



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MERIDA VENEZUELA

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

**Estudio de la Condición Genética y Fisiológica de
la cepa *C57Bl/6* // *BIOU* Producida en el Bioterio
de la Universidad de Los Andes.**

Trabajo Especial de Grado presentado por la Br.
Yesenia Josefina Moreno Rivas ante la Ilustre
Universidad de los Andes para optar al título de
Licenciada en Biología.

Julio 2008

El siguiente 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, 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 Humanísticos y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA), bajo el proyecto N° C-1377-06-03-A

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODO PODEROSO, por iluminarme, por nunca dejarme sola en cada camino que e emprendido en mi vida, por alimentar mi fe, mi esperanza y darme salud a mi a los míos.

A mis Padres Francisco y Gladys, gracias por nunca decirme no y brindarme las mejores oportunidades en mi vida para lograr esta meta. Los amo

A mis Hermanos Javi, Dani, Fray, gracias por el cariño, el apoyo y por darme animo cuando lo necesite. Dios los bendiga

A mis Soles Bellos Fernanda, Gordo y mi bebe bello, por ser una luz en mi vida, por llenarme de sonrisas y alegrías que Dios los bendiga hoy mañana y siempre los adoro.

A mis Abuelos Acacio, Magdalena que están en el cielo espero estén orgullosos de mi, y a mi abuela Alejandrina, Besos abue.

A mis Tíos gracias por estar siempre pendiente de mi, en especial a mi Tía Nancy Tía Ana, Tía María y Miriam.

A la Profesora Rosa De Jesús, por el cariño, la amistad, la compresión, el apoyo, por estar en todo momento y por lo especial que ah sido conmigo.

A los profesores Néstor, Jhon y Wilfredo de los cuales aprendí muchísimo no solo como profesional sino como persona los admiro mucho mil gracias

Al laboratorio de Fisiología Animal y a el laboratorio de la Expresión de Gen y al laboratorio de la Biomex, en especial a la profesora Luisana Avilan y la profesora Mary Boll y al profesor Jhon por su colaboración.

A la familia Ramírez por dejarme ser parte de esa bella familia, en especial a la Tía Edén por adoptarme, por el apoyo y sus grandes consejos los quiero mucho.

A una gran amiga, Dennis Uzcategui, por ser como una hermana mayor, por estar allí, por brindarme su amistad y apoyo, por permitirme conocer a su bella familia, gracias loquita dios te bendiga a ti y a los tuyos.

A mis Amigos de Vida, a las brujas: Mayra, Glenda, Ana, Marianita, Taco y a Yuly, por los consejos, el cariño, las vivencias, el apoyo por todo de verdad Dios no me dio hermanas pero las coloco a ustedes en mi camino.

A mis Amigos de la Facu: Yely, Gaby, Yiyi, La Chiqui, Ekara, Carlita, Andre, Miguel, Ronald, Jackson, Wuilliams sin su ayuda no hubiese llegado al final de este camino que no es más que el comienzo a una nueva meta. Son lo máximo

A mis Compañeros Bellos de Salsa Casino, gracias por su cariño, por bailar conmigo y brindarme un rato de distracción, en especial a Alex por enseñarme que a la vida siempre hay que mostrarle una gran sonrisa, las personas maravillosas como tú son difíciles de encontrar T.Q

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 y José Luis. A las licenciadas Mileyna, Dennis, Ludis

A Sioly, por ser tan especial con nosotros y ser un gran apoyo dentro de la Universidad.

Sin la ayuda de ustedes y de todas aquellas personas que dejaron una enseñanza en mi vida, no hubiese logrado cumplir esta meta por eso desde el fondo de mi corazón mil gracias

RESUMEN

Las cepas consanguíneas producidas en los bioterios, por ser un prototipo de líneas genéticamente estandarizadas debido a que su condición genética es definida, se caracterizan por poseer un alto grado de consanguinidad ($F= 99$), es decir, que deben presentar características de homocigosidad en el 99% de sus alelos; y una condición de isogenicidad en el 99% de sus *loci*. Por lo antes señalado es necesario realizar la caracterización genética y fisiológica de estas cepas, mediante análisis genético y fenotípico, para verificar la calidad de estos animales y ofrecer a los animales con las características correspondientes a cada investigación. Una de las herramientas valiosas en el monitoreo genético, es el análisis molecular de microsatélites mediante la técnica de PCR, análisis en el cual se evalúa la condición de homocigosis de estas cepas consanguíneas de ratones (condición homoalélica) y la variación genética cuando el producto de amplificación difiere del reportado por las bases de datos para éste. En este estudio se analizaron 7 microsatélites para evaluar la condición genética de dichos animales producidos en el bioterio de la Universidad de Los Andes, al igual que se midieron algunas variables fisiológicas tales como: ganancia de peso – talla y algunos parámetros hematológicos y bioquímicos y parámetros reproductivos, tales como: número de crías nacidas por camada, número de crías destetadas y período inter partal. Los resultados obtenidos en el análisis genético, presentaron que seis de siete *loci* de los microsatélites analizados presentaron una condición homoalélica, conllevando a suponer la condición homocigota e isogénica para los reproductores del núcleo de fundación. Sin embargo, el *loci* para el microsatélite *D11Mit2*, presento una condición heterocigota o heteroalélica. Los ratones *C57CL/6* se encuentran en BIOULA desde hace 24 generaciones, lo que de acuerdo a lo que propone el factor F de consanguinidad, estos animales ya deberían haber fijado un solo alelo en el 99% del genoma, además que los mismos se han mantenido en aisladores desde su ingreso al bioterio. Ante esta situación se pudiese considerar, lo reportado en la literatura en relación a que en este cromosoma 11 se localizan una serie de genes implicados con el cáncer, la inestabilidad genómica y producción de una proteína muy importante la cual es una proteína estructural que

requiere de dicha condición de heterocigosis, por lo que se pudiese suponer que la condición de heterocigosis para éste alelo es indispensable, pudiendo ubicarse dentro del 1% de heterocigosis, que presentan estas cepas. En el caso de los análisis fisiológicos los resultados encontrados demostraron que la cepa *C57BL/6//Aly//BIO*, presentan valores de crecimiento, hematológicos y bioquímicos que se encuentran dentro de los rangos establecidos para ratones consanguíneos producidos para la investigación, por laboratorios internacionales. El desarrollo del trabajo permitió cumplir con el objetivo general propuesto de estudiar la condición genética y fisiológica de la cepa *C57BL/6//Aly//BIO* producida en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, logrando caracterizarse la cepa de los ratones consanguíneos de la cepa *C57BL/6//Aly//BIO* producidos en el bioterio de la Universidad de Los Andes, sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, se recomienda analizar un mayor número de *loci* microsatélites, que permitan caracterizar aún más la cepa, verificando su condición homocigota en una gran parte del genoma de estas cepas.

Palabras claves: Ratones consanguíneos, control genético, reacción en cadena de la Polimerasa, microsatélite, bioterio.

ABSTRACT

The inbred strains obtained in animal houses due to the fact of being prototype with defined genetically conditions might be considered as presenting high degree of consanguinity ($F = 99$), for all practical purposes, homozygous across their entire genome and genetically identical to each other. From the previous statement it is necessary to realize genetically and phenotypically monitored in order to guaranty to the users the more adapt prototypes according to the nature of the research to be carried on. One of the tools used is of analysis of microsatellite using the PCR technique. This analysis gives light on the homozygosity condition of the inbred strains of mice (homoallelic condition) as well as in the genetic variation in the case in when the amplification products differ from the report. In the present study 7 microsatellites were used to evaluate the genetic condition of the animal produced in the animal house of Universidad de Los Andes and some physiological parameters were also evaluated (such as increased in weight and tall) hematological and biochemical parameters were also analyzed as well as reproductive parameters as average offspring born of litter, average offspring weaned of litter and interbirth period. The experimental results showed 6 loci of the microsatellites with a homoallelic condition, these results afford to assume that the condition of homozygosity and isogenic for the animal to foundation nucleus. However the loci for microsatellite *D11Mit2* showed a biallelic condition. How C57BL/6 mice have been in our animal house 24 generations and according to the postulates of the "F" factor these animal should have reached homozygosity in the 99% of genome and these has been maintained in aislators since that these arrived to this installations in the years 1995. Is possible then consider literature report to respect about of the linkage of chromosome 11 in cancer appearance, the genomic instability and the production of a structurally protein. Is possible that be important then keep the heterozygosity condition for these alleles, encounter this in the 1% of heterozygosity.. In the results of physiological parameters with strains *C57BL//Aly//BIO*, these showed values for growth, and the parameters for hematology and biochemistry very likely to reported for inbred mice in the literature. The results allowed to comply whit the

genetically and phenotypically characterization objective which were to study the genetic and physiologically conditions of *C57BL//Aly//BIO* strain, obtained in the animal house of la Universidad de Los Andes. The inbred strain mice *C57BL//Aly//BIO* were characterized. However in highly recommended to carry out the study of a greater number of microsatellites in orden to achieve goal an even better knowledge of the strain by verifying the homocytotic condition in greater portion of the genome.

Palabras claves: inbred mice, genetic monitored, chain reacción polimerase, microsatellite, facilities animal house.

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
ALT	Alanina aminotransferasa
ARN	Ácido Ribonucleico
AsT	Aspartato aminotransferasa
cm	Centímetro
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid (Ácido etilen diamino taetracético)
ER	Enzima de restricción
F	Coefficiente de consanguinidad
H2	Complejo mayor de histocompatibilidad del ratón
Kb	Kilobases
µl	Microlitros
µM	Micromolar
mg	Miligramos
ml	Mililitros
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
RAPD	Siglas en Ingles de Randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)
rcf	Relative centrifugal force (fuerza centrífuga relativa)
SSR	Simple Sequence Repeats (Secuencias simples repetidas)

SNP	Simple Nucleotido Polymorphism (Nucleotidos simples polimórficos)
TBE	Tris-Borato EDTA
U	Unidades de enzima
VNTR	Variable Number Tandem Repeats

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	III
ABSTRACT	V
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	VIII
ÍNDICE DE CONTENIDOS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE TABLAS	XVII

Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia de los animales de laboratorio.....	1
Importancia de los ratones sobre otros modelos animales de Investigación.....	1
Cepas consanguíneas.....	2
Características Generales de las cepas consanguíneas de ratones.....	4
Características de la Cepa <i>C57BL/6</i>	6
 Factores que afectan la composición genética de los roedores de laboratorio.....	 7
 La Contaminación Genética y los Controles de Calidad.....	 9
Marcadores Bioquímicos.....	11
Histocompatibilidad Tisular.....	13
Análisis de Color del Pelaje.....	13
Análisis Molecular para el Estudio de la Condición Genética de los Ratones de Laboratorio.....	 14
Marcadores Moleculares Microsatélites.....	15

Análisis de Características Fisiológicas de Ratones de Laboratorio.....	18
Parámetros zootécnicos Caracteres Reproductivo.....	18
Variables Fisiológicas: crecimiento (ganancia de peso – talla).....	18
Variables Fisiológicas: Parámetros Hematológicos.....	19
Hematocrito.....	20
Hemoglobina.....	21
Glóbulos blancos.....	22
Granulocitos o células polimorfonucleares.....	22
Agranulocitos o células monomorfonucleares.....	23
Recuento diferencial.....	23
Variables fisiológicas: Parámetros bioquímicos.....	24
Glucosa.....	24
Colesterol.....	25
Creatinina.....	25
HIPOTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	28
JUSTIFICACIÓN.....	29

Capítulo II. METODOLOGÍA

Análisis de ADN con marcadores moleculares para la cepa <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> (núcleo de fundación).....	30
Extracción de ADN genómico de la cepa <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> a partir de tejido de oreja mediante digestión con Ananase.....	30
Estimación de la cantidad y calidad del ADN de la colonia de la cepa consanguínea <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> por espectrofotometría.....	32

Optimización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación de los microsátélites: <i>D1Mit17, D5Mit101, D6Mit180, D11Mit2, D11Mit31, D12Mit181, D19Mit84</i>	32
Formación de un banco de ADN extraído de tejido de oreja de la cepa de ratones <i>C57BL/6//Aly//BIO</i> para su control genético.....	35
Reacción en cadena de la Polimerasa.....	35
Identificación los alelos para cada uno de los <i>loci</i> de los 7 microsátélites seleccionados en las cepas de ratones consanguíneos (<i>C57BL/6 //Aly//BIO</i>).....	35
Análisis de Garacterísticas Fisiológicas de la Cepa <i>C57BL/6 //Aly//BIO</i> de ratones	36
Parámetros zootécnicos: Caracteres Reproductivos.....	36
Variable Fisiológica: crecimiento (ganancia de peso-talla).....	37
Variable Fisiológica: Parámetros Hematológicos.....	37
Hematocrito.....	37
Hemoglobina.....	37
Glóbulos blancos.....	38
Recuento diferencial.....	38
Variable Fisiológica: Parámetros Bioquímicos.....	39
Glucosa.....	39
Colesterol.....	40

Creatinina.....	41
-----------------	----

Capítulo III. RESULTADOS

Extracción de ADN de tejido de oreja de los ratones de la cepa <i>C57BL/6//Aly//BIO</i>	42
---	----

Formación del banco de ADN de la cepa de ratones <i>C57BL/6//Aly//BIO</i>	43
---	----

Optimización de la técnica de PCR para la amplificación de los microsatélites: <i>D1Mit17, D5Mit101, D6Mit180, D11Mit2, D11Mit31, D12Mit181, D19Mit84,</i>	45
--	----

Identificación los alelos para cada uno de los 7 <i>loci</i> de los microsatélites seleccionados en las cepas de ratones consanguíneos (<i>C57BL/6 //Aly//BIO</i>).....	47
---	----

Características fisiológicas de la cepa *C57BL/6 //Aly//BIO*

Parámetros zootécnicos: Caracteres Reproductivos.....	51
---	----

Variable Fisiológica: Ganancia de peso-talla.....	51
---	----

Determinación de los parámetros hematológicos (Hematocrito, Hemoglobina, Glóbulos blancos y Cuenta diferencial).....	53
--	----

Determinación parámetros Bioquímicos (glucosa, colesterol y creatinina).....	54
--	----

Capítulo IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....57

Capítulo VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....67

APÉNDICES

Apéndice A.

