

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA

ESTANDARIZACION DE LA METODOLOGÍA DE
ELECTROFORESIS PARA Oreochromis niloticus

SEMINARIO

PRESENTADO AL HONORABLE CONSEJO REGIONAL DEL
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA -CEMA-

POR:

YUDEL DAVID KORISTZ SOLORZANO

COMO REQUISITO PARA CONFERIRSELE EL TITULO PROFESIONAL DE
TÉCNICO EN ACUICULTURA

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 1997

12
24
5(19)

RESUMEN

En este trabajo se describen las técnicas de preparación de geles, soluciones y de preparación de extractos de enzimas para análisis electroforético por medio de geles de poliacrilamida. Se utilizaron para este estudio 3 ejemplares de Oreochromis niloticus, dos hembras y un macho y se analizaron las enzimas de 5 tejidos diferentes, aleta, músculo, hígado, ojo y sangre de cada uno de los ejemplares.

Dichas técnicas han sido utilizadas en estudios genéticos en peces, específicamente en Oreochromis niloticus. Se incluye un breve análisis acerca de los datos obtenidos en los tejidos, de cada pez, los cuales contienen información genotípica de cada individuo analizado. No se proporciona un análisis bioquímico muy extenso ya que el principal objetivo de la investigación es el de probar las técnicas ya ensayadas en plantas para su aplicación en estudios poblacionales de peces.

Todas las enzimas analizadas con excepción del Ácido Shikímico fueron polimórficas y se obtuvieron una variedad de patrones en todos los tejidos. Estos se detallan en los zimogramas para cada enzima. Se determinó que las enzimas 6- fosfoglucomato dehidrogenasa y Alcohol dehidrogenadrogenasa son las más adecuadas para el análisis de tejidos de Oreochromis sp. No se encontró ninguna variación en los patrones revelados por la enzima SKDH.

Se demostró que la metodología de electroforesis para el análisis de marcadores genéticos en plantas, es aplicable para el estudio de enzimas en peces, para encontrar posibles marcadores genéticos que puedan ser utilizados para encontrar variaciones genéticas en poblaciones o en lotes de peces.

ÍNDICE GENERAL

Carátula	i
Presentación	ii
Listado de tribunal examinador	iii
Reconocimientos	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1 Antecedentes	3
3.2 Términos y principios básicos	3
3.3 El proceso de la electroforesis	6
3.4 Isoenzimas	7
3.5 Isoenzimas polimórficas para <u>Oreochromis niloticus</u>	9
3.6 Isoenzimas monomórficas para <u>Oreochromis niloticus</u>	10
3.7 Loci de expresiones individuales	11
3.8 Expresiones de loci adicionales	13
3.9 Excepciones para expresiones codominantes	15
3.10 Nomenclatura fenotípica	16
3.11 Fuertes y limitaciones para el estudio de loci en proteínas	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Metodología	19
4.1.2 Preparación de geles	20
4.1.3 Preparación de buffer de extracción	21
4.1.4 Pesado y macerado	21
4.1.5 Colocación del extracto- glicerina en la cámara de electroforesis	22
4.1.6 Corrida de las muestras	22
4.1.7 Tinción y revelación de las enzimas	23
4.2 Materiales	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1 Comparación de zimogramas entre peces	25
5.2 Comparación de zimogramas entre tejidos	28
6. CONCLUSIONES	29
7. RECOMENDACIONES	30
8. BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS

CUADRO 1	25
CUADRO 2	26
CUADRO 3	27
TABLA 1	12
TABLA 2	14
TABLA 3	16
TABLA 4	28

CONSEJO REGIONAL DEL
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA

PRESIDENTE: M.V.FRATERO DIAZ MONGE
COORDINADOR ACADÉMICO: Lic.MAURICIO MEJÍA E.
SECRETARIO: M.Sc. ERICK VILLAGRAN
REPRESENTANTES DEL CLAUSTRO DE CATEDRÁTICOS:
Ing. PEDRO JULIO GARCÍA
M.S.c. LEONEL CARRILLO
REPRESENTANTES ESTUDIANTILES:
T.U.A GUIDO PONCE
T.U.A. GUSTAVO MENENDEZ
T.U.A .RODOLFO LIUTTI
T.U.A. FARAH MENDEZ
Br. MIRIAM DELGADO

ASESOR DE SEMINARIO:
M.Sc. LEONEL CARRILLO OVALLE

RECONOCIMIENTO A:

MIS PADRES

CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA

LABORATORIO DE ELECTROFORESIS DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE
LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

ESTACIÓN PISCÍCOLA DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS
PECUARIOS -DIGESEPE- DE AMATITLAN

Br. FRANCISCO FIGUEROA

Licda. KARLA EVELIN PAZ

M.Sc. LEONEL CARRILLO

M.Sc. LUIS FRANCO

Lic. LORENA BOIX

1. INTRODUCCIÓN

Una molécula con carga neta se desplazara en un campo eléctrico. Este fenómeno llamado **electroforesis**, ofrece un método poderoso para separar las proteínas y otras moléculas, tales como el DNA y RNA.

Las separaciones electroforeticas se realizan casi siempre sobre geles, en vez de disoluciones libres por dos razones principales. La primera, los geles suprimen las corrientes de convección producidas por pequeños gradientes de temperatura, lo que favorece una separación más efectiva. La segunda, los geles sirven de tamices moleculares que potencian la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros de gel se desplazan fácilmente a través de el, mientras que las moléculas mucho mayores que los poros de gel permanecen casi inmóviles. Las moléculas de tamaños intermedios se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad. Los geles de poliacrilamida son los soportes de elección para electroforesis, por que son químicamente inertes y se forman con facilidad mediante polimerización de la acrilamida. Además, escogiendo distintas concentraciones de acrilamida y metilenbisacrilamida y variando los tiempos de polimerización se pueden conseguir tamaños de poros controlados (Stryer, 1990).

En el presente trabajo se realizo un ensayo de las técnicas de electroforesis utilizadas en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos para determinar el sistema reproductivo y estructura genética del zapote (Pouteria zapota) para su aplicación en el estudio de poblaciones de Oreochromis niloticus usando marcadores isoenzimaticos.

Se describe toda la metodología para la elaboración de geles, soluciones para geles, buffer de extracción y extractos de proteínas. Se utilizó material de 5 diferentes tejidos de 3 ejemplares de Oreochromis niloticus procedentes de la estación piscícola de la Dirección General de Servicios Pecuarios (DIGESEPE) de Amatitlan, para su análisis electroforético utilizando cuatro diferentes enzimas para su revelación: Alcohol Dehidrogenasa (ADH), Esterasa (EST), 6- Fosfoglucomato Dehidrogenasa (6 - PHD) y Ácido shikímico (SKDH).

2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 OBJETIVO GENERAL

Probar las técnicas de electroforesis de plantas para el análisis de enzimas en distintos tejidos de Oreochromis sp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Examinar varios tejidos de Oreochromis sp. por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida para identificar enzimas que puedan utilizarse como posibles marcadores genéticos en lotes de peces.

