



C I E N C I A S
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
MÉRIDA VENEZUELA

Departamento de Biología

INFORME DEL JURADO NOMBRADO POR EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES PARA CONSIDERAR EL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE LA BACHILLER

NEYDA COROMOTO RODRIGUEZ RAMIREZ

En Mérida a los siete días del mes de Abril de 2008, a la 1:00 pm. se reunieron los Profesores: Rosa De Jesús (tutora), Néstor González y Luisana Avilán, de la Facultad de Ciencias, miembros del jurado nombrado por el Consejo de la Facultad de Ciencias, para revisar el Trabajo Especial de Grado sobre el tema: **“Monitoreo genético y fenotípico en ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley* producidas en el bioterio de la Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela”**, presentado por la Bachiller Neyda Coromoto Rodríguez Ramirez. Titular de la Cédula de Identidad N° 14.265.234, para optar al título de:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Acto seguido se procedió a oír la exposición que sobre el tema arriba mencionado realizó la Bachiller **Neyda Coromoto Rodríguez Ramirez**.

Después del correspondiente interrogatorio, el Jurado procedió a deliberar sobre la calificación del trabajo sometido a su consideración.

Finalmente el Jurado lo declaró APROBADO con la Calificación de veinte puntos (20) PUNTOS. Y recomendado para su publicación.

Prof. Rosa De Jesús.
(Tutora)

Néstor González

Luisana Avilán





UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MERIDA VENEZUELA

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

**Monitoreo genético y fenotípico en ratas no
consanguíneas *Sprague-Dawley* producidas en el
Bioterio de la Universidad de los Andes.
Mérida-Venezuela**

Trabajo Especial de Grado presentado por la Br.
Neyda Coromoto Rodríguez Ramírez ante la
Ilustre Universidad de Los Andes para optar al
título de Licenciada en Biología.

Mérida, Abril de 2008

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Control Genético de Roedores del Bioterio de La Universidad de Los Andes, bajo la tutoría de la Dra. Rosa De Jesús y el asesoramiento del Dr. Gustavo Fermín M, como requisito para optar al título de Licenciada en Biología. Los recursos para el financiamiento de esta investigación fueron aportados por el Centro de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA), bajo el proyecto N° C-1377-06-03-A.

AGRADECIMIENTOS

Para alcanzar metas importantes es necesario contar con la presencia y la ayuda de muchas personas. Hoy, mi corazón solo tiene memoria para la gratitud y por ello doy gracias...

A *Jesús de la Misericordia*, porque la luz que irradia su corazón me enseñó el camino a seguir en cada momento.

A mis padres Luis y Ana, por brindarme la mejor educación del mundo, *la que proviene del hogar*. Por ayudarme a alcanzar este título y por confiar en mí hasta el final.

A mi hermano Wilmer, el mejor hermano que se puede tener en la vida. Gracias por tu apoyo incondicional.

A mi hermana Thamara y mi sobrino Diego por estar allí y por su cariño.

A la Profesora Rosa De Jesús, por recibirme como tesista y abrirme las puertas del bioterio de la Universidad de Los Andes, por ser tan buena y comprensiva en todo momento, por darme su amistad y cariño, por enseñarme tantas cosas...

Al profesor Gustavo Fermín: Una vez me dijiste que siempre tendría tu apoyo y al instante supe que siempre sería así. Gracias por ser tan incondicional y por la amistad brindada.

Al laboratorio de Fisiología Animal, en especial a la profesora Luisana Avilán.

A la familia Capriles Peraza, por ayudarme, adoptarme y quererme tanto.

A mi colega, mi amiga, y mi camarada Dennis Uzcategui, por enseñarme que dar con amor trae grandes satisfacciones. *Son las almas bellas las únicas que saben lo que hay de grande en la bondad.*

A la hermosa Ciudad de Mérida y a la ilustre Universidad de Los Andes, por ser la combinación perfecta para hacer los sueños realidad.

A los profesores Néstor González, Benito Briceño, Mariana Muñoz, Juan Puig, Marcos Bastidas, Rosa De Jesús y Gustavo Fermín, porque sus enseñanzas marcaron mi formación profesional y me hicieron una mejor persona.

A todas aquellas personas que aportaron su granito de arena para la culminación de este trabajo: técnicos del bioterio de la Universidad de Los Andes: Zoraima Quintero, y José Luis Cuevas. A los licenciados Mileyna Gudiño, Dennis Uzcategui y Andrés Osorio.

A Sioly, por su eficiente labor en el departamento de biología, por hacernos la vida más fácil y por darnos tanto cariño.

A mis compañeros de estudio, Alfredo, Arles, Carmen, Carolaing, Erick, Laudin, William y Yelitza, por todos los momentos agradables compartidos *¡Gracias!*

A mis compañeros y colegas del laboratorio de Fisiología Animal, Armando Briceño, Johanna Moreno, Katherina Boscan, Masyelly Rojas y Francisca Balli, por hacer del ambiente de trabajo un lugar en el que nació la amistad.

Resumen

Las colonias de ratas no consanguíneas producidas para la investigación, se caracterizan por tener gran variabilidad genética. Sin embargo, con el tiempo se puede producir algún incremento de su consanguinidad, ocasionando la pérdida de características específicas de estos roedores de laboratorio. Por ello, es de gran importancia realizar monitoreos genéticos y fenotípicos, para verificar la calidad de estas especies y garantizar de esta manera al experimentador que cuenta con el animal adecuado para su investigación. En el presente estudio se evaluó molecularmente si se mantiene la condición de heterocigosis en las ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley* producidas en el bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), a través del análisis de marcadores moleculares microsatélites con la técnica de PCR, y mediante la evaluación de parámetros fenotípicos, tales como la ganancia en peso-talla, pruebas hematológicas y bioquímicas, para la colonia en estudio. Los resultados obtenidos en el análisis genético demostraron que la colonia de ratas presenta una heterocigosis disminuida, debido a que solo tres de los siete microsatélites evaluados detectaron polimorfismo génico. Además, el análisis estadístico de los datos, reveló una baja heterocigosis de $0,157 \pm 0,214$. Con respecto a la evaluación fenotípica, los resultados obtenidos demostraron que la colonia *Sprague-Dawley*, presenta valores de crecimiento, hematológicos y bioquímicos que se encuentran dentro de los rangos establecidos para las ratas no consanguíneas producidas y utilizadas en la experimentación. El presente estudio permitió caracterizar los animales de la colonia de ratas *Sprague-Dawley* producida en el bioterio de la Universidad de Los Andes, pero es importante mencionar que se recomienda analizar un número mayor de *loci* microsatélites para determinar con mayor precisión el estado de heterocigosis de la colonia y concluir con exactitud si dicha heterocigosis se encuentra disminuida.

Palabras Clave: Bioterio, heterocigosis, no consanguíneo, *Sprague-Dawley*.

ABSTRACT

Colonies of non-consanguineous rats bred for research are characterized by a high degree of genetic variability. With time, however, consanguinity might increase leading to loss of specific and desirable genetic features in these laboratory rodents. It is of great importance, thus, to perform genetic and phenotypic tests in order to check for the quality of these species and provide the researcher animals of proven quality. In this study the heterosis status of the non consanguineous rats *Sprague-Dawley* bred at the Universidad de Los Andes animal nursery, was molecularly assessed through microsatellites amplified by PCR, along with the evaluation of phenotypic parameters such as weight-height gains and hematological and biochemical tests. Data gathered from the molecular tests suggest that the colony under analysis shows a diminished degree of heterosis since only three out of the seven microsatellites analyzed were able to detect genetic polymorphisms. Moreover, statistical analysis also revealed a low degree of heterosis of 0.157 ± 0.214 (Nei). Regarding the phenotypic evaluation, results show the colony shows growth rates and hematological and biochemical values within the normal range established for non-consanguineous rats commonly used for research. This study enabled us to characterize *Sprague-Dawley* rats bred at Universidad de Los Andes nursery; however, we strongly recommend that future studies of this nature employ a larger number of microsatellite loci for the analysis, in order to be able to establish the colony's heterosis with a greater precision.

Keywords: Animal nursery, heterosis, non-consanguineous, *Sprague-Dawley*

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALT	Alanina aminotransferasa
ARN	Ácido Ribonucleico
AsT	Aspartato aminotransferasa
cm	Centímetro
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Crl:(SD)BR	Rata <i>Sprague-Dawley</i> criada en el laboratorio <i>Charles Rivers</i>
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilen diamino taetracético (Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid)
ER	Enzima de restricción
F	Coeficiente de consanguinidad
GOT	Transaminasa glutamato/oxalacetato
GPT	Transaminasa glutamato/piruvato
H2	Complejo Mayor de histocompatibilidad del ratón
Kb	Kilobases
Kd	Kilodalton
μl	Microlitros
μM	Micromolar
mM	Milimolar
mg	Miligramos
ml	Militros
MΩ	Megaomhios
MgCl₂	Cloruro de magnesio
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

RFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)
rcf	Fuerza centrífuga relativa (Relative centrifugal force)
RTI	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de la rata
SSR	Secuencias simples repetidas (Simple Sequence Repeats)
SNP	Nucleótidos simples polimórficos (Simple Nucleotido Polymorphism)
TBE	Tris-Borato EDTA
U	Unidades de enzima
VNTR	Número Variable de repeticiones en tandem (Variable Number Tandem Repeats)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Agradecimientos.....	I
Resumen.....	III
Abstract.....	IV
Lista de siglas y abreviaturas.....	V
Índice de contenidos.....	VII
Índice de figuras.....	XI
Índice de tablas.....	XIII

Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL

(I.1) Importancia de la rata de laboratorio.....	1
Origen de las colonias de ratas no consanguíneas.....	2
Clasificación genética de los roedores usados en la investigación.....	2
Los roedores no consanguíneos (<i>outbred stocks</i>).....	3
Nomenclatura de los roedores no consanguíneos.....	4
Criterios para la producción y mantenimiento de colonias no consanguíneas.....	5
(I.2) Poblaciones naturales y de laboratorio.....	6
Elementos de genética de poblaciones.....	6
Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	7
Factores que afectan la composición genética de los roedores de laboratorio.....	9
(I.3) La contaminación genética y los controles de calidad.....	13
1. Marcadores bioquímicos.....	15
2. Marcadores de histocompatibilidad tisular.....	16
3. Marcadores de color del pelaje.....	17

4. Marcadores de carácter reproductivo.....	17
5. Marcadores de caracteres fisiológicos.....	17
5.1. Ganancia de peso y talla corporal.....	18
5.2. Parámetros hematológicos.....	19
Hematocrito.....	20
Hemoglobina.....	20
Leucocitos o Glóbulos blancos.....	21
Recuento diferencial de los glóbulos blancos.....	21
5.3. Parámetros bioquímicos.....	22
Concentración de Glucosa.....	22
Niveles de Transaminasas (GOT: glutamato/oxalacetato transaminasa y GPT: glutamato/piruvato transaminasa).....	23
Marcadores de ADN.....	24
Análisis de microsatélites por PCR.....	26
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	31
CAPITULO II. METODOLOGÍA	
Evaluación de tres métodos de extracción de ADN a partir de tejido de oreja de rata de la colonia no consanguínea <i>Sprague-Dawley</i> , producida en el bioterio de la Universidad de Los Andes.....	32
Optimización de la técnica de Reaccion en Cadena de la Polimerasa para la amplificación de los microsatélites: <i>D1Mit17</i> , <i>D10Mit10</i> , <i>R-12</i> , <i>R-43</i> , <i>R-99</i> , <i>R- 119</i> y <i>R-145</i>	34

Formación del banco de ADN genómico del núcleo de fundación de las ratas no consanguíneas <i>Sprague-Dawley</i> a partir de tejido de oreja mediante digestión con Ananasa (comunicación personal profesor Néstor González).....	36
Estimación de la cantidad y calidad del ADN de la colonia de ratas no consanguíneas <i>Sprague-Dawley</i> por espectrofotometría.....	37
Verificación de la heterocigosis en la colonia de ratas no consanguíneas <i>SpragueDawley</i>	37
Análisis estadístico.....	38
Evaluación de parámetros fenotípicos para la colonia de ratas no consanguíneas <i>Sprague-Dawley</i>	39
Determinación de la ganancia de peso-talla (Curvas de crecimiento).....	39
Determinación de parámetros hematológicos: hematocrito, hemoglobina, cuenta leucocitaria y cuenta diferencial.....	40
Determinación de parámetros Bioquímicos: glucosa y transaminasas.....	41

CAPÍTULO III. RESULTADOS

Evaluación de tres métodos de extracción de ADN a partir de tejido de oreja de rata.....	45
Formación del banco de ADN de la colonia de ratas no consanguíneas <i>Sprague-Dawley</i>	48

Optimización de la técnica de PCR para la amplificación de los microsatélites <i>D1Mit17, D10Mit10, R-12, R-43, R-99, R-119 y R-145</i> , en la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	49
Verificación de la heterocigosis en la colonia de ratas no consanguíneas <i>Sprague-Dawley</i>	51
Análisis estadístico.....	56
Evaluación de parámetros fenotípicos para las ratas <i>Sprague-Dawley</i>	60
Capítulo IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA CITADA	77
APÉNDICES	
Apéndice A.	
Amortiguadores y soluciones.....	85
Apéndice B.	
Kits enzimático comerciales.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Efecto del número de parejas reproductoras (N) sobre el coeficiente de consanguinidad (F).....	12
Figura 2. Curva de crecimiento de la colonia Crl:CD [®] (SD)BR.....	18
Figura 3. Composición de una región microsatélite en una cadena de ADN.....	27
Figura 4. Uso de los microsatélites como marcadores moleculares.....	28
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (90 voltios/1 h) para muestras de ADN genómico obtenidas por el método <i>HotSHOT</i>	47
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (90 voltios/1 h) para muestras de ADN genómico obtenidas por el método de extracción con proteinasa K.....	47
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (90 voltios, 1 h) para muestras de ADN genómico obtenidas por el método empleando la enzima Ananasa.....	48
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 2,5%, para productos amplificados por PCR con cebadores <i>DIMit17</i> y diferentes concentraciones de MgCl ₂	49
Figura 9. Productos amplificados de <i>loci DIMit17</i> , en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	52

Figura 10. Productos amplificados de <i>loci D10Mit10</i> , en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	52
Figura 11. Productos de amplificación de <i>loci R-12</i> , en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	53
Figura 12. Productos de amplificación de <i>loci R-43</i> , en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	54
Figura 13. Productos de amplificación de <i>loci R-99</i> , en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	55
Figura 14. Productos de amplificación de <i>loci R-119</i> , en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	55
Figura 15. Productos de amplificación de <i>loci R-145</i> , en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	56
Figura 16. Curva de crecimiento en talla de machos y hembras de la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	61
Figura 17. Curva de crecimiento en peso de machos y hembras de la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Parámetros hematológicos de hematocrito, hemoglobina, glóbulos blancos y recuento diferencial, para la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i> Crl:CD [®] (SD)BR.....	22
Tabla 2. Parámetros bioquímicos de glucosa y transaminasas para la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i> Crl:CD [®] (SD)BR.....	23
Tabla 3. Características de los oligonucleótidos iniciadores o <i>primers</i> seleccionados para la evaluación genética de la colonia de ratas no consanguíneas <i>Sprague-Dawley</i> , producidas en BIOULA.....	35
Tabla 4. Análisis de pureza realizado a muestras de ADN de ratas <i>Sprague-Dawley</i> obtenidas por los métodos <i>HotSHOT</i> , Proteinasa K y Ananasa.....	46
Tabla 5. Concentraciones y volúmenes de la mezcla de reacción para la PCR, empleados para la amplificación de <i>loci</i> microsatélites de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	50
Tabla 6. Programa de ciclos de incubación de PCR, empleado para la amplificación de <i>loci</i> microsatélites de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	51
Tabla 7. Frecuencias alélicas de la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i> , para los diferentes <i>loci</i> microsatélites evaluados.....	57
Tabla 8. Variaciones génicas para todos los <i>loci</i> de la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i>	58
Tabla 9. Proporciones de heterocigosis para la colonia de ratas <i>Sprague-Dawley</i> ,	

calculadas mediante el programa de análisis genético de poblaciones
PopGen32.....59

Tabla 10. Evaluación hematológica realizada a la colonia de ratas *Sprague-Dawley*.....
.....62

Tabla 11. Evaluación fenotípica de la colonia *Sprague-Dawley*, mediante el análisis de
parámetros bioquímicos.....63

**A mis padres
mis hermanos
y mi sobrino,
los seres más importantes de mi vida.**

Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1) Importancia de la rata de laboratorio

La rata después del ratón, es el animal de experimentación más utilizado en investigaciones biomédicas, especialmente en fisiología, toxicología, farmacología, estudios de comportamiento, inmunología y oncología.

Hasta la década de 1980, el uso de la rata en estudios genéticos se vio empobrecido por el poco desarrollo de su mapa genético y la baja disponibilidad de líneas genéticamente definidas, sin embargo, en los últimos años esto ha cambiado gracias al desarrollo de mapas genéticos detallados y a la secuenciación completa del genoma de la rata, existiendo hoy en día líneas genéticamente definidas (con un detallado conocimiento de sus parámetros inmunológicos), lo que la ha convertido en la especie más importante como modelo en estudios genéticos. En la actualidad, la rata está siendo utilizada cada vez más en genética experimental (Lazar *et al.*, 2005); en particular, es el modelo preferido para el estudio de enfermedades complejas de transmisión genética, como lo son la hipertensión, la diabetes, las enfermedades renales, las enfermedades autoinmunes, desórdenes del comportamiento, entre otras.

Otra área en la cual la rata ha adquirido importancia es en el desarrollo de técnicas de microcirugía; por tener un mayor tamaño con respecto al ratón, la rata se ha convertido en la especie más importante como modelo para el estudio de trasplantes de órganos.

Existen otras razones por las que las ratas son animales adecuados para la experimentación, y es porque éstas se adaptan muy bien al confinamiento, son animales poco agresivos y fáciles de manipular.

Origen de las colonias de ratas no consanguíneas

Las ratas comenzaron a ser utilizadas como animales de laboratorio a finales del siglo XIX y principios del XX en los Estados Unidos, y en el siglo XIX en Europa, en estudios de fisiología, anatomía y nutrición. Aunque se desconocen datos referentes sobre los ancestros de muchos grupos de ratas de laboratorio, existe información bien documentada con respecto a las ratas *Sprague-Dawley*. Esta colonia se deriva de la rata noruega *Rattus norvegicus* de la que se originaron dos poblaciones:

- Ratas Long Evans: de pelo negro en cabeza y cuello y el resto del cuerpo de color blanco.
- Ratas albinas: entre éstas se encuentran las ratas *Wistar* y las ratas *Sprague-Dawley*. Las primeras son provenientes del *Wistar Institute*, Philadelphia, EE.UU y se caracterizan por tener orejas grandes, cabeza ancha y cola de menor longitud que su cuerpo; y las segundas, se distinguen fenotípicamente por tener el cuerpo alargado, una cabeza estrecha y cola de mayor longitud que su cuerpo. Proviene de Madison, EE.UU. (Zuñiga *et al.*, 2000).

El grupo original de la colonia *Sprague-Dawley* fue desarrollado en 1920 por Robert Dawley a partir de una colonia *Wistar* y una colonia híbrida proveniente esta última de un grupo de ratas de laboratorio y un grupo de ratas silvestres (White y Lee, 1998).

Clasificación genética de los roedores de laboratorio usados en la investigación

En general, los grupos más importantes de roedores de laboratorio empleados para la investigación pueden ser clasificados en tres categorías genéticas: los consanguíneos (endocriados), los F1 híbridos y los no consanguíneos (exocriados). El uso de animales transgénicos ha sido muy frecuente en los últimos años, pero estos tipos característicos son derivados a partir de los tres grupos principales mencionados anteriormente.

Los animales consanguíneos son el resultado de 20 generaciones de apareamientos consecutivos hermanos con hermanas, presentando uniformidad genética que sobrepasa el 98% de los alelos en condición homocigota.

Los animales híbridos son el producto del cruce entre dos líneas consanguíneas. Estos tipos son heterocigotos para todos los *loci* en los cuales sus líneas parentales no lo eran; proveen ventajas en cuanto a uniformidad a pesar de no ser homocigotas como sus parentales.

Los animales no consanguíneos se derivan a partir de apareamientos entre individuos no relacionados. Estos se caracterizan por su alto grado de diversidad individual. Para producir éste tipo de animales es necesario que la consanguinidad sea evitada. Sin embargo, aunque el propósito de los programas de crianza de estos roedores es mantener la heterogeneidad genética, ésta nunca logra establecerse absolutamente, ya que se impone en la colonia una selección inconsciente que tiende hacia la consanguinidad (White y Lee, 1998).