Amortiguadores y soluciones.....74

Apéndice B.

Kits enzimático comerciales.....75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto del número de parejas reproductoras (N) sobre el coeficiente de consanguinidad (F).....	3
Figura 2. Estructura piramidal diseñada para evitar cruzamientos accidentales, en los sistemas de cría de cepas consanguíneas (<i>C57BL7/6</i>).....	11
Figura 3. Composición de una región microsatélite en una cadena de ADN.....	16
Figura 4. Uso de los microsatélites como marcadores moleculares.....	17
Figura 5. Curva de crecimiento de la cepa consanguínea <i>C57BL/6</i>	19
Figura 6. Sistema de aisladores utilizados para la producción de los ratones de la cepa <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i>	30
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 Ananase.....	43
Figura 8. : Carta Pedigree de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> desde su llegada al bioterio 1995 hasta el año 2007.....	44
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 2,5%, para productos amplificados por PCR con cebadores <i>DIMit17</i> y diferentes concentraciones de $MgCl_2$	45

Figura 10. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> para el microsatélite <i>D1Mit17</i>	48
Figura 11. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> para el microsatélite <i>D6Mit160</i>	48
Figura 12. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> para el microsatélite <i>D5Mit101</i>	49
Figura 13. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> para el microsatélite <i>D11Mit31</i>	50
Figura 14. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> para el microsatélite <i>D12Mit181</i>	50
Figura 15. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> para el microsatélite <i>D19Mit84</i>	51
Figura 16. Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> para el microsatélite <i>D11Mit2</i>	51
Figura 17. Curva de crecimiento de la Cepa <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> , de acuerdo al peso (g) de machos y hembras del núcleo de fundación.....	53

Figura 18. Curva de crecimiento de la Cepa *C57Bl/6//Aly//BIO*, de acuerdo a la talla (cm) de machos y hembras del núcleo de fundación.....53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes del color del pelaje del ratón.....	6
Tabla 2. Parámetros hematológicos hematocrito, hemoglobina, glóbulos blancos y recuento diferencial, para la cepa consanguínea <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> producida en <i>The Jackson Laboratory</i>	24
Tabla 3. Parámetros bioquímicos de glucosa, colesterol y creatinina para la cepa consanguínea <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> , producida en <i>The Jackson Laboratory</i>	26
Tabla 4. Características de los oligonucleótidos iniciadores o <i>primers</i> seleccionados para la evaluación genética de la cepa de ratones <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i>	34
Tabla 5. Valores del análisis espectrofotométrico realizado a muestras de ADN del tejido de la oreja de los ratones de la cepa consanguínea <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> digestión con la enzima Ananase (comunicación personal Prof. Néstor González).....	42
Tabla 6. Concentraciones y volúmenes de reactivos de PCR, empleados para la amplificación de loci microsatelites de la cepa de de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i>	46
Tabla 7. Programa de ciclos de incubación de PCR, empleado para la amplificación de <i>loci</i> microsatélites de la cepa de de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i>	47

Tabla 8. Valores de algunos parámetros zootécnicos obtenidos de el registro de tarjetas de producción de la cepa de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i>	52
Tabla 9. Peso (g) de ejemplares pertenecientes a la cepa de de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i>	53
Tabla 10. Valores obtenidos a partir de la evaluación fenotípica de la cepa de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> , mediante el análisis de parámetros hematológicos.....	54
Tabla 11. Valores obtenidos a partir de la evaluación fenotípica de la cepa de de ratones consanguíneos <i>C57Bl/6//Aly//BIO</i> , mediante el análisis de parámetros bioquímicos.....	55

INTRODUCCIÓN

Importancia de los Animales de Laboratorio

Consideraciones éticas restringen la investigación en humanos. Por esta razón el uso de modelos animales para el estudio de “desórdenes humanos” ha jugado un rol crítico en entender los procesos de enfermedades y de hecho, han sido de gran valor para el diseño de pruebas y regímenes de tratamientos. Diferentes modelos han sido utilizados para la experimentación, la década de los 90’s ha sido llamada “la década del ratón” por el Harvard Health Setter (Meraz y Sanchez, 2001). Otros posibles modelos a utilizar, en el futuro, debido al logro de la expresión transgénica, son los animales de mayor tamaño, los cuales permitirán la producción a gran escala de proteínas recombinantes. También, la reciente posibilidad de mutagénesis dirigida en células madre embrionarias “*cells steam*” en ratas, permitirá desarrollar y estudiar modelos de enfermedades que requieren técnicas quirúrgicas difíciles de aplicar en los ratones (*The Jackson Laboratory, 2004*).

Importancia de los Ratones sobre otros Modelos Animales de Investigación

Las ventajas del ratón sobre otros animales experimentales incluyen: la capacidad para manipular la información genética nueva dentro de la célula y de transmitirla a la línea germinal, tiene un ciclo reproductivo muy corto y los tamaños de las camadas son relativamente grandes, su fácil producción bajo condiciones controladas y tienen alta tolerancia a la consanguinidad. Por otro lado, el ratón es un animal pequeño, manipulable y bien caracterizado, además, el conocimiento de la biología del ratón es grande. Es importante hacer notar que la conservación evolutiva nos ha mostrado que tanto los ratones como otros mamíferos son similares a los humanos, además se cuenta con muchas cepas consanguíneas diferentes, aproximadamente: unas 3000 cepas consanguíneas (Festing, 1982; Meraz y Sánchez 2001; *The Jackson Laboratory, 2004*; Benavides y Guénet, 2003).

INTRODUCCION

En los laboratorios se cuenta con grupos de roedores genéticamente definidos denominados cepas consanguíneas. La producción de estas cepas de ratones fue iniciada por Little en 1990 cuando los descendientes de una pareja fueron apareados hermanos con hermanas por más de 20 generaciones, dando así lugar a la primera cepa consanguínea de ratón conocida como cepa *DBA* (Benavides y Guénet, 2003).

Las cepas consanguíneas son un prototipo de líneas genéticamente estandarizadas debido a que su condición genética esta fijada en forma casi definida. La consanguinidad se origina cuando dos individuos que comparten uno o varios antecesores comunes, producen descendencia, la progenie es entonces consanguínea. La consanguinidad produce pérdida de variación genética porque los pares de genes heterocigóticos se vuelven homocigóticos. Este proceso es considerado perjudicial para las poblaciones de animales domésticos porque deprime la reproducción, la supervivencia y la productividad (CIENCIA al DIA Internacional, 2007). La consanguinidad está así mismo asociada con el incremento de defectos hereditarios (Benavides y Guénet, 2003). A largo plazo, la consanguinidad produce una pérdida de variación genética; es decir se produce una disminución de la frecuencia de los fenotipos heterocigotos y paralelamente genera una progresión hacia el estado homoalélico (una sola variante alélica presente), por esta razón cada línea consanguínea representa una colección única de genes imposible de repetir. (Benavides y Guénet, 2003).

Por esta razón, la mayor utilidad de las cepas consanguíneas radica en el hecho de que permiten realizar experimentos eliminando la variabilidad de origen genético y como sus características pueden permanecer constantes por largos períodos de tiempo éstas pueden ser usadas como base en la planificación de diferentes estudios (Papaioannou y Festing., 1980).

Según las reglas adoptadas por el comité sobre la nomenclatura genética estandarizada para el ratón en el año de 1978, se considera que una cepa consanguínea es “aquella que ha sido apareada hermanas con hermanos por veinte o más de 20

INTRODUCCION

generaciones consecutivas y es derivada de una sola pareja reproductora ancestral” (Green y col., 1981; Festing, 1982; 1993; Lyon y col., 1996).

La reducción de la heterocigosidad se expresa por el coeficiente de consanguinidad (F), que mide la disminución del número de *loci* heterocigotos después de varias generaciones consanguíneas y se define como la probabilidad de que dos alelos en un locus dado (en un individuo) sean idénticos por descendencia, es decir que ambos sean la replica de un mismo alelo ancestral. Para que una cepa sea considerada como consanguínea F debe ser igual a 99% valor alcanzado en la generación 20 de endocria, para que este valor alcance el 100% deben pasar unas 150 generaciones (Stanfield., 1992; Silver., 1995). 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.

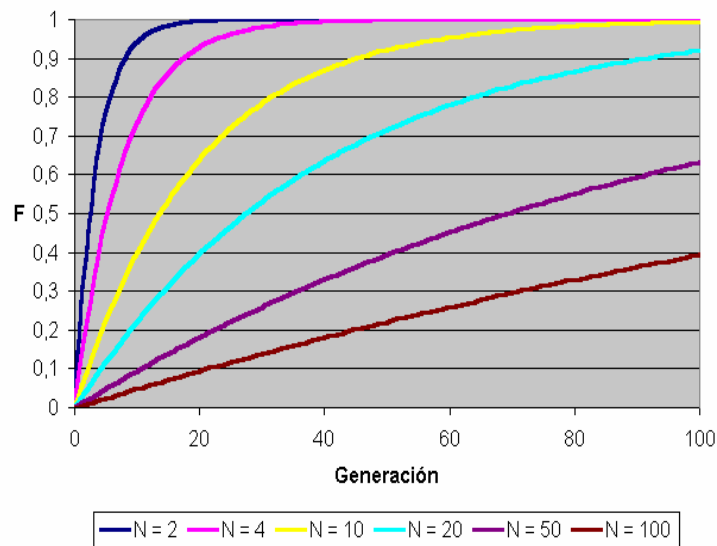


Figura 1: Efecto del número de parejas reproductoras (N) sobre el coeficiente de consanguinidad¹.

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

Las cepas consanguíneas pueden a su vez ser subdivididas en subcepas debido a la presencia de mutaciones espontáneas y a un mínimo grado de heterocigosis residual (1%) que se mantiene con el tiempo produciendo así divergencia de las líneas.

INTRODUCCION

Se puede considerar que las subcepas son formadas:

- Cuando una cepa se separa en diferentes ramas antes de la generación 40. En estos casos la heterocigosis residual puede estar presente.
- Cuando la rama de una línea ha sido mantenida separada de otras por mas de 100 generaciones, contando desde los ancestros comunes. En este caso, la existencia de diferencias alcanzadas por mutaciones es entonces altamente probable.
- Cuando se descubren diferencias génicas con otras ramas de la misma línea, ya sea por mutaciones o por contaminación genética. (Benavides y Guénet, 2003).

Características Generales de la Cepa Consanguíneas de Ratonés.

Las cepas consanguíneas presentan varias características generales que le confieren importancia científica. Estas características son: homocigosis, isogenicidad o igualdad génica, uniformidad fenotípica, larga estabilidad génica, identidad, individualidad, distribución internacional, datos del background o fondo genético (Institute of Laboratory Animal Research, 1979; Benavides y Guénet, 2003).

Homocigosis: todos los animales de una cepa consanguínea son homocigotos en un 99% de todos sus genes. Solo existirán genes recesivos en un estado heterocigoto en un 1% denominado heterocigosis residual (Nomura y col., 1985; Festing, 1982; Festing, 1993; Silver, 1995, Benavides y Guénet, 2003)

Isogenicidad o Igualdad Genética: isogénico significa todos los individuos de una cepa consanguínea determinada son genéticamente idénticos en un 99% de sus locus. Esta característica facilita los injertos de piel y de tumores entre miembros de una misma cepa (Nomura y col., 1985; Festing, 1982; Festing, 1993; Silver, 1995, Benavides y Guénet, 2003).

Uniformidad Fenotípica: debido a que los animales pertenecientes a una misma cepa consanguínea son isogénicos, estos serán uniformes con respecto a todas las

INTRODUCCION

características heredables tales como polimorfismo, características cualitativas o cuantitativas como peso corporal, tamaño de las camadas y otras conductas (Nomura y col., 1985; Festing, 1982; Festing, 1993; Silver, 1995, Benavides y Guénet, 2003).