Evaluar cuatro distintas enzimas para su análisis electroforetico en geles de poliacrilamida en diferentes tejidos de Oreochromis sp.

Evaluar el buffer de concentración para extraer las proteínas de los tejidos de Oreochromis sp para su análisis electroforetico en geles de poliacrilamida .

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Antecedentes

Las Tilapias tienen una gran importancia en la acuicultura en las regiones tropicales y subtropicales y ha sido identificado como el grupo de peces más importante para la investigación. Existe un gran número de especies y lotes de peces que se encuentran disponibles para la investigación y cultivo pero sus orígenes se encuentran generalmente poco documentados y estos son en muchos casos difíciles de distinguir por sus características morfológicas o merísticas.

Las técnicas de electroforesis han sido descritas por varios autores y los usos taxonómicos de la electroforesis son bien conocidos. Muchos trabajos ya han demostrado el valor que las enzimas y otras proteínas tienen como marcadores genéticos para la identificación de especies y lotes de peces.

En general, se espera que hasta las especies que están cercanamente relacionadas difieran en sus *loci* enzimáticos en una proporción sustancial (entre 30 -70%). Por lo tanto, sería necesario comparar solamente un reducido grupo de corridas electroforéticas de enzimas para encontrar marcadores que distingan a individuos de diferentes especies. Una vez han sido establecidas las diferencias de las enzimas de los padres, los híbridos intraespecíficos pueden ser identificados con absoluta certeza (Cruz, T. 1982)

3.2 Términos y principios básicos

La mayoría de genes en los organismos diploides superiores se encuentran contenidos en estructuras del núcleo celular llamados *cromosomas*. Una fracción más pequeña de genes se encuentran fuera del núcleo e incluye a los que se encuentran en las mitocondrias. Los cromosomas (y por tanto los genes) ocurren en pares como consecuencia de los sets individuales de cromosomas que son heredados de cada padre. Estos sets individuales son transmitidos en células germinales llamados *gametos*. El proceso de la formación de los gametos (gametogénesis) incluye la *meiosis* la cual

permite a los cromosomas de cada padre asociarse independientemente a cada gameto. Los gametos se unen a través de procesos sexuales; el huevo es fertilizado por una célula individual de un espermatozoide para formar un *cigoto*. La fertilización resulta entonces, en el apareamiento de sets individuales de cromosomas.

El cigoto unicelular pronto se desarrolla en una diversidad de tejidos y órganos altamente diferenciados los cuales llevan a cabo un sin número de funciones. Esta diferenciación ocurre porque, aunque cada célula tiene un complemento genético idéntico, muy pocos genes en los organismos superiores se encuentran activos en una célula particular. La diferenciación es el resultado de la interacción de genes *reguladores* (los cuales determinan cuando y en que tejido un gen particular es expresado) y genes *estructurales* los cuales contienen información para las proteínas que son producidas por los organismos.

La condición en la cual solamente un set sencillo de cromosomas se encuentra presente, como en los gametos, es llamada *haploidia*, mientras que *diploidia* describe los complementos cromosómicos pareados en el cigoto y que subsecuentemente forman los tejidos celulares. Ocasionalmente los cigotos están formados por tres o cuatro sets de cromosomas (*triploidia* y *tetraploidia*).

La localización de un gen en un cromosoma es llamada *locus* (plural *loci*). El set pareado de genes heredado en la diploidia permite que existan dos formas diferentes de genes para un locus particular. Formas diferentes de un gen son llamadas *alelos*. Pueden existir varios alelos en un *locus* particular en una especie, pero un individuo diploide no puede llevar más de dos alelos en un *locus*. Un individuo es *homocigoto* en un locus particular si los genes en este locus son idénticos, y heterocigoto si son diferentes. Se dice que un gen es *monomorfo* si solo un alelo es conocido, y *polimorfo* si se conocen dos o más alelos. El set de alelos que un individuo posee en un locus determinado es conocido como el *genotipo* del individuo en este *locus*. El *fenotipo* son los caracteres observables de un individuo, y pueden ser influenciados por el ambiente como por el genotipo.

La sustancia química fundamental del gen es el ácido desoxirribonucleico, o *DNA*. El DNA es una molécula gigante construida en forma de una escalera en espiral. Los lados de la escalera son azúcares y grupos de fosfatos alternados. Los escalones de la escalera unidos a los azúcares son pares de *bases*: adenina (A), guanina (G), Timina (T) y Citocina (C). Estas bases se combinan ya sea como A - T (o T - A) o C - G (o G - C) debido a limitaciones físicas y químicas que no permiten otras combinaciones. La información genética está contenida en diferentes secuencias de estas cuatro bases leídas desde uno de los lados de la escalera, la banda codificadora del DNA.

La secuencia de bases del DNA tiene una relación lineal directa con la estructura de las proteínas. Las proteínas son similares al DNA en que son grandes moléculas formadas por diferentes componentes llamados *aminoácidos*. Existen 20 aminoácidos comunes en la naturaleza. Los aminoácidos se encuentran conectados por uniones peptídicas para formar cadenas de *polipéptidos*. Las proteínas activas están formadas solo por cadenas péptidas o en agregado, dependiendo de la proteína. Cada cadena de polipéptidos es llamada una *subunidad*, la mayoría de proteínas posee por lo menos 100 aminoácidos.

Se ha encontrado que diferentes combinaciones de las cuatro bases leídas en secuencias de tres (tripletas o codones) contienen información (o código) para distintos aminoácidos. Esta información, alineada en la molécula del DNA, le dice a la célula cual aminoácido forma una molécula de una proteína y en que orden van.

La decodificación de un segmento de una tripleta en la molécula del DNA en una secuencia de aminoácidos es un proceso de dos pasos. Primero, la información genética del patrón del DNA es copiada, o transcrita, a la secuencia de nucleótidos de una segunda clase de ácido nucleico, el ácido ribonucleico (RNA). Este RNA es llamado RNA *mensajero* (mRNA) por que lleva la información codificada de la molécula del DNA del núcleo al citoplasma, donde ocurre la síntesis de las proteínas. Este proceso de síntesis del mRNA es llamado *transcripción*. A diferencia del DNA, el mRNA posee una sola banda y es muy pequeña, permitiéndole pasar del núcleo al citoplasma a través de pequeños poros en la membrana celular. Las cadenas de polipéptidos son ensambladas en el citoplasma de la

célula en estructuras llamadas *ribosomas* a través de un proceso llamado *translación*. De este modo, a través de la *transcripción* y la *traslación*, las secuencias de aminoácidos en las proteínas son reflejos directos de las secuencias de bases de DNA que constituye a los genes.