Los roedores no consanguíneos (*outbred stocks*)

Como se mencionó anteriormente, los roedores no consanguíneos son animales que tienden a mantener el coeficiente de consanguinidad en el nivel más bajo posible, éste viene determinado por el establecimiento de apareamientos entre animales no emparentados por lazos familiares, llevando a que la población manifieste un alto grado de heterocigosis no definido (De Jesús, 2003). En términos más precisos, un grupo de animales no consanguíneos o "*outbred stock*", se define como una colonia restringida de animales con un limitado incremento del coeficiente de consanguinidad $< 1\%$ por generación y un alto grado de variabilidad genética. Dichas características, la asemejan con la heterogeneidad genética de la población humana, haciendo que las ratas no consanguíneas sean las más usadas en investigaciones toxicológicas y farmacológicas (Yamada *et al.*, 1979). Sin embargo, su uso es polémico en las áreas antes mencionadas, ya que se debe tener en cuenta, que la mayoría de las ratas no consanguíneas comúnmente disponibles, se han mantenido como colonias restringidas sobre un largo

período de tiempo, resultando en poblaciones con la variación genética disminuida. Ésta es una de las razones por las cuales probablemente, estos tipos de roedores están dejando de ser utilizados en estudios de toxicología y farmacología (Festing, 1993). Su uso también se encuentra cuestionado debido a que se puede obtener mayor variabilidad genética utilizando un conjunto de líneas consanguíneas para generar los conocidos híbridos F1. Sin embargo, el hecho de que estos grupos son mucho más económicos que las líneas consanguíneas, que son muy buenos reproductores y dóciles para manipular en el laboratorio, hace que tengan gran popularidad en la investigación (Benavides y Guénet, 2003).

Según el catálogo de animales de laboratorio del *IFFA CREDO* de Francia las ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*, son utilizadas en los siguientes campos: 1) cirugía experimental: microcirugía y cirugía del tracto digestivo; 2) fisiología: estudios del sistema nervioso central y hormonal; 3) farmacología: pruebas de analgésicos, anti-inflamatorios, diuréticos, entre otros; 4) toxicología: general y por inhalación; 5) teratología: debido a su tasa mínima de malformaciones del feto; 6) oncología: estudios tumorales; 7) microbiología experimental; 8) estudios de comportamiento.

Nomenclatura de los roedores no consanguíneos

Debido a la falta de homogeneidad genética, estos grupos de animales deben ser nombrados como “grupos” (*stocks*) o “colonias” y no como líneas (o cepas). Por la misma razón, no existe una nomenclatura oficial sobre estos animales; los últimos reglamentos son de 1972 y no son aplicados con uniformidad. Actualmente existen dos tendencias: (i) utilizar nombres con 2 a 6 letras en mayúscula y aclarar en el texto que se trata de animales exocriados (ratas *WISTAR*, *LONG EVANS*) y (ii), usar un nombre compuesto, colocando en primer lugar el código del laboratorio y, luego de dos puntos, el nombre del grupo (puede agregarse entre paréntesis el origen). Por ejemplo, Crl:(WI)BR que corresponde a la rata *Wistar*, criada en *Charles River Laboratories*

(Benavides y Guénet, 2003). La rata producida en BIOULA puede nombrarse entonces, como: BIO:SD

Criterios para la producción y mantenimiento de colonias no consanguíneas

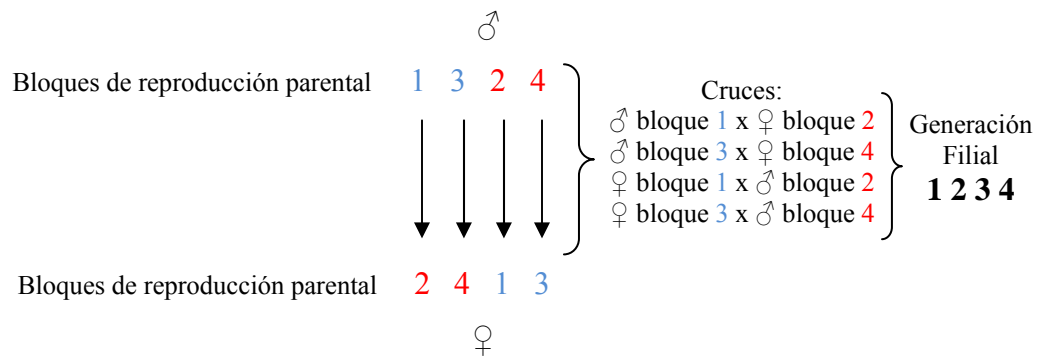
Las colonias no consanguíneas, no están definidas genéticamente, por lo que es necesario cumplir con ciertos requisitos para que éstas no sobrepasen 1% de endocria por generación, y esto se logra cruzando siempre animales no emparentados. En una colonia cerrada, esto es muy difícil de conseguir, por ello, mencionaremos algunos requisitos que deben cumplirse para mantener correctamente dichas colonias:

(1) Que el tamaño de la población sea muy grande. Lo ideal es contar con alrededor de 80 parejas reproductoras como fundadores del núcleo; de esta manera el coeficiente de endocria (F) no llega a superar el 10% dentro de las 20 generaciones (Benavides y Guénet. 2003).

(2) Que todos los animales aptos para la reproducción tengan igual participación en el programa de cría. Aquí, se presenta el inconveniente que una cantidad considerable de animales, es utilizada en la investigación y no tienen posibilidad de participar en el programa de cría. Por la tanto, la limitación con respecto al número de individuos, así como el sexo de los animales a ser usados como reproductores del núcleo de fundación, se relacionan con las limitaciones físicas impuestas por el alojamiento restringido, provocando una disminución de eventos casuales en el cruzamiento. Además, de los criterios de selección consciente e inconsciente, tales como: características morfológicas, fecundidad, agresividad, entre otros, también pueden conducir a la consanguinidad de la colonia.

(3) No debe haber un programa de cría estructurado o algún criterio de selección que pueda inhibir el proceso azaroso del sistema (White y Lee, 1998). Para ello, existen varios sistemas de cría para mantener los animales exocriados que dependen del número de animales que integran la colonia. Se cuenta entonces con: el sistema *Poiley* de tipo rotativo, que se ajusta mejor para grandes colonias; el sistema *Han*, donde se intercalan una o dos veces las generaciones de apareamientos, y es más apropiado para colonias

pequeñas (Benavides y Guénet, 2003); y el sistema de apareamiento Robertson (el cual es el método utilizado en el bioterio de la Universidad de Los Andes para la producción de ratas no consanguíneas), este consiste en cruzar los machos de los bloques impares 1 y 3, con las hembras de los bloques pares 2 y 4, para formar los bloques de la generación filial 1 y 2. Luego, los machos de los bloques pares 2 y 4 son cruzados con las hembras de los bloques impares 1 y 3, para formar la generación filial 3 y 4. Este sistema puede variar de acuerdo al número de bloques y al número de parejas por bloque. El esquema del sistema de apareamiento Robertson se presenta a continuación para un total de cuatro bloques:



(I.2) Poblaciones naturales y de laboratorio

Elementos de genética de poblaciones

Una población o colonia de animales de laboratorio es la que está constituida por animales que se reproducen entre sí, por vivir dentro de un espacio limitado y bien definido, y precisamente por esta causa mantienen en común un cierto grado de parentesco o relación genética, ya sea de especie, subespecie, raza, variedad, cepa, línea, colonia o familia.

Por otra parte, una población natural es un conjunto o comunidad de individuos de una misma especie que conviven en un mismo lugar geográfico y que, por tanto se reproducen libremente.

Existen grandes diferencias entre ambos tipos de poblaciones. Estas son radicalmente distintas por varias causas principales, pero la más importante es el tipo de selección de los individuos que se reproducen en cada generación para obtener la siguiente. Mientras que en las poblaciones naturales actúa la selección natural que se manifiesta a través del medio en que vive la población, en un bioterio actúa casi exclusivamente la selección artificial que ejerce el hombre; es decir, en cada generación es el productor quien decide qué individuos deberán cruzarse para originar la siguiente generación, y transmitir por tanto su información genética a la misma (Zuñiga *et al.*, 2000). En cualquier caso, el hecho de que haya una selección implica que en cada generación se va a producir un cambio en el patrimonio genético, puesto que algunos genotipos resultan favorecidos con respecto a otros. Por consiguiente, habrá un cambio en las frecuencias genotípicas y en las frecuencias alélicas de cada población. (Zuñiga *et al.*, 2000). Para estudiar todos los procesos que afectan la composición genética de grupos de laboratorio, es necesario entender cómo debe ser el comportamiento ideal de las poblaciones naturales con el modelo hipotético de Hardy-Weinberg.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Un principio importante de la genética es que, en una población grande con apareamiento al azar, sin mutaciones y sin migración entre las poblaciones, las frecuencias de alelos y de genotipos se mantienen constantes de una generación a otra. En otras palabras no ocurre ningún cambio evolutivo a través del proceso de reproducción. Este principio se denomina **ley de Hardy-Weinberg**, por los dos geneticistas que lo descubrieron en forma independiente en 1908. El importante descubrimiento de estos dos investigadores demostró que los cambios en las frecuencias de los alelos y los genotipos sólo pueden ser el resultado de la acción de fuerzas adicionales sobre el pool génico de una población (Ricklefs, 1998).

Cuando una población está en equilibrio de Hardy-Weinberg, las proporciones de homocigotos y heterocigotos adquieren valores de equilibrio que pueden calcularse a partir de las proporciones de cada alelo en una población. Supongamos que un

determinado locus genético A tiene dos alelos, A_1 y A_2 , que aparecen en proporciones p y q ($p + q = 1$ y, por lo tanto, $q = 1 - p$).

En el equilibrio de Hardy-Weinberg los tres genotipos que pueden resultar aparecerán en las siguientes proporciones:

Genotipo	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
Frecuencia	p^2	$2pq$	q^2

Observemos que $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Estas proporciones provienen de las probabilidades de que cada tipo de cigota se forme a partir de una combinación aleatoria de dos gametas cualesquiera. Toda desviación de estas frecuencias genotípicas indica la presencia de selección, apareamiento no al azar u otros factores que influyen en la composición genética de la población (Ricklefs, 1998).

La ley de Hardy-Weinberg se aplica por definición, a poblaciones de efecto ilimitado, en las cuales los apareamientos se realizan al azar (estas poblaciones son muy difíciles de encontrar en la realidad). Por lo tanto, es difícilmente aplicable a los roedores, en los que las poblaciones son relativamente pequeñas y los acoplamientos están influenciados por factores de atracción respecto a unos congéneres y repulsión respecto a otros. Además, los apareamientos en los roedores de laboratorio son siempre decididos por el criador en función de un protocolo rígido (Benavides y Guénet, 2003).

Conocidas las diferencias existentes entre poblaciones naturales y de laboratorio, y entendidas un poco las bases de la genética de poblaciones, se presentaran los parámetros poblacionales que afectan los grupos de roedores de laboratorio no consanguíneos y cómo dichos procesos actúan para modificar dichas poblaciones.

Factores que afectan la composición genética de los roedores de laboratorio

Cuando un grupo de individuos es separado de su población original por barreras biológicas y/o geográficas, es posible que existan diferencias en la genética de la nueva población con respecto a la que le dio origen; las cuales son producto de la operación independiente de diversos procesos, tales como: la deriva genética, la selección, la consanguinidad y la mutación. Cada uno de estos procesos, dirige a la población formada hacia una divergencia genética, que se traducirá luego en la diferenciación entre los grupos.

A continuación, se detallaran cada uno de los procesos que ocasionan cambios en la composición genética de los roedores de laboratorio.

El primero de ellos es la **deriva genética**. Esta se da por modificaciones en las frecuencias alélicas al azar, debido a que los genes de la descendencia no constituyen una muestra aleatoria suficientemente representativa de los genes parentales. Este proceso puede llegar a fijar uno de los alelos y eliminar el otro, perdiéndose toda posibilidad de polimorfismo en la población.

El efecto fundador o mejor conocido cuello de botella, es una forma particular de deriva genética que tiene lugar cuando un grupo pequeño se separa de una población más grande para fundar una nueva colonia (Suzuki *et al.*, 1993). Un ejemplo del efecto **cuello de botella** en grupos de laboratorio, ocurre cuando un número pequeño de animales es utilizado para la formación de una colonia no consanguínea. En casos especiales se observa también este efecto, cuando en los bioterios requieren producir individuos con buen estado de salud a través de un proceso denominado *Redirevación*, éste se realiza mediante cesárea o transferencia de embriones con el objetivo de obtener animales limpios microbiológicamente, los cuales van a formar parte de los núcleos de fundación de la nueva colonia. (White y Lee, 1998). Es notable que dicho proceso conduzca a una reducción en el tamaño del núcleo de fundación, el cual no tendrá la información genética completa de sus ascendientes.

Un factor que puede favorecer el efecto cuello de botella descrito anteriormente es el error de muestreo (White y Lee, 1998). Por ejemplo, si una población es de tamaño finito y si una pareja dada de progenitores tiene sólo un pequeño número de descendientes, la frecuencia de cada gen no se reproducirá con exactitud en la siguiente generación, ni siquiera en ausencia total de fuerzas selectivas, a causa de errores de muestreo. Si en una población de 1000 individuos, la frecuencia de a es 0,5 en una generación, en la siguiente generación puede ser de 0,493 ó de 0,505, por azar. En la segunda generación, habrá otro error de muestreo, basado sobre la nueva frecuencia génica. Por lo tanto, este proceso de fluctuación aleatoria continúa generación tras generación, sin que ninguna fuerza empuje a la frecuencia a retornar a su estado inicial, porque la población no tiene “memoria genética” del estado en que se encontraba inicialmente (Suzuki *et al.*, 1993).

El segundo proceso que ocasiona cambios en la composición genética de roedores de laboratorio es la **selección**. Esta consiste en la elección, según sus características, de los animales de una generación para reproducirse y dar lugar a la siguiente. Los animales de laboratorio están sujetos a selección natural y artificial. La selección natural actúa a favor de individuos poseedores de algunos caracteres útiles para la supervivencia y la reproducción, asociados por ejemplo, con la resistencia a enfermedades o a la fuerza del individuo (Mettler y Gregg, 1972). Es importante tener en cuenta que los individuos en una población difieren en cuanto a su fertilidad y viabilidad, por lo que ellos contribuyen con un número diferente de descendientes a la próxima generación. Esta contribución de descendientes es llamada *fitness* o valor adaptativo, y si las diferencias de este *fitness* están asociadas con la presencia o ausencia de un gen particular en el genotipo de los individuos, entonces la selección opera en dicho gen. Por ello, cuando un gen está sujeto a selección, su frecuencia en los descendientes no es lo misma que en sus parentales y es aquí, en donde la selección natural ocasiona cambios en la frecuencia génica y consecuentemente en la frecuencia genotípica de los nuevos individuos.

La selección artificial, se aplica en zootecnia de acuerdo con un programa que tenga en cuenta los siguientes objetivos: fijar un rasgo determinado, alterar el promedio de expresión de un carácter en la colonia, y mantener una tasa adecuada de reproducción. No obstante, los efectos de la selección dependen del nivel de variación genética existente en la población, de manera que no sería posible seleccionar nada si todos los individuos fuesen iguales (Zuñiga *et al.*, 2000)

La **consanguinidad** es el tercer proceso que afecta la composición de las poblaciones de laboratorio, y para entenderla es necesario plantear en cuales circunstancias se produce un animal consanguíneo; por ejemplo, cuando sus progenitores tienen parentesco familiar entre sí, compartiendo uno o varios antecesores comunes. Esto hace que el número de *loci* homocigotos aumente, ocasionando una reducción en la heterocigosis que conlleva a la disminución de la variabilidad genética. Al cabo de veinte generaciones de apareamientos hermanos con hermanas, los heterocigotos habrán desaparecido casi por completo (Zuñiga *et al.*, 2000). La reducción de la heterocigosis se expresa con el coeficiente de consanguinidad (F), que mide la disminución del número de *loci* heterocigotos después de varias generaciones consanguíneas, tomando como base la población de la cual proviene dicha línea consanguínea. La fijación de genes en la condición de homocigosis se hace muy rápidamente por consanguinidad, siendo necesarias muy pocas generaciones para obtener un grado de homocigosis elevado.

En la figura 1, se muestra la evolución de los valores del coeficiente de consanguinidad, a lo largo de 100 generaciones de consanguinidad para diversos valores del tamaño de la población.

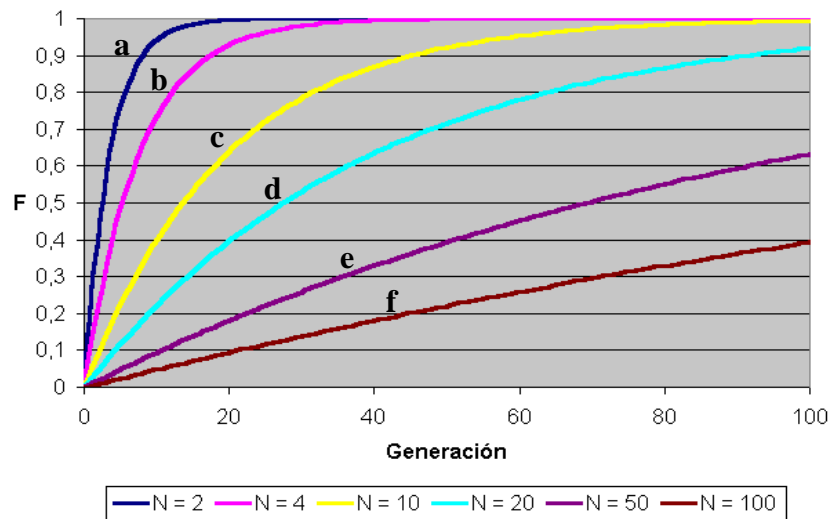


Figura 1. Efecto del número de parejas reproductoras (N) sobre el coeficiente de consanguinidad (F). a) autofecundación en organismos idénticos; b) cruces hermano con hermana; c) cruces entre primos hermanos; d) cruces entre primos segundos; e, f) cruces al azar¹.

Una consecuencia negativa de la consanguinidad, es la depresión por consanguinidad; la cual se manifiesta, por ejemplo, cuando se deriva una línea consanguínea de otra que no lo es, mediante la aparición de un descenso en la aptitud biológica de la cepa (fertilidad, ritmo de crecimiento, viabilidad, entre otros). Este fenómeno se debe a razones tales como la pérdida de combinaciones alélicas favorecidas por la selección natural, o la acumulación de alelos recesivos deletéreos, que en estado homocigoto se expresan libremente, lo cual no ocurre en la heterocigosis (Zuñiga *et al.*, 2000).

¹<http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/genetica/Deriva/Endogamia.htm>

El cuarto proceso que afecta la composición genética de los roedores de laboratorio es la **mutación**. Las mutaciones ocurren en los animales de las colonias de roedores de laboratorio y ellas pueden llegar a fijarse o pueden no persistir (si la mutación se da en un animal que no es reproductor. Algunas mutaciones no son ventajosas y pueden ser contra selectivas, por ejemplo, aquellas mutaciones que causan infertilidad (White y Lee, 1998).

Resumiendo, la selección tiende a fijar determinados caracteres con expresión fenotípica apreciable, la consanguinidad reduce considerablemente y rápidamente la heterocigosis y por consiguiente, la variabilidad genética de una población, y la deriva genética puede modificar radicalmente las frecuencias alélicas al azar. Por tanto, estos agentes evolutivos actúan como factores determinantes sobre las poblaciones de animales de laboratorio, que pueden entonces, sufrir cambios en su estructura genética. El resultado es que al cabo de unas pocas generaciones dichas poblaciones son totalmente diferentes de la población original. Estas alteraciones escapan muchas veces al control humano, por lo que es necesario tomar medidas para prevenir los cambios genéticos en las poblaciones de laboratorio (Zuñiga *et al.*, 2000).

I.3) La contaminación genética y los controles de calidad

La calidad de un animal de laboratorio viene determinada por sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas o de cualquier otra índole que definen su fenotipo, el cual es el resultado de la interacción entre su genotipo y el ambiente. Por tanto, dado que el ambiente de los bioterios es homogéneo por estar rigurosamente controlado, las características de un animal de laboratorio derivan principalmente de su patrimonio genético. En consecuencia, el control y la preservación de la calidad genética del animal de laboratorio deben ser prioritarios (Melloy y Balk, 1993).

Cuando se habla de contaminación genética en animales de laboratorio, se hace referencia a la pérdida de la condición de homocigosis en el 98% de los alelos y de la

condición de isogenicidad en el 98% de los *loci* de las colonias de roedores consanguíneos.

A lo largo de los últimos 30 años, se han publicado varios casos de líneas de ratas y ratones que han perdido su autenticidad genética, con la correspondiente depreciación de los resultados obtenidos, pérdida de tiempo y dinero. De aquí la necesidad de establecer controles genéticos, para que los resultados de cualquier investigación sean reproducibles y tengan validez científica. Frecuentemente, la obtención de resultados erróneos en la investigación es atribuida a distintos factores experimentales, pero muy pocas veces se repara en verificar la genética de los animales utilizados en la experimentación.

En la actualidad, se han realizado diferentes estudios para el monitoreo genético de roedores de laboratorio, mediante el uso de un conjunto de técnicas que permiten verificar si los animales que estamos utilizando conservan las características genéticas originales de la línea o colonia a la cual pertenecen, o han sufrido algún cambio debido a contaminación genética (por cruza accidentales). Lamentablemente, estos controles no están diseñados para detectar la presencia de mutaciones espontáneas, ya que al producirse al azar sería necesario evaluar la totalidad del genoma. El fundamento de los controles de pureza genética consiste en analizar caracteres cualitativos o cuantitativos (enzimas, marcadores inmunológicos, marcadores de ADN) y compararlos con valores de referencia establecidos internacionalmente para la línea o colonia en estudio. En todos los casos se trata de utilizar marcadores lo suficientemente polimórficos para detectar los cambios ocurridos en estos tipos de animales.