Larga Estabilidad Genética: las cepas consanguíneas solo pueden cambiar su constitución genética como resultado de la manifestación de la heterocigosis residual, debido a la contaminación genética o por efecto de mutaciones. Esto permite estudiar y comparar los resultados experimentales entre animales de diferentes laboratorios y a lo largo del tiempo (Nomura y col., 1985; Festing, 1982; Festing, 1993; Silver, 1995, Benavides y Guénet, 2003).

Identidad: si el patrimonio genético de una cepa consanguínea es alterado porque accidentalmente es cruzada con otra cepa la nueva condición genética puede ser detectada por procedimientos de control de calidad genética (Nomura y col., 1985; Festing, 1982; Festing, 1993; Silver, 1995, Benavides y Guénet, 2003).

Individualidad: cada cepa es genéticamente única cada una de ellas fija una serie de caracteres que le dan individualidad con respecto a sus cualidades y la hacen diferentes de otras cepas en un amplio rango de características (Nomura *et al.*, 1985; Festing, 1982; 1993; Silver, 1995, Benavides y Guénet, 2003).

Distribución Internacional: la mayoría de las cepas tienen distribución internacional; cualquier experimento puede ser repetido en cualquier parte del mundo sin que existan variaciones con respecto a la genética del animal que se está usando como modelo esto conlleva a resultados reproducibles (Nomura y col., 1985; Festing, 1982; 1993; Silver, 1995, Benavides y Guénet, 2003).

Datos de “Background” o Fondo Genético: se refiere a los registros existentes sobre datos relacionados al fondo o perfil genético de las cepas, las cuales hoy en día se encuentran en una amplia gama de literatura usada comúnmente para la planificación e interpretación de resultados experimentales (Nomura y col., 1985; Festing, 1982; Festing, 1993; Silver, 1995, Benavides y Guénet, 2003).

INTRODUCCION

Características de la Cepa *C57BL/6*

Los ratones *C57BL/6* son una subcepa que se derivan de la cepa consanguínea *C57BL*, fueron producidos por Little en el año 1921 de un apareamiento de la hembra 57 con el macho 52 de la producción de Abby Lathro's, son ratones de color negro (el genotipo para el color esta dado por los genes a; B; C y D), (Tabla 1). Dentro de sus características reproductivas, se encuentra que éstas mantienen un promedio de seis crías nacidas por camada (*The Jackson Laboratory 2004; Aceanimal, 1999*).

El genotipo que caracteriza el color del pelaje de la cepa de ratones consanguínea *C57BL/6* se expresa en la siguiente tabla.

Tabla 1: Genes del color del pelaje del ratón.

Cepa	Color	Genotipo			
<i>C57BL/6</i>	Negro	aa	BB	CC	DD

Fuente: Benavides y Guénet 2003.

Locus A (cromosoma 2) controla la cantidad relativa de los pigmento amarillos (feomelanina) y negro (eumelanina), El pigmento que se producirá depende de la interacción entre los componentes del sistema regulador de síntesis de pigmentos conformado por: **a)** la hormona melanocortina u hormona estimulante de los melanocitos (**MSH**, del inglés *melanocyte stimulating hormone*), la cual es elaborada por la hipófisis, glándula endocrina situada en la base del cerebro; **b)** el receptor de la MSH conocido como **MSH-R** (del inglés *melanocyte stimulating hormona receptor*) o **MC1R** y **c)** la **proteína Agutí**. La unión de la MSH al MC1R estimula a la enzima tirosinasa favoreciendo la ruta metabólica para la síntesis de eumelanina, mientras que la unión de la proteína Agutí actúa como antagonista inhibiendo la señal de transducción por bloqueo de la acción melanocortina del MC1R y es favorecida la ruta alternativa de síntesis de feomelanina (Robbins y col., 1993; Klungland y col., 1995; Ayala y col., 2006). La síntesis de la melanina consta de una serie de reacciones enzimáticas que tienen lugar en el interior de unas organelas especializadas llamadas melanosomas. La tirosinasa, la TRP-1 y la TRP-2 son las enzimas más importantes entre las que

INTRODUCCION

intervienen en la melanogénesis. La tirosinasa transforma la tirosina en 3-4 DOPA, y posteriormente, convierte ésta en dopaquinona. A continuación, la TRP-1 y TRP-2 intervienen en la síntesis de eumelanina, mientras que la feomelanina se obtiene mediante la incorporación de derivados sulfatados por una vía anabólica alternativa (Ayala y col., 2006).

Locus B (cromosoma 4) actualmente llamado *Tyrp I* (proteína relacionada con la Tirosinasa), presenta los alelos B (negro) y b (marrón); ambos *loci* (A y B) se ven afectados por la regulación del locus C, el cual activa o reprime su expresión y el locus D que determina la decoloración (Giffiths y col., 1995).

Locus C (cromosoma 7) denominado históricamente locus albino, es el gen de la Tirosinasa (*Tyr*) enzima que realiza la oxidación de la tirosina hacia melanina, lo que determina la presencia de pigmento. El alelo c es la mutación del gen. El alelo C (dominante) produce un fenotipo con color pues permite la expresión de los *loci* A y B (Giffiths y col., 1995).

Locus D (cromosoma 9) cuyo nombre actual es *Myo5a* (miosin Va) regula la distribución de los gránulos de melanina dentro de los melanocito. El alelo D (dominante) produce una distribución regular de pigmento. El alelo d (resivo) es una mutación del gen que produce irregularidad en la distribución de pigmentos es decir un fenotipo con una notable dilución del color (Giffiths y col., 1995).

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 se acumulen diferencias en las reservas genéticas de la nueva población, las cuales son producto de la operación independiente de diversos procesos, tales como: la consanguinidad, la selección y la deriva genética (Zuñiga y col., 2000). La actuación de cada uno de estos procesos, dirige a la población

INTRODUCCION

hacia una divergencia genética, que se traducirá luego en la diferenciación entre los grupos formados a partir de la población inicial (Zuñiga y col., 2000).

Existen 3 procesos claramente definidos que afectan la composición genética de los roedores de laboratorio:

1. La consanguinidad es el primer proceso que afecta la composición de las poblaciones de laboratorio, no es más que un aumento en la condición de homocigosidad de los animales es decir pares de genes que eran heterocigotos se vuelven homocigotos, por ende esto 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 y col., 2000).

La depresión por consanguinidad es una de las consecuencias negativas de la consanguinidad. 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 y col., 2000).

2. 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 primera 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

INTRODUCCION

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 la misma que en sus parentales y es aquí, en donde la selección ocasiona cambios en la frecuencia génica y consecuentemente en la frecuencia genotípica de los nuevos individuos (Zuñiga y col., 2000).

El segundo tipo de selección: la 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 fueran iguales (Zuñiga y col., 2000).

3. Otro de los procesos es la deriva genética. Esta puede definirse por modificaciones en las frecuencias alélicas al azar. 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 y col., 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 (Suzuki y col., 1993).

La Contaminación Genética y los Controles de Calidad

Cuando se considera una colonia de animales de laboratorio la cual mediante manejo zootécnico se ha llevado a una condición genética de alta consanguinidad, hablamos de una cepa consanguínea, que como ya se dijo anteriormente, dos de sus principales características son la homocigosidad (99% de sus alelos en condición

INTRODUCCION

homocigoto) y la isogenicidad (99% de sus *loci* iguales). El manejo zootécnico se realiza principalmente mediante el esquema de producción que se desarrolla para lograr después de 20 generaciones las características antes señaladas. El esquema de producción planteado para la obtención de las cepas consanguíneas esta dado por estructuración de un núcleo de fundación, constituido generalmente por dos parejas reproductoras que definen dos líneas paralelas, ya que nunca se deben cruzar individuos pertenecientes a éstas. A continuación se encuentra un núcleo de expansión constituido por pocas parejas; la cantidad depende de la demanda de la cepa y por último por un núcleo de producción en el cual se encuentran un número mayor de parejas reproductoras. El esquema de producción de las cepas consanguíneas se encuentra estructurado, entonces, en forma piramidal tal como se representa en la figura 2, considerándose de primordial importancia el control genético del núcleo de fundación (Zuñiga y col., 2000).

Como se dijo anteriormente, las cepas consanguíneas se caracterizan por la condición de homocigosis en el 99% de los alelos de los individuos que conforman la colonia, esta condición se manifiesta en las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas o de cualquier otra índole que definan su fenotipo, siendo éste el resultado de la interacción entre su genotipo y el ambiente (dramatipo). Por tanto, dado que el ambiente de los bioterios debe ser estandarizado para cada especie, por lo que debe estar rigurosamente controlado, entonces, 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 ya que alteraciones de éste, por cualquier tipo de alteración genética conducirá a resultados no reproducibles (Zuñiga y col., 2000). Se debe aclarar que la alteración de la condición homocigoto u homoalélismo a una condición heterocigota se denomina “contaminación genética”. (Zuñiga y col., 2000).

INTRODUCCION

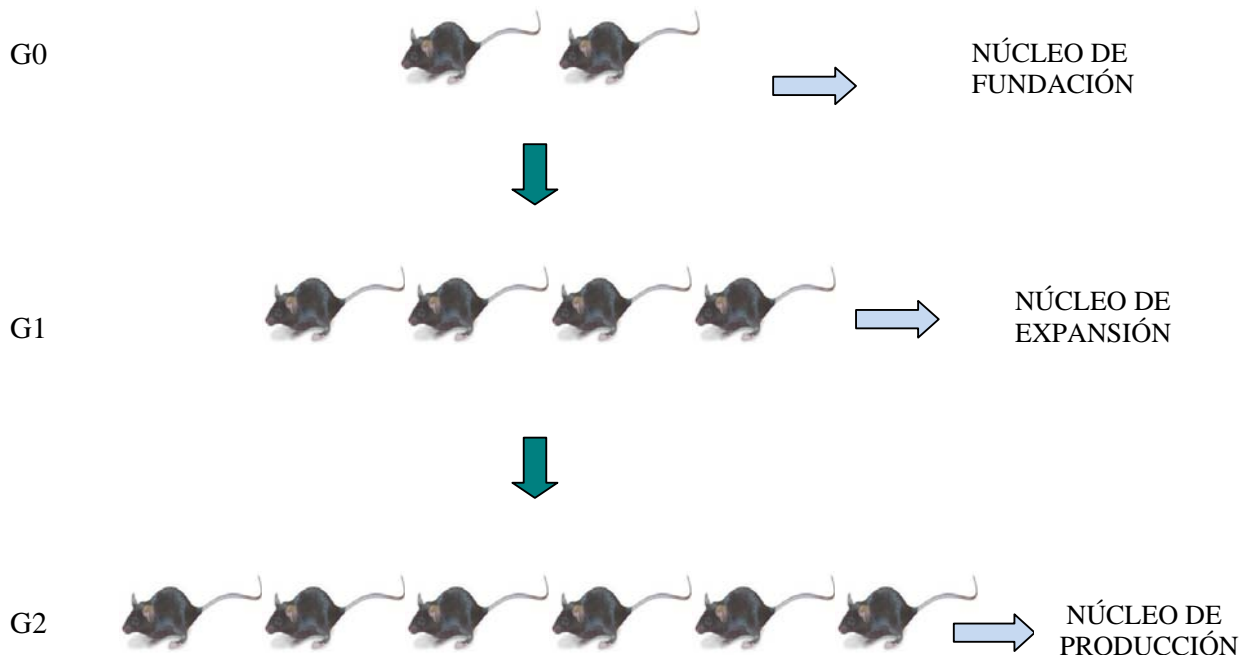


Figura 2: Estructura piramidal diseñada para evitar cruzamientos accidentales, en los sistemas de cría de cepas consanguíneas (*C57BL/6//Aly//BIO*)

Fuente: *The Jackson Laboratory* (2003). Modificado

Para detectar posibles contaminaciones genéticas, se utilizan diferentes pruebas, las cuales tienen como fundamento técnicas desarrolladas a nivel molecular y a nivel fenotípico. Entre las primeras tenemos por ejemplo la que usa marcadores bioquímicos, marcadores de histocompatibilidad tisular y marcadores de ADN. Entre las segundas, la que se fundamenta en marcadores de caracteres morfológicos (Bailey, 1982); métodos que utilizan marcadores inmunológicos (Bonhomme y cols., 1983; West y cols., 1985; Kahan, 1987), las que analizan el color del pelaje, las características reproductivas y características fisiológicas, entre otras.

Marcadores Bioquímicos

Con el avance tecnológico ocurrido en los años 70, el uso de geles de almidón y la tinción histoquímica de las proteínas, se demostró dentro de un organismo la existencia de las isoenzimas, formas moleculares múltiples dentro de un organismo que

INTRODUCCION

catalizan una misma reacción. El efecto de una modificación alélica puede ser detectado con certeza, debido a un cambio de movilidad electroforética de las isoenzimas en el gel. Esta sensibilidad electroforética hizo que la técnica haya revolucionado los estudios de diversidad genética en diversas especies (Zuñiga y col., 2000).

