio del sangrado, lo cual permite suponer que se comporta como una proteína reactante de fase aguda. Esta respuesta de fase aguda se expresa como múltiples alteraciones de las funciones metabólicas, endocrinas, neurológicas e inmunológicas, caracterizadas principalmente por un aumento en la síntesis de algunas proteínas hepáticas, leucocitos, así como también un incremento de los niveles de cobre sérico.

Si comparamos de nuevo la concentración y actividad de la ceruloplasmina de este trabajo con los anteriores, observamos que no existen diferencias es esta proteína que podamos atribuir a un efecto de la selección realizada.

El contenido de hierro sérico aun cuando es igual en las dos colonias estudiadas, presenta valores de aproximadamente la mitad de los obtenidos por Pulido, 1982 (2.15 $\mu\text{g/ml}$) y Velazquez, 1984 (2.36 $\mu\text{g/ml}$). Sin embargo, dada la similitud de los datos de este trabajo no podemos descartar al factor alimenticio como responsable de estos valores tan bajos.

La albúmina, que es una proteína de origen hepático y muy abundante en el plasma, tampoco presentó modificación alguna. La cantidad total de proteína sérica no se vio drásticamente afectada, durante el sangrado (Pulido, 1982 y Mainero 1993) ya que en términos generales ésta se mantiene constante.

Los valores de proteína sérica de este trabajo son iguales a los obtenidos anteriormente para condiciones de no sangrado, pero son significativamente diferentes respecto a la colonia abierta. Una posible causa de esta diferencia pudiera ser que colonia abierta posea mayor cantidad de inmunoglobulinas o anticuerpos debido a sus condiciones de adaptación, aseo y alimentación respecto a la colonia cerrada, cuyas condiciones estaban bajo control.

Todos estos resultados nos demuestran que en la colonia proveniente de individuos resistentes al sangrado no se presentan cambios heredables ni en los parámetros hematológicos ni en las proteínas séricas, por el proceso de selección realizado. No sabemos si existen realmente cambios en la colonia cerrada que no es posible detectar debido tanto a la variación individual y a la variación de los métodos empleados, como al número pequeño de individuos muestreados. Se ha presentado a lo largo del desarrollo de la colonia la modificación de algunos parámetros; sin embargo, estos cambios no han sido lo suficientemente pronunciados como para separar a la colonia cerrada de la población de conejos en general. Así, podríamos considerar como otra posibilidad el que estos factores no han sido sujetos de variación genética y por lo tanto la selección no puede actuar.

Desconocemos, sin embargo, si existirían diferencias en la respuesta de una anemia experimental entre la colonia cerrada y una colonia abierta.

2.0. VARIACION GENETICA

Los niveles de variación genética estimada como heterocigosis (H) = 0.028 y polimorfismo (P) = 26.84 % en la colonia cerrada de *Oryctolagus cuniculus* muestra una gran diferencia con respecto a los valores encontrados en la colonia abierta (H) = 0.145 y (P) = 45.62%.

Los valores bajos nos indican que hay poca variación genética en la colonia cerrada. Esto sugiere que esta colonia ha sufrido efectos importantes por deriva genética o endogamia, que conducen a una pérdida o disminución de la variación genética, o que existe poco flujo genético dentro de la colonia.

Comparando las frecuencias alélicas de los diferentes loci entre las colonias, se observa que hay mayor heterogeneidad en la colonia abierta, mientras que en la colonia cerrada se observó menor heterogeneidad, es decir, mayor número de loci homocigóticos (Tabla 6).

El trabajo de Daly, 1981 es el único reporta estudios acerca de cuatro enzimas de conejos; sin embargo, sus resultados no nos permitieron hacer una relación comparativa con nuestro estudio, dado el bajo número de enzimas estudiadas. En nuestro caso se estudiaron un número de 20 enzimas en las colonias, permitiendo comprobar que la colonia cerrada de conejos es el 46.66% endogámica, mientras que la colonia abierta posee un 20.00% de endogamia, esta diferencia en el porcentaje nos

indica que en la colonia cerrada existe mayor consanguinidad que en la colonia abierta, ya que este valor se ubica dentro del rango que la caracteriza como endogámica.

Al comparar los resultados de la variación genética en la colonia cerrada *Oryctolagus cuniculus*, con los valores obtenidos para otros mamíferos o vertebrados encontramos valores similares, de polimorfismo y herocigiosidad.

Nei y Roychoudhury (1974) en sus análisis de variación genética en las tres principales razas del hombre, observaron que los valores significativos son mayores que los que reportan Harris y Hopkinson (1972) debido, principalmente, a la inclusión de doce proteínas no enzimáticas, nueve de las cuales son altamente polimórficas; si se omiten estas proteínas de las muestras, la heterocigosis media se reduce $(H)= 0.084$ valor que no es significativamente diferente al obtenido por Harris y Hopkinson (1972).