Según Festing (1990), estos controles se pueden dividir en tres categorías: (i) **Caracterización**: este tipo de control se usa para describir el genotipo de una nueva línea o grupo, analizando el mayor número de *loci* posibles. (ii) **Control tipo I**: se emplea sólo para confirmar el perfil genético de la línea o colonia. (iii) **Control tipo II**: en el cual se analiza un grupo mínimo de *loci* seleccionados especialmente para

discriminar entre varias líneas. El último tipo de control es el que debería aplicarse periódicamente en los bioterios de roedores usados en experimentación. Ante la inquietud de saber cuándo se debe realizar un control de pureza genética, podemos decir que una colonia debe ser controlada genéticamente, en dos casos: a) al establecer una colonia nueva; y b) cuando se sospecha de contaminación genética. Más allá de estos casos, un control de rutina debería estar presente en aquellas colonias con alto riesgo de contaminación, como en los bioterios que mantienen más de una línea albina simultáneamente.

Las técnicas de control genético se pueden agrupar en aquellas que controlan *loci* individuales y las que lo hacen sobre varios *loci* simultáneamente. Dentro del primer grupo encontramos los marcadores bioquímicos, los marcadores inmunológicos, el análisis del color del pelaje y la tipificación de microsatélites de ADN. Dentro de las técnicas que controlan varios *loci* simultáneamente, encontramos los injertos de piel, los estudios morfológicos, el comportamiento reproductivo, entre otros (Dagnaes, 1994).

Según Kiran *et al.*, (2007), el monitoreo genético basado en caracteres físicos (color del pelaje, análisis mandibular, entre otros), y caracteres bioquímicos (isoenzimas, marcadores inmunológicos y otros), es muy práctico en centros de producción e investigación para mantener la calidad genética de los animales bajo su cuidado.

A continuación se describirán algunas técnicas empleadas para el control genético de los animales de laboratorio.

1. Marcadores bioquímicos

Este método es muy útil en el control genético de líneas consanguíneas. Con frecuencia existen diferencias más o menos sutiles entre los distintos alelos de los genes que codifican ciertas enzimas (isoenzimas), que no interfieren en su funcionalidad, pero que hacen que éstas presenten diferencias en su velocidad de migración a través de un

gel de electroforesis. Una vez separadas en el gel (almidón o poliacrilamida), las distintas enzimas se visualizan añadiéndoles un sustrato que da un producto coloreado cuando es metabolizado por la enzima. Si analizamos este polimorfismo isoenzimático a un buen número de genes, los resultados permiten la caracterización genética de determinadas líneas o colonias de roedores (Bedel *et al.*, 1997), es decir, se puede obtener información indirecta, pero precisa, sobre la constitución genética de los animales y detectar contaminación con la sola presencia de patrones anormales (Benavides y Guénet, 2003).

2. Marcadores de histocompatibilidad tisular

El sistema inmunitario provee a los mamíferos de un mecanismo de defensa frente a la invasión por cuerpos extraños y organismos patógenos. El reconocimiento de tales agentes se efectúa a través de los anticuerpos, moléculas proteicas, que se unen en forma específica a los antígenos, los cuales son todas aquellas moléculas que no reconocen como propias. Consecuencia de este reconocimiento, es también el rechazo de los trasplantes de órganos provenientes de otros congéneres. Existen más de treinta genes distintos implicados en el sistema de histocompatibilidad, dentro de ellos, los pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), denominado complejo H2 en el ratón y complejo RTI en la rata (Snell y Stimpfling, 1966). El uso de trasplantes de piel supone un poderoso método para el control de la pureza genética de animales de laboratorio, pues éstos serán rechazados si el individuo donante y el receptor no son genéticamente idénticos (Zuñiga *et al.*, 2001).

Por medio de esta técnica se pueden evaluar cientos de *loci* de histocompatibilidad en forma accesible a cualquier laboratorio, pues no requiere ni reactivos ni instrumental específico. El protocolo más recomendable consiste en trasplantar recíprocamente un pequeño fragmento de piel de la oreja o cola entre dos o más animales y observar durante no menos de 60 días la evolución del injerto. Esta técnica se encuentra actualmente en desuso por ser poco confiable y por el largo tiempo que lleva su lectura (Benavides y Guénet, 2003).

3. Marcadores de color del pelaje

Este análisis se basa en la cruce de prueba de un ratón albino o rata albina (de la línea o colonia que estamos controlando) con otro animal de color, para desenmascarar el genotipo oculto por el albinismo (genes hipostáticos), permitiendo analizar todas las combinaciones de genes que se presenten en la F1 y así confrontarlos con el estándar para la línea. Éste es un método muy económico, fácil de realizar y muy eficiente para detectar cruces accidentales recientes en una colonia de líneas albinas (Benavides y Guénet, 2003).

4. Marcadores de carácter reproductivo

El número de crías por camada de los ratones y ratas de laboratorio es una característica propia de cada línea o colonia. Su promedio es utilizado frecuentemente como un primer indicador de la pureza genética de los animales. Un importante factor de alerta de contaminación genética, será la detección de camadas que difieran ampliamente del promedio calculado para la línea o colonia. En este caso es aconsejable realizar otros controles más precisos para confirmar dicha sospecha (Benavides y Guénet, 2003).

5. Marcadores de caracteres fisiológicos

Además de los métodos ya citados, existen otros rasgos fenotípicos que se pueden emplear en la caracterización genética de los animales de laboratorio. Estos rasgos pueden ser analizados mediante la evaluación de parámetros fisiológicos, los cuales caracterizan de forma rápida a cada cepa o colonia de animal de laboratorio, tales como: el hematocrito, el recuento de eritrocitos y linfocitos, concentración de hemoglobina, la tasa de crecimiento, la longevidad, la respuesta a un tratamiento farmacológico, entre otros. Estos parámetros deben ser valorados en todas las colonias

de animales de laboratorio para comprobar su oscilación dentro de los límites normales estimados para la línea o colonia a la cual pertenecen.

El laboratorio *Charles Rivers Laboratory*, es uno de los más importantes a nivel internacional por la producción de diferentes especies y cepas de animales de laboratorio con control genético, microbiológico y nutricional, entre otros, además que ofrece diferentes servicios, como una base de datos presentada en la dirección electrónica <http://www.charlesriverslaboratory.com> en donde se encuentra registrada gran parte de la información fenotípica y fisiológica de las líneas y colonias de roedores que mantienen en sus laboratorios.

5.1. Ganancia de peso y talla corporal

Dentro de los parámetros fisiológicos que se registran en el laboratorio *Charles Rivers* se encuentran datos del crecimiento de la ratas *Sprague-Dawley* CrI:CD[®](SD)BR que se muestran en la siguiente figura.

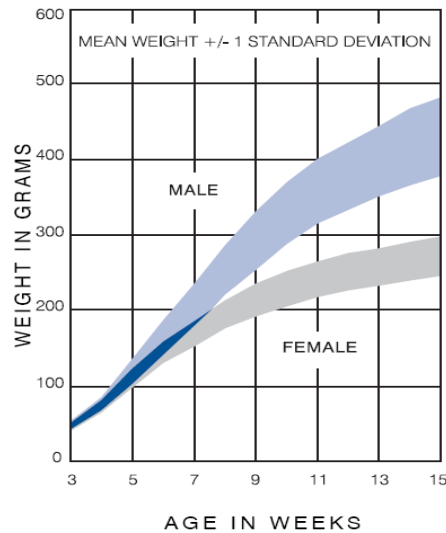


Figura 2. Curva de crecimiento de la colonia CrI:CD[®](SD)BR, para ratas con 13 semanas de vida (2006).

Fuente: <http://www.charlesriverslaboratory.com>.

El crecimiento o tamaño corporal de los animales homeotérmicos como los ratones de laboratorio está relacionado directamente con el índice metabólico basal (Hill, *et al.*, 2006), el cual varía dependiendo de los factores ambientales y del comportamiento conductual de éstos. Si se considera que dentro de los bioterios los factores ambientales se mantienen constantes, entonces el crecimiento lo determina la genética de los animales, ya que en el mismo participa el sistema endocrino (Cunningham, 2003). Estos planteamientos son bastantes generales y en los bioterios donde no existe el control ambiental es difícil separar exactamente cuál es la influencia de la genética o la influencia del ambiente en la ganancia del peso y de la talla de los animales. Sin embargo, para realizar la caracterización de las líneas de roedores de laboratorio, es necesario realizar las curvas de crecimiento de los mismos.

Otros valores fisiológicos reportados en la base de datos de *Charles Rivers Laboratory*, son los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos, que serán descritos a continuación:

5.2 Parámetros hematológicos

La sangre se puede separar por centrifugación en sus componentes celular y líquido. La fase líquida es más ligera que la celular, por tanto queda en la parte superior del tubo de centrifugación, este líquido acelular se denomina plasma y está constituido en un 93% por agua y entre un 5% y 7% de moléculas proteicas, cuya presencia le dan un color amarillo pálido típico. Los componentes celulares pueden constituir un 30-50% del volumen de la sangre (variable según las especies) (Cunningham, 2003). Los parámetros hematológicos están dados por: el hematocrito, la hemoglobina y la cuenta leucocitaria.

- **Hematocrito**

Se define el hematocrito (Hto) como la fracción de volumen que los eritrocitos o hematíes ocupan en un volumen de sangre. Se determina centrifugando una cantidad de sangre a la que se le ha añadido anticoagulante; como las células son más pesadas que el plasma se depositan en el fondo del tubo durante la centrifugación. La mayoría de los componentes celulares aparecen de color rojo ya que gran parte son eritrocitos. Éstos deben su color a la hemoglobina (proteína que contiene un pigmento rojo).

Los eritrocitos, en los frotis coloreados, se observan como células redondeadas teñidas de color rosa brillante, debido a la hemoglobina, que se une a la eosina ácida que se utiliza como colorante. Suelen tener un diámetro de 6,5 a 8,5 μm y poseen una forma bicóncava que maximiza su relación superficie/volumen que optimiza el intercambio de oxígeno. Los eritrocitos carecen de núcleo, que se pierde durante su formación (Stevens y Lowe, 1998).

- **Hemoglobina**

La hemoglobina es un pigmento respiratorio, que como se mencionó anteriormente, proporciona a la sangre su color característico. Este color puede cambiar dependiendo de su contenido en oxígeno (O_2). La hemoglobina de los vertebrados, excepto la de los ciclóstomos, tiene un peso molecular de 68000 Kd y contiene cuatro grupos prostéticos de hierro porfirínico, *hemo*, asociados a una proteína, la globina (Eckert, 1998).

Los eritrocitos tienen la capacidad de concentrar la hemoglobina en el líquido celular hasta unos 34 g/dL de células. La concentración nunca se eleva por encima de este valor porque constituye un límite metabólico del mecanismo de formación de hemoglobina en la célula. Sin embargo cuando la formación de hemoglobina en la médula ósea es deficiente, el porcentaje de hemoglobina en las células puede reducirse considerablemente por debajo de este valor, y el volumen de los hematíes reducirse

también debido a la menor cantidad de hemoglobina que llena la célula (Guyton y Hall, 1997).

La hemoglobina, transporta el oxígeno desde los pulmones a los tejidos, y cataliza la reacción entre el dióxido de carbono y el agua, debido a la gran cantidad de anhidrasa carbónica que contienen. La rapidez con que se produce esta reacción hace posible que el agua de la sangre reaccione con grandes cantidades de dióxido de carbono y por lo tanto lo transporte desde los tejidos a los pulmones en forma de ión bicarbonato (HCO_3^-). Además, la hemoglobina es un excelente amortiguador ácido-básico en las células, de forma que los eritrocitos son responsables de la mayor parte del poder amortiguador de la sangre (Guyton y Hall, 1997).

- **Leucocitos o Glóbulos blancos**

Los leucocitos son las unidades móviles del sistema protector del organismo. Se forman en parte en la médula ósea (los granulocitos y los monocitos y unos pocos linfocitos), y en el tejido linfático (los linfocitos y las células plasmáticas). Tras su formación son transportados de forma específica a áreas de infección e inflamación intensas, proporcionando una rápida y potente defensa frente a cualquier agente infeccioso que pudiera entrar al organismo (Guyton y Hall, 1997).

- **Recuento diferencial de los glóbulos blancos**

El recuento diferencial puede definirse como el porcentaje diferencial de los diferentes tipos de leucocitos. La mayoría de sus funciones sanguíneas tienen lugar cuando abandonan la circulación y entran en los tejidos. El número total de leucocitos en los humanos en la sangre periférica normalmente es de $4,0$ a $11,0 \times 10^9$ /litro. Existen cinco grandes tipos de leucocitos y sus nombres y proporciones relativas en la circulación son las siguientes: neutrófilos: 40-75%; eosinófilos: 5%; basófilos: 0,5%; linfocitos: 20-50%; monocitos: 1-5%.

De acuerdo a las necesidades del organismo, éste puede aumentar la actividad de cualquiera de los tipos celulares en los tejidos periféricos y por tanto aumentar el número y la proporción de ese determinado tipo celular (Stevens y Lowe, 1997).

Tabla 1. Parámetros hematológicos de hematocrito, hemoglobina, glóbulos blancos y recuento diferencial, para la colonia de ratas *Sprague-Dawley* CrI:CD[®](SD)BR, producida en *The Charles Rivers Laboratory*. Fuente obtenida de <http://www.charlesriverslaboratory.com>

Valores hematológicos	♂	♀
Hematocrito (%)	43,25	42,24
Hemoglobina (g/dl)	15,35	14,64
Glóbulos blancos (x100mm ³)	11,130	8,580
Recuento Diferencial	♂	♀
Neutrofilos (%)	11,11	9,71
Linfocitos (%)	82,93	84,98
Eosinofilos (%)	1,32	1,24

5.3. Parámetros bioquímicos

- **Concentración de Glucosa**

La glucosa es un monosacárido de seis carbonos que representa el principal combustible metabólico de la mayoría de las células. La oxidación de este azúcar en la glucólisis conduce a la formación de la molécula mas importante para la captura y transferencia de energía libre en los sistemas biológicos, el adenosin trifosfato (ATP).

La disponibilidad de la glucosa para el metabolismo celular está regulada durante los periodos de abundancia (después de una comida) o escasas (después del ayuno), por el ajuste de las concentraciones sanguíneas de insulina y glucagón (Lodish *et al.*, 2002). Debido a que la concentración de glucosa en el organismo se encuentra

regulada, la variación de la misma con respecto a los valores normales, permite determinar ciertos desordenes o desequilibrios en el organismo, así como también, la caracterización fisiológica de una especie animal específica.

Tabla 2. Parámetros bioquímicos de glucosa y transaminasas para la colonia de ratas *Sprague-Dawley* CrI:CD[®](SD)BR, producida en *The Charles Rivers Laboratory*. Fuente obtenida de <http://www.charlesriverslaboratory>

	Glucosa (mg/dl)	Transaminasas	
		ALT (U/l)	AST (U/l)
♂	211,8	46,9	107,3
♀	219,9	44,8	137,5

- **Niveles de Transaminasas (GOT: glutamato/oxalacetato transaminasa y GPT: glutamato/piruvato transaminasa)**

En el organismo los niveles de transaminasas están regulados tanto por vía hormonal como por la dieta. Poseen interés clínico puesto que es bien conocido que los valores de sus concentraciones en suero son empleados como indicadores de enfermedades cardiacas, como el infarto, o hepáticas, como la hepatitis. Por lo tanto, son ejemplos de marcadores, cuya presencia, en concentraciones anormalmente elevadas, es indicativa de la existencia de una lesión en los tejidos de procedencia, lo que provoca su paso masivo a la sangre (Lozano *et al.*, 1995).

La función de las transaminasas o aminotransferasas es la desaminación de aminoácidos en la etapa inicial de su metabolismo. En el grupo prostético de estas enzimas, el fosfato de piridoxal (vitamina B₆), se da un equilibrio en el que el grupo α -amínico de un aminoácido se transfiere a un α -cetoácido, dando lugar, respectivamente al α -cetoácido y α -aminoácido correspondientes. Cualquier aminoácido puede ser un donador potencial de grupos amínicos y, en teoría, cualquier α -cetoácido podría ser receptor. Sin embargo, la mayor parte de las aminotransferasas funcionan con la pareja

receptora α -cetoglutarato/glutamato (Lozano *et al.*, 1995). Dentro de los α -cetoácidos receptores encontramos intermediarios del ciclo de krebs y de la glucolisis, como piruvato, oxaloacetato y α -cetoglutarato, por lo que estas reacciones constituyen un enlace entre el metabolismo de los carbohidratos y el de los aminoácidos (Díaz y Hicks, 1994; Herrera, 1996).

Entre las transaminasas más abundantes en tejidos animales, siempre con la pareja aceptora α -cetoglutarato/glutamato, destacan la glutamato/oxalacetato transaminasa (GOT), también denominada aspartato aminotransferasa (AsT), y la glutamato/piruvato transaminasa (GPT), alternativamente nombrada alanina aminotransferasa (AIT) (Lozano *et al.*, 1995).

La (AsT), participa en la formación de L-aspartato a partir de oxaloacetato, el cual es un intermediario del ciclo de krebs (1):



Por otro lado, la (AIT), participa en la formación de L-alanina a partir del piruvato que es un intermediario de la glucolisis (2):



6. Marcadores de ADN

Todos los métodos de control vistos hasta ahora se basan en el análisis de caracteres fenotípicos, es decir, de la expresión de los genes, y cuya posibilidad de variación está restringida por la selección natural. Cabe entonces la posibilidad de que se produzcan variaciones genómicas que no trasciendan al plano fenotípico, pasando así inadvertidas. Por esta razón los métodos de análisis directo del ADN mediante la detección de marcadores moleculares son incomparablemente más exactos y adecuados si deseamos tener un control estricto de la genética de los animales de laboratorio. Existe

un grupo de técnicas de análisis genético molecular que permiten la caracterización precisa de individuos de cualquier especie, mediante el establecimiento de lo que se conoce como la huella genética del ADN o *DNA finger printing*. Entre éstas, las más utilizadas en zootecnia son las que analizan los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*, en inglés) y las que analizan los polimorfismos de número variable de repeticiones en *tandem* (VNTR: *Variable Number Tandem Repeats*, en inglés).

El estudio de los RFLP se basa en el uso de endonucleasas de restricción (ER), éstas son enzimas que cortan el ADN por sus sitios diana. Cuando el ADN genómico de un animal es cortado con una ER, se producen numerosos fragmentos que pueden separarse por electroforesis. Las variaciones genéticas causadas por mutaciones espontáneas o por contaminación genómica pueden alterar la localización y el número de las dianas para las ER, alterando así el patrón de bandas en la electroforesis (Zuñiga *et al.*, 2001).

En el genoma de los mamíferos, es posible encontrar VNTR, uno de los tipos más conocidos dentro de este grupo son los minisatélites. Su descubrimiento se produjo por el hallazgo de fragmentos de tamaño variable en las bibliotecas genómicas del ADN humano. Esta variabilidad radica en que, los distintos alelos poseen diferente número de unidades de repetición. La razón de esta variación es la recombinación genética entre unidades de repetición mal alineadas. La alta variabilidad de los minisatélites los hacen especialmente útiles en el mapeo genético, ya que existe una alta probabilidad de que los individuos cambien sus alelos en estos *loci* (Lewin, 2001).

Otros polimorfismos del ADN usados como marcadores, son las repeticiones de secuencias simples (SSR: del inglés *Simple Sequence Repeat*) o microsátélites. A mediados de la década de los 80 se da a conocer la existencia de estos polimorfismos de ADN repetitivo de di, tri o tetranucleótidos tales como CA, GA, o CGG, los cuales presentan un rango de repetición de unidades nucleotídicas entre 15 y 40, facilitando la

posibilidad de amplificación de éstas regiones utilizando para ello oligonucleótidos iniciadores de las secuencias únicas adyacentes, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*: del inglés *Polimerase Chain Reaction*) (Silver, 1995; Zuñiga *et al.*, 2001). Según Hans (2004). Los polimorfismos microsatélites se derivan principalmente de la variabilidad en la longitud de la secuencia primaria, por otra parte, la variación genética en cualquier *loci* microsatélite está caracterizada por una alta heterocigosis y por la presencia de múltiples alelos, en las colonias de animales no consanguíneos.

Otros marcadores importantes son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP: del inglés *Single Nucleotide Polimorphism*) los cuales son el resultado de la variación de un nucleótido en cualquier sitio del genoma y constituyen la forma más común de variación genética; éstos son los tipos de polimorfismos más abundantes. Se encuentran tanto en las secuencias codificantes y no codificantes y presentan dos alelos. El análisis de estos marcadores bi-alelicos se ve favorecido por la aparición del “genotipado” automático, basado en PCR y microarreglos o “microchips” de ADN, que permiten analizar miles de muestras a la vez. Actualmente son de mucha importancia en el control genético de animales de laboratorio, ya que ofrecen nuevos marcadores polimórficos aún entre cepas o colonias estrechamente relacionadas, permitiendo identificar contaminación genética en colonias consanguíneas (Petkov *et al.*, 2004).

6.1. Análisis de microsatélites por PCR

El uso de microsatélites en controles de calidad genética presenta varias ventajas sobre las demás técnicas: (a) por ser altamente polimórficos resulta mucho más fácil la selección de un juego de microsatélites para controlar un grupo de líneas o colonias (Benavides y Guénet, 2003). Muchos de estos polimorfismos se encuentran en el rango de 2 a 40 (pb) y son detectados por la observación de los productos de amplificación por PCR en geles de agarosa o poliacrilamida (Love *et al.*, 1990). (b) son marcadores codominantes (los heterocigotos se pueden distinguir de los homocigotos y por ello

aportan mayor información que los marcadores dominantes, por ejemplo, RFLP. (c) su gran abundancia (hay más de 8000 descritos para la rata) y (d) todos los microsatélites pueden ser analizados con el mismo protocolo y a partir de cantidades ínfimas de ADN 50 nanogramos (ng) provenientes, por ejemplo, de unos pocos microlitros (μl) de sangre o de una punta de cola. En los últimos años esta técnica ha sido adoptada por la mayoría de los bioterios y grandes criadores comerciales de ratas y ratones como un control genético rápido, eficaz y económico (Benavides *et al.*, 1998).