Las principales características de las isoenzimas incluyen la simplicidad, el bajo costo y una cobertura del genoma de 10-20 *loci* por especie. La expresión alélica es de tipo codominante, lo que permite establecer comparaciones entre especies, poblaciones de una misma especie, y detectar la presencia de híbridos e introgresión de genes (Paredes y Gepts, 1995).

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 de enzimas (isoenzimas), que no interfieren en su funcionalidad, pero que hacen que éstas presenten diferencias en su RF 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 (Zuñiga y col., 2000).

Si analizamos este polimorfismo isoenzimático, los resultados permiten la caracterización genética de una línea de ratones o ratas determinadas (Zuñiga y col., 2000), es decir se logra obtener información indirecta, pero precisa, sobre la constitución genética de los animales, pudiendo detectarse contaminación con la sola presencia de patrones anormales para la línea.

Los principales inconvenientes de estos marcadores son que deben llevarse a cabo protocolos específicos para cada isoenzima, otro aspecto a considerar es que las proteínas, siendo un producto del ADN, pueden ser afectadas cualitativa y cuantitativamente en su nivel de expresión por factores ambientales y que requieren de grandes cantidades de tejido con el consecuente sacrificio de animales (Benavides y Guénet, 2003).

Histocompatibilidad Tisular

El sistema inmunitario provee a los mamíferos de un mecanismo de defensa frente a la invasión por cuerpos extraños y organismos patógenos (Benavides y Guénet, 2003). El reconocimiento de tales agentes se efectúa a través de los anticuerpos, moléculas proteicas que se unen en forma específica a los antígenos, que son todas aquellas moléculas que no reconocen como propias. Consecuencia de ello es también el rechazo de los trasplantes de órganos provenientes de otros congéneres (Benavides y Guénet, 2003).

Puesto que 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 (Benavides y Guénet, 2003), el uso de trasplantes de piel supone un poderoso método para el control de la pureza genética de animales de laboratorio, pues tales trasplantes serán rechazados si el individuo donante y el receptor no son genéticamente idénticos (Zuñiga y col., 2000).

Por medio de esta técnica se pueden evaluar cientos de *loci* de histocompatibilidad simultáneamente en forma accesible a cualquier laboratorio, pues no requiere ni reactivos ni instrumental específico. El protocolo más recomendable consiste en transplantar 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 ejecución (Nomura y col., 1984; Benavides y Guénet, 2003).

Análisis del 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 confrontarlo con el estándar para la línea. Este es un método muy económico, fácil de realizar y muy eficiente para detectar cruzas accidentales recientes en una colonia de líneas albinas (Altman y Katz, 1979; Benavides y Guénet, 2003).

Análisis de Molecular para el Estudio de la Condición Genética de los Ratones de Laboratorio

Todos los métodos, antes mencionados para detectar alteraciones en la condición genética en estas cepas tienen como fundamento el análisis del producto de la expresión de los genes (Zúñiga y col., 2000).

En la actualidad se utilizan técnicas que se basan en el análisis directo del genoma de los animales, tales como son el análisis de marcadores moleculares, entre éstos: polimorfismos de los fragmentos de restricción (*RFLP's*), (Wang y col., 1992; Doebley y Wendel, 1989, Foolad y col., 1995); Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD), (Williams y col., 1990); minisatélites (Heat y col., 1993); microsátélites; Polimorfismos de Repetición o de longitud (*SSLP's* iniciales en inglés); la huella del ADN (*fingerprinting*: en el inglés) y los Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP's) (Griffith y col., 1999; Tolwani y Otto, 2002).

Para el análisis de los microsátélites se usa como herramienta la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ésta es relativamente menos complicada de aplicar que la de los marcadores bioquímicos e inmunológicos, mediante esta técnica se puede amplificar las secuencias repetitivas de ADN (microsatélites) usando *primers* (*cebadores*) específicos (Love y col., 1990) la cual puede permitir la identificación y comparación de cepas consanguíneas de ratones (Montagutelli y col., 1991), considerándose este análisis como una herramienta valiosa en la detección de alteraciones genéticas o contaminaciones genéticas.

Marcadores Moleculares Microsatélites.

Las secuencias de ADN de minisatélites (*Variable Number Tandem Repeat*) y microsatélites (*Simple Single Repeat*) son dos categorías de secuencias repetidas que se presentan en eucariontes. Ellas se encuentran repetidas en *tandem* y dispersas a través del genoma representando muchos *loci*. Cada *locus* tiene distinto número de repeticiones variable, asociándose de esta manera a alelos específicos de alta variabilidad. A través del uso de estos marcadores se han obtenido patrones complejos de ADN en animales, plantas, y microorganismos (Brondani y col., 1998).

Los minisatélites han sido usados para estudiar diversidad genética y realizar la identificación de individuos (*fingerprinting*) en diversas especies (Stockton y col., 1990; Ramakrishna y col., 1995).

Los microsatélites son secuencias de 1 a 5 nucleótidos repetidas en *tandem*. Mediante los microsatélites se puede medir la diversidad entre genotipos, amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. El uso de microsatélites ha ido aumentando debido a la producción de bibliotecas de cebadores y la secuenciación automática fluorescente, ambas permiten el diseño de los cebadores que rodean los microsatélites (Brondani y col., 1998). Los fragmentos generados por amplificación mediante la PCR, son separados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y visualizados radioactivamente o por tinción con nitrato de plata.

Los microsatélites son muy atractivos para los genetistas pues combinan varias ventajas como son su codominancia, multiallelismo y su alta heterocigosidad (Brondani y col., 1998). El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos, los microsatélites usan cantidades mínimas de ADN, equivalentes a las que se usan en *RAPD*. Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicas y la variación en la longitud de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas (Ramakrishna y col., 1995).

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

INTRODUCCION

sirven de molde para la hibridación de los oligonucleótidos iniciadores en la técnica de PCR.

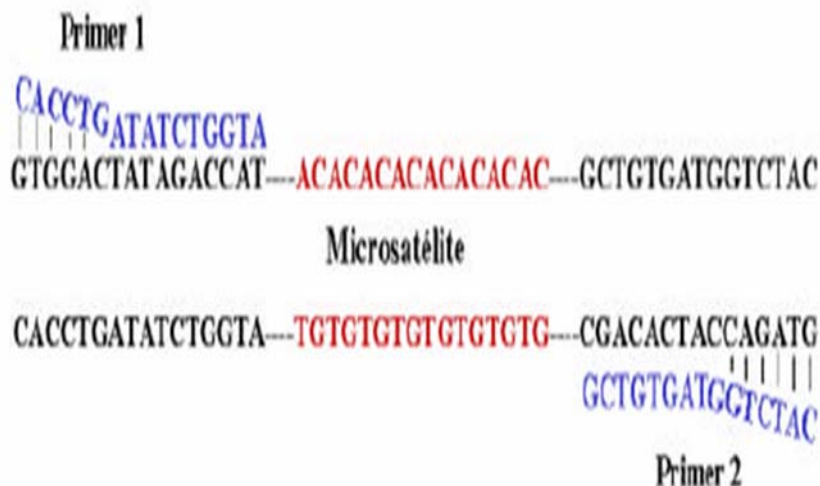


Figura 3: esquema que ilustra la composición de una región microsatélite en una cadena de ADN².

²[http://www. Terralia.com/revista12/pagina981.htm](http://www.Terralia.com/revista12/pagina981.htm).

En la figura 4, 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. Como se observa en la figura, 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 los locus A y B del individuo 2. Cuando no hay diferencias en pares de bases entre los alelos de un mismo *locus*, se presenta una condición de homocigosis.

INTRODUCCION

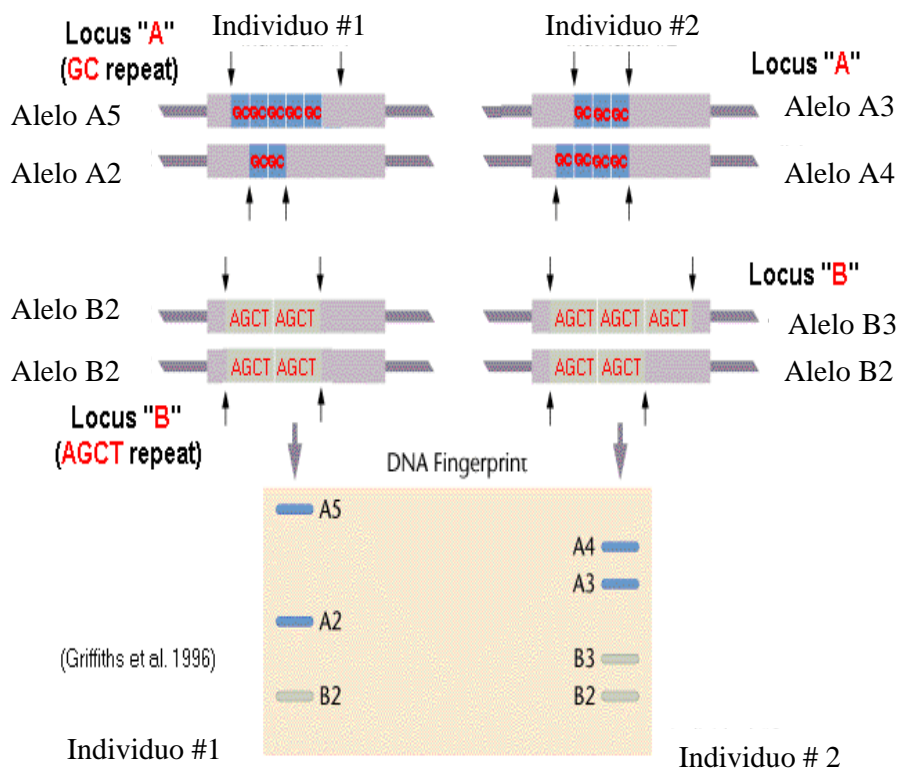


Figura 4: Uso de los microsatélites como marcadores moleculares³.

³Griffiths y col., 1996

En general, la amplificación de microsatélites ha demostrado que éstos son más variables que isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD. Por ejemplo, en *Cucumis* 29 isoenzimas no mostraron polimorfismo entre dos genotipos comerciales (Perl-Treves y col., 1985). Dentro del mismo género, mediante el uso del RAPD detectó un 38% de polimorfismo, mientras que los microsatélites detectaron un 71%, e incluso detectaron diferencias genéticas entre cultivares altamente emparentados que mediante otras técnicas no habían podido ser distinguidos (Katzir y col., 1996). Es así como se ha comprobado, en diversas especies, la complementariedad de todas las técnicas mencionadas anteriormente en el estudio global de la organización genética del germoplasma (Katzir y col., 1996).

Una de las desventajas de los microsatélites es el tiempo y costo involucrado en el proceso del diseño de cada cebador, sin embargo existe la posibilidad de usar los mismos cebadores en más de una especie (Katzir y col., 1996).

Análisis de Características Fisiológicas de los Ratones del Laboratorio.

Existen también parámetros fisiológicos que caracterizan a cada cepa consanguínea. Variables tales como el hematocrito, el recuento de eritrocitos y linfocitos, el contenido de hemoglobina, la tasa de reproducción, promedio de individuos por camada, tasa de crecimiento, longevidad y la respuesta a tratamientos farmacológicos. Deben ser identificadas en todas las líneas consanguíneas para comprobar que sus valores se encuentran dentro de los límites normales de la misma (Benavides y Guénet, 2003).

Parámetros zootécnicos: Caracteres Reproductivos

Los caracteres reproductivos en los roedores de laboratorio están representados por distintas variables; entre éstas se encuentran: el número de crías nacidas por camada de los ratones y ratas de laboratorio, característica propia de cada línea o colonia, el número de cría destetadas, los períodos entre partos entre otras (Benavides y Guénet, 2003). Los promedios de estas variables son utilizados en la caracterización de las cepas consanguíneas debido a que las mismas están determinadas genéticamente (Benavides y Guénet, 2003). La primera variable enunciada (número de crías nacidas por parto) es utilizada 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 cepa o colonia. En este caso es aconsejable realizar otros controles más precisos para confirmar dicha sospecha (Benavides y Guénet, 2003).

Variables Fisiológicas: crecimiento (ganancia de peso y talla)

Existen caracteres fenotípicos que se pueden emplear como indicadores de posibles contaminaciones genéticas, entre estos se pueden tomar en cuenta la ganancia de peso y talla; además, que el monitoreo continuo de éstas permiten caracterizar las cepas consanguíneas que se producen en cualquier bioterio (Benavides y Guénet, 2003).