Estudios realizados por O'Brien *et al.* (1985) en nueve especies de Felidae entre ellos *Acinonyx jubatus* (chita) y otros mamíferos como *Mus musculus* (ratón) y *Homo sapiens* (hombre) para conocer la variación genética por medio de análisis de isoenzimas y variación de proteínas solubles, han revelado una alta variación genética en todas las especies, enfatizando la ausencia de variación genética en el chita. Una causa aducida por los autores es la presencia de un patógeno viral. O'Brien, *et al.* 1983 mostró que otras especies de mamíferos también tenían niveles bajos de variación genética pero este bajo nivel está relacionado a otra causa tal como el tamaño de la muestra.

Allendorf, F.W. *et al.* (1979) en su estudio comprobó que la variación genética en el *Thalarectos maritimus* (oso polar) y otros mamíferos es baja excepto en el hombre. Todos estos estudios llevan a concluir que los vertebrados presentan por lo general menos variabilidad $(H)= 0.06$ que los invertebrados $(H)= 0.134$ y plantas (Selander y Kaufman, 1973).

En cuanto a las frecuencias genéticas y los índices de fijación F de la colonia cerrada indican que existe un exceso de homocigos respecto a lo esperado por apareamiento al azar. Sus valores son homogéneos en general, y la relación entre los siete loci positivos y el total de loci estudiados indican que hay endogamia en esta colonia.

Además, podemos decir que su apareamiento es no aleatorio, es decir, de individuos que están relacionados entre sí por descendencia ancestral (padres e hijos, hermanos) lo que ha hecho incrementar las frecuencias de homocigotos en todos los loci como podemos ver en esta colonia. Por otro lado, seis loci han sido fijados en esta colonia cerrada lo que permite proponer que todos los individuos de ella tienen idéntico genotipo con respecto a esos loci, siendo esto una base de la uniformidad genética de estirpes altamente endogámicas (Falconer 1981).

Al comparar el coeficiente de endogamia obtenido para esta colonia, con los coeficientes reportados (Falconer 1981), se observa que después de 13 generaciones la colonia está por debajo de los valores característicos para varios sistemas de endogamia estrecha. Esto puede deberse a que en nuestra colonia los apareamientos no han sido entre hermanos completos ni entre medios hermanos en forma repetida, sino que las cruces fueron realizadas tomando, predominantemente, padres e hijos, y en ocasiones medios hermanos y hermanos completos.

Por otro lado, los valores de los índices de fijación que son en la mayoría de los loci negativos, y homogéneos para la colonia abierta, indican un exceso de heterocigos respecto de lo esperado por el azar. Únicamente para dos loci (PGM-1 y PGM-3) los valores son estadísticamente significativos lo cual nos indica un exceso de heterocigos real. La razón de esto podría ser la eliminación selectiva de homocigotos o de que la frecuencia génica sea diferente en machos y hembras de la generación paternal. Para el resto de los loci la discrepancia entre lo observado y esperado no es significativa lo cual nos indica que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg y que las diferencias pudieran originarse aleatoriamente en el muestreo de un número tan pequeño de conejos.

Al comparar el coeficiente de endogamia F determinado para cada uno de los conejos de la colonia cerrada usando el árbol genealógico, con el calculado utilizando el índice de fijación F de los diferentes loci, se observa que los valores son prácticamente idénticos y nos llevan a concluir en que la colonia cerrada de *Oryctolagus cuniculus* hay una endogamia cercana al 50%.

VI. CONCLUSIONES

1. La colonia cerrada de conejos *Oryctolagus cuniculus* no se ha visto afectada por el proceso de selección realizado, ni por los parámetros hematológicos ni por las proteínas séricas.
2. Se analizaron por primera vez 17 enzimas con 31 loci en total. Para cada una de las colonias de conejos se encontró un polimorfismo de 26.84% y de 45.62% para la colonia cerrada y abierta respectivamente, mientras que la heterocigosis observada para estas dos colonias fue de 0.028 y 0.145.
3. Los valores del índice de fijación F, indican que la colonia cerrada es más endogámica que la abierta, aun cuando debido a las restricciones de apareamiento en esta última por tratarse de una línea comercial, tiene un cierto grado de consanguinidad.
4. El coeficiente de endogamia F calculado por dos métodos diferentes nos indica que en la colonia cerrada estudiada hay un 50% de endogamia después de 13 generaciones.