La figura 3 muestra un ejemplo de una secuencia microsatélite no codificante (en rojo), flanqueada por el lado derecho e izquierdo por secuencias (en negro) que sirven de molde para la hibridación de los oligonucleótidos iniciadores en la técnica de PCR.

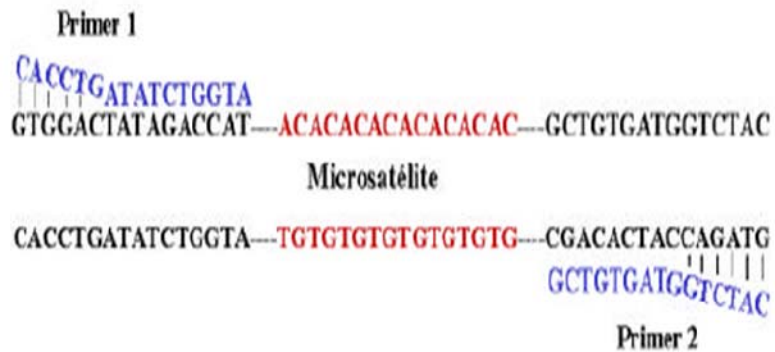


Figura 3. Composición de una región microsatélite en una cadena de ADN.

En la siguiente figura, se muestra un ejemplo del análisis genético mediante microsatélites. Se observan patrones de bandas de PCR de los alelos pertenecientes a los locus A y B de dos individuos diferentes.

²<http://www.Terralia.com/revista12/pagina981.htm>.

Como se observa, el análisis de microsatélites por PCR permite detectar diferencias entre los individuos de una población para un mismo locus. La diferencia en pares de bases entre los alelos de un mismo gen indica una condición de heterocigosis, por ejemplo, para el individuo 2, el locus A presenta el polimorfismo A3 y A4, y el locus B presenta el polimorfismo B3 y B2. Cuando no hay diferencias en pares de bases entre los alelos de un mismo, se presenta una condición de homocigosis, como se observa en el locus B del individuo 1.

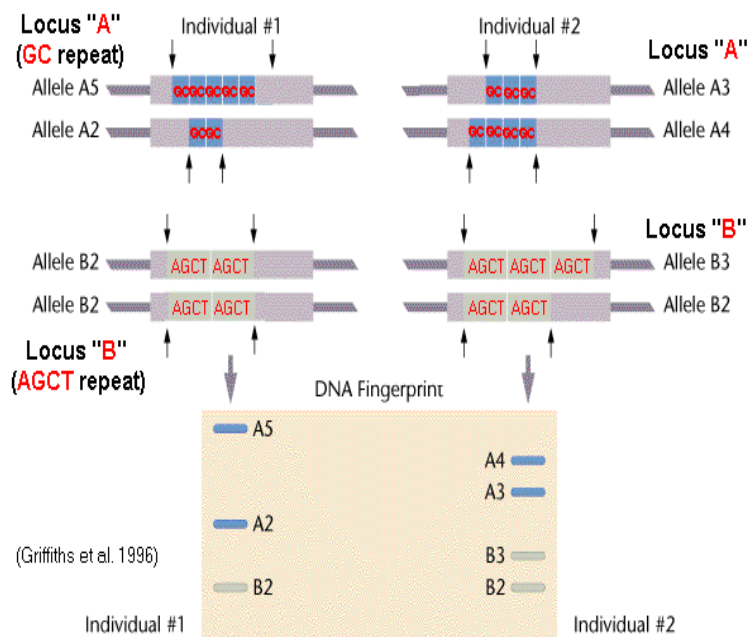


Figura 4. Uso de los microsatélites como marcadores moleculares.

HIPÓTESIS

Si la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley* producidas en el bioterio de la Universidad de Los Andes han conservado su condición de heterocigosis, al realizar el análisis de marcadores moleculares microsatélites, usando la técnica de la PCR, encontraremos para éstos una condición bi-alelica. Por otra parte, al analizar parámetros fenotípicos tales como crecimiento, valores hematológicos y bioquímicos, encontraremos similitud con los valores reportados en importantes bases de datos, indicando que la colonia conserva su aptitud biológica y por ende su variabilidad genética.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Evaluación molecular de la condición de heterocigosis en la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*, mediante el análisis de marcadores moleculares microsatélites.
- Evaluación fenotípica de la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*, a través de la determinación de la ganancia de peso-talla y de la determinación de los valores de pruebas hematológicas y bioquímicas sanguíneas.

Objetivos Específicos:

1. Estandarizar las técnicas requeridas para el desarrollo de la investigación
 - Evaluación de tres métodos de extracción de ADN a partir de tejido de oreja de rata.
 - Optimización de la técnica de PCR para la amplificación de los *loci* microsatélites en estudio.
2. Formar el banco de ADN de la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*, utilizando el método de extracción de ADN seleccionado para el estudio.
3. Verificar la heterocigosis de la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*, mediante la identificación de los alelos correspondientes a los siete *loci* microsatélites en estudio.
4. Evaluar parámetros fenotípicos en la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*.
 - Realizar curvas de crecimiento (ganancia de peso-talla) para las ratas hembra y ratas macho de la colonia.

- Realizar pruebas hematológicas, entre ellas, la determinación de valores de hemoglobina, hematocrito, leucocitos (glóbulos blancos) y recuento diferencial celular.
- Realizar pruebas bioquímicas sanguíneas, entre ellas, la determinación de valores de glucosa y transaminasas.

Capítulo II. METODOLOGÍA

Evaluación de tres métodos de extracción de ADN a partir de tejido de oreja de rata de la colonia no consanguínea *Sprague-Dawley*, producida en el bioterio de la Universidad de Los Andes

En el presente estudio se ensayaron tres métodos diferentes de extracción de ADN, con el propósito de seleccionar el método que ofreciera la mejor calidad y pureza en el ADN obtenido. Para esta evaluación se utilizaron 10 animales seleccionados al azar pertenecientes al núcleo de fundación de la colonia *Sprague-Dawley*

El primer método evaluado se realizó mediante la técnica *HotSHOT* (Truett *et al.*, 2000); ésta técnica se basa en la extracción de ADN mediante lisis alcalina. Para la obtención del tejido de oreja de rata, se realizó la limpieza y esterilización del material de trabajo, se limpió cada oreja con alcohol al 70% para desinfectar y evitar contaminaciones futuras. Se tomaron fragmentos de oreja de ~2x2 mm y se almacenaron en tubos estériles. Se agregaron 75 µl de solución alcalina (A) que contenía NaOH 25 mM y 0,2 mM de disodium EDTA a pH 12; se incubó en baño de agua a 95 °C durante 60 minutos, se enfrió a 4 °C y se adicionaron 75 µl de solución neutralizante contentiva de Tris HCl 40 mM a pH 5.

El segundo método evaluado se encuentra descrito en Sambrook y Russell, (2001), éste se basa en el aislamiento de ADN genómico sin emplear extracción con fenol ni centrifugación. Se realizó la limpieza y esterilización del material de trabajo, se limpió cada oreja con alcohol al 70% para desinfectar y evitar contaminaciones futuras. Se tomaron fragmentos de oreja de ~2x2 mm y se almacenaron en tubos estériles. Se agregaron 500 µl de buffer de lisis A (ver apéndice A) y Proteinasa K (10 mg/ml) (Promega. Cat. V3021). La digestión fue completada incubando en estufa a 55 °C, durante 12 horas con agitación; seguidamente se agregó 1 volumen de isopropanol 95% (500 µl) y se agitó por inversión por 15 minutos hasta que desapareciera la viscosidad. Luego, el precipitado insoluble o *pellet* fue recuperado con una punta descartable para

micropipeta, llevado a estufa a 37 °C para eliminar el exceso de líquido y finalmente resuspendido en 100 µl de buffer TE a pH 8,0 (ver apéndice A).

El tercer método evaluado, se basa en la extracción de ADN genómico empleando la enzima Ananasa, según comunicación personal del profesor Néstor González de la Universidad de Los Andes. El fundamento de esta técnica, consiste en la digestión de la muestra de tejido utilizando NaCl 6M y Ananasa (20 mg/ml). La obtención del tejido de oreja de rata fue realizada bajo las mismas condiciones empleadas en los métodos descritos anteriormente. Se lavaron los fragmentos de tejido con 500 µl de solución (1) a pH 8,2 contentiva de Buffer TE y NaCl 0,4 M. La solución de lavado fue descartada, se adicionaron 400 µl de solución (1), 40 µl de solución SDS al 10% y 8 µl de Ananasa (20 mg/ml) para conformar el buffer de lisis (B) (ver apéndice A). Las muestras fueron incubadas en estufa a 37 °C durante 2 horas, transcurrido este periodo se aumentó la temperatura a 65 °C por 15 minutos. Luego, se agregaron 300 µl de NaCl 6M, agitando seguidamente por inversión hasta observar la homogenización de la solución. Las muestras fueron centrifugadas en frío durante 30 minutos a 13.400 rcf, se colectó y transfirió el sobrenadante en tubos nuevos y estériles. Se adicionó 1 volumen de isopropanol absoluto (750 µl), se agitó por inversión, y se dejaron las muestras por 12 horas a 4 °C. Se centrifugó nuevamente a 13.400 rcf en frío por 30 minutos. Finalmente, el *pellet* fue recuperado y resuspendido en 50 µl de buffer TE a pH 8,0.

Con la finalidad de optimizar el protocolo de extracción, se realizó en algunos casos, la precipitación del ADN con NaCl y etanol, según Sambrook y Russell (2001), de la siguiente manera: se adicionaron a cada muestra 50 µl de NaCl 0,3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (250 µl), se dejaron a -20 °C durante 12 horas; seguidamente se centrifugó por 10 minutos a 11.160 rcf, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado insoluble con 1 ml de etanol 70% frío, el sobrenadante fue nuevamente descartado y el *pellet* se sometió al secado en estufa a 37 °C, posteriormente fue resuspendido y almacenado en 50 µl de buffer TE.

Optimización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación de los microsatélites: *DIMit17, D10Mit10, R-12, R-43, R-99, R-119 y R-145*

En la actualidad, la técnica de PCR es empleada en una gran variedad de estudios. A pesar de su versatilidad y amplio espectro en el área de la investigación, debemos tener presente que las condiciones de cada PCR son muy específicas y que existen diversas variables que deben controlarse, por ejemplo; la concentración del ADN, la concentración de iones Mg^{+2} , la temperatura de alineación de los oligonucleótidos iniciadores, el programa empleado para la amplificación de los *loci*, entre otros. Por ello, en el presente estudio se controlaron todas las variables mencionadas para asegurar la eficiencia de la técnica. La optimización de la técnica se inició tomando en cuenta los siguientes detalles:

La mayoría de marcadores moleculares microsatélites utilizados (*R-12, R-43, R-99, R-119 y R-145*) para la evaluación genética de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, fueron seleccionados de acuerdo a los resultados reportados por Serikawa *et al.*, (1992), en donde se realizó el mapeo genético de rata mediante el análisis de marcadores microsatélites por PCR. El criterio de selección, se enfocó en escoger los *loci* microsatélites que mostraron mayor polimorfismo genético. Otro criterio tomado en cuenta, fue que los microsatélites estuviesen ubicados en diferentes cromosomas.

Para los microsatélites *DIMit17* y *D10Mit10*, la selección se realizó mediante la búsqueda en la página Web <http://rgd.mcw.edu>; Rat Genome Database (RGD).

En la siguiente tabla se resumen las características de los siete microsatélites seleccionados y evaluados, se describen las unidades de repetición y el tamaño en pares de bases de los fragmentos esperados mediante la amplificación por PCR.

Tabla 3. Características de los oligonucleótidos iniciadores o *primers* seleccionados para la evaluación de genética de la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*, producidas en BIOULA. NR = no reportado.

Locus	Crom.	Nombre Microst.	Secuencias de oligonucleótidos iniciadores Forward y Reverse	Unid. Repetic.	Longitud Pb
<i>AFP</i>	14	R43	5'-AAGCATAGCAGTGAATTGGTG-3' 5'-TTCATCATCCTTTCATAAAGGC-3'	(GT)23b	151
<i>CKB</i>	6	R99	5'-GCCCTATGTCTGAGTGTTC-3' 5'-CTAGGTGAAGTGACAGGCCA-3'	(GT)26	128
<i>LSN</i>	1	R119	5'-CAAGGACTGAGTGCATGCTC-3' 5'-TTCTCTCTTGCTAGCTGCCA-3'	(GATG)7	118
<i>NPY</i>	4	R12	5'-AGGGAGTGGCAGCATTTAG-3' 5'-GAGATAGTTCAGAAGAAACCCATG-3'	(GA)28 (AAAT)7	135
<i>TNF</i>	20	R145	5'-AGGAAATGGGTTTCAGTTCC-3' 5'-CAGGATTCTGTGGCAATCTG-3'	(AC)46	125
NR	1	D1Mit17	5'-GTGTATGTATGGGTGCGTGC-3' 5'-TGGAAAGGTGGAGACAAATG-3'	NR	213
<i>Bp12</i>	10	D10Mit10	5'-TTAAAGAGCATCGTTACCTTCTTG-3' 5'-TCCTTTGAAACAAAGTATTGAAAA-3'	NR	204

Para la determinación de la concentración de ADN genómico a utilizar, se tomó como referencia la utilizada por Serikawa *et al.*, (1992) y Benavides *et al.*, (2000), además se realizó un ensayo para verificar si dicha concentración era también aplicable para nuestra investigación.

Con respecto a la concentración de Cloruro de Magnesio, ésta se determinó mediante una curva de Magnesio con el par de oligonucleótidos iniciadores *D1Mit17*. Se efectuó la amplificación por PCR de una muestra de ADN de rata *Sprague-Dawley*, con las siguientes variaciones en cuanto a la concentración de Cloruro de Magnesio: 0 mM, 1,5mM, 2,0 mM, 2,5 mM y 3 mM.

En cuanto a la determinación de las concentraciones óptimas de los oligonucleótidos iniciadores, se utilizó una concentración de 0,5 μ M, ya que ésta resultó

ser la más eficiente para la amplificación de microsatélites en la colonia de ratas en estudio.

Con respecto a la temperatura óptima de alineación, se emplearon las temperaturas descritas por el proveedor para cada par de oligonucleótidos iniciadores.

El programa empleado para la optimización de la técnica de PCR, con el uso de marcadores moleculares microsatélites de rata, se encuentra descrito en la página 51 de la sección de resultados.

Formación del banco de ADN genómico del núcleo de fundación de las ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley* a partir de tejido de oreja mediante digestión con Ananasa.

La extracción de ADN de la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*, se realizó a cada uno de los animales que conforman el banco genético de dicha colonia (31 ejemplares en total), que se encuentran en el área de producción del bioterio de la Universidad de Los Andes. Esta área se caracteriza por tener barreras de seguridad que exigen el cumplimiento de una serie de normas para el acceso a la instalación y al uso y manejo de los animales que allí se encuentran. Por ello, antes de entrar al área mencionada, fue necesario pasar por las diversas barreras de bioseguridad y acatar las pautas que éstas comprenden, por ejemplo: ducha a la entrada del área, uso de vestimenta especial que incluye: gorro, tapaboca, tapapies y guantes quirúrgicos. También, es importante mencionar que se tuvo el máximo cuidado al momento de manipular a los animales de la colonia, esto se hizo con la finalidad de producir el mínimo de dolor y estrés, ya que alteraciones de este tipo pueden influir en el comportamiento social y fisiológico de los individuos.

Estimación de la pureza del ADN de la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley* por espectrofotometría

Para la estimación de la pureza del ADN genómico obtenido por el método de extracción con Ananasa, se realizó la dilución de 30 µl de cada muestra de ADN en 970 µl de agua destilada (1/33). Luego se realizaron las medidas de absorbancia a 260 nm y 280 nm, en un espectrofotómetro marca JENWAY 6305 UV/Vis y se calculó la relación A_{260}/A_{280} .

La calidad (integridad) del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa; para ello se prepararon geles horizontales de agarosa al 0,9% (p/v) que contenían 1 mg/ml de bromuro de etidio. El buffer empleado para la preparación de los geles y para la corrida electroforética fue el tris-borato-EDTA (ver apéndice A), y la escalera de peso molecular utilizada fue λ DNA/*Hind* III Fragments (Invitrogen, Cat. No. 15612-013). Se tomaron 2 µl de muestra de ADN, se mezclaron con 1 µl de agua destilada estéril y 1 µl de buffer de carga. La electroforesis fue realizada a 90 Voltios durante 60 minutos y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV de 254 nm. El registro fotográfico se efectuó con una cámara digital Sony DSC-P10.

Verificación de la heterocigosis en la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*

Se realizó la amplificación de los alelos de los siete *loci* microsatélites seleccionados, utilizando el ADN genómico proveniente del banco de ADN formado. La colonia estudiada estuvo integrada por 16 parejas pertenecientes al núcleo de fundación, con un total de 31 ejemplares.

El rendimiento y el tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR, fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa. Para ello se prepararon geles horizontales de agarosa al 2,5% (p/v) contentivos de 1 mg/ml de bromuro de etidio. El buffer de elección para el gel y las cámaras fue el Tris-Borato-EDTA (ver apéndice A). La escalera de peso molecular utilizada fue Φ X174 RF DNA/*Hae* III fragments (Life

Technologies, Cat. 15611-015). De cada tubo de reacción se tomaron 12 µl y se mezclaron con 1,5 µl de buffer de carga. Las muestras fueron corridas a 110 V durante 60 minutos y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV de 254 nm. El registro fotográfico se efectuó con una cámara digital Sony DSC-P10.

La longitud de los productos amplificados fue determinada calculando los rf de cada una de las bandas obtenidas por microsatélite analizado

Análisis estadístico

La información sobre la diversidad genética de una población, puede obtenerse mediante la estimación de parámetros poblacionales, luego de analizar marcadores moleculares en la población. Los dos tipos más populares de marcadores usados en los últimos años para la estimación de parámetros poblacionales, son los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y los microsatélites. (Agrafioti y Stumpf, 2007). Por lo tanto, para determinar de manera más precisa el estatus genético de la colonia de ratas, se decidió realizar en el estudio la determinación de algunos parámetros poblacionales que permitieran analizar cuantitativamente los resultados obtenidos en la evaluación genética efectuada con los marcadores microsatélites.

Los datos resultantes de la amplificación de los microsatélites de la colonia de ratas *Sprague-Dawley* fueron analizados mediante el programa Popgen 32 (Yeh *et al.*, 1999), el cual se basa en el análisis genético de poblaciones, a través de la evaluación de la variación genética entre y dentro de poblaciones naturales, cuando son utilizados marcadores codominantes o dominantes. Esta versión está diseñada exclusivamente para analizar poblaciones de organismos haploides y diploides, además, realiza la mayoría de tipos de análisis aplicados en genética de poblaciones y campos relacionados. Por ejemplo, puede ser usado para calcular frecuencias alélicas, diversidad genética, distancia genética, en una población simple o en varias poblaciones.

Evaluación de parámetros fenotípicos para la colonia de ratas *Sprague-Dawley*

Para realizar el monitoreo fenotípico de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, se realizó la selección al azar de 5 hembras y 5 machos con 8 días de nacidas, cuyos progenitores formaban parte del núcleo de fundación de dicha colonia. Este análisis se enfocó, en determinar algunos parámetros tales como ganancia de peso-talla, parámetros sanguíneos y bioquímicos sanguíneos, que permiten caracterizar las colonias o líneas de roedores que se producen en los bioterios y compararlos con los reportados en las bases de datos del laboratorio *Charles Rivers Laboratory*.

En cuanto a los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos examinados, es importante mencionar que estos valores se determinaron en la etapa adulta de los individuos (13 semanas de edad).

Determinación de la ganancia de peso-talla (Curvas de crecimiento)

La medición del crecimiento reportada en talla y peso se efectuó desde los 8 días del nacimiento de las crías hasta que éstas alcanzaron la madurez sexual o adultez. Las medidas de peso y talla fueron tomadas semanalmente durante un periodo aproximado de tres meses (13 semanas), para esto, se utilizó una balanza electrónica marca Mettler de precisión 0,1 g y una regla milimetrada, los valores obtenidos se reportaron en unidades de peso (gramos: g) y longitud (centímetros: cm) respectivamente.

Determinación de parámetros hematológicos: hematocrito, hemoglobina, cuenta leucocitaria y cuenta diferencial

Entre las pruebas sanguíneas evaluadas en el monitoreo fenotípico de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, se encuentra la determinación de los valores de hematocrito. Para llevar a cabo este protocolo y todos los que se describirán a continuación, fue necesaria la obtención de una cantidad considerable de sangre de los ejemplares seleccionados. Para ello, los animales fueron sedados y sacrificados en una cámara con

exceso de éter de petróleo, para realizar la extracción de sangre mediante punción cardiaca.