La división celular y la replica de cromosomas y DNA son procesos complejos. Muchos errores son hechos ocasionalmente en la formación de gametos. Malos apareamientos de bases pueden llevar a la sustitución de aminoácidos y proteínas o a la discontinuación en la formación de cadenas y muy probablemente a una proteína no funcional. Tales malos apareamientos son una fuente común de mutaciones, los cuales, cuando son pasados a la próxima generación, son los principales orígenes de cualquier variación genética.

3.3 EL PROCESO DE LA ELECTROFORESIS

Cinco de los veinte aminoácidos comunes que forman las proteínas están cargados; la carga de la lisina, histidina y arginina es positiva, mientras que la del ácido aspártico y el acidoglutámico es negativa. De este modo, diferentes proteínas tienden a tener distintas cargas eléctricas. La electroforesis utiliza esta propiedad físico-química de las proteínas para separar mezclas de proteínas basada en la carga. Si ocurren diferencias de alelos en un locus codificador de una proteína, frecuentemente la carga de la proteína cambia. La electroforesis en geles hace posible la identificación de las diferencias de los alelos.

El proceso de electroforesis incluye una gel (comúnmente almidón o poliacrilamida) en las cuales la introducción de soluciones de proteínas son separadas por el paso de una corriente eléctrica directa a través de la gel. Inicialmente, se extraen las muestras de proteínas por medio de un buffer de concentración de diferentes tejidos tales como músculo esquelético, corazón e hígado, o a menos que estos ya se encuentren contenidos en líquidos corporales tales como el humor vítreo o suero sanguíneo. Estas mezclas de las proteínas son entonces introducidas a la gel. De 10 a 15 individuos pueden ser analizados en una sola gel.

Una corriente directa es aplicada a través de la gel durante 3 a 5 horas. El tiempo real es determinado por variables como la composición de la solución del buffer utilizada para hacer la gel, su fuerza ionica, y el grosor de la gel. Las proteínas con una carga eléctrica positiva se mueven hacia el polo negativo (catodo) y las proteínas cargadas negativamente se mueven hacia el polo positivo (anodo). El grado de migración es determinado por la carga absoluta de la proteína. Una solución teñidora es añadido a la muestra para marcar el proceso de la electroforesis, luego cada gel es teñida para la actividad de una proteína específica.

La mayoría de proteínas que son estudiadas por medio de electroforesis son *enzimas* las moléculas catalíticas vitales para cualquier forma de vida, debido a que es fácil desarrollar procedimientos histoquímicos para visualizar las actividades de proteínas específicas. Estos procedimientos usan un producto específico de la actividad de la enzima para localizar precisamente a la enzima en la gel.

La localización de la actividad de una enzima en la gel ha sido llamada "método de las isoenzimas". El termino isoenzima se refiere a las diferentes moléculas distinguibles encontradas en los mismos organismos las cuales catalizan la misma reacción. El termino aloenzima se refiere comúnmente a la expresión electroforetica de proteínas alelicas en un locus determinado. La capacidad de localizar visualmente la actividad de una enzima a resultado en la detección de las actividades de docenas de enzimas reflejando noventa o más *loci*.

Tinciones específicas para la actividad de una enzima permiten que se pueda distinguir una enzima particular, una por una, en una mezcla de cientos de proteínas típicamente encontradas en el sustrato del tejido de un pez. El resultado final del procedimiento de la electroforesis son bandas, que identifican la localización de varias formas de un solo tipo de proteína en una gel. El patrón de bandas de un individuo contiene información acerca de su genotipo con respecto a la codificación del locus (*loci*) para esa proteína en particular.

3.4 Isoenzimas

Cuando las geles que han sido sometidas a electroforesis son sumergidas en una solución que tiñe determinada isoenzima, una o más regiones de actividad enzimática son reveladas. El patrón de bandas que se obtiene es el correspondiente fenotipo electroforético, el cual generalmente consiste de una o más bandas coloreadas por cada individuo analizado. Este fenotipo varía grandemente en su complejidad, dependiendo de numerosos factores, tales como organismo, tejido y enzima analizada. En algunos casos, este puede ser simple, consistiendo de una banda invariante en todas las muestras (Figueroa, 1997).

Las isoenzimas pueden observarse cuando los extractos del tejido se someten a electroforesis en uno de los varios tipos de geles y posteriormente se sumergen en soluciones conteniendo colorantes específicos para cada enzima. El análisis genético puede indicar que algunas de las variantes electroforéticas son codificadas por alelos alternos en

un locus, en cuyo caso los productores alélicos se denominan "aloenzimas". Los datos que se obtienen de las geles consisten de un número de productos enzimáticos con relativa movilidad (banda), los que con análisis genéticos apropiados se transforman en genotipos con un locus o multilocus para cada individuo analizado (Figueroa 1997).

Varios factores son considerados como determinantes principales del número de bandas observadas en una gel:

- a) el número de genes que codifican la isoenzima
- b) el estado alélico (homocigoto o heterocigoto)
- c) estructura cuaternaria de los productos de la proteína
- c) su localización subcelular (en plastidios o en el núcleo).

La forma práctica de dilucidar la genética de los patrones electroforéticos es mediante la realización de cruzamientos de prueba. El caso más simple es aquel en el cual una región de tinción con varios electromorfos (aloenzimas) es observado en diferentes individuos.

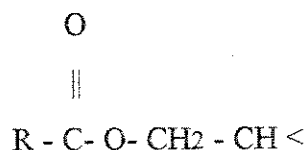
Debido a que las isoenzimas son usualmente heredadas en forma codominante, cruces entre

individuos portadores de diferentes electromorfos producirán una progenie F1 que mostrará los electromorfos parentales. Adicionalmente, la F1 puede mostrar bandas “híbridas” no observadas en ninguno de los padres; la presencia y número de ellas depende del número de subunidades de polipéptidos contenidos en la enzima activa. Así, para una enzima dimérica, tres bandas son observadas, las dos homodiméricas parentales y un producto adicional de movilidad intermedia, o heterodimero, compuesto de un polipéptido codificado por cada uno de los alelos parentales. En el caso de que la enzima sea tetramera, cinco bandas son visibles en individuos heterocigóticos, dos homotetrameras (AAAA y BBBB) y tres heterotetrameras (AAAB, AABB, ABBB). Cabe mencionar que estos son los casos más fáciles de interpretar, sin embargo, cuando dos o más genes están presentes, la interpretación de las bandas electroforéticas se hace más complicada (Figuroa, 1997).