BIBLIOGRAFIA

- ALBA LOIS, L., A. MAINERO, V. VALDES, L. BENAVIDES. Y J. MARTINEZ. 1992. Erythropoiesis and iron metabolism: their study in an in vivo system in the rabbit. II. Dependence of the response on iron storage and transport. **Arch Med. Res.** **23**, pp 7-11.
- ALLENDORF, F.W., F.B. CHRISTIANSEN, T. DOBSON, W.F. EANES, Y O. FRYDENBERG. 1979. Electrophoretic variation in large mammals I. The polar bear, *Thalarchos maritimus*. **Hereditas.** **91**, pp 19-22.
- AYALA, F.J., J.R. POWELL, M.L. TRACEY, C.A. MOURAO, y S. PEREZ-SALAS. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. **Genetic variation in natural populations of Drosophila willistoni** **Genetics.** **70**, pp 113-139.
- AYALA, F.J. 1980. **Molecular Evolution.** Interamericana España. pp 16-18.
- BILLINHAM, R.E, y W.K. SILVERS. 1959. Inbred animals and tissue transplantation immunity, **Transplant. Bull.** **6**, 399-406.
- BREWER, G.J. 1970. **An Introduction to Isozyme Techniques.** Acade-Press. USA, pp. 186.
- BROWN, A.H.D. y G.F. MORAN. 1981. Isozymes and the genetic resources of forest. Pags. 1-10. in: M.T. Conkle, ed. **Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects.** Gen. Tech. Rep. PSW-48. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture.
- BRUCE, E.J. y F.J. AYALA. 1979. Phylogenetic relationships between Man and the Apes: Electrophoretic Evidence. **Evolution.** **33**, pp. 1040-1056.
- CASTILLO, R. 1985. **Animales de laboratorio en las investigaciones biomédicas.** Ed. Ciencias Médicas. La Habana. pp. 56-67.
- CROW, J.F. y M. KIMURA. 1970. **An introduction to population genetics theory.** Harper and Row, USA.
- CURZON, G. 1961. Some properties of coupled iron-ceruloplasmin oxidation systems. **Biochem. J.** **79**, pp 656.
- CURZON, G. y S. O' REILLY. 1960. A coupled iron-ceruloplasmin oxidation system. **Biochem Biophys Res Commun.** **2**, pp 284.
- DALY, J.C. 1981. Efectos of social organization and environmental diversity on determining the genetic structure of a population of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. **Evolution.** **35**, pp. 689-706.

- ELLIOTT, F.L., M. PETTER, P.M. WASER, F.G. CRACKEN. 1989. Genetic variation in two populations of *Dipodomys spectabilis*. **J. Mamm.** **70**, pp. 852-855.
- ENDLER, J.A. 1973. Gene flow and population differentiation. **Science** **179**, pp. 243-250.
- FALCONER, D.S. 1986. **Introducción a la genética cuantitativa**. 2da. ed. C.E.C.S.A. México. pp 258 - 260.
- FESTING, M.F. W. y 1972. Mouse strain identification. **Nature** (London). **238**, pp. 315-352.
- FESTING, M.F.W. y J. STAATS. 1973. Standardized nomenclature for inbred strains of rat fourth listing. **Transplantation**. **16**, pp. 221-245.
- FESTING, M.F. 1979. **Inbred Strains in Biomedical Research**. Macmillan, USA, 5, pp 179- 192.
- FOSTER, H., J. Small, y J. Fox. 1981. **The mouse in biomedical research**. Edit. Academic Press. pp 7.
- FUTUYMA, D.J. 1986. **Evolutionary biology**. 2nd edition. Sinaver Associates, Inc. Publishers, USA.
- GOTTLIEB, L.D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics, **Ann. Mo.Bot. Gar.** **64**, pp 161-180.
- HAKIM- ELAHI, E.A. 1982. **Temporal changes in the population structure of the slender wild oat *Avena barbata* as Measured by Allozyme polymorphisms**. Ph. D. thesis University of California. Davis. pp. 124.
- HAMILTON, M.J., R.K. CHESSER, y T.L. BEST. 1987. Genetic Variation in the Texas Kangaroo rat, *Dipodomys elator* Mirriam. **J. Mamm.** **68**, pp. 775-781.
- HAMRICK, J.L., Y. B. LINHART, y J. B. MITTON. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically-detectable genetic variation in plants. **Ann.Rev. Syst.** **10**, pp-173-200.
- HAMRICK, J.L., J.B. MITTON, y Y.B. LINHART. 1981. Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics. pags. 35-41. in: M.T. Conkle, ed. **Proceeding of the Symposium on isozymes of North American Forest trees and forest insects**. Gen. tech. Rep. psw-48. pasific southwest Forest and Range experiment station. Forest service, U.S. Department of Agriculture.
- HAMRICK, J.L. y M.D. LOVELESS. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetics structure of plant populations. pp. 211-233 in: A. Estrada y J.H. Fleming, eds. **Frugivores and Seed Dispersal**. W. Junk. Dordrecht.
- HARRIS, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. **Proc. Roy. Soc. Ser. B.** **164**, pp. 298-310.