Hematocrito

La sangre obtenida fue colectada en tubos de ensayo y tratada con anticoagulante EDTA. Se llenaron tubos capilares a $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad, con la sangre de los individuos en estudio, cada capilar fue sellado por uno de sus extremos y sometido a centrifugación en un micro-hematocrito (CriptSpin), durante 3 minutos a 3350 rcf. Finalmente se hizo la lectura con la ayuda de un lector de hematocrito.

Hemoglobina

Para la obtención de los niveles de hemoglobina, se adicionaron 5 ml del reactivo Cianuro de Hemoglobina (hemogloWiener *Standar*) (apéndice B), a 20 μ l de sangre tratada con anticoagulante; se mezcló por inversión y se incubó en oscuridad durante 15 minutos. Posteriormente se obtuvieron las absorbancias de las muestras a 546 nm, en un fotómetro marca Boehringer Mannheim 4010. Los valores de hemoglobina de los individuos en estudio se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$f = \frac{\text{Estándar (g/l)}}{S} \quad (1)$$

donde Estándar (g/l) es la concentración de hemoglobina correspondiente al lote de hemoglowienar Standar.

Cuenta leucocitaria (glóbulos blancos)

En cuanto a la determinación de los valores de glóbulos blancos, se realizó el siguiente procedimiento: en pipetas especiales para blanco, se tomaron 0,5 ml de sangre tratada con anticoagulante, se enrazó cada pipeta con reactivo de Turk (ver apéndice A),

hasta 1,1 ml y se agitó durante 3 minutos. El recuento de células leucocitarias fue realizado en cámaras de Neubauer, bajo microscopio de luz a 40X.

Recuento diferencial

Para realizar el recuento diferencial celular, se prepararon láminas portaobjetos con extendido de sangre (frotis) tratada con anticoagulante y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se fijó el extendido con metanol puro y se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, cada lámina fue teñida con colorante Giemsa (ver apéndice A) en proporción 1:10 durante 15 minutos y lavada con agua corriente. Finalmente, se observaron los tipos celulares (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos) en el microscopio de luz, bajo lente óptico de 100X con aceite de inmersión. Los datos fueron registrados con la ayuda del contador diferencial Microprocessor PBE-8E.

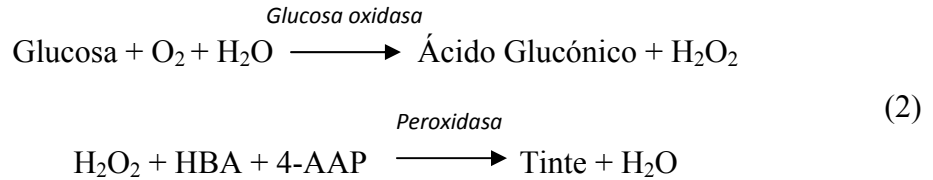
Determinación de parámetros bioquímicos sanguíneos: glucosa y transaminasas

Para realizar las pruebas de química sanguínea, fue necesaria la obtención del suero a partir de cada una de las muestras sanguíneas colectadas. Para ello, se tomaron en tubos de ensayo 3 ml de sangre, se dejó coagular y se eliminó la sangre coagulada. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos en centrifuga marca FANEM Excelsa Bady I. Modelo 206, a 1675 rcf para lograr la separación de fases y obtener finalmente el suero.

Glucosa

Para la obtención de los valores de glucosa fue utilizado el kit comercial *Qualitest*, el método utilizado en este reactivo se basa en la reacción indicadora de peróxido de hidrógeno que une 4-aminoantipirina a un compuesto fenólico como propuso inicialmente Trinder (1969). El principio de éste método se basa en la oxidación enzimática de la glucosa por la Glucosa Oxidasa, produciendo Acido Glucónico y Agua

Oxigenada (H₂O₂). El peróxido de hidrogeno reacciona en presencia de peroxidasa con ácido 4-hidroxibenzoico (HBA) y con 4-aminoantipirina (4-AAP) para dar lugar a un tinte de quinonimina rojo. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa. La reacción se describe a continuación (2):



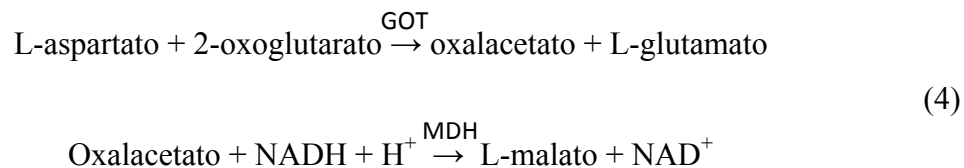
Para llevar a cabo este análisis, se realizó la reconstitución del reactivo, se agregaron 0,1 ml de enzimas y 0,1 ml de sustrato en 10 ml de solución tampón. Una vez reconstituido el reactivo, se mezclaron 2 ml del mismo con 20 µl de suero, se incubó durante 10 minutos a 37 °C en estufa y finalmente se leyó la absorbancia en fotómetro Boehringer Mannheim 4010 a una longitud de onda de 546 nm. El cálculo de resultados se efectuó mediante la siguiente fórmula (3):

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times [\text{patrón}] = \text{glucosa (mg/dl)}
 \tag{3}$$

Transaminasas (GPT y GOT)

Por otro parte, para el registro de los valores de transaminasas se utilizaron los siguientes Kits comerciales: GPT (ALT) método UV optimizado (IFCC) para la determinación de alanina aminotransferasa (GPT/ALT) (ver apéndice B) y GOT (AST) método UV optimizado (IFCC) para la determinación de aspartato aminotransferasa (GOT/AST) (ver apéndice B).

El fundamento para la determinación de GOT (AST) se basa en el siguiente esquema de reacción (4):

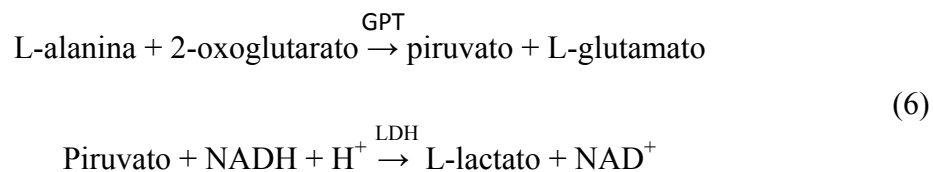


Se realizó inicialmente la reconstitución del reactivo. Para ello se mezclaron 20 ml de buffer a un frasco de sustrato. En tubos de ensayo incubados en baño de agua a 37 °C, se adicionaron 100 µl de suero a 1 ml de sustrato reconstituido, se mezcló rápidamente, luego de 1 minuto fue registrada la absorbancia inicial a 340 nm y posteriormente a los 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Los cálculos se realizaron determinando la diferencia promedio de absorbancia/minuto ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Luego, con los valores obtenidos se determinaron las GOT de cada individuo mediante la siguiente fórmula (5):

$$\text{GOT (U/l)} = \Delta A/\text{min} \times \text{factor} \quad (5)$$

donde el termino factor representa el cálculo correspondiente a la temperatura de reacción seleccionada, que para este caso fue de 37 °C, y una longitud de onda 340 nm.

De igual manera, el fundamento para la determinación de GPT (ALT), se describe en el siguiente esquema de reacción (6):



Al igual que en la experiencia anterior, se realizó la reconstitución del reactivo agregando 20 ml de buffer a un frasco de sustrato. En tubos de ensayo incubados a 37 °C en baño de agua, fue agregado 1 ml de reactivo reconstituido e inmediatamente fueron adicionados 100 µl de suero proveniente de los individuos en estudio, luego de un minuto se registró la absorbancia inicial a una longitud de onda 340 nm y posteriormente

a los 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Los cálculos se realizaron determinando la diferencia promedio de absorbancia/minuto ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Luego, con los valores obtenidos se determinaron las GPT de cada individuo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{GPT (U/l)} = \Delta A/\text{min} \times \text{factor} \quad (7)$$

donde el término factor representa el cálculo correspondiente a la temperatura de reacción seleccionada, que para este caso fue de 37 °C, y longitud de onda 340 nm.

Capítulo III. RESULTADOS

Evaluación de tres métodos de extracción de ADN a partir de tejido de oreja de rata

Los tres métodos evaluados resultaron ser efectivos para obtener ADN genómico proveniente de tejido de oreja de rata. Sin embargo, el método *HotSHOT* (Truett *et al.*, 2000) presentó inconvenientes en cuanto a los resultados obtenidos en las pruebas de calidad realizadas en geles de agarosa al 0,9% (figura 5).

En contraste con los resultados obtenidos en el tratamiento anterior, la extracción de ADN genómico basándose en la digestión con Proteinasa K (10 mg/ml) reportado en Sambrook y Russell, (2001), resultó ser muy eficiente en el objetivo planteado. Los resultados del análisis espectrofotométrico son mostrados en la tabla 4, y los resultados de la electroforesis en gel de agarosa son presentados en la figura 6.

Resultados similares fueron obtenidos con el tratamiento de extracción de ADN genómico empleando la enzima Ananasa. Este método permitió obtener ADN con la pureza (tabla 4) e integridad deseada para la investigación (figura 7).

Los valores del cociente A_{260}/A_{280} obtenidos para los tres métodos de extracción son comparados en la tabla 4. Aquí se pueden apreciar diferencias significativas en las medidas espectrofotométricas entre estas tres técnicas de extracción de ADN genómico. Para el método *HotSHOT*, los valores de pureza obtenidos son considerablemente bajos, mientras que se obtuvo el ADN más puro con el método de la ananasa.

Tabla 4. Análisis de pureza realizado a muestras de ADN de ratas *Sprague-Dawley* obtenidas por los métodos *HotSHOT* (Truett *et al.*, 2000); digestión con proteinasa K (Sambrook y Russell, 2001) y digestión con la enzima ananasa (comunicación personal Prof. Néstor González).

Ejemplar	<i>HotSHOT</i>	Proteinasa K	Ananasa
	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
P1B1♂	1,22	1,33	1,54
P1B1♀	1,28	1,39	1,57
P2B1♂	1,33	1,40	1,63
P2B1♀	1,24	1,57	1,68
P3B1♂	1,32	1,39	1,32
P3B1♀	1,29	1,64	1,53
P1B2♂	1,26	1,37	1,57
P1B2♀	1,16	1,31	1,63
P2B2♂	1,1	1,45	1,70
P2B2♀	1,17	1,40	1,63

La visualización del ADN mediante las electroforesis en geles de agarosa al 0,9% se presentan en las figuras 5, 6 y 7, en éstas se pueden observar las diferencias entre las tres técnicas de extracción.

En la figura 5 correspondiente al método de extracción de ADN *HotSHOT*, las muestras de ADN no migraron en el transcurso de la corrida electroforética. Mientras que la escalera de peso molecular (carril 1), migró perfectamente y tuvo buen despliegue en la electroforesis. Para mejorar este resultado, se hicieron diluciones del ADN y se dejaron correr las muestras por mucho más tiempo y con un voltaje menor, pero estas modificaciones no mostraron mejoramiento o variación en los resultados.

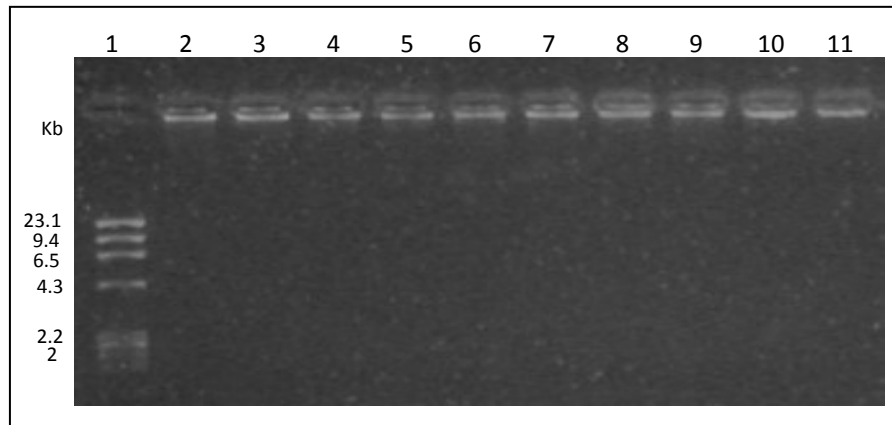


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (90 voltios/1 h) para muestras de ADN genómico obtenidas por el método *HotSHOT* (Truett *et al.*, 2000). **Carril 1:** marcador λ DNA/*Hind* III Fragments. **Carriles 2 al 11:** ADN de ratas *Sprague-Dawley*.

La figura 6, presenta la electroforesis en gel de agarosa al 0,9% del ADN obtenido mediante el método descrito en Sambrook y Russell (2001), en donde fue posible la obtención de ADN de buena calidad, ya que se observa una banda integra de aproximadamente, 23 Kb.

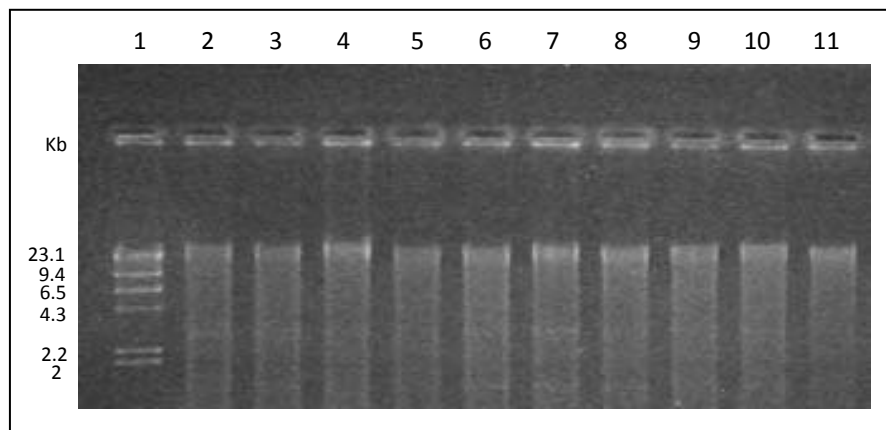


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (90 voltios/1 h) para muestras de ADN genómico obtenidas por el método de extracción con proteinasa K (Sambrook y Russell, 2001). **Carril 1:** marcador λ DNA/*Hind* III Fragments. **Carriles 2 al 11:** ADN de ratas *Sprague-Dawley*.

Un resultado muy similar al anterior fue obtenido con el método de extracción de ADN empleando ananasa (figura 7). Las bandas se observan con bastante nitidez, lo que sugiere que esta técnica resulta ser muy eficaz para la obtención de ADN genómico de calidad, a partir de tejido de oreja de rata.

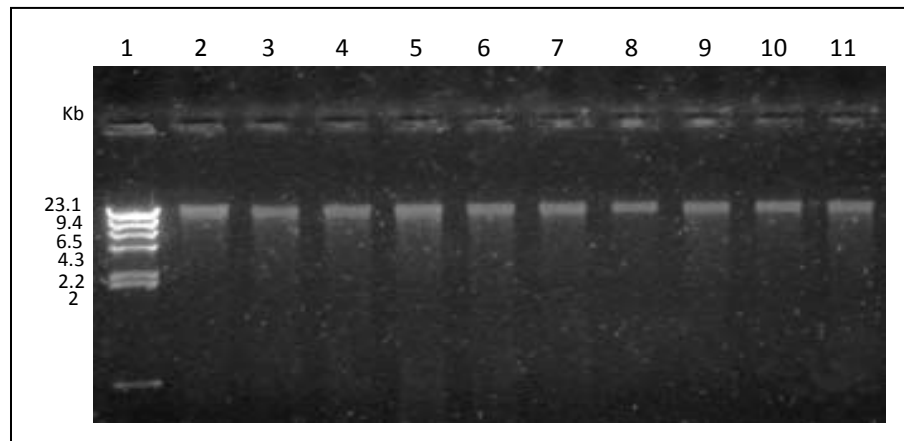


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (90 voltios, 1 h) para muestras de ADN genómico obtenidas por el método empleando la enzima Ananasa (comunicación personal. Prof. Néstor González). **Carril 1:** marcador λ DNA/*Hind* III Fragments. **Carriles 2 al 11:** ADN de ratas *Sprague-Dawley*.

Formación del banco de ADN de la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*

Se realizó la extracción de ADN a partir de tejido de oreja de rata, para cada uno de los ejemplares que conforman el núcleo de fundación de la colonia. Dicha extracción se realizó mediante la técnica de extracción con la enzima ananasa. Éste método se seleccionó debido a que no se observó degradación del ADN, se visualizó además una hebra nítida y los reactivos para el desarrollo del mismo son relativamente económicos y de fácil adquisición. El banco de ADN se conserva en el bioterio de la Universidad de los Andes, bajo condiciones adecuadas en nevera a -20 °C, ya que es de importancia contar con este tipo de material biológico para llevar un registro completo de la colonia

y poder realizar en el futuro comparaciones con los animales que suplantarán a estos progenitores monitoreados en este estudio.

Optimización de la técnica de PCR para la amplificación de los microsatélites: *DIMit17*, *D10Mit10*, *R-12*, *R-43*, *R-99*, *R-119* y *R-145*, en la colonia de ratas *Sprague-Dawley*

La concentración adecuada de Cloruro de Magnesio, fue determinada mediante la realización de un PCR ensayando diferentes concentraciones de $MgCl_2$ con los oligonucleótidos iniciadores *DIMit17*. El resultado del ensayo de amplificación de ADN de rata *Sprague-Dawley* se presenta en la siguiente figura.

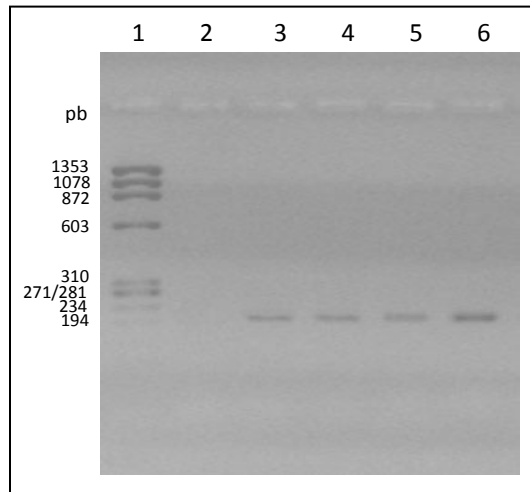


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 2,5%, para productos amplificados por PCR con cebadores *DIMit17* y diferentes concentraciones de $MgCl_2$. **Carril 1:** escalera $\Phi X 174$ *Hae* III; **Carril 2:** 0,0 mM de $MgCl_2$. **Carril 3:** 3 mM de $MgCl_2$. **Carril 4:** 2,5 mM de $MgCl_2$. **Carril 5:** 2 mM de $MgCl_2$. **Carril 6:** 1,5 mM de $MgCl_2$.

En esta figura, se puede apreciar que el producto amplificado con una concentración de $MgCl_2$ de 1,5 mM, presentó mayor intensidad con respecto a las

muestras que contenían menor concentración del reactivo, aunque éstas también rindieron productos de amplificación.

En el capítulo anterior, se explicaron con detalle cuáles fueron los criterios para estandarizar las condiciones de PCR en esta investigación. Por ello, las condiciones y el programa utilizado para la amplificación de cada uno de los microsátélites evaluados, se encuentran resumidas en las tablas 6 y 7 que se presentan a continuación. Estos resultados se incluirán en el protocolo propuesto para el monitoreo genético de las colonias de ratas, que se producen en el bioterio de la Universidad de los Andes.

Tabla 5. Concentraciones y volúmenes de reactivos de mezcla de reacción para la PCR, empleados para la amplificación de *loci* microsátélites de ratas *Sprague-Dawley*. *Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen. Cat. N° 10966-020).

Buffer (10X)	5 µl
dNTP's (250 µM)	1 µl
Oligo. Iniciad. (0,5 µM)	
Forward	1 µl
Reverse	1 µl
MgCl ₂ (1,5 mM)	3 µl
*Taq DNA polimerasa (1,5 U/µl)	0,3 µl
ADN (100 ng)	2 µl
Agua dest. estéril 18,6 MΩ	37,7 µl

El programa de los ciclos de incubación presentó variaciones en cuanto a las temperaturas de alineación de los cebadores. Sin embargo, los ciclos de desnaturalización, elongación y extensión final se mantuvieron constantes entre los distintos oligonucleótidos iniciadores. El programa general se muestra a continuación.

Tabla 6. Programa de ciclos de incubación de PCR, empleado para la amplificación de *loci* microsatélites de ratas *Sprague-Dawley*.

<u>1 ciclo</u>
95 °C por 4 minutos
<u>35 ciclos</u>
95 °C por 45 segundos
47 °C - 55 °C por 45 segundos
72 °C por 30 segundos
<u>1 ciclo</u>
72 °C por 4 minutos

Las temperaturas de alineación empleadas para cada uno de los cebadores fueron las siguientes: 50,3 °C para *DIMit17*; 47,5 °C para *D10Mit10*; 54,4 °C para *R-12* y *R-99*; 49,7 °C para *R-43* y por último, 52,3 °C para *R-119* y *R-145*.

Verificación de la heterocigosis en la colonia de ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*

La identificación de los alelos para cada uno de los siete *loci* microsatélites analizados, se realizó con la finalidad de evaluar la condición de heterocigosis de los 31 ejemplares que conforman el núcleo de fundación de dicha colonia. A continuación se muestran los productos de amplificación para los microsatélites *DIMit17* y *D10Mit10* (figuras 9 y 10).