INTRODUCCION

Estos parámetros deben ser conocidos en todo animal de laboratorio para comprobar qué tanto varían dentro de los rangos de valores normales establecidos para las distintas cepas consanguíneas. Por ejemplo, uno de los productores más importantes en la reproducción de animales de laboratorio, *The Jackson Laboratory*, cuenta con una base de datos muy completa, en donde se encuentra registrada toda la información fenotípica y fisiológica de las cepas y colonias de roedores que se producen en dichos laboratorios. La Figura 5, presenta la curva de crecimiento, tanto para hembras como para machos, de la cepa consanguínea *C57BL/6* de *The Jackson Laboratory*.

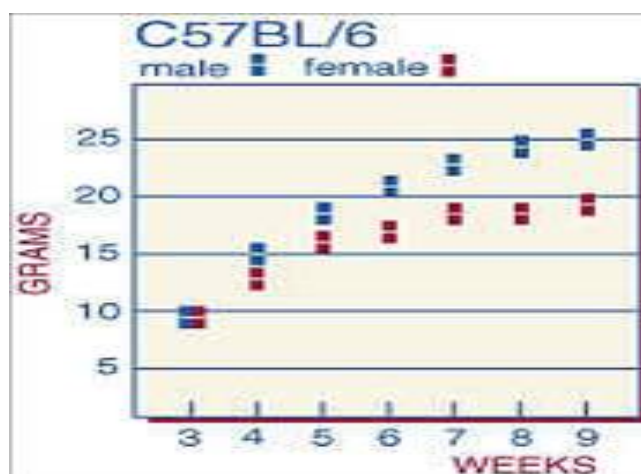


Figura 5: Curva de crecimiento de la cepa consanguínea *C57BL/6*⁴.

Fuente: ⁴<http://www.informatics.jax.org>.

Variables Fisiológicas: Parámetros Hematológicos

La sangre se puede separar por centrifugación en sus componentes celulares 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 da un color amarillo pálido típico. Los componentes celulares pueden constituir un 30-50% del volumen de la sangre (variable según las especies), (Cunninghan, 2003). Los

parámetros hematológicos están dados por: el hematocrito, la hemoglobina y la cuenta leucocitaria (Cunningham, 2003).

Hematocrito

Se define el hematocrito (Hto) como la fracción de volumen que los eritrocitos o hematíes ocupan en un volumen de sangre. La principal función de estas células, es transportar hemoglobina, la cual lleva el oxígeno desde los pulmones a los tejidos. Los hematíes, además de transportar la hemoglobina, tienen la función de catalizar la reacción entre el dióxido de carbono y el agua, gracias 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 hematíes son responsables de la mayor parte del poder amortiguador de la sangre (Guyton y Hall, 1997).

Los hematíes aparecen como células redondeadas teñidas de color rosa brillante, debido a la hemoglobina transportadora de oxígeno, 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 la cual optimiza el intercambio de oxígeno. Los eritrocitos de mamíferos carecen de núcleo, el cual se pierde durante su formación (Stevens y Lowe, 1997).

Hemoglobina.

Hemoglobina (Hb), es una heteroproteína de la sangre, la hemoglobina de los vertebrados, excepto la de los ciclóstomos, tiene un peso molecular de 68000 kDa, de color rojo característico, este color puede cambiar dependiendo de su contenido en oxígeno (O_2), el cual es transportado desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, en mamíferos, ovíparos y otros animales. A la hemoglobina la forman cuatro cadenas

INTRODUCCION

polipeptídicas (globinas) a cada una de las cuales se une un grupo hemo, cuyo átomo de hierro se le une de forma reversible el oxígeno. El grupo hemo se forma por:

1. Unión de la Succinil CoA (formado en ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico) a un aminoácido glicina formando un grupo pirrol.
2. Cuatro grupos pirrol se unen formando la Protoporfirina IX.
3. La protoporfirina IX se une a una molécula de hierro ferroso (Fe^{2+}) formando el grupo hemo (Eckert, 1998).

Los hematíes 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, 1998).

Glóbulos Blancos

Los glóbulos blancos o leucocitos forman parte de los efectores celulares del sistema inmunológico; siendo células con capacidad migratoria, utilizan la sangre como vehículo para acceder a diferentes partes del cuerpo. Los leucocitos son los encargados de destruir los agentes infecciosos y las células infectadas y también de secretar sustancias protectoras como los anticuerpos, combatiendo las infecciones. (Guyton y Hall, 1998).

El conteo normal en mamíferos de leucocitos está en un rango entre 4.500 y 11.500 células por mm^3 (o microlitro) de sangre, variable según las condiciones fisiológicas de los individuos (embarazo, stress, deporte y edad.) y patológicas (infección, cáncer,

inmunosupresión y aplasia). El recuento porcentual de los diferentes tipos de leucocitos se conoce como "fórmula leucocitaria". Según las características microscópicas de su citoplasma (tintoriales) y su núcleo (morfología), las células se identifican como:

- **los granulocitos o células polimorfonucleares:** que son los neutrófilos, basófilos y eosinófilos; poseen un núcleo polimorfo y numerosos gránulos en su citoplasma con tinción diferencial según los tipos celulares.
- **los agranulocitos o células monomorfonucleares:** que son los linfocitos y los monocitos; sin gránulos en el citoplasma y con núcleo redondeado (Stevens y Lowe, 1997; Guyton y Hall, 1998).

Granulocitos o células polimorfonucleares

- ❖ **Neutrófilos:** son células presentes en sangre entre 2.500 y 7.500 células por mm^3 . Estas células se tiñen pálidamente, de ahí su nombre. Éstas se encargan de fagocitar sustancias extrañas (bacterias, agentes externos, etc.) que entran en el organismo. En situaciones de infección o en inflamación, su número aumenta en la sangre (Stevens y Lowe, 1997).
- ❖ **Basófilos:** estas células, se cuentan de 0.1 a 1.5 células por mm^3 en sangre, comprendiendo un 0.2-1.2% de los glóbulos blancos. Presentan una tinción basófila, lo que los define. Estas células secretan sustancias como la heparina, de propiedades anticoagulantes, y la histamina que contribuyen con el proceso de la inflamación (Stevens y Lowe, 1997).
- ❖ **Eosinófilos:** son células presentes en la sangre de 50 a 500 células por mm^3 (1-4% de los leucocitos). Su número aumenta debido a enfermedades producidas por parásitos, en las alergias y en el asma (Stevens y Lowe, 1997).

Agranulocitos o células monomorfonucleares

- ❖ **Monocitos:** se encuentran en un número entre 150 y 900 células por mm^3 (2% a 8% del total de glóbulos blancos). Esta cifra se eleva casi siempre por infecciones originadas por virus o parásitos. También en algunos tumores o leucemias. Son células con núcleo definido y con forma de riñón. En los tejidos se diferencian hacia macrófagos o histiocitos (Stevens y Lowe, 1997).
- ❖ **Linfocitos:** el valor normal entre 1.300 y 4000 por mm^3 (24% a 32% del total de glóbulos blancos). Su número aumenta sobre todo en infecciones virales, aunque también en enfermedades neoplásicas (cáncer) y pueden disminuir en inmunodeficiencias. Los linfocitos son los efectores específicos del sistema inmunológico, ejerciendo la inmunidad adquirida celular y humoral. Hay dos tipos de linfocitos, los linfocitos B y los linfocitos T. (Stevens y Lowe, 1997).

Recuento Diferencial Celular

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 la sangre periférica normalmente es de 4,0 a $11,0 \times 10^9$ / litro.

Hay cinco grandes tipos de leucocitos y sus nombres y proporciones relativas en la circulación son las siguientes: neutrofilos: 55 - 70%; eosinofilos: 1 - 4 %; basofilos: 0,2 – 1.2 %; linfocitos: 24 – 32 % y monocitos: 2 – 8 % (Stevens y Lowe, 1997).

Si hay una necesidad de aumentar la actividad de cualquiera de los tipos celulares en los tejidos periféricos, aumentará el número y las proporciones de ese determinado tipo celular (Stevens y Lowe, 1997).

INTRODUCCION

Tabla 2: Parámetros hematológicos de hematocrito, hemoglobina, globulos blancos y recuento diferencial, para la cepa consanguínea, producida en *The jackson Laboratory*⁵.

Fuente: ⁵ <http://www.informatics.jax.org>

Valores hematológicos	♂ 8 Semanas	♀ 8 Semanas
Hemoglobina (g/dl)	16.2	17.0
Hematocrito (Vol. %)	52.1	51.5
Glóbulos blancos (x100mm ³)	2.62	3.48
Linfocitos (%)	76.7	88.6
Neutrófilos Seg. (%)	18.5	7.4
Eosinófilos (%)	2.6	2.6

Variables Fisiológicas: Parámetros Bioquímicos

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 escasez (después del ayuno), por el ajuste de las concentraciones sanguíneas de insulina y glucagón. 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 desórdenes o

desequilibrios en el organismo, así como también, la caracterización fisiológica de una especie animal específica (Lodish y col., 2002).

Colesterol

Es un lípido esteroide, molécula de ciclo pentano perhidrofenantreno (o esterano), constituida por cuatro carbociclos condensados o fundidos, denominados A, B, C y D, que presentan varias sustituciones:

1. Dos radicales metilo en las posiciones C-10 y C-13.
2. Una cadena alifática ramificada de 8 carbonos en la posición C-17.
3. Un grupo hidroxilo en la posición C-3.
4. Una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6.

En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos. Así, el colesterol es una molécula tan hidrófoba que la solubilidad de colesterol libre en agua es de 10^{-8} M y, al igual que los otros lípidos, es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo (CHCl_3). (Stevens y Lowe, 1997).

Los organismos mamíferos obtienen colesterol a través de dos vías, una vía exógena o absorción de colesterol contenido en los alimentos, y una vía endógena o síntesis de novo, en cuyo proceso se realiza la síntesis de colesterol en las células animales a partir de su precursor, el acetato, en su forma activada acetil-coenzima A. (Lodish y col., 2002).

Creatinina

Es un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina (que es un nutriente útil para los músculos). Es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que usualmente es producida por el cuerpo en una tasa muy

INTRODUCCION

constante (dependiendo de la masa de los músculos), y normalmente filtrada por los riñones y excretada en la orina. La medición de la creatinina es la manera más simple de monitorear la función de los renal (Lodish y col., 2002).

Tabla 3: Parámetros bioquímicos de glucosa, colesterol y creatinina para la cepa consanguínea *C57Bl/6*, producida en *The Jackson Laboratory*⁶.

Fuente: ⁶<http://www.informatics.jax.org>

Valores Bioquímicos	♂	♀
	8 Semanas	8Semanas
Glucosa (mg/dl)	156	176
Colesterol (mg/dl)	63,7	89,9
Creatinina (mg/dl)	1,2	1,3

HIPOTESIS

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Si los grupos de ratones consanguíneos producidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes conservan su condición de homocigosidad e isogenicidad, al realizar el análisis de marcadores moleculares microsatélites, mediante la técnica de la PCR, encontraremos para éstos una condición homo-alélica, la cual será comparada con lo reportado en la base de datos de *The Jackson Laboratory*. Por otra parte, al analizar algunas características fisiológicas, tales como: ganancia de peso y talla, variables hematológicas y bioquímicas encontraremos similitud con los valores reportados en bases de datos para éstos, evidenciándose así, que las colonias conservan su condición genética.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la condición genética y fisiológica de la cepa *C57Bl/6//Aly//BIO* producida en el Bioterio de la Universidad de Los Andes.

Objetivos Específicos

1. Estudiar la condición genética de los ratones de la cepa *C57Bl/6//Aly//BIO* usando marcadores moleculares microsatélites usando PCR.

- Estandarizar la técnica de extracción de ADN de tejido de ratones
- Determinar de la calidad del ADN mediante espectrofotometría y electroforesis.
- Estandarizar la técnica de PCR, realizando curvas de concentración de cloruro de Magnesio y oligonucleótidos iniciadores.
- Identificar los alelos para cada uno de los *loci* de los 8 microsatélites seleccionados en las cepas de ratones consanguíneos (*C57Bl/6//Aly//BIO*).
- Comparar los resultados de los productos de amplificación con la base de datos de *The Jackson Laboratory*.

2. Estudiar algunas características fisiológicas de la cepa *C57Bl/6//Aly//BIO*.

- Extraer los datos de los registros de producción registrados durante 12 años de producción de la cepa en el bioterio de la Universidad.
- Analizar los datos extraídos de los registros de producción de los parámetros reproductivos de la cepa *C57Bl/6//Aly//BIO*
- Realizar las curvas de ganancia de peso y talla, para las hembras y los machos de la cepa *C57Bl/6//Aly//BIO*.
- Realizar pruebas hematológicas y de bioquímica sanguínea, para caracterizar la cepa.

JUSTIFICACION

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Los animales para la investigación producidos en los bioterios deben mantener las características específicas de acuerdo a la condición genética de cada cepa o línea, que se expresan en las: características requeridas en las investigaciones y por el investigador.