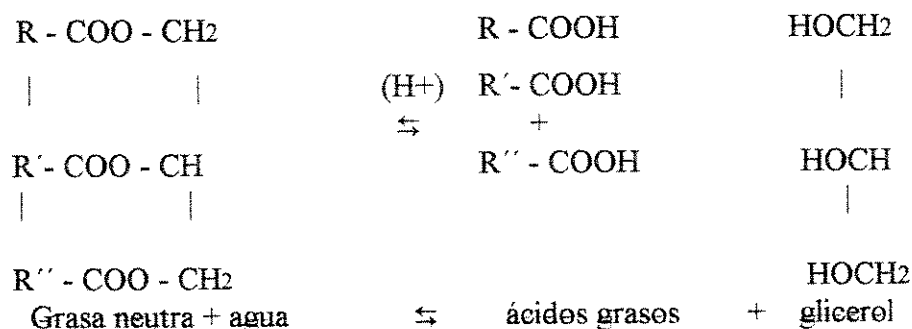
3.5 Isoenzimas polimórficas para Oreochromis niloticus

3.5.1 EST : Esterasa. (EC No.3.1.1.)

Según Stryer, esta enzima pertenece al grupo de las hidrolasas y forma intermediarios covalentes enzima-sustrato. La esterasa posee un grupo reactante serina cuya fórmula es $\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH} <$ y su tipo de intermediario covalente es el Acil éster, de forma molecular:

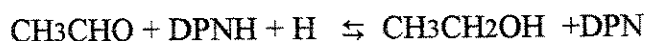


Las esterases son enzimas que catalizan la hidrólisis de las grasas neutras, originando tres moléculas de ácido graso y una de glicol en plantas o animales, también denominadas lípidos. La reacción es la siguiente :



3.5.2 ADH: Alcohol Deshidrogenasa (EC. No. 1.1.1.1)

Esta enzima llamada deshidrogenasa alcohólica cataliza la reacción que reduce el acetaldehído por el DPNH. la reacción es la siguiente:



Así en la levadura, el acetaldehído sustituye al ácido pirúvico como oxidante del DPNH que surge en la oxidación del 3 - fosfogliceraldehído. Esta enzima es importante elemento componente del metabolismo del etanol.

La primera y principal vía usa alcohol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa que convierten el alcohol en acetaldehído y de ahí a acetato, que luego pasa a acetil - CoA. En las dos reacciones se produce NADH - y H⁺.

En la primera vía, el etanol es convertido en acetaldehído, el cual puede seguir dos caminos:

- a) fijación a proteínas y ácidos nucleicos y
- b) conversión a acetato, acetil - CoA y luego intervenir en el incremento de síntesis de ácidos grasos.

En la segunda vía, la enzima interviene en la reacción NADH/NAD elevada produciendo:

- a) incremento en la proporción lactato/piruvato.
- b) inhibición de gluconeogénesis
- c) bloqueo de oxidación de ácidos grasos
- d) inhibición de glicerofosfato deshidrogenasa que lleva a elevar el glicerofosfato.

3.6 Isoenzimas monomórficas para Oreochromis niloticus

3.6.1 SKDH: Ácido Shikímico Deshidrogenasa. (EC. No.1.1.1.25)

Esta enzima interviene en el proceso de síntesis de la fenilalanina y la tirosina y del ácido antranílico, precursor en la síntesis del triptófano.

La mayoría de los compuestos fenólicos se derivan de los intermediarios del metabolismo respiratorio a través del ácido shikímico. Ciertos aminoácidos del grupo prostético de ciertas enzimas y la sustancia que tiene un anillo bencénico es el ácido shikímico, que da su nombre a esta vía de transformaciones.

La vía del ácido shikímico sigue los siguientes caminos:

- a) Por medio de la utilización de un ATP a ADP y PEP, se convierte en ácido corísmico que se transforma en un proceso específico en TRIPTÓFANO (aminoácido)
- b) El ácido corísmico puede transformarse en ácido prefénico y convertirse en TIROSINA
- c) El ácido prefénico también puede transformarse en FENILALANINA.

3.7 Loci de expresiones de loci individuales

La conexión entre las secuencias de las bases del DNA, secuencias de aminoácidos proteicos, y las expresiones electroforéticas de diferentes genotipos pueden ser más fácilmente ilustradas para una proteína *monomérica*. Las proteínas monoméricas son proteínas compuestas por subunidades individuales (una cadena de polipéptidos individual).

Se puede asumir lo siguiente

- Un locus está codificado para una proteína monomérica teniendo dos alelos designados como A y A' (locus polimórfico);
- Estos alelos producen subunidades (la proteína activa para monómeros), designados a y a' respectivamente, que son distinguibles por diferentes movilidades electroforéticas; y
- La proteína a' codificada por el alelo A' emigra más lentamente que la proteína a codificada por el alelo A.

Tres diferentes genotipos son posibles para un individuo en este locus: AA, AA', y A'A'.

Un individuo con el genotipo AA produce solamente la forma de proteína de más rápida migración. Esta forma aparece en una posición en la gel como una banda individual.

Igualmente, un individuo con el genotipo A'A' produce solamente la forma de proteína de más lenta migración en diferentes posiciones en la gel. El genotipo heterocigoto (AA') produce las dos formas de proteínas y esta reflejada como dos bandas en la gel. Asumimos que tal alelo resulta en la producción de cantidades iguales de proteínas teniendo el mismo nivel de actividad. Por esta razón se espera que cada una de las dos bandas de individuos heterocigotos exprese la mitad de la dosis de la banda individual expresada por un individuo homocigoto. Este patrón de expresiones genotípicas de una proteína monomérica codificada para un locus individual con dos alelos es ilustrada en la tabla 1.

TABLA 1

Fenotipos electroforeticos cuando un solo locus es expresad

GENOTIPOS	AA (homocigoto)	AA' (heterocigoto)	A'A' (homocigoto)	subunidades y combinaciones de subunidades
FENOTIPOS Monomero	—	— —	—	a a'
Dimero	—	— — —	—	aa aa' a'a'
Tetramero	—	— — — —	—	aaaa aaaa' aaa'a' aa'a'a' a'a'a'a'

Fuente: Population genetics and fishery management

Los patrones de bandas en una gel se vuelven mas complicados cuando la proteina activa es multimérica, compuesta de dos o mas subunidades proteicas.

Un individuo con el genotipo AA es expresado como una banda individual reflejando moléculas de subunidades a combinadas en parejas. Igualmente, la expresión de un individuo con el genotipo A'A' es otra banda individual reflejando subunidades a'a' apareadas en diferentes posiciones en la célula. Sin embargo un individuo con el genotipo AA' es expresado por tres bandas reflejando las combinaciones al azar, en parejas de las dos clases de subunidades electroforeticamente distinguibles. Dos de las bandas son combinaciones *homoméricas* de subunidades aa y a'a'. La tercera banda del medio es una banda *heteromérica* reflejando combinaciones de subunidades a y a'. (Notese que los monomeros no pueden formar bandas heteromericas porque la subunidad principal es la proteina activa).

Extendamos las suposiciones de las expresiones genotipicas de la tabla 1 para incluir un segundo locus:

La suma de la intensidad de las tres bandas expresadas por genotipos heterocigotos se espera que iguale a la intensidad de las expresiones de homocigotos de una sola banda por que tanto el individuo homocigoto como el heterocigoto producen el mismo número de subunidades.