- HARRIS, H. 1967. **Enzyme variation in man: some general aspects**. pp. 207 - 214 in J.F. Crow and J.V. Neel (eds). *Proceeding of the Third International Congress of Human Genetics Plenary Sessions and Symposia*. Johns Hopkins Press. Baltimore.
- HARRIS, H.D., A. HOPKINSON y J. LUFFMAN. 1968. Enzyme diversity in human population. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **151**, pp. 232-242.
- HARRIS, H. y D.A. HOPKINSON. 1972. Average heterozygosity per locus in man: an estimate based on the incidence of enzyme polymorphism. **Ann. Hum.Genet. lond.** **36**, pp. 9-20.
- HARRIS, H. y D.A. HOPKINSON. 1976. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. American Elsevier. N.Y.
- HARTL, D.L. 1980. **Principles of population genetics**. Sinauer Ass. Inc. USA, **11**, pp 309 - 325.
- HARTL, D.L. y A.G. Clark. 1989. **Principles of populations genetics**. Sinauer Ass. Inc. USA, pp. 235-280
- HEDRICK, P.W. 1983. **Genetics of population**. Science Books Int. USA.
- HILL, P.G., T.N.C. WELLS. 1983. Bromo cresol purple and the measurement of albumin. **Ann Clin Biochem** **20**, pp. 264.
- HUBBY, J.L. y L.H. THROCKMORTON. 1968. Protein differences in *Drosophila*, IV. A study of sibling species. **Amer. Natur.** **102**, pp. 193-205.
- HUNTER, R.L. y C.L. MARKERT. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels, **Science.** **125**, pp. 1294-1295.
- JOHNSON, E.W. *et al.* 1966. An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light *Drosophila ananassae* strains from American and Western Samoa. **Proc. Nat.Acad. sci. U.S.A.** **56**, pp. 199-225.
- JOHNSON, E.W. y R.K. SELANDER. 1971. Protein variation and systematics in Kangaroo rat (*Dipodomys genus*). **Syst. Zool.** **20**, pp. 377-405.
- JOHNSON, F. M., C.G. KANAPI, R. H. RICHARDSON., M.R. WHEELER, and W.S. STONE. 1986. An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light *Drosophila ananassae* strains from American and Western Samoa. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** **56**, pp. 199-225.
- KING, M.C. y A.C. WILSON. 1975. Evolution at two levels. Molecular similarities and biological differences between humans and chimpanzees, **Science.** **188**, pp. 107-116.

- LEWONTIN, R.C. y J.L. HUBBY. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural population. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural population of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**. **54**, pp. 595 - 607.
- LEWONTIN, R.C. 1967. An estimate of average heterozygosity in man, **Amer. J. Hum. Genet** **19**, pp 681 - 685.
- LEWONTIN, R.C. 1974. **The genetic basis of evolutionary change**. Columbia University Press. USA.
- LIVINGSTONE, F.B. 1967. **Abnormal hemoglobins in human populations**. Aldine. Chicago.
- LOUDERBARK, A., E.H. MEALEY, N.A. TAYLOR. 1968. A new dyebinding technique using brom cresol purple for determination albumin in serum. **Clin Chem**. **14**, pp. 793.
- LUSH, I. E. 1967. **The biochemical genetics of vertebrates excepts man**. North- Holland. Amsterdam.
- LYON, M.F. 1978. Standardized genetic nomenclature for mice: past, present and future. In: **Origin of Inbred Mice** (H.C Morse, III, ed.), pp 445-455. Academic press, USA.
- MAINERO, A. 1982. **Caracterización y cinética de las diferentes poblaciones de células sanguíneas nucleadas de conejo bajo distintas condiciones de anemia**. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- MAINERO, A. 1993. **Purificación y caracterización parcial de la ceruloplasmina de conejo y su participación en el metabolismo del hierro**. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- MANCINI, G., A.O. Carbonara, y J.H. Hermans. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry** **2**, pp. 235.
- MARKERT, C.L. y F. MOLLER. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. **45**, pp. 753-763.
- MARKERT, C.L. 1968. The molecular basis for isozymes. **Ann. N.Y. Acad.Sci**. **151**, pp. 14-40.
- MARTINEZ, M.J., VALDÉS V.L., A. LOIS, B. BECERRIL, B. MAYANI, y MAINERO, A. 1991. **A Study of Erythropoiesis and Iron Metabolism in Rabbit in vivo. I**. Caracterización and limits of the Physiological Response. **Arch Invest Med**. **22**, pp. 312.
- MAYANI, V.H. 1984. **Estudio y caracterización de los precursores eritroides presentes en la médula ósea de conejos a lo largo de un proceso de anemia inducido experimentalmente**. Tesis profesional, Facultad de Ciencias. UNAM. México.