La cepa *C57BL/6* debe caracterizarse por presentar una alta condición de homocigosis en sus alelos y de isogenicidad en los *loci* de la colonia, a su vez debe tener características fisiológicas que le confieren individualidad, de aquí la necesidad de caracterizar genética y fenotípicamente la cepa consanguínea *C57BL/6//Aly//BIO* producida en el Bioterio de la Universidad de Los Andes desde hace doce años, con la finalidad de observar si ésta mantiene aún las características referidas por las bases de datos para los animales pertenecientes a ésta, o si puede ser una subcepa de ésta; *C57Bl/6//Aly//BIO* y de esta manera poder ofrecer a los investigadores usuarios animales de calidad definida.

METODOLOGIA.

Análisis del ADN con marcadores moleculares microsatélites: para la cepa *C57Bl/6//Aly//BIO* (núcleo de fundación).

Extracción de ADN genómico de la cepa consanguínea *C57Bl/6//Aly//BIO* a partir de tejido de oreja mediante digestión con Ananasa (comunicación personal profesor Néstor González).

La extracción de ADN de la cepa de ratones consanguíneas *C57Bl/6//Aly//BIO*, se realizó a cada uno de los individuos que conforman el núcleo de fundación de dicha cepa (10 individuos en total), los cuales se encuentran dentro de los aisladores (Figura, 6) del Bioterio de la Universidad de Los Andes. Es importante mencionar que se tuvo el máximo cuidado al momento de manipular a los animales de dicha cepa, para producir el mínimo dolor y estrés de los animales, al igual que cuando se tomaron las muestras de tejido de la oreja en animales sin destetar hay que tener el máximo cuidado de no sangrar los animales para que no sean sacrificados por sus progenitores.



Figura 6. Sistemas de aisladores utilizados para la producción de los ratones de la cepa *C57Bl/6//Aly//BIO*.

METODOLOGIA

El fundamento de esta técnica, consiste en la digestión de la muestra de tejido de la oreja utilizando NaCl 6M y Ananasa (20 mg/ml). Para la obtención del tejido de oreja de ratón, 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 colocaron en tubos eppendorf estériles. 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 y se adicionaron al tubo eppendorf 400 µl de solución 1 (ver apéndice A), 40 µl de solución SDS al 10% y 8 µl de Ananasa (20 mg/ml) para conformar la solución 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 ref, se colectó y transfirió el sobrenadante a 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 RPM en frío por 30 minutos. Finalmente, el *pellet* fue recuperado y resuspendido en 50 µl de agua mega pura (comunicación personal profesor Néstor González).

Con la finalidad de mejorar la calidad del ADN y optimizar el protocolo de extracción, se realizó un paso de purificación adicional a dicha extracción. A las muestras con el ADN se les realizó nuevamente una precipitación con NaCl y etanol, según (Sambrook y col., 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 10.000 RPM, 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 seco en la estufa a 37 °C, posteriormente fue resuspendido y almacenado en 50 µl de agua nanopure.

Estimación de la cantidad y calidad del ADN de la colonia de la cepa consanguínea C57Bl/6//Aly//BIO por espectrofotometría

Para la estimación de la concentración de ADN genómico obtenido mediante el método de extracción con Ananasa, se realizó la dilución de 5 μ l de ADN de cada muestra en 995 μ l de agua destilada estéril (5/1000). Luego se realizaron las medidas de absorbancia a 260 y 280 nm, en un espectrofotómetro marca JENWAY 6305 UV/Vis. Una vez realizadas las medidas, se procedió a realizar el cálculo de la relación A_{260}/A_{280} y de la concentración de ADN (μ g/ml) mediante la fórmula $A_{260} \times 50 \times$ dilución de la muestra (donde el número 50 representa una constante relacionada con una solución de ADN doble hélice, cuya concentración es de 50 μ g/ml con $A_{260} = 1$), (Sambrook y col., 2001).

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa; para ello se prepararon geles de agarosa al 0,9% (p/v). El buffer empleado para la preparación de los geles y para la corrida electroforética fue el tris-borato-EDTA y la escalera de peso molecular utilizada fue λ DNA/*Hind* III Fragments (invitrogen, Cat. No. 15612-013). De cada tubo contentivo de ADN, se tomaron 1.5 μ l de muestra y se colocaron con 1 μ l de buffer de carga en un tubo eppendorf. 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 LUMIX Panasonic modelo FX50.

Optimización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación de los microsatélites: *D1Mit17*, *D5Mit101*, *D6Mit180*, *D11Mit2*, *D11Mit31*, *D12Mit181*, *D19Mit84*.

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

METODOLOGIA

ADN a utilizar, la concentración de iones Mg^{+2} , la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos iniciadores, el programa empleado para la amplificación de los *loci*, entre otros. Por ello, en el presente estudio se controlaron al máximo todas las variables mencionadas, para asegurar la eficiencia de la técnica.

La optimización de la técnica se inició tomando en cuenta los siguientes detalles:

Se seleccionaron los siguientes marcadores microsatélites: *D1Mit17*, *D5Mit101*, *D6Mit180*, *D11Mit2*, *D11Mit31*, *D12Mit181*, *D19Mit8*. El criterio de selección, se enfocó en escoger los microsatélites que mostraron mayor polimorfismo genético según lo reportado por la base de datos consultada (<http://www.jacksonlaboratory.com>), es decir, los que reportaron productos de amplificación con mayor cantidad en el número de alelos entre cepas consanguíneas. Otro criterio tomado en cuenta, fue que los microsatélites estuviesen ubicados en diferentes cromosomas. En la siguiente tabla (Tabla 4), se resumen las características de los siete microsatélites seleccionados, se describen las unidades de repetición y el tamaño en pares de bases de los fragmentos esperados mediante la amplificación por PCR.

Luego de la selección de los oligonucleótidos iniciadores, se realizó el pedido de los mismos enviando la secuencia de cada uno de ellos a MGW Biotech, a través de la dirección electrónica http://www.mgw-biotech.com/html/s_synthesis/s_overview.shtml.

En cuanto a la determinación de la concentración de ADN genómico a utilizar, se tomó como referencia la utilizada por (De Jesús 2006), se realizó un ensayo para lo cual se hizo una curva de ADN, usando 2; 2,5; 3 y 3,5 μ l.

Con respecto a la concentración de Cloruro de Magnesio, ésta se determinó mediante una curva de Magnesio con el par de cebadores *D1Mit17*. Se efectuó la amplificación por PCR de dos muestras de ADN de la cepa de ratones *C57Bl/6//Aly//BIO* con las siguientes variaciones en cuanto a la concentración de Cloruro de Magnesio: 1mM, 1,5 mM, 2mM y 3 mM.

METODOLOGIA

Tabla 4: Características de los oligonucleótidos iniciadores o *primers* seleccionados para la evaluación genética de la cepa de ratones *C57Bl/6//Aly//BIO*.

Alelo	Crom.	Nombre Microst.	Secuencias de cebadores Forward y Reverse	Longitud Pb
a	1	D1Mit17	5'-GTGTATGTATGGGTGCGTGC-3' 5'-TGGAAGGTGGAGACAAATG-3'	170
b	5	D5Mit101	5'-GGGATGACGTTTGAGGTTG-3' 5'-CTGCTTGGGATGTGGGTC-3'	130
c	6	D6Mit160	5'-AAGAGGACAGGCTAGTCTCGG-3' 5'-AGCAAAGCTGAAAAGAAAGGG-3'	115
d	11	D11Mit2	5'-TCCCAGAGTCTCCAAGACA-3' 5'-CCACAGTGTGTGATGTCTTC-3'	112
e	11	D11Mit31	5'-GCCTGAATTCACATGGTGG-3' 5'-AGAATAAGTAAACCCAGCTGCG-3'	138
c	12	D12Mit180	5'-ATGTTACACACACACTATACCTAACCC-3' 5'-AAGATGTGTTCCCTCACTTTTGTG-3'	100
a	19	D19Mit84	5'-CTCTGCTAGGGTGAGTGTGG-3' 5'-TGGAATGGTAAATCACTGGC-3'	148

En cuanto a la determinación de las concentraciones óptimas de los oligonucleótidos iniciadores, se siguió el protocolo estandarizado por (De Jesús 2006), en donde una concentración de 0,2 μ M de los cebadores, resultó ser la más eficiente para la amplificación de microsatélites en líneas de ratones de laboratorio producidas en diferentes bioterios de Venezuela.

Con respecto a la temperatura óptima de alineamiento, se emplearon las temperaturas descritas por el proveedor para cada par de cebadores se tomó en cuenta para esto la regla de la $T_m^\circ =$ temperatura promedio del proveedor de ambos *cebadores* – 5°C. El programa empleado para la optimización de la técnica de PCR, con el uso de marcadores moleculares microsatélites de ratón, será descrito en el capítulo III, en la sección de resultados.

Formación de un banco de ADN extraído de tejido de oreja de la cepa de ratones *C57Bl/6//Aly//BIO* para su control genético.

Se formó el banco de ADN de la cepa de ratones *C57Bl/6//Aly//BIO* a partir del tejido de oreja de los animales que constituyen el núcleo de fundación o banco genético de dicha cepa. Para la selección se tomó en cuenta la carta pedigree de los animales, por lo que se seleccionaron las dos parejas reproductoras existentes y las crías que se seleccionaron para el reemplazo de éstas. Para la extracción del ADN se desarrolló la metodología planteada en la primera sección de materiales y métodos. Una vez verificada la calidad y cantidad del ADN por espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa, las diferentes muestras fueron colectadas en tubos nuevos y estériles y almacenadas a -20 °C.

Reacción en cadena de la Polimerasa

Para la amplificación de los alelos de los 7 *loci* microsatélites seleccionados, se utilizó el ADN genómico proveniente del banco de ADN formado. La población estudiada estuvo integrada por 2 parejas y 6 crías pertenecientes al núcleo de fundación, con un total de 10 ejemplares.

La amplificación de cada uno de los *loci* se realizó con un termociclador Eppendorf Mastercycler personal, el cual posee una tapa de calentamiento que permite prescindir del uso de aceite mineral en los tubos de reacción de PCR. Las condiciones y el programa de PCR utilizado para cada uno de los microsatélites estudiados, se presentarán en el siguiente capítulo, en la sección de resultados.

Identificación de los alelos para cada uno de los *loci* de los 7 microsatélites seleccionados en las cepas de ratones consanguíneos (*C57BL/6 //Aly//BIO*.)

El rendimiento y el tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR, fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa al 2,5%. Para ello se prepararon geles

METODOLOGIA

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 0.5X. 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 20 μ l y se mezclaron con 1,5 μ l de buffer de carga. Las muestras fueron corridas a 110 V durante 70 minutos y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV de 254 nm. El registro fotográfico se efectuó con una cámara digital LUMIX Panasonic modelo FX50.

Análisis de Características Fisiológicas de la Cepa de Ratones *C57Bl/6//Aly//BIO*.

Para realizar el monitoreo fenotípico de la cepa de ratones *C57Bl/6//Aly//BIO*, se realizó la selección al azar de 3 parejas las cuales se dejaron en apareo para producir su generación F1; obteniéndose 16 crías, de los cuales se tomaron al azar 5 hembras y 5 machos una vez transcurrido los 8 días de nacidas y se les comenzó seguir la ganancia de peso y al pasar 2 meses, una vez transcurrido el tiempo se sacrificaron siguiendo las reglas de la eutanasia para el análisis para de algunos parámetros bioquímicos y sanguíneos, resultados que deben permanecer cercanos a los valores reportados en las bases de datos de *The Jackson Laboratory*. Se seleccionó esta base de datos debido a que éste es el laboratorio más importante a nivel internacional en la producción y manejo genético de los ratones de laboratorio.

Parámetros zootécnicos: Caracteres Reproductivos

En cuanto a los caracteres reproductivos se tomaron los siguientes datos del registro de tarjetas de los animales de producción del bioterio de la Universidad de Los Andes: el número de crías por camada, el numero de crías destetadas por camada y el periodo interpartal, éstos datos se tomaron desde los años iniciales de la producción (1995), y se escogieron las tarjetas de aquellos años donde el registro estaba completo.

VARIABLES FISIOLÓGICAS: CRECIMIENTO (GANANCIA DE PESO Y TALLA)

La medición del crecimiento reportada en peso (gr) y talla (cm) de estos 16 ejemplares, se efectuó desde los 8 días del nacimiento de las crías, hasta las 8 semanas. Las medidas de peso y talla fueron tomadas semanalmente durante un periodo aproximado de 2 meses (8 semanas); para esto, se utilizó una balanza marca SF-400 con una precisión de ± 1 g, y una regla común de medición.

