

ESTUDIOS ELECTROFORETICOS EN CONEJOS II.

ZARAGOZA, M.P., ARANA, A.

Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCION

La existencia de investigaciones en la caracterización y diferenciación a través de marcadores genéticos (polimorfismos bioquímicos) de distintas razas e incluso líneas de diversas especies ganaderas y su bajo nivel de desarrollo en la especie cunícola, sobre todo en las razas españolas, nos indujo a llevar a cabo los primeros estudios electroforéticos para caracterizar y conocer las razas cunícolas explotadas en nuestro país, a través de marcadores genéticos.

En España nos encontramos actualmente con la presencia de razas locales de indudable valor, que se han fijado y posteriormente casi abandonado, como es el caso del Gigante de España de los que desconocemos su constitución genética, detectable sólo mediante marcadores genéticos, en este caso polimorfismos bioquímicos que a su vez son responsables de la variabilidad genética de las distintas razas.

En la mayoría de las especies animales se observa una variabilidad genética en rasgos cualitativos, lo cual da lugar a diferencias entre fenotipos. FORD (1940) designó a esta variabilidad con el nombre de "polimorfismo genético", es decir la aparición al mismo tiempo, y en el mismo hábitat, de dos o más formas genéticamente y fenotípicamente distintas de una especie, en tal proporción que la más rara de ellas no pueda mantenerse por mutación periódica recurrente. Este polimorfismo atañe tanto a rasgos externos (forma, color, etc...), como a caracteres detectables por métodos laboratoriales. Es a este grupo al que pertenecen los polimorfismos bioquímicos, que según SEGER y LUCOTTE (1981) son representativos de la variación genética detectable a nivel molecular.

SMITHIES (1955), cuyo descubrimiento inició la metodología electroforética para la detección de variantes moleculares (polimorfismos bioquímicos electroforéticos), fué uno de los que permitió avances más representativos de la genética bioquímica. Durante los años 60 comenzaron a estudiarse los polimorfismos bioquímicos electroforéticos en distintas especies vege-

tales y animales. En la década de los 70, las investigaciones de los polimorfismos bioquímicos electroforéticos en especies ganaderas cobró un gran auge, especialmente con el estudio de las variables sanguíneas, tanto eritrocitarias como plasmáticas, determinadas genéticamente.

El estudio de los polimorfismos en especies ganaderas está principalmente abocado al esclarecimiento de su significación biológica tanto en los aspectos genéticos como los bioquímicos, ecológicos y biológicos, todos ellos a menudo íntimamente combinados entre sí.

En ganadería y en este caso nos referimos a la cunicultura en especial, los marcadores genéticos sanguíneos tienen múltiples aplicaciones, entre las que podemos citar: a) Identificación de los animales. b) Comprobación de parentesco. c) Estudio de la estructura genética de las poblaciones. d) Estudio de las relaciones genéticas y filogenia de líneas, razas y poblaciones ganaderas. e) Estudio de su correlación con caracteres productivos del ganado y posible utilización en la selección animal desde el nacimiento. f) Experimentación animal con creación y caracterización de líneas comerciales.

Dadas las grandes posibilidades de cara a una eficaz ayuda a la ganadería, además de la falta de caracterización en la especie cunicola, este trabajo se ha centrado en el estudio de los polimorfismos bioquímicos electroforéticos sanguíneos tanto plasmáticos como celulares en distintas razas de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) existentes en España.

MATERIAL Y METODOS

Los primeros pasos se han orientado en la búsqueda exhaustiva y completa en lo que a bibliografía se refiere. Actualmente se poseen más de trescientas citas sólo referidas a polimorfismos bioquímicos en conejos para su posible estudio como marcadores genéticos. Igualmente se ha realizado un servicio de consulta bibliográfica a través del terminal remoto de ordenador instalado en el Instituto de Información y Documentación en Ciencia y Tecnología de Madrid.

Después de completas la bibliografía conviene estudiar por un lado la genética básica de las razas autóctonas españolas y otras extranjeras utilizadas en nuestro país, y por otro las producciones de las mismas.

Para realizar el estudio de la genética básica se han tomado muestras en distintos puntos de España (Aragón, Cataluña, Navarra) y en distintas razas entre las que podemos mencionar: Común español, Gigante de España, Neozelandés blanco, California, Leonado de Borgoña y Mariposa y una Línea híbrida con el fin de demostrar la posibilidad y practicidad del método que proponemos, de cada animal se ha recogido dos centímetros cúbicos de sangre y dos centímetros cúbicos de suero, mediante corte en la vena marginal de la oreja. El ritmo de extracción osciló entre 8-10 conejos/hora, que ingresaron en el laboratorio en el mismo día de la sangría.

La extracción del suero a partir de sangre sin anticoagulante se realizó manteniendo la sangre a temperatura ambiente durante 24 horas y separando el coágulo de la pared del tubo con una aguja larga; posteriormente se centrifugó a 1000g. durante 15 minutos para eliminar el plasma y la capa de leucocitos ayudados de una trompa de vacío. Seguidamente se realizan lavados con solución salina (cloruro sódico al 0,9% a pH = 7,3) hasta conseguir que el sobrenadante esté limpio y transparente. Desechar éste.

La hemólisis de las células rojas se realizó por congelación a -30°C durante 48 horas. Seguidamente el hemolizado se almacenó en una cámara de congelación a -25°C .