- MORSE, H.C. 1981. The laboratory Mouse - A - Historical perspective en: The Mouse in biomedical research vol. 1. **History, genetics and wild Mice**. Editors Foster HL, small DJ and Fox J.G. Academic press New York, USA. chap 1, pp 1-16.
- MURAYAMA, T., AND M. KIMURA. 1980. Genetic variability and effective population size when local extinction and recolonization of subpopulations are frequent. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 77, pp. 6710- 6714.
- MURPHY, R.W. *et al.* 1990. **Proteins I**: Isozyme electrophoresis en: Molecular systematics. Ed, David M. Hillis and Sinaver Associates, Inc. publishers. Craig Moritz. USA. chap 4. pp. 45-126.
- MYERS, K., y W.E. POOLE. 1962. A study of the biology of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, in confined populations. III. reproduction. **Aust. J. Zool.** 10, pp. 255-267.
- MYKYTOWYCZ, R. Y P.J. FULLAGER. 1973. Effects of social environment on reproduction in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. J. reproduction. **Fertil.** 19, pp. 503-522.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations, **Amer. Natur.** 106, pp. 283-292.
- NEI, M. y A.K. ROYCHOUDHURY. 1974. Genic variation within and between the three major races of man, Caucasoids, Negroids and Mongoloids. **Amer. J. Hum. Genet.** 26, pp. 421-443.
- NEI, M. 1987. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, USA.
- NEVO, E. 1978. Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. **Theor. Population. Biol.** 13, pp. 121-177.
- O'BRIEN, J.S., GOLDMAN, D., MERRIL, R.C, y BUSH, M. 1983. The cheetah is depauperate in genetic variation. **Science.** 227, pp 459 - 461.
- O'BRIEN, J.S., M.E. ROELKE, L. MARKER, A. NEWMAN, C.A. WINKLER, D. MELTZER, L. COLLY, J.F. EVERMANN, M. BUSH, y D.E. WILDT. 1985. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. **Science.** 227, pp. 1428-1433.
- PETRAS, M.L. y F.G. BIDDLE. 1967. Serum esterases in the house mouse. *Mus musculus*. **Canadian J. Genet. Cytol.** 9, PP. 704-710.
- PIÑERO, D. 1982. **Correlation between enzyme phenotypes and physical environment in california populations of *Avena barbata* and *Avena fatua***. Ph. D. thesis. University of California, Davis, USA.
- PIÑERO, D. y L. EGUIARTE. 1988. The origin and biosystematic status of *Phaseolus coccineus* ssp. Polyanthus: electrophoretic evidence. **Euphytica.** 37, PP. 199-203.

- PULIDO, C.G. 1982. **Estudio de los mecanismos involucrados en el transporte de hierro en conejos hechos anémicos por sangrado.** Tesis profesional, Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- RICHARDSON, B.J., P.R. BAVERSTOCK, y M. ADAMS. 1986. **Allozyme electrophoresis.** Academic press. Australia.
- RIDER, C. y C. TAYLOR. 1980. **Isoenzymes.** Chapman & Hall. USA.
- SELANDER, R. K. 1969. Protein polymorphism and genic heterozygosity in a wild population of the house mouse (*Mus musculus*). **Genetics.** **63**, pp. 653-667.
- SELANDER, R.K., W.G. HUNT. y S.Y. YANG. 1969.a. Protein polymorphism and genetic heterozygosity in two European subspecies of the house mouse. **Evolution.** **23**, pp. 379-390.
- SELANDER, R.K., S.Y. YANG, y W.G. HUNT. 1969.b. Polymorphism in esterases and hemoglobin in wild populations of the house mouse (*Mus musculus*). **Studies in genetics V. Univ. Texas Publ.** **6918**, pp. 271-338.
- SELANDER, R.K. y S.Y. YANG. 1969. Biochemical genetics and behavior in wild house mouse populations. In G. Lindzey and D.D. Thiessen (eds), **Contributions to Behaviors-genetics Analysis the Mouse as a Prototype.** **Appleton-Century-Crofts, New York**, in press.
- SELANDER, R.K. 1970. Behavior and genetic variation in natural populations. **Amer. Zool** **10**, pp. 53-66.
- SELANDER, R.K., M.H. SMITH., S.Y. YANG., W.E. JOHNSON, y J.B. GENTRY. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse. (*P. polionotus*). **Univ. Texas Publ. Genet.** **7103**, pp. 49- 90.
- SELANDER, R.K. y D.W. KAUFMAN. 1973. Genic variability and strategies of adaptation in animals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **70**, pp. 1875-1876.
- SELANDER, R.K. y E.W. JOHNSON. 1973. Genetic variation among vertebrate species. **Annual Review of Ecology and Systematics.** **4**, pp. 75-91.
- SWOFFORD, D.L. y R.B. SELANDER. 1981. Biosys-1, A computer program for the analysis of allelic variation in genetics. Release 1. Urbana: University of Illinois
- SHADE, A.L., J. OYAMA, R.W. RANHART, R.L. MILLER. 1954. Bound iron and unsaturated iron-binding capacity of serum: rapid and reliable quantitative determination. **Proc Soc. Exp. Biol. Med.** **87**, pp. 443.