VARIABLES FISIOLÓGICAS: PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

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 éter de petróleo para realizar la extracción de sangre mediante punción retro-orbital. La sangre obtenida fue colectada en tubos de ensayo y tratada con anticoagulante EDTA para el grupo de ensayos descritos a continuación:

Hematocrito

Entre las pruebas sanguíneas evaluadas en la caracterización fenotípica de la cepa de ratones *C57Bl/6//Aly//BIO*, se realizó la determinación de los valores de hematocrito. 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 RPM. 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*) 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: (Trinder, 1969)

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

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

Glóbulos Blancos

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

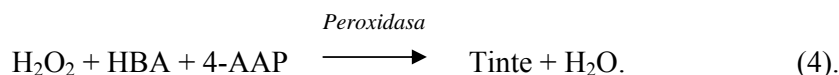
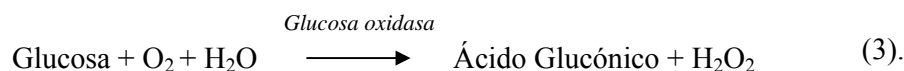
Para realizar el recuento diferencial celular, se prepararon laminas portaobjetos con extendido de sangre tratada con anticoagulante y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se fijó el extendido con metanol puro y se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, cada lámina fue teñida con colorante Giemsa en proporción 1:10 durante 15 minutos y lavada con agua corriente. Finalmente, se observaron los tipos celulares 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.

Variables Fisiológicas: Parámetros Bioquímicos

Para llevar a cabo esta parte de la experiencia, fue necesario tomar una cantidad de sangre de los ejemplares seleccionados, pero sin anticoagulante, ya que el grupo de pruebas que se desarrollaron en esta sección se realizan con suero y no con plasma.

Glucosa

Para la obtención de los valores de glucosa en la cepa de ratones *C57Bl/6//Aly//BIO*, fue utilizado el kit comercial *Qualitest*. El método utilizado en este reactivo se basa en la reacción indicadora de peróxido de hidrogeno 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 (H_2O_2). 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: (Trinder, 1969).



Para llevar a cabo este análisis, se realizó la reconstitución del reactivo, esto se realizó agregando 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 μ l de suero, se incubó durante 10 minutos a 37 °C en baño de María y finalmente se leyó la absorbancia en fotómetro Boehringer Mannheim 4010 a 546 nm. El cálculo de

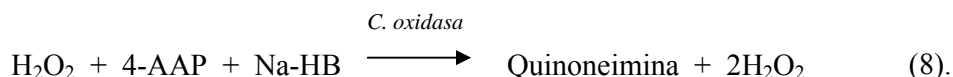
METODOLOGIA

resultados se efectuó mediante la siguiente fórmula: (método enzimático para la determinación de glucosa en sangre).

$$\frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de patrón}} \times \text{Concentración de patrón} = \text{glucosa (mg/dl)} \quad (5).$$

Colesterol

La medición de dicha prueba se realizó con el plasma sanguíneo. Al igual que para la glucosa se utilizó el kit comercial *Qualitest* cuyo método para la determinación del colesterol total en la sangre se basa en acción de la Colesterol Esterasa y la Colesterol Oxidasa para hidrolizar los esteres de colesterol y oxidar al colesterol libre respectivamente, con producción de agua oxigenada (H_2O_2). Esta última oxida al cromógeno en presencia de Peroxidasa produciendo un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra analizada (Allain, 1974). La reacción se describe a continuación: (método enzimático para la determinación de colesterol en sangre)



Para llevar a cabo este análisis, se realizó la reconstitución del reactivo, esto se realizó agregando 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

METODOLOGIA

incubó durante 10 minutos a 37 °C en baño de Maria y finalmente se leyó la absorbancia en fotómetro Boehringer Mannheim 4010 a 546 nm. El cálculo de resultados se efectuó mediante la siguiente fórmula: (método enzimático para la determinación de colesterol en sangre)

$$\frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de patrón}} \times \text{Concentración de patrón} = \text{Colesterol Total (mg/dl)} \quad (9).$$

Creatinina

Como en los dos casos anteriores se trabajó con el suero sanguíneo este método se basa en la reacción de la creatinina con un reactivo de picrato Alcalino produciéndose así un compuesto coloreado de Creatinina – Picrato Alcalino, cuya intensidad de color medida a 546nm es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra analizada.

Para llevar a cabo este análisis, se realizó la reconstitución del reactivo, esto se realizó agregando en cantidades parciales el reactivo en una proporción 1:1, 1 ml de Solución de Acido Pírico y 1 ml de Reactivo Alcalino. Una vez reconstituido el reactivo, se mezclaron 2 µl del mismo con 200 µl de plasma, se incubó durante 15 minutos a 37 °C en baño de Maria y finalmente se leyó la absorbancia en fotómetro Boehringer Mannheim 4010 a 546 nm. El cálculo de resultados se efectuó mediante la siguiente fórmula: (método de Jaffé modificado para la determinación de creatinina en sangre)

$$\frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de patrón}} \times \text{Concentración de patrón} = \text{Creatinina (mg/dl)} \quad (10).$$

RESULTADOS

RESULTADOS

Estudio la condición genética de los ratones de la cepa *C57Bl/6//Aly//BIO* usando marcadores moleculares microsatélites

Extracción de ADN del tejido de la oreja de los ratones de la cepa consanguínea *C57Bl/6//Aly//BIO*.

La extracción de ADN se realizó del tejido de la oreja como se mencionó en la sección de metodología empleando la enzima Ananasa (Comunicación Personal. Prof. Néstor González). Este método permitió obtener no solo concentraciones apreciables de ADN que oscilan entre 90 y 480 ng/ μ l (Tabla 5)

Tabla 5: Valores del análisis espectrofotométrico realizado a muestras de ADN del tejido de la oreja de los ratones de la cepa consanguínea *C57Bl/6//Aly//BIO* digestión con la enzima Ananasa (comunicación personal Prof. Néstor González).

Ejemplar	Ananasa		
	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	[ADN]
	Sin Lavado	Lavado	ng/ μ l
P18♂	0,7	1.33	200
P18♀	0,4	1.03	210
P28♂	1	1.16	180
P28♀	0,8	1.25	160
O.D y C♀	0,9	1.14	370
O.D♀	0,8	1.40	480
O.I♀	0,8	1.21	470
2O♀	0,4	1.47	90
O.D♂	0,4	1.0	170
O.I♂	0,3	1.3	450

RESULTADOS

La pureza e integridad de las muestras de ADN obtenidas mediante la metodología aplicada puede observarse en la Figura 7, mediante la electroforesis en geles de agarosa al 0,9%, puede observarse la eficiencia de dicho método para la obtención genómico a partir de tejido de mamíferos, ya que las bandas se observan con nitidez e integridad. Como se puede observar, el método de extracción usando la enzima ananasa, permite obtener una concentración adecuada para el desarrollo del trabajo, a demás que no se observó degradación en las hembras de ADN.

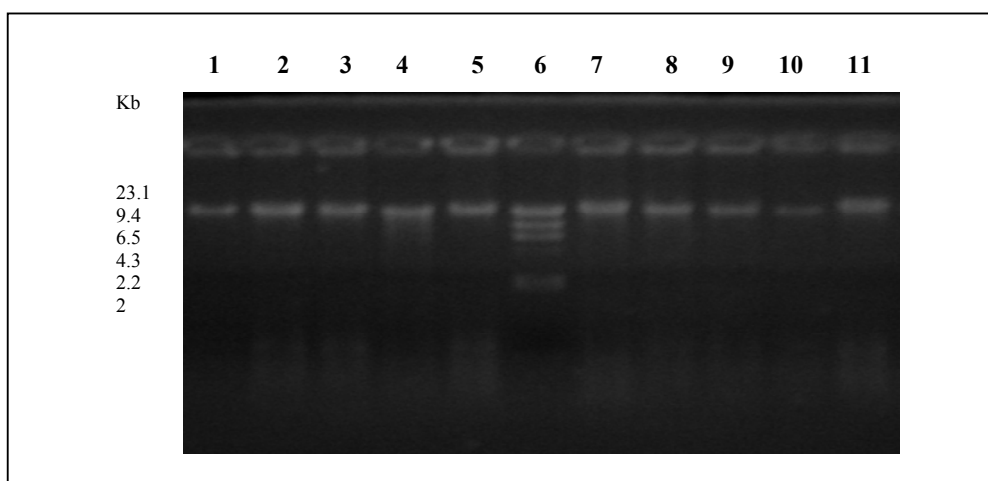


Figura 7: electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (90 voltios, 1 h) para muestras de ADN genómico obtenidas por el método empleando la enzima Ananasa (comunicación personal. Prof. Néstor González). **Carril 6:** marcador λ DNA/*Hind* III Fragments. **Carriles 1 al 5 y 7 al 11:** ADN de los ratones de la cepa consanguínea *C57Bl/6//Aly//BIO*.

Formación del banco de ADN de la cepa consanguínea *C57Bl/6//Aly//BIO*.

Se realizó la extracción de ADN a partir de tejido de oreja de ratón, para cada uno de los ejemplares que conforman el núcleo de fundación de la colonia en este caso se observó la carta pedigree (Figura 8) de la colonia para hacer la selección de los animales, estos fueron los reproductores de la F24 y las crías seleccionadas para el reemplazo de éstas, como ya se había dicho anteriormente. El banco de ADN se

RESULTADOS

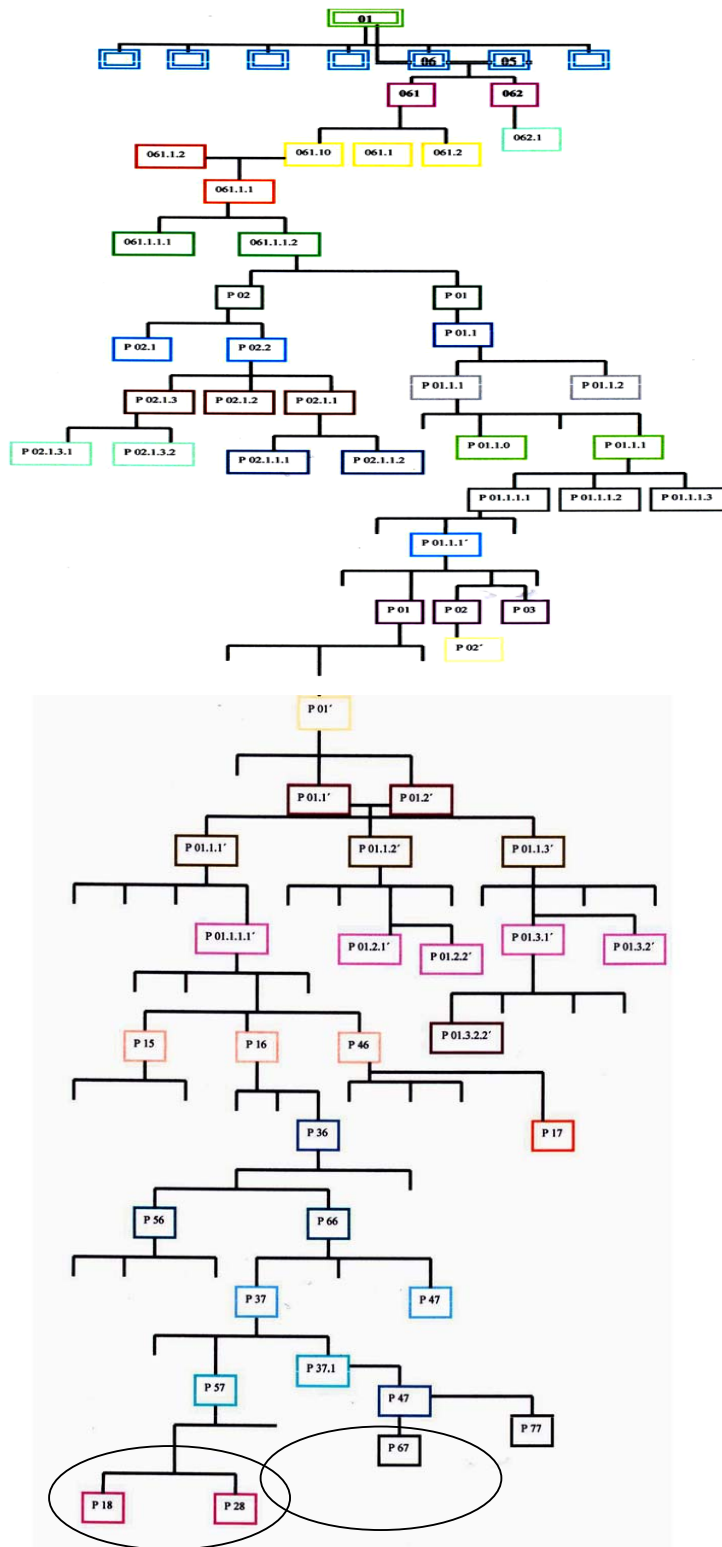


Figura 8: Carta Pedigree de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO* desde su llegada al bioterio 1995 hasta el año 2007.

RESULTADOS

conservará en el Bioterio de la Universidad de los Andes, bajo condiciones adecuadas a -20°C , lo de que permitirá contar con este material biológico para continuar realizando un registro más completo de la cepa y poder realizar en el futuro comparaciones con los animales de otras generaciones.

Optimización de la técnica de PCR para la amplificación de los microsatélites: *D1Mit17*, *D5Mit101*, *D6Mit180*, *D11Mit2*, *D11Mit31*, *D12Mit181*, *D19Mit84*.