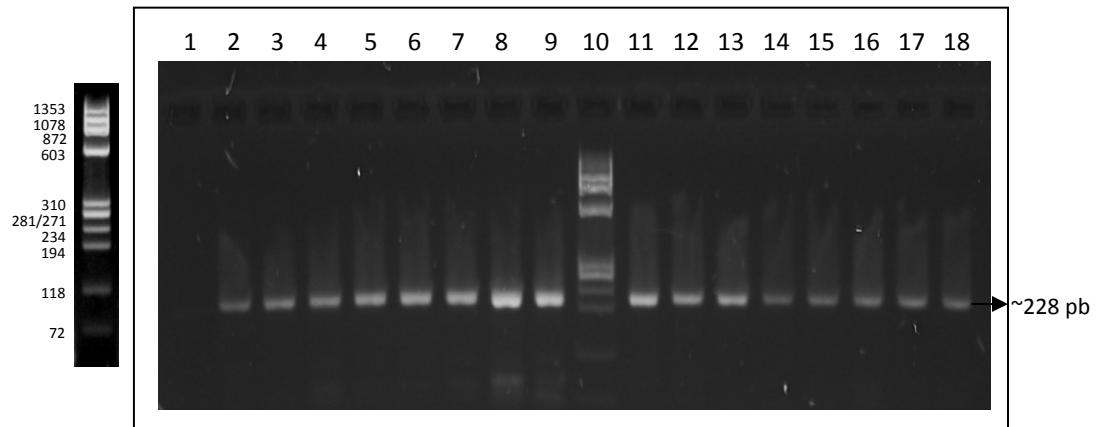


Figura 9. Productos amplificados en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas *Sprague-Dawley*. **Carril 1:** control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 2 al 9 y 11 al 18:** productos de amplificación de microsatélite *DIMit17*, para los ADN en estudio. **Carril 10:** marcador Φ X 174 *Hae* III.

En ambas figuras, se puede apreciar una condición homoalélica por la presencia de una única banda para todos los productos amplificados, correspondientes a cada uno de los ejemplares que conforman la colonia en estudio.

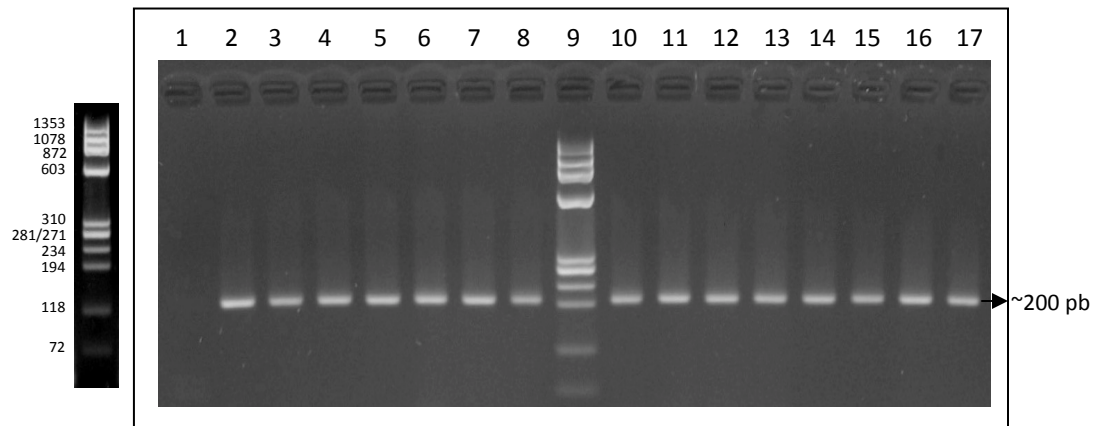


Figura 10. Productos amplificados en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas *Sprague-Dawley*. **Carril 1:** control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 2 al 8 y 10 al 17:** productos de amplificación de microsatélite *DIOMit10*, para los ADN en estudio. **Carril 10:** marcador Φ X 174 *Hae* III.

Es importante mencionar que los productos de amplificación presentados en cada uno de los *loci*, corresponden a una muestra del total de animales monitoreados.

Las longitudes de las bandas obtenidas para el *loci DIMit17* fueron de ~228 pb, el cual es un valor muy próximo a la longitud reportada para este microsatélite (213 pb). Para el microsatélite *DIOMit10*, las longitudes de los fragmentos amplificados fueron de ~200pb, acercándose considerablemente al valor reportado de 203 pb.

Las figuras 11 y 12 presentadas a continuación, pertenecen a los productos de amplificación por PCR de los microsatélites *R-12* y *R-43* respectivamente. En la figura 10, se aprecia una condición homoalélica para cada una de las bandas, cuyas longitudes corresponden ~151 pb, mientras que la longitud reportada para dicho *loci* es de 135 pb. la muestra contenida en el carril 18 (no se muestra en la figura), no generó producto de amplificación.

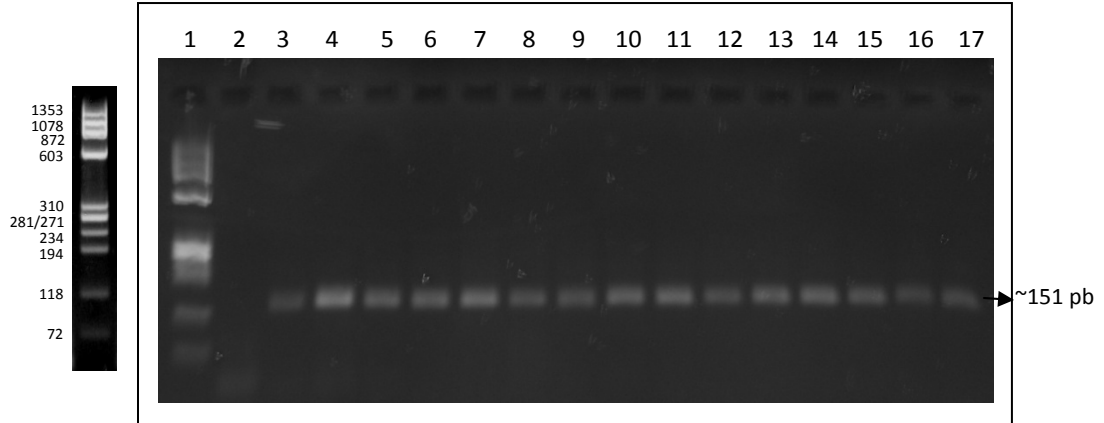


Figura 11. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas *Sprague-Dawley*. **Carril 1:** marcador Φ X 174 *Hae* III. **Carril 2:** control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 3 al 17:** productos de amplificación de microsatélite *R-12* para los ADN en estudio.

En la figura 12, se observan los productos de PCR para el microsatélite *R-43*. Para la mayoría de los individuos se presenta una condición homoalélica y algunos tienen una condición bi-alélica (muestras en los carriles 6 y 13). Además, algunos amplificados presentan polimorfismo, tal es el caso de las bandas visualizadas en los carriles 14 y 15, en donde la banda en el carril 14 tiene una cantidad en pares de bases de ~148, y la banda en el carril 15 de ~178 pb. Este resultado evidencia que existen diferencias polimórficas entre algunos de los *loci* microsatélites evaluados, la cual viene determinada por la diferencia en pares de bases de las regiones microsatélites amplificadas.

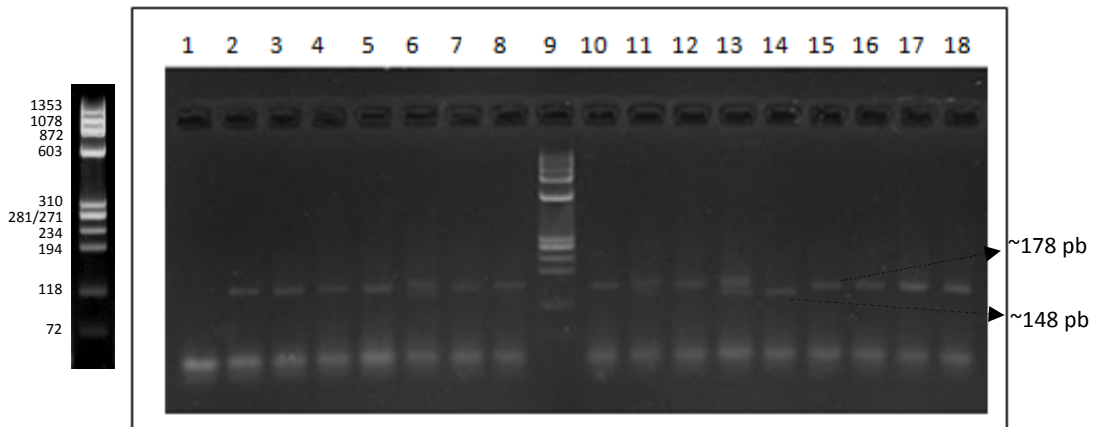


Figura 12. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas *Sprague-Dawley*. **Carril 1:** control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 2 al 8 y 10 al 18:** productos de amplificación de microsatélite *R-43*, para los ADN en estudio. **Carril 10:** marcador Φ X 174 *Hae* III.

Los productos de amplificación para el microsatélite *R-99*, presentados en la figura 13, muestran una situación similar con la reportada anteriormente. Existen amplificados de varias muestras de ADN, que presentan la condición bi-alélica esperada para la colonia de ratas en evaluación, así como también, se evidencia una condición homoalélica para otras muestras, en donde la longitud de algunas de las bandas varían con respecto a otras. También puede apreciarse, la aparición de dímeros de

oligonucleótidos iniciadores que pudieron interferir con la efectividad y el rendimiento de la técnica de PCR. Sin embargo, fue posible la amplificación. La longitud de las bandas obtenidas corresponden a ~91 pb y 109 pb mientras que la longitud de la banda reportada es de 128 pb.

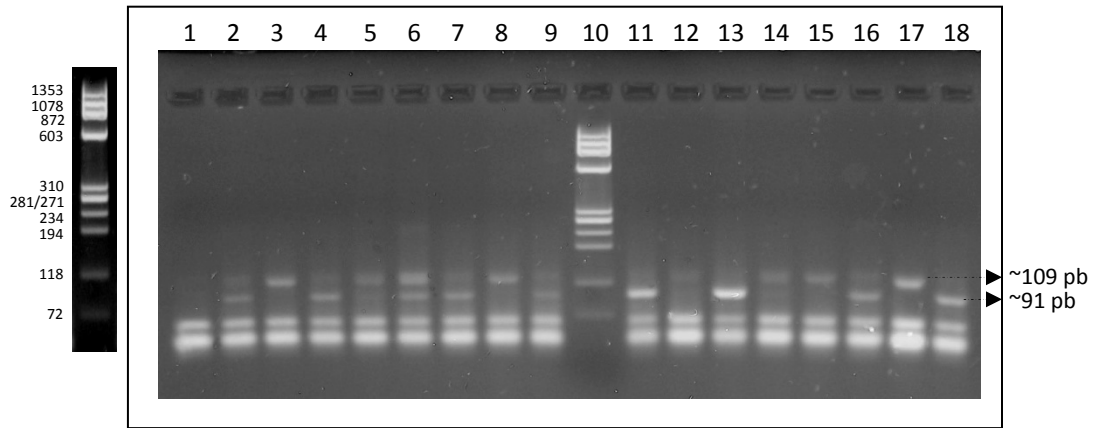


Figura 13. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas *Sprague-Dawley*. **Carril 1:** control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 2 al 9 y 11 al 18:** productos de amplificación de microsatélite *R-99*, para los ADN en estudio. **Carril 10:** marcador Φ X 174 *Hae* III.

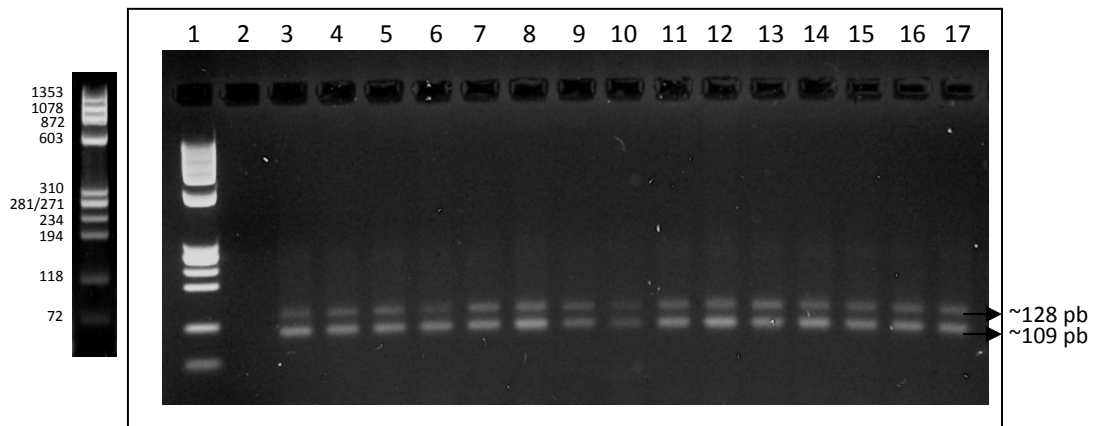


Figura 14. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas *Sprague-Dawley*. **Carril 1:** marcador Φ X 174 *Hae* III. **Carril 2:** control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 3 al 17:** productos de amplificación de microsatélite *R-119*, para los ADN en estudio.

Cada uno de los productos amplificados correspondientes al microsatélite *R-119* (figura 14), presentaron una condición bi-alélica, y las longitudes de los fragmentos amplificados fueron de ~109 pb y ~128 pb.

Contrario a esto, en el *loci R-145* (figura 15), se puede apreciar una condición homoalélica para todos los individuos del núcleo de fundación de la colonia. La longitud de la banda reportada para el microsatélite *R-145* es de 125 pb, mientras que las longitudes de los amplificados fueron de ~126 pb.

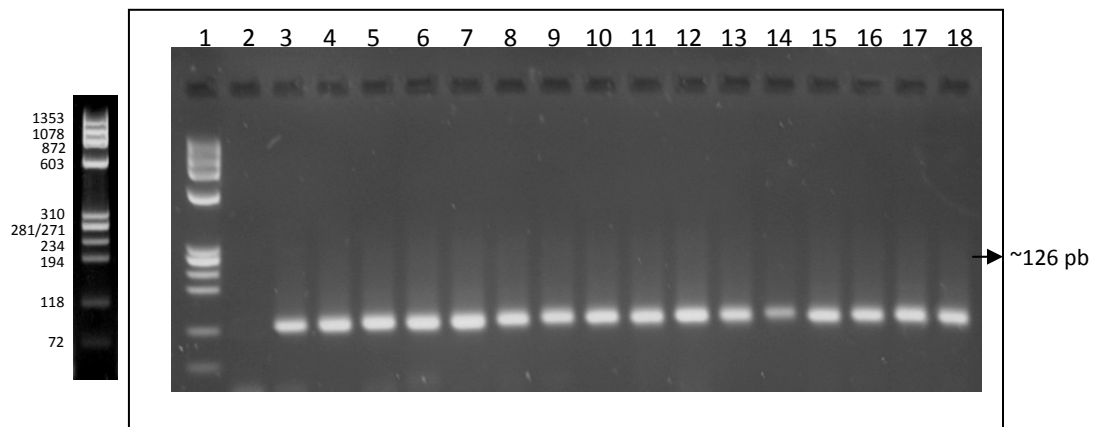


Figura 15. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5%, para la colonia de ratas *Sprague-Dawley*. **Carril 1:** marcador Φ X 174 *Hae* III. **Carril 2:** control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 3 al 18:** productos de amplificación de microsatélite *R-145*, para los ADN en estudio.

Análisis estadístico

Los resultados del análisis estadístico realizado con el programa PogGen 32, se presentan a continuación. La tabla 7 muestra las frecuencias alélicas de cada uno de los *loci* analizados. Las frecuencias alélicas para el microsatélite *R-119*, demuestran que dicho locus posee la proporción máxima de heterocigotos, es decir, 0,5; mientras que para *R-99* y *R-143*, se observa la tendencia a la fijación de un alelo, ya que la frecuencia de un alelo es muy alta con respecto a la frecuencia del otro, por ejemplo, para *R-43* la

frecuencia del alelo A es de 0,883 (aproximándose a 1), mientras que la frecuencia del alelo B es de 0,116 (acercándose a 0). Para *D1Mit17*, *D10Mit10*, *R-12* y *R-145*, las frecuencias son iguales a 1 debido a la existencia de un alelo único.

Tabla 7: Frecuencias alélicas de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, para los diferentes *loci* microsatélites evaluados.

Alelo	Locus						
	<i>D1Mit17</i>	<i>D10Mit10</i>	<i>R-12</i>	<i>R-43</i>	<i>R-99</i>	<i>R-119</i>	<i>R-145</i>
A	1.000	1.000	1.000	0.883	0.725	0.500	1.000
B	-	-	-	0.116	0.274	0.500	-

Estos resultados permitieron estimar el porcentaje de *loci* polimórficos y monomórficos, con respecto al total de microsatélites analizados. El porcentaje de *loci* polimórficos para los microsatélites *R-43*, *R-99*, *R-119* fue de 42.86%, mientras que un porcentaje de 57,14%, está representado por *loci* monomórficos para los microsatélites *D1Mit17*, *D10Mit10*, *R-12*, *R-145*.

A continuación, se presentan en la tabla 8 los estadísticos de la variación génica (cantidad de alelos) de la población de ratas *Sprague-Dawley*, para todos los *loci* microsatélites analizados. Se observa que el tamaño de la muestra para los *loci* *R-12* y *R-43* fue de 60, mientras que para el resto de los *loci* fue de 62. Esto se debe a que en ambos locus no se presentó producto de amplificación para una de las muestras de ADN (como se mencionó anteriormente). Por lo tanto, no se reportan los alelos correspondientes a dichos locus en el análisis.

Tabla 8. Variaciones génicas para todos los *loci* de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*. *na = número de alelos observados. *ne = número de alelos efectivos (kimura y Crow. 1964). *I = Índice de información de Shannon's (Lewontin y Krakauer, 1973).

Locus	Tamaño Muestra	na*	ne*	I*
D1Mit17	62	1.000	1.000	0.000
D10Mit10	62	1.000	1.000	0.000
R-12	60	1.000	1.000	0.000
R-43	60	2.000	1.259	0.360
R-99	62	2.000	1.661	0.587
R-119	62	2.000	2.000	0.693
R-145	62	1.000	1.000	0.000
Promedio	62	1.428	1.274	0.234
Desv. Est.	62	0.534	0.403	0.308

El promedio del número de alelos por locus para toda la colonia fue de $1,428 \pm 0,534$ y el promedio del número de alelos efectivos fue de $1,274 \pm 0,403$. El valor (na) indica el número de alelos observados para la colonia, mientras que el (ne) mide la frecuencia de aparición o la efectividad de estos alelos.

El índice de información de Shanno's, representa una medida de diversidad genética y la encontrada para nuestra colonia con respecto a los microsatélites estudiados fue de $0,234 \pm 0,308$, indicando una diversidad muy baja.

Heterocigosis para todos los *loci*

La diversidad genética de una población es comúnmente medida calculando el promedio de heterocigotos por locus. (Nei y Roychoudhury, 1973). El método propuesto por Nei. (1973), es aplicable a cualquier población sin considerar el número de alelos por locus, el patrón de fuerzas evolutivas tales como la mutación, selección y migración

y el método reproductivo del organismo usado. La estimación de las heterocigosis esperadas mediante Levene (1949) y Nei (1973) es realizada asumiendo apareamiento al azar. Ambas medidas estiman la proporción de heterocigotos esperados en una población.

Tabla 9. Proporciones de heterocigosis para la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, calculadas mediante el programa de análisis genético de poblaciones PopGen 32. ^ΔHeterocigosis esperada (Levene, 1949)
*Heterocigosis esperada (Nei, 1973).

Locus	Tamaño muestra	Homo. Obs.	Heter. Obs.	Homo ^ΔEsp.	Heter. ^ΔEsp.	Hete. Esper. Nei*
D10mit10	62	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000
D1Mit17	62	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000
R-12	60	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000
R-43	60	0.833	0.166	0.790	0.209	0.206
R-99	62	0.709	0.290	0.595	0.404	0.398
R-119	62	0.000	1.000	0.491	0.508	0.500
R-145	62	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000
Promedio	61	0.791	0.208	0.839	0.160	0.157
Desv. Est.		0.367	0.367	0.218	0.218	0.214

La proporción de homocigotos y heterocigotos observados para nuestra colonia de ratas fue de $0,791 \pm 0,367$ y $0,208 \pm 0,376$ respectivamente. Estos valores indican que la proporción de heterocigotos se encuentra notablemente disminuida.

Las proporciones de homocigotos y heterocigotos esperados (Levene, 1949), son una función de los *loci* polimórficos, del número de alelos por locus polimórficos y de las frecuencias alélicas bajo el supuesto de apareamiento netamente al azar. Las proporciones obtenidas para estos dos parámetros fueron: $0,839 \pm 0,218$ para la homocigosis esperada y $0,160 \pm$ para la heterocigosis esperada. Es importante mencionar que los números esperados deben ser muy similares a los números observados (aunque

la prueba no específica que factor es determinante de la concordancia), ya que los números esperados se calculan de las frecuencias génicas determinadas por las cifras observadas, y como podemos ver no existen mayores diferencias entre ellas.

El coeficiente de diversidad de Nei (1973) para todos los *loci* estudiados en la colonia de ratas fue de $0,157 \pm 0,214$. Este índice representa la probabilidad de que dos alelos de un mismo locus (elegidos al azar), sean diferentes uno del otro. Este resultado indica que la heterocigosis de la colonia se encuentra en niveles muy bajos.