Los patrones de una proteína con cuatro subunidades (un tetramero) se describen en la parte inferior de la tabla 1. Nuevamente, asumimos un solo locus polimorfo para dos alelos detectables por electroforesis. Las respectivas expresiones homocigotas presentan una sola banda por la identidad de cada una de las cuatro subunidades. El individuo heterocigoto presenta cinco bandas, representando combinaciones al azar de dos subunidades alelicas en agregados de cuatro. Las cinco bandas incluye tres bandas heteroméricas en adición a las dos bandas homoméricas; de nuevo su intensidad combinada es equivalente a la banda individual de las expresiones homocigotas.

3.8 Expresiones de loci adicionales

Patrones electroforéticos mas complicados ocurren frecuentemente cuando el mismo tipo de proteína es codificado para dos o más loci. Estas complicaciones incluye bandas adicionales de proteínas surgiendo de las combinaciones de las subunidades, codificado por diferentes loci y que poseen distintas movilidades electroforéticas, o patrones electroforéticos resultado de dos (o más) loci que poseen la misma movilidad o sobrepuesta.

Extendamos las suposiciones de las expresiones genotípicas de la tabla 1 para incluir un segundo locus. Cada individuo es homocigoto para el alelo B en este locus (locus monomorfo) el cual decodifica subunidades b idénticas electroforéticamente. Ambos loci son expresados en los mismos niveles. Bandas homoméricas de subunidades b poseen diferentes movilidades electroforéticas que aquellos que poseen subunidades a o a' codificadas por los alelos A y A' del primer locus. Los fenotipos de individuos homocigotos en ambos loci (columnas 1 y 3 en la tabla 2) se asemejan a los individuos

heterocigotos en la expresión del locus individual de la tabla 1. Esta semejanza es debido a la similitud entre la expresión de dos alelos del mismo locus en la tabla 1 y dos loci en la tabla 2. En las proteínas monoméricas, una sola banda es expresada para cada alelo (en este caso los alelos A y B contrastaron con los alelos A y A' en el caso del locus individual). Las proteínas multimericas expresan las bandas adicionales de interacciones casuales de las subunidades del individuo (en este caso las subunidades a y b contrastaron con las subunidades a y a' en el caso del locus individual). Las intensidades relativas esperadas de las bandas de fenotipos dimeros y tetrameros de individuos homocigotos cuando solo se expresa un locus individual.

TABLA 2
Fenotipos electroforéticos cuando dos loci son expresados

GENOTIPOS	AA (homocigoto)	AA' (heterocigoto)	A'A' (homocigoto)	subunidades y combinaciones de subunidades
FENOTIPOS Monomero				a a' b
Dimero				aa aa' a'a' ab a'b bb
Tetramero				aaaa aaaa' aaa'a' aa'a'a' aaab a'a'a'a' aaa'b aa'a'b aabb a'a'a'b aa'bb abbb a'bbb bbbb

Fuente: Population genetics and fishery management

3.9 Excepciones para expresiones codominantes

Los fenotipos de las tablas 1 y 2 son llamados expresiones *codominantes* de los genotipos correspondientes por que se pueden identificar las contribuciones de los alelos. Las expresiones codominantes son un atributo importante de la electroforesis debido al valor que tiene la información genotípica en un loci individual en estudios genéticos de poblaciones. Sin embargo, hay excepciones para las expresiones electroforéticas de codominancia que deben de ser consideradas.

La aparición de subunidades electroforéticamente idénticas sintetizadas por dos loci distintos puede ser observada en algunos peces (salmonidos). Uno de los locus o ambos pueden variar. En cualquiera de los casos la expresión electroforética del isoloci hace complicada la determinación de los genotipos.

Una parte de estas complicaciones esta en que es casi imposible asignar alelos a loci específicos cuando dos (o posiblemente más loci) codifican subunidades electroforéticamente idénticas. Las suposiciones subyacentes de los fenotipos de la tabla 2 son iguales que las de la tabla 3 excepto que el producto de los alelos B (unidades b) del locus monomorfo no son electroforéticamente distinguibles a los de los alelos A (subunidades a) del locus polimorfo. Esta situación tienen como resultado la incapacidad de distinguir los aportes de las subunidades a y b del fenotipo electroforético. Consecuentemente , los números y movilidades de las bandas expresadas por ambos genotipos AA' y A'A' son los mismos. Aunque el fenotipo A'A' no produce subunidades a, las dos dosis de las subunidades b que poseen las mismas movilidades de las subunidades a esconden esta ausencia. Ocurriría exactamente la misma situación si el locus B en lugar del locus A fuera polimorfo. No hay forma de distinguir cual locus es polimorfo si ambos loci son expresados en la misma forma en todos los tejidos.

TABLA 3

Fenotipos electroforéticos cuando se expresan isoloci

GENOTIPOS	AA (homocigoto)	AA' (heterocigoto)	A'A' (homocigoto)	subunidades y combinaciones de subunidades
FENOTIPOS Monomero				a, b a'
Dimero				aa, ab, bb aa', a'b a'a'
Tetramero				aaaa,bbbb,aaab,aabb,abbb aaaa',a'bbb,aaa'b,aa'bb aaa'a',aa'a'b,a'a'a'b a'a'a'a'

Fuente: Population genetics and fishery management

3.10 Nomenclatura fenotípica

El material introducido hasta este punto no ha incluido más de dos loci, y en la mayoría de los casos no más de dos alelos en cada locus. Una especie diploide particular posee cientos de loci, y un locus particular frecuentemente posee más de dos alelos (aunque por supuesto que solo uno o dos alelos pueden ser expresados por el individuo. Muchas personas dedicadas al tema han adoptado el uso de un convenio muy útil diseñado por Allendorf y Utter, 1979), en el cual los loci son identificados por abreviaciones con letras itálicas reflejando el nombre de la proteína. Si hay más de un locus para esa proteína de la especie en cuestión, se agrega un número con un guión a la abreviatura del locus; la secuencia de esta numeración comienza con la banda homomérica más alejada del ánodo. Los alelos son también identificados numéricamente basados en las movilidades electroforéticas de las proteínas homoméricas. Se designa 100 a un alelo *LDH-2(100)* y otros alelos son designados de acuerdo al porcentaje de movilidad de sus proteínas homoméricas relativa a la distancia que migró la proteína homomérica del alelo 100. Por ejemplo, una designación alelica de *LDH-2(80)* nos indicaría que el homomero codificado por este alelo emigra 80% de la distancia de la proteína homomérica del alelo *LDH-2(100)*.

3.11 Fuertes y limitaciones para el estudio de loci en proteínas

Los principios para obtener datos acerca del genotipo directamente de patrones electroforéticos pueden ser ampliamente aplicados como resultado de esto la electroforesis ha sido identificada “como el procedimiento más útil que se haya inventado hasta ahora para revelar variaciones genéticas”. El poder único de la electroforesis para detectar variaciones alelicas se ve resaltada por el gran volumen de información que se puede obtener con un poco de trabajo. Los extractos de las proteínas pueden ser preparados fácilmente. Varias muestras pueden ser corridas en una sola gel, y cada gel puede ser teñida para distintas proteínas para revelar distintos loci.