- SITES, J.W., JR., R.L. BEZY and P. THOMPSON. 1986. Nonrandom heteropolymen expression of lactate dehydrogenase isozymes inthe lizard family Xantussiidae. **Biochem. Syst. Ecol.** **14**, pp 539- 545.
- SLATKIN, M. 1980. The distribution of mutant alleles in a subdivided population. **Genetics.** **95**, pp. 503-523.
- STAATS, J. 1976. Standardized nomenclature for inbred strains of mice: Sixth listing. **Cancer Res.** **36**, pp. 4333-4377.
- SOLTIS, D.E., C.H. HAUFLER, D.C. DARROW, y G.J. GASTONY. 1983. Starch gel electroforesis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **Amer. Fern. J.** **73**, pp. 9-27.
- VELAZQUEZ, N. 1984. **Cambios en los parámetros hematológicos y aspectos de transporte del hierro durante las primeras etapas del desarrollo postnatal en el conejo.** Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- WRIGTH, S. 1977. **Evolution and The Genetics of Populations.** Vol. 3: Experimental results and evolutionary deductions. University of Chicago press. Chicago. pp. 45-96.

APENDICE 1.

METODOS ELECTROFORETICOS.

Abreviaciones

DPN: Beta-nicotinamida adenina dinucleótido (SIGMA N-7004)
 MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (SIGMA M-2128)
 NBT: Azul de tetrazolio (SIGMA N-6876)
 PMS: Fenozine metosulfato (P-9625)
 TPN: Beta-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (SIGMA-M-0505)
 TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano (SIGMA 7-9 T-1378)

Tabla A. 1. Composición de los amortiguadores del gel y del electrodo usados para electroforesis del gel de almidón y condiciones electroforéticas.

AMORTIGUADORES			
Nombre	Gel	Electrodo	Corriente
HlIstidina	pH 7.0 DI-Histidina 1.02 g Aforar a 1 lt con agua destilada. Ajustar el pH con NaOH.	pH 7.0 Ac.Cítrico 9.04 g Tris 16.35 g Aforar a 1 lt con agua destilada.	45 mA (4 h.)
Litio	pH 7.6 Tris 5.04 g Ac. Cítrico 1.47 g LioH 0.16 g Ac. Bórico 1.56 g Aforar a 1 lt con agua destilada. Ajustar el pH con HCl.	pH 8.0 LioH 1.64 g Ac. Bórico 16.23 g Aforar a 1 lt con agua destilada. Ajustar el pH con LioH.	225 vol. (7 h.)
TEMM	pH 7.4 Llevada acabo la dilución al amortiguador restante es para el electrodo.	pH 7.4 Anh. Maleico 0.98 g EDTA 3.72 g Tris 12.1 g MgCl 2.03 g El Anh. Maleico y el EDTA se calientan en 500 ml de agua El Tris y el se disuelven MgCl en 500 ml de agua se unen las dos partes. Ajustar el pH con HCl. Se hace una dilución 1:10 con agua destilada.	35 mA (12h)
Tris-citrato	pH 8.0 Ac-Cítrico 33.09 g Tris 83.2 g Aforar a 1 lt con agua destilada.	pH 8.0 Se hace una dilución 1:29 para el electrodo	100 mA (17h)

SOLUCIONES DE TINCION

1. 1M Acetato de sodio, pH 5.0:

Acetato de sodio cristalino (Trihidratado)	136.1g
Agua destilada	1 lt

 Ajustar el pH con ácido acético.

2. Amortiguador de fosfatos pH 6.0:

Fosfato de potasio dibasico	45.6g
Fosfato de potasio monobásico	109.0g

 Aforar a 100 ml con agua destilada.

3. 1M Tris-HCl pH 8.0:

Tris	121.1g
------	--------

 Aforar con 1 lt con agua destilada
 Ajustar el pH con ácido clorhídrico (HCl) concentrado.

4. 1 % Acetato alfa-naftil

Acetato alfa-naftil	1.0g
Acetona	100ml

5. 1 % Fosfato ácido alfa-naftil

Fosfato ácido alfa-naftil	1.0g
Acetona	50ml
Agua destilada	50ml

TINCION ESPECIFICA PARA LAS ENZIMAS

ACONITASA (ACO; E.C. 4.2.1.3)

- | | |
|---------|-----------------------------------|
| 0.075 g | Ac. cis-aconítico |
| 50 ml | 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 |
| 1 ml | 1 M MgCl ₂ |
| 10 ml | Isocitrato deshidrogenasa (1μ/ml) |
| 1 ml | 1 % TPN |
| 2 ml | 1 % MTT |
| 0.2 ml | 1 % PMS |
- Incubar a la oscuridad a 30 °C.

ADENILATO CINASA (AK; E.C. 2.7.4.3)

57 mg	ADP
32 mg	Hexocinasa
50 ml	0.2 M Tris-HCl, pH 8.0
113 mg	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
1 ml	1 M MgCl ₂
1 ml	1 % TPN
1 ml	1 % MTT
0.1 ml	1 % PMS

Amortiguador Histidina, tiempo 4 horas.

Incubar a la oscuridad a temperatura ambiente por un tiempo de 5 horas.

FOSFATASA ALCALINA (ALP; E.C. 3.1.3.1)

0.15 g	Polivinyil pirrolidona
0.05 g	Fast Blue BB salt
0.85 g	NaCl
1 ml	1 M MgCl ₂
0.15 ml	1 % Alfa-naftil ácido fosfato (Sol. de tinción N°5)
50 ml	0.2 M Tris-HCl, pH 9.0

Incubar a la oscuridad a temperatura ambiente.