Evaluación de parámetros fenotípicos para las ratas *Sprague-Dawley*

Crecimiento (ganancia peso-talla)

El crecimiento de la colonia *Sprague-Dawley* fue registrado como una medida de talla y de peso adquirida por los ejemplares seleccionados a partir de los ocho días de nacidos.

El seguimiento de este parámetro a los animales producidos en los bioterios, sirve de complemento al monitoreo genético, ya que los cambios ocurridos en el genoma de los individuos pueden verse reflejados a nivel fenotípico.

A continuación se muestran las gráficas del crecimiento en peso (figura 16) y longitud (figura 17) registrado para la colonia en estudio para ambos sexos.

En la figura 16 se puede apreciar que la ganancia en talla de la colonia, aumenta a medida que transcurren las semanas a partir de su nacimiento y que dicho crecimiento se detiene a partir de la semana 11 y cesa por completo en la semana 13. También puede notarse que la ganancia de talla en los machos y hembras tiene el mismo comportamiento, pero este crecimiento es menor en las hembras con respecto a los machos.

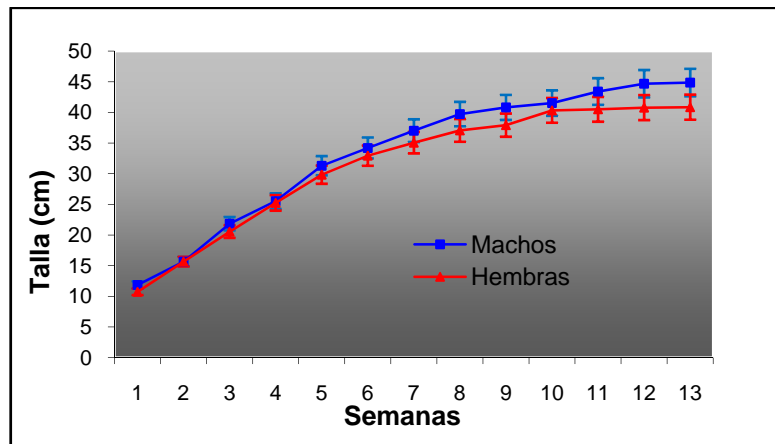


Figura 16. Curva de crecimiento en longitud de machos y hembras de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*

La figura 17 muestra el crecimiento de los animales relacionado a la ganancia en peso, desde su nacimiento hasta la etapa adulta. Aquí se puede observar que los machos presentan una ganancia de peso mayor con respecto a las hembras que conforman dicha colonia.

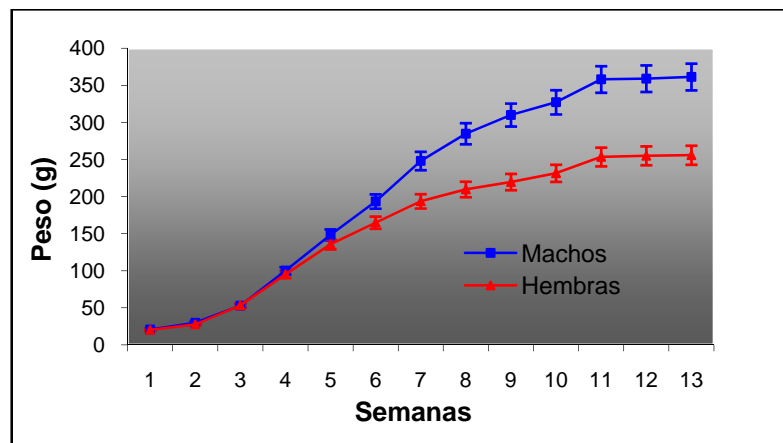


Figura 17. Curva de crecimiento de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, de acuerdo al peso de machos y hembras del núcleo de fundación.

Los machos son mucho más robustos que las hembras, las cuales no sobrepasan los 260 g en ninguna etapa de su crecimiento, mientras que los machos superan fácilmente los 250 g a partir de la semana 7 y alcanzan más de 350 g en la etapa adulta.

Determinación de parámetros hematológicos

A continuación, se presentan en la tabla 10, los valores hematológicos correspondientes a: hematocrito, hemoglobina, conteo de leucocitos (glóbulos blancos), y recuento diferencial (neutrófilos, linfocitos y eosinófilos), realizado a las ratas *Sprague-Dawley*, a los dos meses del nacimiento.

Al analizar la tabla se puede observar que los valores de hematocrito, hemoglobina, y linfocitos, son muy similares entre los machos y las hembras de la colonia. Mientras que los valores de glóbulos blancos y neutrófilos difieren entre ambos géneros.

Tabla 10. Evaluación hematológica realizada a la colonia de ratas *Sprague-Dawley*.

Valores hematológicos	♂ (n=5)	♀ (n=5)
Hematocrito (Vol. %)	43	43,6
Hemoglobina (g/dl)	15,14	15,37
Glóbulos blancos (x100mm ³)	6133,3	4950
Seg. Neutrofilos (%)	6,66	4,33
Linfocitos (%)	93,3	95,6
Eosinofilos (%)	-	-

Determinación de parámetros bioquímicos (glucosa y transaminasas)

La tabla 11 presenta los valores obtenidos en los análisis bioquímicos correspondientes a glucosa y transaminasas (GPT y GOT), realizados a las ratas *Sprague-Dawley*, mediante kit enzimáticos comerciales. Se puede apreciar que los valores de glucosa y transaminasas difieren un poco entre los machos y hembras de la colonia.

Tabla 11. Evaluación fenotípica de la colonia *Sprague-Dawley*, mediante el análisis de parámetros bioquímicos.

Valores bioquímicos		♂ (n=5)	♀ (n=5)
Glucosa (mg/dl)		150	135,5
Transaminasas (U/l)	GPT	53,7	43,10
	GOT	41,6	30,10

Capítulo IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Cuando se experimenta con animales de laboratorio es necesario que los investigadores tengan conocimiento de las características fisiológicas y genéticas de éstos, con la finalidad de que puedan interpretar correctamente los resultados que se obtienen en las distintas experiencias, que puedan extrapolar tales resultados a otras especies incluyendo el hombre, y que a la vez, los resultados sean reproducibles y tengan validez científica.

En el bioterio de la Universidad de Los Andes se producen diferentes especies y líneas de animales usados como modelos experimentales tanto en la investigación intrauniversitaria como extrauniversitaria, regional como nacional, entre estas especies se encuentra la colonia de ratas *Sprague Dawley*.

Dentro de las metas que tiene el bioterio se encuentra la caracterización de las colonias y líneas que se producen en él, es por esto que la caracterización de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, tanto genética como fenotípica se plantea como el objetivo general del presente estudio.

La colonia de ratas *Sprague-Dawley* que se produce en el bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), llegó al país procedente del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) de la Habana-Cuba, a donde había llegado procedente de Hannover-Alemania. Esta colonia se encuentra en el bioterio desde el año 1995, lo que implica que se ha mantenido como una colonia cerrada durante 26 generaciones de reproducción. Es importante entonces, caracterizar la condición genética y fenotípica de estas ratas que se producen en BIOULA ya que hasta los momentos nunca se ha realizado ningún estudio que permita caracterizarlas, para conocer su condición genética y determinar si la misma puede ser considerada una colonia de animales heterocigotos, como es denominada por los distintos laboratorios internacionales en los cuales se producen, o la misma puede haber sufrido el

efectocuello de botella, llegando a la fijación de caracteres en estado homocigoto y por tanto perdiendo su heterocigosis en una alta proporción de sus alelos.

Para realizar la evaluación genética se planteó el análisis de microsatélites a través de la PCR, éste es un análisis que proporciona una valiosa herramienta para la identificación y análisis de la pérdida de autenticidad genética o para evidenciar heterocigosis en los animales de laboratorio de una colonia de fundación de animales consanguíneos (Montagutelli *et al.*, 1991). Mediante esta clase de análisis, De Jesús (2006), realizó la caracterización genética de ratones de laboratorio consanguíneos producidos en diferentes bioterios de Venezuela verificando de esta forma la homocigosidad de estos animales.

Para el desarrollo de la técnica de PCR, es necesario contar con un ADN óptimo para garantizar la amplificación de los microsatélites. Por esta razón, el primer paso para el desarrollo de este estudio fue disponer con muestras de ADN con calidad que permitan su análisis mediante métodos de biología molecular (De Jesús *et al.*, 2005).

Para esto, se evaluaron tres métodos de extracción de ADN de tejido de oreja de rata, con la finalidad de estandarizar un método que permitiera obtener un ADN con la calidad y la pureza requerida para amplificar secuencias de ADN mediante la técnica de PCR; teniendo en cuenta que dicho método pudiese desarrollarse de manera económica, en un tiempo relativamente corto y que no implicara el sacrificio del animal, primero porque los animales a caracterizar eran los del núcleo de fundación de la colonia y además para cumplir con la ética en cuanto al uso de animales de laboratorio en la investigación.

Cuando se determinó el grado de pureza de las muestras de ADN, mediante el cálculo del cociente A_{260}/A_{280} , (el ADN se mide a 260 nm y las proteínas a 280 nm), se pudo inferir una probable concentración de proteínas en las muestras, ya que estos

valores se encontraban por debajo de 1.8, y absorbancias menores a esta, indican que la preparación de ADN no está libre de impurezas.

Sin embargo, al realizar las electroforesis en geles de agarosa al 0,9% (figuras 4, 5 y 6), para comprobar la integridad del ADN, se encontró que el ADN obtenido por el método *HotSHOT*, no presentó desplazamiento a través del gel, probablemente por la gran cantidad de proteínas que tienen estas muestras por no ser desproteinizadas, estando este resultado de acuerdo a lo propuesto en trabajos de De Jesús *et al.*, (2005) y De Jesús (2006).

Contrario a este resultado, las muestras de ADN obtenidas por los otros dos métodos restantes, sí presentaron un buen desplazamiento a través del gel mostrando una hebra con una cantidad en pares de bases en relación al marcador molecular de aproximadamente 23.000 pb. Estos resultados pueden ser atribuidos a que en estos dos métodos se emplean proteasas y detergentes que conducen a la desnaturalización de las proteínas y además involucran la obtención de los ácidos nucleicos por la extracción de fases con solventes orgánicos, tales como etanol y/o isopropanol.

La evaluación de las muestras de ADN realizada a través de espectrofotometría y electroforésis, permitió visualizar la integridad del ADN y la pureza del mismo; lo que condujo a seleccionar el método para la formación del banco de ADN de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, que empleara la menor cantidad de tiempo y dinero en su desarrollo y permitiera obtener un ADN con integridad, por ello se seleccionó el método de extracción con la enzima ananasa, ya que es un método relativamente sencillo, requiere menos tiempo, es mucho más económico (debido al reemplazo de la proteinasa K por la enzima ananasa) y las muestras se conservan durante meses en la nevera a 4 °C. Además, este es un método de innovación, ya que está siendo utilizado por vez primera para la obtención de ADN a partir de tejido animal, gracias a la comprobación de su efectividad en esta investigación y en otras investigaciones que se encuentran actualmente en desarrollo en el bioterio de la Universidad de Los Andes.

Una vez seleccionado el método de extracción del ADN de tejido de ratón, se realizó la optimización de las condiciones para efectuar la amplificación de secuencias

de ADN mediante la técnica de PCR, ésta constituye una etapa necesaria para todo análisis genético que implique la utilización de marcadores moleculares de ADN. En relación a la determinación de la cantidad de ADN utilizada para la amplificación de los *loci* microsatélites de rata, se acordó trabajar con una concentración de ADN de 100 ng/ul, como reportan Serikawa *et al.*, (1992) y Benavides *et al.*, (2000).

La especificidad de la PCR también depende de la estabilidad del complejo de hibridación, la cual está dada por: la temperatura de alineación de los oligonucleótidos iniciadores y de la concentración de los reactivos en la mezcla de reacción (cloruro de magnesio y oligonucleótidos iniciadores) (Larzul, 1990). En relación a la optimización de la concentración de cloruro de magnesio, se determinó la concentración óptima de 1,5 mM, mediante la realización de una curva de MgCl₂ empleando el microsatélite *DIMit17* (figura 8), dicha concentración también resultó ser la óptima para los seis microsatélites restantes evaluados en este trabajo y es la utilizada en los trabajos de Serikawa *et al.*, (1992); Benavides *et al.*, (2000); Deschepper *et al.*, (1997) y Kiran *et al.*, (2007).

La determinación de la concentración de MgCl₂, es un paso muy importante, ya que determina la productividad del proceso de amplificación. Por ejemplo, concentraciones muy altas evitan la desnaturalización de la doble hélice, estabilizan alineamientos incorrectos de los oligonucleótidos iniciadores al templado generando bandas inespecíficas que no corresponden con los productos de amplificación esperados. Por otra parte, concentraciones muy bajas de MgCl₂, perjudican las reacciones de elongación, debido a que este compuesto es empleado como cofactor para la actividad enzimática de la ADN Taq polimerasa (Gibbs, 1990).

En cuanto a la concentración de oligonucleótidos iniciadores utilizada en este trabajo, se utilizó la concentración de 0,5 µM para un volumen final de reacción de 50 µl. Sin embargo, en otros estudios del genoma de roedores, (Benavides *et al.*, 1998; 2000), se reporta el empleo de diferentes concentraciones de estos oligonucleótidos.

Un exceso de oligonucleótidos iniciadores puede traer desventajas, ya que puede conducir a la formación de estructuras denominadas dímeros, las cuales disminuyen el rendimiento de la amplificación por PCR. Dichas estructuras pueden formarse cuando los extremos 3' de los oligonucleótidos iniciadores son complementarios o cuando la temperatura de alineación de los mismos es tan baja, como para permitir su hibridación al templado de ADN (McCusker *et al.*, 1992). En la figura 12 se puede observar la formación de estos dímeros a pesar de la estandarización realizada, sin embargo, la presencia de los mismos no afectó el resultado de la amplificación realizada.

En cuanto a las temperaturas de alineación de los oligonucleótidos iniciadores empleadas para la amplificación de los siete *loci* microsatélites, fueron las reportadas por la casa de síntesis de los mismos. Temperaturas inadecuadas de hibridización de los oligonucleótidos iniciadores a la cadena molde de ADN, pueden conducir a la formación de bandas inespecíficas en la amplificación y a la formación de los dímeros de oligonucleótidos iniciadores mencionados anteriormente. De acuerdo a los resultados obtenidos en la experiencia realizada, se pudo observar que las temperaturas de alineación utilizadas fueron las adecuadas, pues no se observaron productos de amplificación inespecíficos.

Con los resultados obtenidos a partir de la estimación genética realizada a la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, a través del análisis de los siete *loci* microsatélites mediante la técnica de PCR, se demostró que la evaluación de estos marcadores moleculares, permiten determinar el estatus genético de una colonia de animales de laboratorio, como las producidas en BIOULA.

La colonia de ratas *Sprague-Dawley*, presentó la condición monomórfica y homocigota para cuatro de los siete *loci* estudiados: *DIMit17*; *D10Mit10*; *R-12* y *R-145* (figuras 8, 9, 10 y 13) respectivamente. Con respecto al microsatélite *R-119*, se observó una condición heterocigota pero isogénica, y para los *R-43* y *R-99*, se observó una condición de polimorfismo.

Es importante mencionar que para los microsatélites *R-12* y *R-145*, se esperaba encontrar dos o más alelos, debido a que Serikawa *et al.*, (1992), encontraron que estos

locus eran muy polimórficos en una gran variedad de ratas de laboratorio analizadas, sin embargo, esta condición no se observa en el análisis realizado.

Con respecto a los microsátélites *R-43* y *R-99*, se encontró para ambos un patrón polimórfico (figuras 12 y 13), en el cual se presentan para algunos productos de amplificación dos alelos (condición heterocigota) y para otros un único alelo (condición homocigota). Lo interesante de estos resultados, es que entre los locus de condición homocigota, se halló polimorfismo, lo que sugiere que existen diferencias en cuanto al número de bases que conforman dichas secuencias microsátélites.

Por otro lado, el locus *R-119*, presentó un patrón monomórfico con dos alelos, sugiriendo una condición heterocigota para este marcador, en la totalidad de la colonia, indicando una condición isogénica, (figura 14). Serikawa *et al.*, (1992), reportaron la aparición de tres alelos para dicho locus en la mayoría de ratas evaluadas en su investigación y Kiran *et al.*, (2007), determinaron polimorfismos en tres colonias mutantes de ratas *Wistar*. El resultado obtenido para este locus, entonces, satisface la hipótesis planteada en el trabajo realizado, debido a que fue el único microsátélite que presentó la condición de heterocigosis esperada para las ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley*.

Aunque los resultados obtenidos en relación a los locus *R-43*, *R-99* y *R-119*, no demuestran un alto nivel de heterocigosis, estos pueden corresponderse con el trabajo realizado por Kluge *et al.*, (1994), los cuales determinaron una heterocigosis elevada para ratas no consanguíneas con más de 30 años de existencia en el laboratorio, mediante el uso de clásicos marcadores microsátélites.

Los resultados obtenidos permiten inferir que las ratas *Sprague-Dawley*, no han conservado la variabilidad genética que caracteriza a este tipo de roedores. Resultados similares fueron obtenidos por (Kloting *et al.*, 1997; 2002); quienes realizaron el análisis de variabilidad genética en ratas no consanguíneas, mediante marcadores microsátélites; demostrando que todos los grupos de ratas estudiados perdieron un porcentaje importante de su variabilidad. Otro resultado similar a éste, fue reportado por Festing (1992), en donde se demostró un alto grado de uniformidad genética con $84-95 \pm 5\%$ en

ratas no consanguíneas *Wistar*, *Sprague-Dawley* y *Hooded Lister*. Estos resultados indicaron claramente, que estas colonias consideradas como no consanguíneas se convirtieron en consanguíneas.

Un aspecto importante de resaltar, es que en este tipo de análisis genético, deben elegirse la mayor cantidad de marcadores moleculares posibles y sobre todo, que dichos marcadores sean informativos para el estudio. Es importante entonces, conocer las bases de datos disponibles en la web, que contienen toda la información necesaria con respecto al genoma de los roedores e investigar los trabajos que hayan reportado el uso del marcador a ser utilizado y los resultados obtenidos mediante su análisis. Teppner *et al.*, (2004), realizaron la evaluación de 153 *loci* microsatélites en ratones no consanguíneos, ellos encontraron 73 marcadores que no aportaron ninguna información relevante, debido a que la gran mayoría presentaban condición homocigota o no mostraban ningún producto de amplificación. Por otra parte, Serikawa *et al.*, (2006), determinaron una gran variedad de marcadores polimórficos en líneas de ratas genéticamente definidas, los cuales se encuentran reportados en la página principal del *National Bio Resource Project for the Rat* en Japón, la cual constituye una fuente de información importante en el campo de la investigación con animales de laboratorio, ambas fuentes de información fueron consultadas para realizar la selección de los microsatélites a utilizar en este trabajo.

En el análisis realizado no se incluyó un control positivo, debido a que cualquier línea producida en otro bioterio sería completamente diferente, con respecto a la colonia sometida al análisis genético. Esto debe tenerse en cuenta, cuando se realiza la evaluación genética de una colonia no consanguínea, en donde el análisis es difícil, ya que los animales que integran dichas poblaciones no están definidos genéticamente y la mayoría de microsatélites reportados en las bases de datos mencionadas anteriormente, han sido identificados a través del estudio de líneas genéticamente puras, es decir, líneas consanguíneas. Esto es debido a que los *loci* evaluados pueden no ser informativos debido a la existencia de las diferencias en pares de bases en las secuencias

microsatélites seleccionados o también en las secuencias flanqueantes (Weinshenker *et al.*, 2005).

También, es importante mencionar que existen diferencias significativas entre el genoma de las ratas no consanguíneas que pertenecen al mismo tipo, por ejemplo, las ratas *Sprague-Dawley*, del bioterio de la Universidad de Los Andes, son genéticamente distintas a las ratas *Sprague-Dawley* criadas en cualquier bioterio del país o del mundo. Incluso, se ha reportado variabilidad genética entre y dentro de líneas de ratas consanguíneas, tal es el caso, del estudio realizado por Smits *et al.*, (2004), en el cual se detectó una variabilidad potencial entre diferentes líneas producidas en diversos bioterios en el mundo, por lo que se debe considerar que los resultados experimentales que provienen de laboratorios diferentes, pero que emplean el mismo tipo animal, pueden llegar a diferir notablemente.

Con relación a lo expuesto anteriormente, las diferencias en el genoma de los roedores de laboratorio del mismo tipo genético, pueden atribuirse a que los ancestros de cada una de estos grupos, son totalmente diferentes a los ancestros que dieron origen a la colonia, y a una gran variedad de factores que influyen en la genética de los roedores, como la selección artificial; la deriva genética; la consanguinidad; el sistema de cria, entre otros.

El descenso de la variabilidad genética de las ratas analizadas, ha sido evidenciada por la disminución de la heterocigosis en los *loci* evaluados. Esta pérdida de variabilidad, puede deberse a que al inicio de la producción, el núcleo de fundación de la colonia fue reducido a 15 parejas, a partir de una población constituida por 30 parejas reproductoras (este hecho puede resumirse al error de muestreo planteado en el capítulo I). El motivo por el cual se hizo esta reducción tan drástica fue la baja demanda de estos roedores por parte de los investigadores. Por tal motivo, era innecesario tener una producción que condujera a pérdidas económicas, de mano de obra y al sacrificio de los animales.