Para el estudio de cada marcador genético, en este caso polimorfismo bioquímico, se han puesto a punto una serie de técnicas usando como medio de soporte el gel de almidón y el gel de poliacrilamida. Cada uno de los pasos se detallan seguidamente:

1.- Gel de almidón.

Confeción del gel, se realiza fabricando anteriormente un molde de cristal vertiendo una solución tampón, que contiene disuelto el almidón, cubriéndola con un cristal para obtener una superficie homogénea, dejando transcurrir 18-24 horas, necesarias para la gelificación.

Se procede después a la colocación de las muestras en el gel, para ello se levanta con cuidado el cristal superior y se realiza un corte transversal al gel a la distancia que interese en cada caso del cátodo, donde se colocan cuadraditos de papel Whatmann. Posteriormente se realiza el mon-

taje del gel en cámara frigorífica a 4°C. (electroforesis horizontal). Los compartimentos de cubetas de electroforesis se comunican mediante una goma spontex, y las cubetas con el gel mediante cuadrados de papel Whatmann. La conexión de las fuentes de alimentación se lleva a cabo mediante los bornes de las cubetas y un cable con dos polos que se unen a la fuente de alimentación y comienza el paso hacia el gel de corriente continua durante un tiempo adecuado en cada caso.

Para poder visualizar la separación de las proteínas en estudio, es necesario añadir a la superficie del gel una serie de reactivos (específicos en cada caso) que al reaccionar con ellas aparezcan coloreadas.

2.- Gel de Poliacrilamida.

Confección del gel. Se realiza fabricando anteriormente un molde de cristal y vertiendo una solución de acrilamida procurando que no haya burbujas. Seguidamente se procede a la colocación de las muestras en el gel. Utilizamos una jeringa Hamilton y depositamos en cada celdilla una muestra problema. Posteriormente se realiza el montaje del gel en cámara frigorífica a 4°C. (Electrofores vertical) Para establecer el puente entre la cubeta de electroforesis y el gel se utiliza una bayeta porosa. Se procede a la conexión de la fuente de alimentación, comenzando la electroforesis a corriente continua.

El revelado de las proteínas se realiza de la misma forma que el indicado para el gel de almidón.

RESULTADOS Y DISCUSION

Hasta el momento, siguiendo este método de trabajo, hemos estudiado 9 proteínas séricas (Transferrina, Albúmina, Postalbúmina, Ceruloplasmina, Hemopexina, Haptoglobina, β -Globulina, Grupo complemento y Esterasas séricas) y 13 eritrocitarias (Hemoglobina, Esterasa-1, Esterasa-2, Esterasa-3, Adenosin deaminasa, 6-Phosphoglucónico deshidrogenasa, Adenilato kinasa, Tetrazolium oxidasa, NADH diaforasa 1, NADH diaforasa 2, Catalasa, Anhidrasa carbónica 1 y Anhidrasa carbónica 2).

De las 22 proteínas sanguíneas estudiadas, 13 han aparecido polimórficas, 6 de ellas son proteínas séricas: Transferrina, Postalbúmina, Hemopexina, Haptoglobina, β -Globulina, Esterasas séricas y 7 eritrocitarias: Esterasa 1, Esterasa 2, Esterasa 3, Adenosin desaminasa, 6-Fosfogluconico deshidrogenasa, NADH diaforasa 1, Anhidrasa Carbónica 1. El resto (9) son monomórficas, es decir, no aparece variación electroforética: Albúmina, Ceruloplasmina, Grupo complemento, Hemoglobina, Adenilato kinasa, Tetrazolium oxidasa, NADH diaforasa 2, Catalasa y Anhidrasa carbónica 2 (ZARAGOZA, 1984).

Esta proporción alta de proteínas polimórficas encontradas nos abre todo un mundo en la genética del conejo, con la posibilidad de utilizar estos marcadores en la identificación de razas, poblaciones y animales selectos, ello unido a un control de los caracteres productivos y reproductivos de los animales originará el estudio de las posibles correlaciones, lo que da lugar a la selección del animal desde su nacimiento, sin necesidad de esperar a la comprobación de su eficacia por su descendencia. Este último hecho originaría un aumento de la rentabilidad de las explotaciones.

Actualmente se está realizando el estudio del control genético de cada marcador mediante análisis segregacional y estudio de ligamiento.

Una vez conocido el control genético de cada marcador sanguíneo se procederá a la caracterización genética de distintas razas de conejos e igualmente es posible realizar un estudio de las distancias genéticas existentes entre poblaciones, con la ventaja de que una vez conocida esta distancia genética, puedan cruzarse razas alejadas para obtener la ventaja productiva de la heterosis.

BIBLIOGRAFIA

- FORD, E.B.: Polymorphism and taxonomy. En Huxley (Ed.): The new systematics, Claderon Press, Oxford, 1940.
- MARTINEZ, J.: Investigación en Cunicultura. Situación y Futuro. El Campo 88: 20, 1982.
- SEGER, J. y LUCOTTE, G.: La pratique de l'electrophorese appliquée a la détection des polymorphismes humains. Masson, Barcelona, 1981.

SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal adults, Biochem. J. 61: 629, 1955.

ZARAGOZA, P.: Polimorfismos bioquímicos sanguíneos en conejos (*Oryctolagus Cuniculus* L.) explotados en España: Estudios electroforéticos y poblacionales. Tesis Doctoral, Univ. Zaragoza. Dept. Genética y Mejora, 1984.