CREATINA CINASA (CK; E.C. 2.7.3.2)

57 mg	DPN
32 mg	Hexocinasa
0.05 g	Fosfocreatina
0.01 g	TPN
0.002 g	PMS
0.01 g	MTT
0.36 g	Agar
25 ml	0.2 M Tris-HCl, pH 8.0
113 mg	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
1 ml	1 M MgCl ₂

Amortiguador Histidina, tiempo 4 horas.

Incubar a la temperatura ambiente 3 Horas.

DIAFORASA (DIA; E.C. 1.6.99)

0.004 g	2,6-Diclorofenol-indofenol
0.012 g	Beta-NADH
0.008 g	MTT
0.36 g	Agar
20 ml	0.025 M tris-HCl, pH 8.6
24 ml	agua destilada

Amortiguador TEMM, tiempo 12 horas.

Incubar a la oscuridad a 37 °C. 6 horas.

ENZIMA MALICA (ME; E.C. 1.1.1.40)

5 ml	1 M Tris-HCl, pH 8.0 (Sol. de tinción N°3)
45 ml	agua destilada
5 ml	1 M DL-Malato, pH 7.8
1 ml	1 M MgCl ₂
0.01 ml	1 % TPN
0.01 ml	1 % PMS
0.015 ml	1 % MTT

Amortiguador TEMM, tiempo 12 horas.

Incubar a la oscuridad a 30 °C. 7 horas.

ESTERASA (EST; E.C. 3.1.1.1)

0.063 g	Fast blue RR salt
2.5 ml	1 % Acetato alfa-naftil (Sol. de tinción N°4)
2.5 ml	1 M Amortiguador de fosfatos, pH 6.0 (Sol. de tinción N°2)
45 ml	Agua destilada

Amortiguador Litio, tiempo 7 horas.

Teñir en la oscuridad a temperatura ambiente 2 horas.

FOSFATASA ACIDA (ACPH; E.C. 3.1.3.2)

0.075 g	Fast Garnet GBC salt
50 ml	Agua destilada
1 ml	10 % MgCl ₂
2 ml	1 % Fosfato ácido alfa-naftil (Sol. de tinción N°5)
4 ml	1 M Acetato de sodio, pH 5.0 (Sol. de tinción N°1)

Amortiguador Histidina, tiempo 4 horas.

Teñir en la oscuridad a temperatura ambiente 7 horas.

FOSFOGLUCOMUTASA (PGM; E.C. 2.7.5.1)

0.075 g	D-glucosa-1-fosfato
113 mg	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
0.01 g	TPN
0.005g	MTT
0.001 g	PMS
5 ml	1M Tris-HCl, pH 8.0 (Sol. de tinción N°3)
50 ml	Agua destilada
1 ml	1 M MgCl ₂

Amortiguador Histidina, tiempo 4 horas.

Incubar ala oscuridad a temperatura ambiente 5 horas.

6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA (6-PGD; E.C. 1.1.1.44)

0.05 g	Acido- 6-fosfogluconico (sal de bario)
0.01 g	TPN
0.005 g	MTT
0.001 g	PMS
5 ml	1M Tris-HCl, pH 8.0 (Sol. de tinción N°3)
50 ml	Agua destilada
1 ml	1M MgCl ₂

Amortiguador Histidina, tiempo 4 horas.

Incubar a la oscuridad a 37 °C. 6 horas.

FOSFOGLUCOSA ISOMERASA (PGI; E.C. 5.3.1.9)

0.02 g	D-fructuosa-6-fosfato
0.01 g	TPN
0.01 g	MTT
0.03 g	PMS
50 ml	1M Tris-HCl, pH 7.5
80 ml	Agua destilada
1 ml	10 % MgCl ₂
4.5 ml	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (40u)

Amortiguador TEMM, tiempo 12 horas.

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente 8 horas.

FUMARASA (FUM; E.C. 4.2.1.2)

0.05 g	Acido fumárico
0.0073 g	Malato deshidrogenasa
0.01 g	DPN
0.01 g	NBT
0.005 g	PMS
50 ml	0.2 M Tris-HCl, pH 8.0

Amortiguador Tris-citrato, tiempo 17 horas.

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente por 5 horas.

GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH; E.C. 1.4.1.3)

2 g	Acido L-glutámico
10 mg	DPN
0.015 g	MTT
0.05 g	PMS
10 ml	1 M Tris-HCl, pH 8.0 (Sol. de tinción N°3)
40 ml	Agua destilada

Amortiguador Litio, tiempo 7 horas.

Incubar en la oscuridad a 37 °C. 4 horas.

GLUTAMATO OXALOACETATO TRANSAMINASA (GOT; E.C. 2.6.1.)

- 1) 2 g Acido Ketoglutárico
4 g L. Acido aspártico
- 2) 4 mg Piridoxal- 5 fosfato
150 mg Fast Blue BB salt

Añadir a 1):

50 ml	1M Tris-HCl, pH 8.0
100 ml	Agua destilada

Amortiguador Histidina, tiempo 4 horas.