Existen limitaciones para la información que se puede obtener por medio de la electroforesis en el loci codificador de una proteína. La información necesaria en la genética de poblaciones se relaciona con las secuencias de bases de DNA estudiadas directa o indirectamente. Las sustituciones de aminoácidos en las proteínas detectadas por la electroforesis son reflejos indirectos de sustituciones reales de bases en las secuencias de bases. No todas las sustituciones de bases resultan necesariamente en cambios en los aminoácidos. Aun más, no todas las sustituciones de aminoácidos resultan en cambios detectables por la electroforesis en las proteínas. Se ha estimado que solo aproximadamente un tercio de las sustituciones de aminoácidos son detectadas bajo condiciones usadas para recolectar datos electroforéticos en la mayoría de laboratorios .

Todas las expresiones electroforéticas descritas hasta este punto han tenido una base genética. Pronto se vuelve aparente cualquier persona recogiendo información genética por medio de electroforesis que los fenotipos electroforéticos pueden ser afectados por influencias además del genotipo del individuo. Las expresiones electroforéticas de las proteínas pueden ser fuertemente modificadas debido a la duración y las condiciones del almacenado. Un reflejo común de tales variaciones son bandas extras expresadas de forma anododal o catadodal de la banda primaria. Se ha demostrado que el almacenamiento a bajas temperaturas, y el pronto análisis de las geles proporcionan las condiciones optimas para minimizar la aparición de “bandas fantasmas”, o “isoenzimas conformacionales”.

Las bandas fantasmas pueden presentar problemas cuando se registra información genética de fenotipos observados en una gel. Se deben de tomar varios puntos en cuenta para interpretar correctamente la información en las geles. Si un homomero de un alelo está acompañado de una banda fantasma, los homomeros de cada alelo para el mismo locus van a estar probablemente acompañados por sus propias bandas fantasmas, en la misma dirección (catododal o anododal) y a la misma distancia de las bandas homoméricas.

Conocer la estructura de la subunidad de la proteína y, por lo tanto, el número esperado de bandas y sus intensidades relativas en los fenotipos heterocigotos, ayuda a una interpretación precisa de la gel. En las geles, en las cuales más de un locus es expresado para una proteína multimerica particular, las bandas heteroméricas y las bandas fantasmas hacen aun más difícil interpretar correctamente las geles. Se puede lograr una interpretación correcta desde el inicio cuando la frecuencia de un alelo particular es suficientemente alta para detectar un homocigoto para ese alelo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 METODOLOGÍA

4.1.1 Preparación de soluciones para geles de poliacrilamida

Cuatro distintas soluciones con pH diferentes se prepararon para las geles de poliacrilamida, se describe a continuación los elementos necesarios y sus respectivas cantidades.

Solución A Acrilamida 30 %

-Acrilamida 87.3 gr

- N-N, bis-metilen- acrilamida 2.4 gr

Hacer 300 ml con agua estilada, filtrar y almacenar a 4° C en oscuridad (30 días máximo)

Solución B 1.5 M Tris HCl , pH 8.8

- Tris base 27.23 gr

- Agua destilada 80 ml

- Ajustar a pH 8.8 con HCl 1 N . Hacer 100 ml con agua estilada y almacenar a 4° C

Solución C 0.5 M Tris- HCl pH 6.8

- Tris Base 6 gr

- Agua destilada 60 ml

- Ajustar a pH 6.8 con HCl 1 N. Hacer 100 ml con agua destilada y almacenar a 4° C

Solución D Buffer de electrodo 5X, pH 8.3

- Tris base 9.0 gr
- Glicina 43.0 gr
- Agua destilada 600 ml

- Almacenar a 4°C. Temperaturas de 37° C antes de su uso pueden causar precipitación. Diluir 60 ml del stock 5X en 240 ml de agua destilada para una corrida electroforética

4.1.2 Preparación de geles

Se utilizó un sistema discontinuo, consistente en una gel de resolución con 12% de acrilamida, y una gel de concentración al 4% de acrilamida, con una modificación de una tercera gel con un pH de 8.3. Las mezclas de los elementos y reactivos se disolvieron bien por medio de un agitador magnético. Se aplicó las geles una por una en la cámara electroforética, permitiendo que cada gel se polimerizara antes de aplicar la siguiente. Inmediatamente después de aplicada la gel de concentración final se coloca un peine el cual marca las celdas en las cuales se introduce los extractos de las proteínas por medio de una micro pipeta graduada.

A continuación se describe los elementos y cantidades necesarias para la preparación de cada gel.

Gel de resolución al 12%

- Agua destilada 33.5 ml
- Solución B 25 ml
- Solución A 40 ml
- Persulfato de amonio (0.2 gr/ 1ml de agua) 500 μ l
- Temed 50 μ l

Gel de concentración al 4%

- Agua destilada	12.2 ml
- Solución C	5 ml
- Solución A	2.6 ml
- Persulfato de Amonio	100 μ l
- Temed	20 μ l

Gel de concentración final

- Agua destilada	12.2 ml
- Solución C1 (10 ml buffer de electrodo/10 microlitros triton X-100	5 ml
- Solución A	2.6 ml
- Persulfato de amonio	100 μ l
- Temed	20 μ l

4.1.3 Preparación de buffer de concentración

Se preparó el buffer de concentración para extraer las proteínas de los tejidos con los siguientes elementos:

- 2% Triton X- 100	400 ml
- 1% Mercaptoethanol	20 μ l
- 5% PVPP (No.40)	1.0 gr
- Sucrosa	1.4 gr

4.1.4 Pesado y macerado

Se disectó material para su análisis electroforético de 3 ejemplares de Oreochromis niloticus. Cinco tejidos diferentes se utilizaron para la obtención de las proteínas: Aleta (A), hígado (H), músculo (M), ojo (O), sangre (S). Se utilizo 0.1 gr de cada tejido y se maceró con 850 microlitros del buffer de concentración hasta obtener una mezcla homogénea.

Cada extracto previamente identificado se traslado a un tubo de reacción frío; estos tubos de reacción, con los extractos deben de mantenerse a temperaturas bajas (-4°C) para evitar la desnaturalización de las proteínas. Posteriormente se centrifugaron durante 15 minutos en frío para concentrar las proteínas. Una vez concentradas, se añade 1 gota de glicerina a cada tubo, manteniendolos siempre a temperaturas bajas.

4.1.5 Colocación del extracto-glicerina en la cámara de electroforesis

Se lleno la cámara con buffer de electrodo frío, en cada una de las celdas formadas en la gel al retirar el peine se introduce 100 microlitros de extracto utilizando para esto una micro-pipeta graduada de 20 microlitros. Cada extracto debe de ser introducido en una celda y usando una boquilla diferente para cada uno, esto para evitar que las muestras sean contaminadas con otras , lo que alteraría el resultado de la corrida. También se debe procurar que las muestras no pasen de una celda a otra, por que también se contaminan los extractos.