Como se ha mencionado anteriormente en este trabajo y es aplicable en este caso, que un número de procesos actúan contra el mantenimiento de la variabilidad genética de poblaciones no consanguíneas a largo plazo, especialmente si estas poblaciones son

pequeñas. Estos procesos incluyen la mutación, la selección natural e inconsciente y la deriva génica (Hartl, 2001). Una forma particular de deriva génica, es el efecto cuello de botella, el cual se produce cuando ocurre la separación de un grupo pequeño de individuos a partir de un grupo más grande. Si analizamos con detalle la situación descrita anteriormente, podemos notar fácilmente que dicho efecto fue aplicado a la colonia cuando se hizo la reducción de su núcleo de fundación. La generación proveniente del nuevo núcleo, dependerá de los recursos genéticos de sus progenitores (Mettler, 1972), por lo que ésta seguramente presentó, de modo más o menos fortuito, una dotación genética peculiar poco nutrida, que fue heredada generación tras generación, llevando a modificaciones aleatorias de las frecuencias alélicas, en donde probablemente ocurrió el descenso en la frecuencia de los heterocigotos, con el subsecuente aumento en la frecuencia de los homocigotos.

La pérdida de variabilidad genética en la colonia estudiada, también puede ser explicada por el proceso de consanguinidad. Como se explicó anteriormente, la consanguinidad de una población puede aumentar con el tiempo, cuando la misma está conformada por un número reducido de individuos (tal como ocurrió en la colonia).

Cuando se establece un sistema de apareamiento en una población numerosa, se puede tener alguna certeza, de que los individuos apareados no tienen un grado de parentesco elevado y el coeficiente de consanguinidad puede mantenerse por debajo del 1%. Por lo tanto, es posible que en ésta colonia se estén estableciendo cruces inconscientes entre individuos que, probablemente ya presentan algún tipo de parentesco o relación genética, aumentando así la probabilidad de que los dos alelos que representan un locus en un individuo sean idénticos por descendencia, es decir, que los dos gametos que formaron el cigoto provienen de padres emparentados y llevan alelos que son producto de la replicación de un solo gen de un antecesor común.

El cálculo de las frecuencias alélicas en el análisis estadístico con el programa Popgen 32 (tabla 7), reveló que la colonia de ratas ha perdido considerablemente su heterocigosis y que dicha pérdida podría llegar a ser total, ya que se observan frecuencias que tienden a la fijación de un alelo (como se explicó en la sección de

resultados). También, podemos notar que el porcentaje de polimorfismo para los tres *loci* (*R-43*, *R-99*, *R-119*) en los que se encontró un poco de variabilidad fue muy bajo (42,86%), mientras que el 57,14% de los *loci* restantes (*DIMit17*, *D10Mit10*, *R-12*, *R-145*) no presentaron polimorfismo o variabilidad.

En cuanto a la variación génica calculada estadísticamente (tabla 8), mediante este programa, se puede notar que los promedios obtenidos del número de alelos por locus ($1,428 \pm 0,534$) (*na*), y del número de alelos efectivos $1,274 \pm 0,403$, son cercanos entre sí, pero distan del valor efectivo real de 2, que indica la presencia de 2 alelos; estos resultados corroboran, al igual que el cálculo de las frecuencias alélicas, que la variabilidad de la colonia se encuentra disminuida. Otro índice evaluado mediante el programa estadístico utilizado es el de información de Shanno's, el cual representa una medida de la diversidad genética y la encontrada para la colonia analizada con respecto a los microsatélites estudiados fue de $0,234 \pm 0,308$, indicando una diversidad muy baja ya que el valor esperado es de 1. Es importante señalar que la colonia presenta la condición heterocigota para algunos *loci* indicando la existencia de una variabilidad genética en ésta, sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico, esta variabilidad se encuentra disminuida, pero la alta desviación estándar que se observa indica la necesidad de evaluar un número mayor de microsatélites para corroborar esta última observación.

Otra medición realizada mediante el programa estadístico PooGen32, es la estimación de las heterocigosis esperadas mediante Nei (1973), en la cual se observó que la medida de heterocigosis esperada era de $0,157 \pm 0,214$ y la heterocigosis observada fue de $0,208 \pm 0,367$ (tabla 9), estos valores corroboran que la proporción de heterocigotos se encuentra en niveles disminuidos.

Existen estudios en los cuales se intenta recuperar la condición de heterocigosis en colonias de animales no consanguíneos que con el transcurso del tiempo presentan la condición de homocigosis. Una de estas formas es presentada por Campino *et al.*, (2002), realizando apareamientos con ratones silvestres, los cuales sirven de almacén natural de la gran variabilidad no observada en las líneas de laboratorio. Posteriormente,

estos investigadores determinaron los microsatélites que detectaron mayor variabilidad en el grupo de ratones silvestres y analizaron dichos marcadores en las ratas mantenidas en el laboratorio, logrando de esta manera observar variabilidad genética. Otro estudio similar fue realizado por Voigt *et al.*, (1997), en donde se analizaron ratas silvestres y ratas consanguíneas mediante marcadores microsatélites. Aquí se detectó una diferencia alélica de 80% entre los *loci* estudiados para ambos grupos, presentándose la mayor variabilidad en las ratas silvestres, por lo que se concluye que dichas poblaciones son una fuente importante para el aporte de nuevos alelos en una población de ratas de laboratorio.

Para realizar la caracterización de las colonias de animales producidas en el bioterio es conveniente conocer algunos parámetros que son característicos de éstas y que pueden servir como datos base para las investigaciones realizadas y además sustentar el análisis genético molecular realizado a las mismas. La información con respecto a cuáles eran los parámetros convenientes a evaluar fueron sustentados de diferentes catálogos de laboratorios productores de líneas no consanguíneas. Se seleccionaron: ganancia de peso-talla, parámetros hematológicos (hematocrito, hemoglobina, cuenta de glóbulos blancos, recuento diferencial de células) y bioquímicos sanguíneos (glucosa y transaminasas).

Con respecto a la ganancia de peso-talla de la colonia de ratas producidas en BIOULA, para los dos grupos (hembras y machos) se observó un aumento continuo de peso a lo largo de las 13 semanas evaluadas. En la edad adulta, los machos son de mayor peso que las hembras, estos se encuentran por encima de los 350 gramos, mientras que las hembras no exceden los 250 gramos. Al observar las curvas de crecimiento presentadas por el laboratorio *Charles Rivers* para las ratas no consanguíneas *Sprague-Dawley* CrI:CD[®](SD)BR (figura 2), se pudo observar que el crecimiento de la población en peso con respecto a la *Sprague-Dawley*:BIOULA es muy similar (figuras 17). En la curva de crecimiento en talla (figura 16), la ganancia de talla entre los machos y las hembras es muy similar, éstos datos no pudieron compararse con otros laboratorios ya que no son reportados en los catálogos o bases de datos

consultadas. Sin embargo, en el estudio realizado, este parámetro fue medido con la finalidad de establecer dicha medida para el control fenotípico de la colonia, y establecer comparaciones en el futuro con las siguientes generaciones de ratas de la colonia.

En relación a los valores de hematocrito y hemoglobina para la colonia, se encontró que tales valores presentan un promedio de 43% y 15 g/dl respectivamente, estos son valores considerables dentro de los rangos normales para mamíferos y además al compararlos con los valores reportados para la línea Crl:CD[®](SD)BR (ver tablas 3 y 8), por la *Charles Rivers*, presentan una estrecha relación, cuyos promedios se encuentran 42-43% para el hematocrito y 14-15 g/dl para la hemoglobina.

Con respecto al valor de la cuenta de glóbulos blancos los valores observados fueron de 6133,3 ($\times 100 \text{ mm}^3$) para los machos y de 4950 ($\times 100 \text{ mm}^3$) para las hembras, al igual que para los parámetros del hematocrito y la hemoglobina, éstos se encuentran dentro de los rangos normales para los mamíferos, sin embargo al compararlos con los que reporta el catálogo de la *Charles Rivers*, éstos presentan diferencias, siendo mayores que los encontrados en el análisis realizado.

El recuento diferencial de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, presentó valores que se diferencian de los reportados para la colonia Crl:CD[®](SD)BR, para los cuales el porcentaje de linfocitos fue de 83%, y el encontrado en el análisis realizado para los animales de la colonia de BIOULA es de 94% (ver tablas 1 y 10). Los valores de neutrófilos para los machos fue de 6,66% y para las hembras de 4,33; en relación a los eosinófilos estos no se encontraron en el conteo realizado; siendo los primeros menores a los que presenta el grupo de comparación. En relación a la cantidad de linfocitos la proporción observada en el análisis está relacionada con la que se presenta en los animales de la *Charles Rivers*.

En relación a los parámetros bioquímicos analizados de glucosa y transaminasas para las ratas *Sprague-Dawley*, se determinaron valores que se encuentran dentro del rango establecido para los mamíferos. El valor de glucosa hallado para los machos fue de 150 g/dl, y para las hembras fue de 135,5 g/dl (tabla 2). Al realizar la comparación de estos valores con respecto a los reportados para la línea Crl:CD[®](SD)BR, se puede apreciar que la glucosa de dicha colonia es mayor en cuanto a los valores encontrados

para la colonia *Sprague-Dawley* de BIOULA. Esta diferencia puede ser atribuida al alimento, ya que el mismo puede variar en cuanto al porcentaje de azúcares que contenga.

Con respecto a los valores de transaminasas (GOT y GPT) examinados en la colonia (tabla 2), la GOT hallada fue de 53,7 (U/lt) y 43,10 (U/lt) para los machos y las hembras respectivamente. Mientras que los valores de GPT fueron de 41,6 (U/lt) para los machos y 30,10 (U/lt) para las hembras. Los valores de GPT para machos y hembras son similares a los valores de GPT reportados para la línea CrI:CD[®](SD)BR, en cambio, los valores de GPT difieren entre la colonia *Sprague-Dawley* de BIOULA y la línea CrI:CD[®](SD)BR, siendo estos mayores.

Es importante resaltar que los valores obtenidos en este análisis fenotípico son particulares de la colonia de ratas *Sprague-Dawley* de BIOULA, por lo que la comparación se realiza con el objetivo de observar si no existen diferencias drásticas en éstos. Las diferencias observadas se encuentran dentro de los rangos normales debido a que las condiciones ambientales que rodean ambas colonias son diferentes, en el laboratorio de la Charles Rivers, los parámetros ambientales se encuentran estandarizados, sin embargo, en el bioterio de la Universidad de Los Andes tal estandarización no existe.

Bibliografía citada

Agrafioti, I y Stumpf, H. 2007. **SNPSTR: a database of compound microsatellite-SNP markers.** Nucleic Acid Research. 35: 71-75.

Benavides, F., Cazalla, D., Pereira, C., Fontanals, A., Salaverri, M., Goldman, A., Buggiano, V., Dran, G y Corley, E. 1998. **Evidence of genetic heterogeneity in a BALB/c mouse colony as determined by DNA fingerprinting.** Laboratory Animals 32:80-85.

Benavides, F., Glasscock, L., Coghlan, M., Stern, M., Weiss, D y Conti, C. 2000. **PCR based microsatellites analysis for differentiation and genetic monitoring of nine SENCAR mouse strains.** Laboratory Animals. 35: 157-162

Benavides, F. y Guénet, J. 2003. **Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios Básicos y aplicaciones.** Universidad de Alcalá. Laboratory Animals Ltd. SECAL. Pp: 312.

Bedel, M., Jenkis, N y Copeland, N. 1997. **Mouse models of human disease.** Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. Pp. 1-11.

Campino, S., Behrschmidt, C., Bagot, S., Guénet, J., Cazenave, P., Holmberg, D y Goncalves, C. 2002. **Unique genetic variation revealed by a microsatellite polymorphism survey in ten wild-derived inbred strains.** Genomics. 79: 618-620.

Catálogo IFFA CREDO (2002)

Cunningham, J. 2003. **Fisiología Veterinaria**. ELSEVIER. Tercera Edición. Pp. 575.

Dagnaes H. 1994. **Laboratory animal genetics and genetic monitoring**. En: Handbook of laboratory animal science. Svendsen P, Hau J (ed). CRC Press, London.

De Jesús, R. 2003. **¿Cómo sabemos si los animales consanguíneos usados en la investigación son genéticamente puros?** Boletín de Malariología y Salud Ambiental. 2: 15-22.

De Jesús, R., Moreno, N y Martínez, J. 2005. **Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de ratones consanguíneos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**. Boletín de Malariología y Salud Ambiental 15:134-140.

De Jesús, R. 2006. **Caracterización genética de líneas consanguíneas de ratón producidas en Venezuela, mediante análisis de microsatélites**. Tesis. (Doctorado en Ciencias) Universidad Central de Venezuela. Maracay.

Deschepper, C., Prescott, G., Hendley, E., Reudelhuber, L. 1997. **Genetic Characterization of Novel strains of rats Derived from Crosses Between Wistar-Kyoto and Spontaneously hypertensive Rats, and Comparisons with Their Parental strains**. Laboratory Animal Science. 47: 638-646.

Diaz, J y Hicks, G. 1994. **Bioquímica**. Segunda Edición. Interamericana McGRAW-Hill. Madrid.

Eckert, R. 1998. **Fisiología Animal**. Tercera Edición. Interamericana McGRAW Hill. Madrid.

Festing, W. 1990. **Introduccion to genetic monitoring.** Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science 17:119-125.

Festing, W. 1992. **Genetic variation in outbred rats estimated from DNA fingerprints: implications for toxicological screening.** Human Experiment Toxicology. 11: 590-591.

Festing, W. 1993. **Genetic variation in outbred rats and mice and its implications for toxicological screening.** J. Experiment Animal. Science. 35: 210-200.

Gibbs, R. 1990. **DNA amplification by the polymerase chain reaction.** Analytical Chemistry. 62: 1202-1214

Guyton, A y Hall, J. 1997. **Tratado de Fisiología Médica.** Novena edición Interamericana McGRAW-Hill.. Distrito Federal. México.

Hans, E. 2004. **Microsatellites: Simple Sequences With Complex Evolution.** Nature Reviews. 5: 435-445.

Hartl, D. 2001. **Genetic Management of Outbred Laboratory Rodent Populations.** Department of Organismic and Evolutionary Biology. Harvard University. Cambridge, Massachusetts. Pp: 1-17.

Herrera, E. 1996. **Bioquímica.** Interamericana McGraw-Hill. Segunda Edición Madrid.

Hill, R., Wyse, G y Anderson, M. 2006. **Fisiología Animal.** Editorial Médica Panamericana. Madrid.

Kidd, K y Ruano, G. 1995. **Optimizing PCR**. En Dieffenbach, C y Dveksler, G. (Ed). **PCR Primer. A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ch. 1. Pp: 1-21.

Kimura, M y Crow, J. 1964. **The number of alleles that can be maintained in a finite population**. Genetics. 49: 725-738.

Kiran, K., Vijaya, B., Vishnuvardhan, R y Giridharan, N. 2007. **DNA Fingerprinting and Phylogenetic Analysis of WNIN Rat Strain and Its Obese Mutants Using microsatellite Markers**. Biochemical Genetics. 45: 77-91.

Kloting, I., Nitschke, C y Brandt, V. 2002. **Impact of genetic profiles on experimental studies: outbred versus wild rats**. Toxicology and Applied Pharmacology. 189. 68-71.

Kloting, I., Vogt, L y Voigt, P. 1997. **How heterozygous are wild rats (*Rattus norvegicus*)?**. Transplantation Proceedings. 29: 1772-1773.

Kluge, R., Meyer, J y Rapp, K. 1994. **Genetic characterization of the mouse strains of the institute for animal breeding of the veterinary faculty of the university of Munich, Germany**. Journal Experiment Animal. Science. 36: 179-188.

Larzul, D. 1990. **PCR. Un procédé d'amplification**. Collection Genie-Genetique. Tec & Doc. Lavoisier Editions Medicales internationales. Ch 5. Pp. 1-31.

Lazar, J., Moreno, C., Jacob, H y Kwitek, A. 2005. **Impact of genomics on research in the rat**. Genome Research. 15: 1717-1728.

Levene, H. 1949. **On a matching problem in genetics.** Ann Math Stat. 20: 91-94.

Lewin, B. 2001. **Genes VII.** Marban Libros, S.L. Madrid.

Lewontin, R y Krakauer, J. 1973. **Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms.** Genetics 74: 175-195.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D y Darnell, J. 2002. **Biología Celular y Molecular.** Cuarta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Love, J., Knight, A., McAleer, M y Todd, J. 1990. **Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-based microsatellites.** Nucleic Acids Research 18:4123-4130.

Lozano, J., Galindo, J., Garcia, J., Martinez, J., Peñafiel, R y Solano, F. 1997. **Bioquímica para Ciencias de la Salud.** Interamericana McGRAW-Hill. Madrid.

Nei, M. 1973. **Analysis de Gene Diversity in subdivided Populations.** Proc. National Academy. Science 70: 3321-3323.

Nei, M y Roychoudhury, K. 1973. **Sampling Variances of Heterozygosity and Genetic Distance.** Genetics 76: 379-390.

McCusker, J., Dawson, M., Noone, D., Gannon, F y Smith, T. 1992. **Improved method for direct PCR amplification from whole blood.** Nucleic Acids Research. 20: 6747.

Melloy, E y Balk, M. 1993. **The importance of laboratory animal genetics, health and the environment in Biomedical Research.** Academic Press, New York.

Mettler, L y Gregg, T. 1972. **Genética de las poblaciones y evolución.** Unión tipográfica Editorial Hispano-Americana. Distrito Federal. México.

Montagutelli, X., Serikawa, T y Guénet, J. 1991. **PCR-analyzed microsatellites: Data concerning laboratory and wild-derived mouse inbred strains.** Mammalian Genome 1: 255-259.

Petkov, P., Ding, Y., Caseell, M., Zhang, W., Wagner, G., Sargent, R., Asquith, S., Crew, V., Johnson, K., Robinson, P., Scott, V y Wiles, M. 2004. **An Efficient SNP System for Mouse Genome Scanning and Elucidating strain Relationships.** Genome Research. 14:1806-1811.

Ricklefs, R. 1998. **Invitación a la Ecología.** Editorial Médica Panamericana. Cuarta Edición. Buenos Aires. Parte IV. Pp.387-413.

Sambrook, J. y Russell, D. 2001. **Molecular Cloning. A laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Pp. 6.23- 6.27.

Serikawa, T., Kuramoto, T., Hilbert, P., Mori, M., Yamada, J., Dubay, C., Lindpainter, K., Ganten, D., Guénet, J., Lathrop, M y Beckmann, J. 1992. **Rat Gene Mapping Using PCR-Analyzed Microsatellites.** Genetics 131: 701-721.

Serikawa, T., Mashimo, T., Voigt, B., Tsurumi, T., Naoi, K., Nakanishi, S., Yamasaki, K y Kuramoto, T. 2006. **A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains.** Genetics. 7: 1-8.

Silver, L., 1995. Ed. **Mouse Genetics. Concepts and Applications**. New York: Oxford University Press. Pp. 345.

Smits, Bart., Zutphen, Bert., Plasterk, Ronald y Cuppen, Edwin. 2004. **Genetic Variation in Coding Regions Between and Within Commonly Used Inbred Rat Strains**. *Genome Research*. 14: 1285-1290.

Snell, G y Stimpfling, J. 1966. **Genetics of tissues transplantation**. En: *Biology of the laboratory mouse*. Green, E (ed). McGraw-Hill. New York.

Stevens, A y Lowe, J. 1998. **Histología Humana**. Editorial Harcourt Brace. Madrid.

Suzuki, D., Griffiths, A., Miller, J y Lewontin, R. 1993. **Introducción al análisis genético**. Cuarta Edición. Interamericana. McGRAW-Hill. Cartagena. Madrid.

Teppner, I., Aigner, B., Schreiner, E., Muller, M y Windisch, M. 2004. **Polimorphic microsatellite markers in the outbred CFW and ICR stocks for the generation of speed congenic mice on C57BL/6 background**. *Laboratory Animals*. 38: 406-412.

Trinder, P. 1969. **Determination of Glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor**. *Ann. Clin. Biochem*. 6: 24-28.

Truett, G., Heeger, P., Mynatt, R., Truett, A., Walker, J y Waqman, M. 2000. **Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (*HotSHOT*)**. *BioTechniques* 28: 52-54.

Weinshenker, D., Wilson, M., Williams, K., Weiss, J., Lamb, N y Twigger, S. 2005. **A new method for identifying informative genetic markers in selectively bred rats.** Mammalian Genome. 16: 784-791.

White, W y Lee, C., 1998. **The Development and Maintenance of the Crl:CD[®](SD)IGS BR Rat Breeding System.** Charles River Laboratories 251 Ballardvalle Street Wilmintong.

Yamada, J., Nikaido, H y Matsumoto, S. 1979. **Genetic variability within and between outbred Wistar strain of rats.** Experiment Animal. 28: 259-269.

Yeh, F., Boyle, T., Rongcai, Y., Ye, Z y Xijan, J.: [francis.yeh@ualberta.ca] **PopGen version 1,31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis** [<http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh>]. 28 de agosto de 1999.

Voigt, B., Kovacs, L y Kloting, I. 1997. **How Heterozygous Are Wild Rats (*Rattus norvegicus*)?** Transplantation Proceedings. 29: 1772-1773.

Zuñiga, J., Tur, M., Milocco, S y Piñeiro, R. 2000. Ed. **Ciencia y Tecnología en protección y experimentación Animal.** McGraw-Hill. Interamericana. Madrid.