Mezclar 1. y 2. e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente de 2-4 horas. Leer rápido.

HEXOCINASA (HEX; E.C. 27.1.1)

- 1) 25 mg Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa
 2 ml 1 M MgCl₂
 25 ml 0.2M Tris-HCl, pH 8.0
 1 ml 1 % MTT
 0.3 ml 1 % PMS
- 2) 15 ml 0.2M Tris-HCl, pH 8.0
 10 ml Agua destilada
- 3) 36 mg Agar
 15 ml Tris

Mezclar 1 y 2. e incubar a la oscuridad 2 horas.

ISOCITRATO DESHIDROGENASA (IDH; E.C. 1.1.1.42)

- 0.1 g Acido isocitrico
 1 ml 1 % TPN
 1 ml 1 % MTT
 0.2 ml 1 % PMS
 25 ml 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0
 1 ml 1 M MgCl₂
 0.36 g Agar

Amortiguador TEMM, tiempo 12 horas.

Incubar en la oscuridad a 37 °C. toda la noche.

LACTATO DESHIDROGENASA (LDH; E. C. 1.1.1.27)

- 10 mg DPN
 5 mg MTT
 5 mg PMS
 500 mg Agar
 2 ml Acido DI Láctico
 25 ml 0.05M Tris-HCl, pH 8.0
 25 ml Agua destilada

Amortiguador TEMM, tiempo 12 horas.

Incubar en la oscuridad a 37 °C. 5 horas.

LEUCINA AMINO PEPTIDASA (LAP; E. C. 3.4.11.1)

100 mg	Fast Black-k-salt
1 ml	2.5 % L.Leucil-amide
50 ml	0.2 M Tris-maleato, pH 5.2
5 ml	Agua destilada

Amortiguador Litio, tiempo 7 horas.

Incubar en la oscuridad durante 15-30 minutos a 37 °C. Posteriormente agregar el Fast Black-k-salt disuelto e incubar nuevamente por 3 horas.

MALATO DESHIDROGENASA (MDH; E. C. 1.1.1.37)

8 mg	DPN
8 mg	NBT
0.01 g	PMS
25 mg	1M Acetato de sodio, pH 5.0 (Sol de tinción N°1)
50 ml	0.2 M Tris-HCl, pH 8.05
5 ml	1M DL-Malato, pH 7.8

Amortiguador Tris-citrato, tiempo 17 horas.

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente 3 Horas.

PEROXIDASA CATODICA (CPX; E. C. 1.11.17)

50 mg	3-Amino-ethyl-carbozole
3.5 ml	Dimetil formamida
1 ml	3 % Peróxido de hidrógeno
5 ml	1M Acetato de sodio, pH 5.0 (Sol, de tinción N°1)
1 ml	1 % CaCl ₂
50 ml	Agua destilada

Amortiguador Litio, tiempo 12 horas.

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente 5 horas.

PIRUVATO CINASA (PK; E. C. 2.7.1.40)

57 mg	ADP
0.01 g	NAD
0.01 g	MTT
0.002 g	PMS
32 mg	Hexocinasa
0.02 g	Phosfoenol-piruvato
25 ml	0.2 M Tris-Hcl, pH 8.0
1 ml	0.1 M MgCl ₂
113 mg	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Amortiguador Histidina, tiempo 4 horas.

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente 3 horas.

SHIKIMATO DESHIDROGENASA (SDH; E. C. 1.1.1.25)

0.100 g	Acido shikimico
0.010 g	TPN
0.010 g	MTT
0.005 g	PMS
20 ml	1M Tris-HCl, pH.8.0
80 ml	Agua destilada

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

SUPEROXIDO DESMUTASA (SOD; E. C. 1.15.1.1)

10 mg	DPN
0.010 g	NBT
0.002 g	PMS
50 ml	0.1 M Tris-HCl,pH.8.0
3 ml	Etanol

Amortiguador Histidina, tiempo 4 horas.

Incubar en la oscuridad a 30 °C. 2 horas.

Esta enzima resulto al llevar a cabo la tinción para la enzima Alcohol deshidrogenasa (ADH).

Fe de erratas**VI. CONCLUSIONES**

1. La colonia cerrada de conejos *Oryctolagus cuniculus* no se ha visto afectada por el proceso de selección realizado, ni en los parámetros hematológicos ni en las proteínas séricas.
2. Se analizaron por primera vez 17 enzimas con 31 loci en total. Para cada una de las colonias de conejos se encontró un polimorfismo de 26.84% y de 45.62% para la colonia cerrada y abierta respectivamente, mientras que la heterocigosis observada para estas dos colonias fue de 0.028 y 0.145.
3. El coeficiente de endogamia F calculado por dos métodos diferentes nos indica que en la colonia cerrada estudiada hay un 50% de endogamia después de 13 generaciones.