4.1.6 Corrida de las muestras

Una vez colocadas todas las muestras en la gel, se introducen en la cámara de electroforesis, y se llena la cámara con buffer de electrodo. Luego se conecta la cámara a la fuente de poder y se aplica 220 voltios de electricidad durante 4-5 horas. La cámara debe de mantenerse durante el tiempo que dure la corrida dentro de un refrigerador (a -4°C) o un recipiente con hielo; esto para evitar que las temperaturas altas que se producen puedan romper los vidrios de la cámara.

4.1.7 Tinción y revelación de las enzimas

Al finalizar el tiempo de la corrida, se retira las geles de la cámara y se colocan en bandejas plásticas. La esquina inferior de la celda número 1 debe de ser cortada para indicar en donde comienzan las celdas.

Previamente, a la obtención de la gel se prepara la enzima que va a ser utilizada para la coloración de las enzimas. Se describe a continuación los reactivos y sus cantidades necesarias para la preparación de cada gel.

Alcohol dehidrogenasa (ADH)

- 0.1 M Tris - HCl pH 8.0	25 ml
- NAD	7.5 mg
- MTT	5 mg
- PMS	1 mg
- Etanol (95%)	0.5 ml trazas

Esterasa (ES)

- Fast blue rr SaH	100 mg
- Buffer fosfato 0.1 M pH 7.1	100 ml

Disolver bien con agitador magnético agregar:

-Naphtyl acetate 2% en acetona	1.5 ml
--------------------------------	--------

incubar 3 horas a temperatura ambiente

6- Fosfoglucomato dehidrogenasa (6 - PHD)

-0.1 M Tris-HCl pH 7.2	25 ml
- 6- fosfoglucomato	6 mg
- NAPP	4 mg
- MTT	4 mg
- Meldola blue	Trazas

Acido Shikimico dehidrogenasa (SKDH)

- 1M Tris-Hcl pH 8.0	5 ml
- Agua destilada	45 ml
- Acido shikimico	25 mg
- MTT	7.5 mg
- NADP	5.0 mg
- PMS	1.0 mg

Una vez preparada cada enzima (estas deben de aplicarse separadamente) se aplica sobre la gel en la bandeja y se incuba en oscuridad durante 3 horas. Una vez obtenidas las bandas deben de dibujarse en cuadrículas, debido a que estas no permanecen permanentemente en la gel.

4.2 MATERIALES

Los patrones de bandas se representaron por medio zimogramas. Las bandas son medidas en la gel desde el origen utilizando una regla graduada. Estas bandas son dibujadas en la cuadrícula a la misma distancia desde el origen que la de la gel.

- Cámara de electroforesis
- Ejemplares de Oreochromis niloticus
- Micropipetas graduadas
- Boquillas para micropipetas
- Cristalería
- Reactivos
- Fuente de poder
- Aparato de recirculación de agua fría
- Morteros para maceración
- Refrigeradores
- Agitadores magnéticos
- Tubos de reacción

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los patrones de bandas (zimogramas) de cada enzima de los tres ejemplares se compararon entre ellos, presentando un variado número de bandas. Todas las enzimas fueron polimórficas a excepción del ácido shikímico el cual fue monomórfico en todos los tejidos y en todos los peces, por lo que no se hará ninguna discusión acerca de esta enzima.

Las abreviaturas que se utilizaron para cada tejido fueron las siguientes: aleta (A), hígado (H), músculo (M), ojo (O) y sangre (S). Se describe con números arábigos el número del pez analizado.

5.1 COMPARACIÓN DE ZIMOGRAMAS ENTRE PECES

CUADRO 1
(ESTERASA)

1(O)	1(M)	1(H)	1(A)	1(S)	2(S)	2(H)	2(O)	2(M)	2(A)	3(M)	3(H)	3(S)	3(A)	3(O)
♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Se distinguen 2 diferentes patrones en los tejidos de la hembra 1 del hígado, músculo, y el tercer patrón estuvo presente en los tejidos del ojo, aleta y sangre. Por ser todos los tejidos del mismo pez no debería de presentarse diferencia entre los patrones, sin embargo, esto podría explicarse como genes que se encuentran presentes en todos los tejidos pero solo se expresan en ciertos tejidos. En la hembra 2 se distinguen 3 diferentes patrones en los tejidos de la sangre, ojo y aleta, un cuarto patrón esta presente en el hígado y músculo. En el macho podemos distinguir 2 patrones distintos, uno en los tejidos del hígado, aleta y ojo, y el segundo en el músculo y sangre.

CUADRO 2

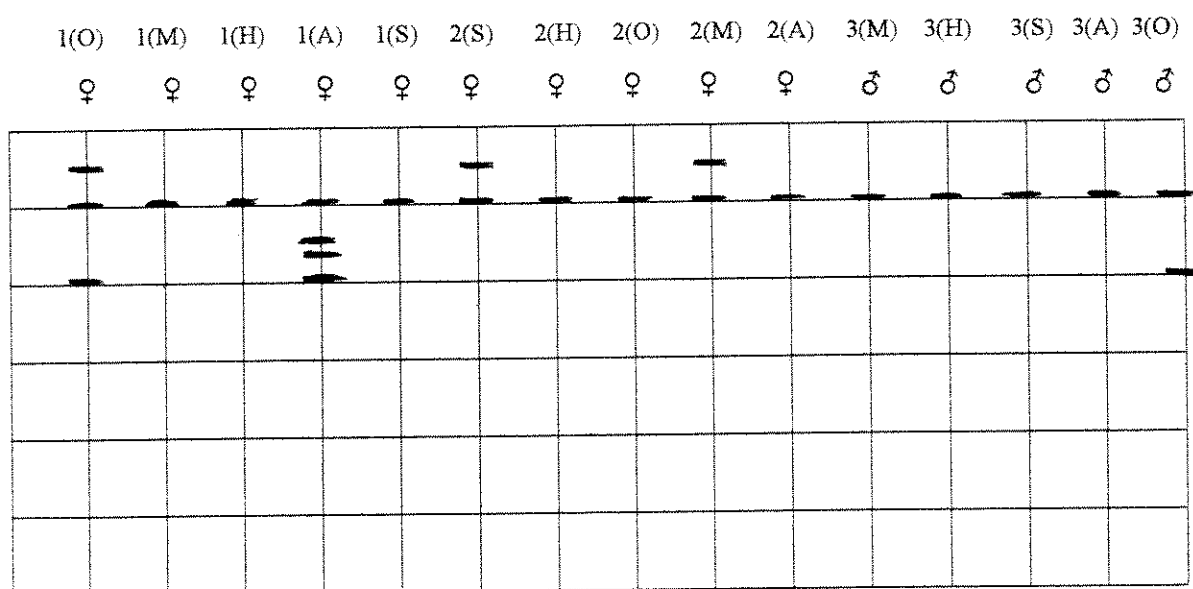
6 - FOSFOGLUCAMATO DEHIDROGENASA (6-PHD)

1(O) ♀	1(H) ♀	1(M) ♀	1(A) ♀	1(S) ♀	2(S) ♀	2(H) ♀	2(O) ♀	2(M) ♀	2(A) ♀	3(M) ♂	3(H) ♂	3(S) ♂	3(A) ♂	3(O) ♂
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—													
	—				—									
—														
					—							—		

En la hembra 1, los tejidos de la aleta, hígado y sangre presentaron un solo posible alelo homocigoto; se encontró un alelo más en el ojo y otros dos alelos en el músculo. Todos los zimogramas de la hembra 2, excepto el del tejido de la sangre, presentaron el mismo alelo homocigoto. La sangre reveló otros dos posibles alelos homocigotos. Todos los tejidos en el macho presentaron alelos idénticos excepto la sangre, la cual presentó un alelo extra.

CUADRO 3

ALCOHOL DEHIDROGENASA (ADH)



Se encontraron en la hembra 1, dos patrones distintos en el ojo y aleta, mientras que el hígado, músculo y sangre, presentaron un solo alelo idéntico. La hembra 2 presentó un alelo más cercano al origen en los tejidos de la sangre y músculo. En el macho se reveló un alelo que estuvo presente en todos los tejidos y el zimograma del ojo se pudo diferenciar un alelo más, el cual tuvo una mayor migración que la de los demás.

5.2 COMPARACIÓN DE ZIMOGRAMAS ENTRE TEJIDOS

TABLA 4

TEJIDO	ENZIMAS		
	ADH	EST	6 - PHD
ALETA	Un solo alelo fue revelado en todos los ejemplares. El macho presento un alelo más que las hembras.	Los tres individuos presentaron dos alelos posiblemente tetrameros, el primero fue idéntico en los tres. La hembra 2 presento dos bandas más y el macho una.	No hubo ninguna variación para este tejido. Los tres individuos presentaron un solo alelo homocigoto.
HÍGADO	No presento ninguna variación (solo un alelo fue expresado en todos.	la hembra 2 y el macho presentaron patrones idénticos. La hembra 1 revelo una banda más.	No hubo ninguna variación para este tejido. Los tres individuos presentaron un solo alelo homocigoto.
MÚSCULO	La hembra 2 presento dos alelos a diferencia de la hembra 1 y el macho.	Los tres individuos presentaron patrones diferentes. La hembra 1 presento 2 patrones ambos con cinco bandas. La hembra dos y el macho revelaron el mismo número de bandas en el primer tetramero, y en el segundo el macho presentó una banda más.	Solamente la hembra uno presento variación en dos bandas. Los tres individuos revelaron un alelo idéntico.
OJO	Los 3 individuos revelaron un mismo alelo; la hembra 1 presento un alelo diferente cerca del origen, y un tercero el cual estuvo expresado también en el macho.	La hembra 1 presento un patrón con cuatro bandas y un segundo con tres. La hembra 2 presento dos patrones ambos con cinco bandas. El macho presento dos patrones posiblemente tetramero.	La hembra 2 y el macho revelaron un solo alelo homocigoto, mientras que la hembra 1 revelo una banda más.
SANGRE	Los tres individuos revelaron un mismo alelo, la hembra 2 presento un segundo alelo cerca del origen,	La hembra 1 y el macho presentaron 2 patrones idénticos ambos con cuatro bandas. La hembra 2 revelo el primer patrón idéntico al de los otros dos individuos pero presento una banda más en el segundo.	La hembra 1 presento solamente una banda para este tejido, este tejido fue expresado en los tres individuos. La hembra 2 revelo tres posibles alelos, probablemente monomeros heterocigotos y el macho presento un alelo más.

6. CONCLUSIONES

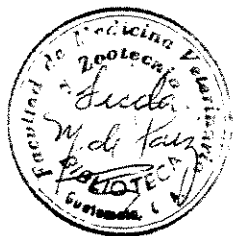
1. La metodología utilizada en el análisis de marcadores genéticos por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en plantas, es aplicable al estudio de enzimas en peces, para encontrar posibles marcadores genéticos, los cuales pueden servir para mostrar variaciones genéticas en poblaciones de peces.
2. La esterasa fue la enzima que tuvo mejor resolución de bandas, sin embargo, es la que presenta mayor dificultad para su interpretación.
3. Todas la enzimas analizadas a excepción del ácido shikímico fueron polimórficas en todos los peces, lo cual indica la variabilidad genética en los peces analizados.

7. RECOMENDACIONES

1. Utilizar tejido de aletas para hacer análisis electroforético, para evitar sacrificar a los peces.
2. No se recomienda utilizar el ácido shikímico para el análisis electroforético en Oreochromis niloticus ya que no se pueden encontrar variaciones en los patrones que puedan ayudar a la identificación de posibles marcadores genéticos.
3. Se recomienda utilizar las enzimas 6 - PHD y ADH ya que presentan una buena resolución de bandas y son de fácil interpretación.
4. Se recomienda revisar la salud de los peces que se van a someter a análisis, ya que si están enfermos se puede alterar los patrones de bandas.

BIBLIOGRAFÍA

- CRUZ, T.A.; THORPE, J.P.; PULLIN, R.S.V. Enzyme electrophoresis in Tilapia zilli: a pattern for determining biochemical genetic markers for use in Tilapia stock identification. *Acuaculture* (Amsterdam), no 29: 311- 329.
- FIGUEROA, F. 1997. Determinación del sistema reproductivo y estructura genética del zapote __ (pouteria zapota) usando marcadores isoenzimáticos en la parte alta de la cuenca del río Hato, municipio de San Agustín Acasagustán El Progreso. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 109 p.
- GAMAN, O.R. et al. 1988. The use of electrophoresis as a technique for the identification and control of Tilapia breeding stocks in Israel. *Israel*, s.n. p. 177-181
- POPULATION GENETICS and fishery management. Washington sea grant program. Distributed by University of Washington press Seattle and London 1988. Ed. por N. Rymann.; Fred Utter. London, s.n. p 21-45.
- STRYER, L. 1990. Bioquímica. Investigación en proteínas. 2 ed. España, José Maraculla Reverté. 871 p.



Guatemala 18 de Noviembre de 1997

Señores
Miembros de la Coordinación Académica
Centro de Estudios del Mar y Acuicultura
Edificio

Señores Miembros:

Por este medio les informo que revisé el trabajo titulado "Estandarización de la Metodología de Electroforesis para Oreochromis niloticus", seminario para optar al título de Técnico Universitario en Acuicultura, de el estudiante Yudel David Koristz Solorzano, el cual llena los requisitos impuestos para estos trabajos de investigación.

Agradeciéndoles su atención, me despido atentamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"



M.Sc. Leonel Carrillo Ovalle

Asesor de Seminario

Handwritten note:
19/11/97