En relación a la determinación de la concentración adecuada de cloruro de Magnesio, para los *primers* utilizados, se presenta el resultado de la amplificación del *D1Mit17*. En la Figura 9, se puede apreciar que los productos amplificados con 3 mM de Mg^{+2} (Carril 8) presentaron mayor intensidad con respecto a las muestras que contenían menor concentración del mismo.

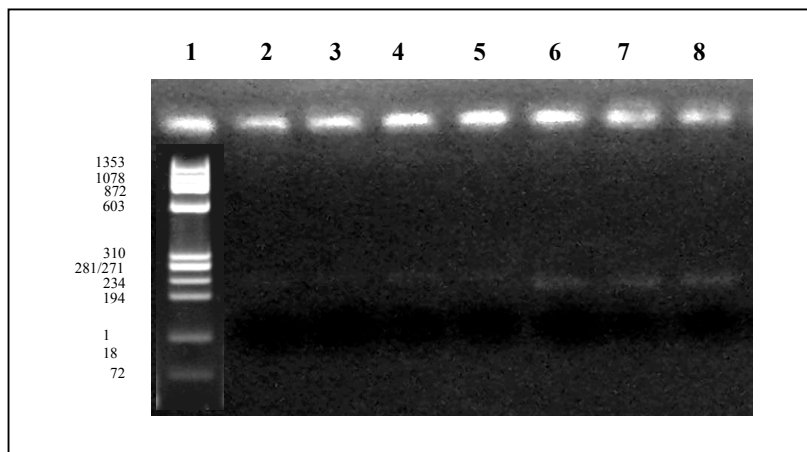


Figura 9: electroforesis en gel de agarosa 2,5% de ensayo de PCR, con diferentes concentraciones de Cloruro de Magnesio para dos muestras de ADN de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO* con el par de *primers D1Mit17*. **Carril 1:** marcador $\Phi\text{X } 174 \text{ Hae III}$. **Carril 2 y 3:** 1mM de Mg^{+2} . **Carril 4 y 5:** 1.5mM de Mg^{+2} . **Carril 6 y 7:** 2.0mM de Mg^{+2} . **Carril 8:** 3mM de Mg^{+2} .

En el caso de las condiciones y el programa utilizado para la amplificación de cada uno de los microsatélites evaluados, se encuentran resumidas en las tablas 6 y 7 que se presentan a continuación al igual que el protocolo para el monitoreo genético de la cepa

RESULTADOS

de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO* que se producen en el Bioterio de la Universidad de los Andes.

El programa de los ciclos de incubación presentó variaciones en cuanto a las temperaturas de alineación de los cebadores.

Las temperaturas de alineación empleadas para cada uno de los cebadores fueron las siguientes: 53 °C para *D1Mit17*, *D5Mit101*, *D11Mit2*; 55°C *D6Mit180*, *D11Mit31*, *D12Mit181*, *D19Mit84*. 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: Concentraciones y volúmenes de reactivos de PCR, empleados para la amplificación de loci microsatelites de la cepa de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*.

Buffer (5 X)	10 µl
dNTP's (200 µM)	0.8 µl
Primer (30 µM)	
Forward	0.4µl
Reverse	0.4 µl
MgCl ₂ (3 mM)	3.0 µl
Taq polimerasa (1U/µl)	0.2 µl
ADN (20 ng)	2 µl
Agua dest. Estéril	26.4 µl

RESULTADOS

Tabla 7: programa de ciclos de incubación de PCR, empleado para la amplificación de *loci* microsatélites de la cepa de de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*.

<p style="text-align: center;"><u>1 ciclo</u> 95 °C por 4 minutos <u>35 ciclos</u> 95 °C por 45 segundos 51 °C - 55 °C por 45 segundos 72 °C por 30 segundos <u>1 ciclo</u> 72 °C por 4 minutos</p>
--

Identificación los alelos para cada uno de los *loci* de los 7 microsatélites seleccionados en las cepas de ratones consanguíneos (*C57BL/6 //Aly//BIO*.)

La identificación de los alelos para cada uno de los 7 *loci* microsatélites analizados, se realizó con la finalidad de evaluar la condición de homocigosidad e isogenicidad de los 10 ejemplares que conforman el núcleo de fundación de dicha cepa.

Los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica PCR, con los microsatélites *D1Mit17*, *D5Mit101*, *D6Mit180*, *D11Mit31*, *D12Mit181*, *D19Mit84*, son presentados continuación en las figuras 10, 11, 12, 13, 14 y 15, en las cuales se puede apreciar una condición homoalélica, es decir la presencia de una sola banda para todos los productos de amplificación, cada una fue comparada con el ADN control (donado por el Dr, Jean Louis Guenét del Laboratorio de Control Genético de Mamíferos del Instituto Pasteur de Francia), con el respectivo marcador molecular al igual que con los datos reportados en la base de datos *The Jackson Laboratory*.

La Figura 10, presenta los productos de amplificación obtenidos para el microsatélite *D1Mit17*, en ésta se puede observar una condición homoalélica para todas las muestras de ADN analizadas, las cuales presentan una cantidad de pares de bases de

RESULTADOS

152pb, la longitud de las bandas obtenidas para el *loci* microsatélite *DIMit17*, difiere con respecto a la longitud para dicho segmento descrito en la base de datos, el cual es de 170 pb para esta cepa

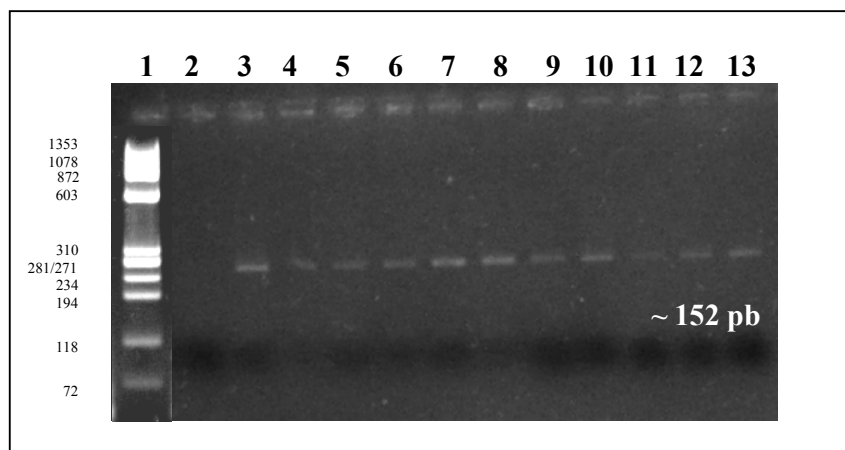


Figura 10: Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*. **Carril 1:** marcador Φ X 174 *Hae* III. **Carril 2:** Control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 3:** Control positivo. **Carriles 4 al 13:** productos de amplificación de microsatélite *DIMit17*, para los ADN en estudio.

En el caso del microsatélite *D6Mit180* (Figura 11), igualmente se observa la condición homoalélica en este caso dicho amplificado coincide con lo reportado para este en la base de datos de

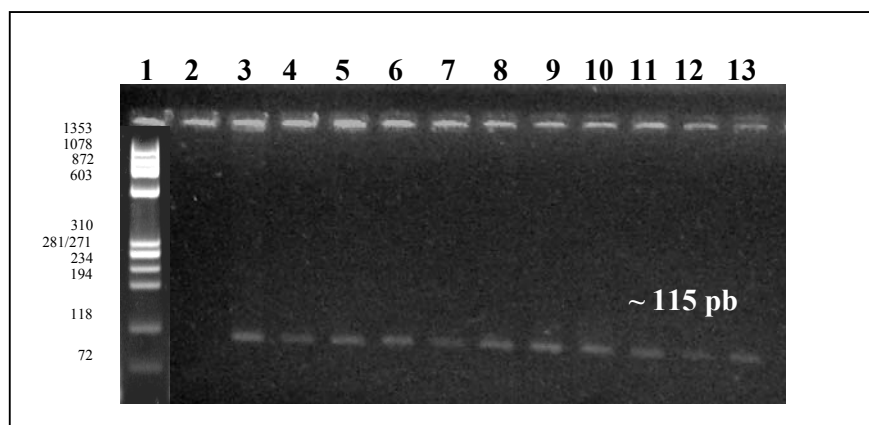


Figura 11: Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*. **Carril 1:** marcador Φ X 174 *Hae* III. **Carril 2:** Control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 3:** Control positivo. **Carriles 4 al 13:** productos de amplificación de microsatélite *D6Mit180*, para los ADN en estudio.

RESULTADOS

datos el valor reportado para este que es de 115pb, en el caso de su control positivo podemos no se observa que presente diferencias con respecto a su longitud.

Para los microsatélite *D5Mit101* y *D11Mit31* (Figuras 12 y 13) como en el caso anterior se puede observar la condición homoalélica en todas muestras estudiadas, tal como se pudiese esperar teniendo en cuenta que se supone una condición homocigota en los ratones analizados, característica ésta de las cepas consanguíneas de ratones. Sin embargo al comparar con el control positivo correspondiente y con la base de datos en pb reportada, éstos deberían de presentar una cantidad en pares de bases de 130 y 138 respectivamente, para el caso de los productos de amplificación del microsatélite *D5Mit101* hay diferencia con lo reportado y lo encontrado en este estudio, para los productos de amplificación del microsatélite *D11Mit31* lo encontrado en este estudio con lo reportado

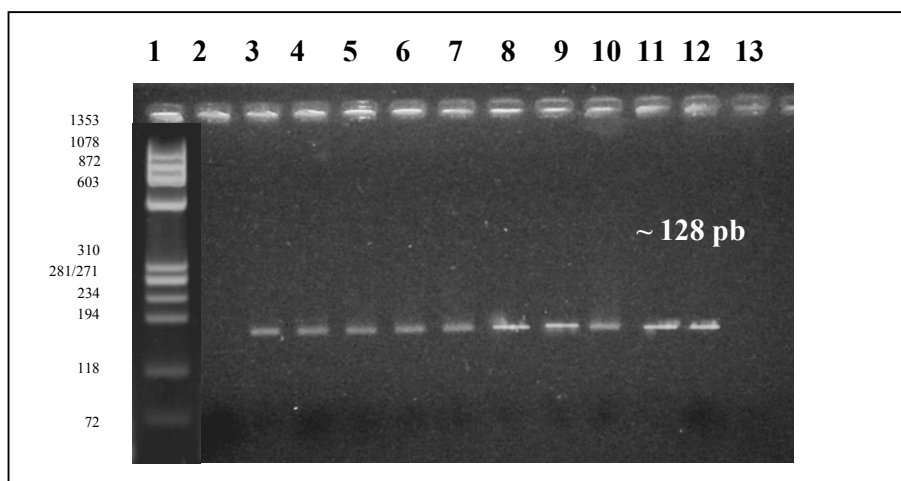


Figura 12: Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO* Carril 1: marcador Φ X 174 *Hae* III. Carril 2: Control negativo (mezcla de reacción sin ADN). Carriles 3: Control positivo. Carriles 4 al 13: productos de amplificación de microsatélite *D5Mit101*, para los ADN en estudio.

RESULTADOS

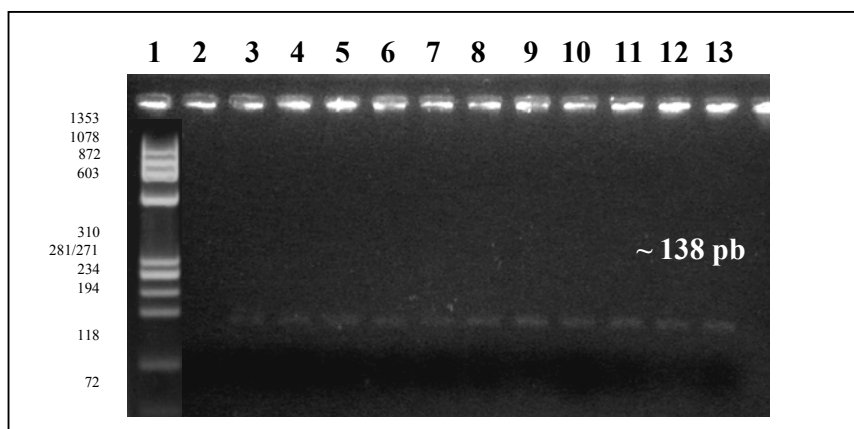


Figura 13: Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*. **Carril 1:** marcador Φ X 174 *Hae* III. **Carril 2:** Control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 3:** Control positivo. **Carriles 4 al 13:** productos de amplificación de microsatélite *D11Mit31*, para los ADN en estudio

Para el *D12Mit181* y *D19Mit84* (Figuras 14 y 15) también se evidencio la condición homoalélica para todas las muestras estudiadas, sin embargo, existen diferencias con la longitud de los amplificados y su control respectivo, e igualmente se observan diferencias entre los valores reportados y obtenidos experimentalmente.

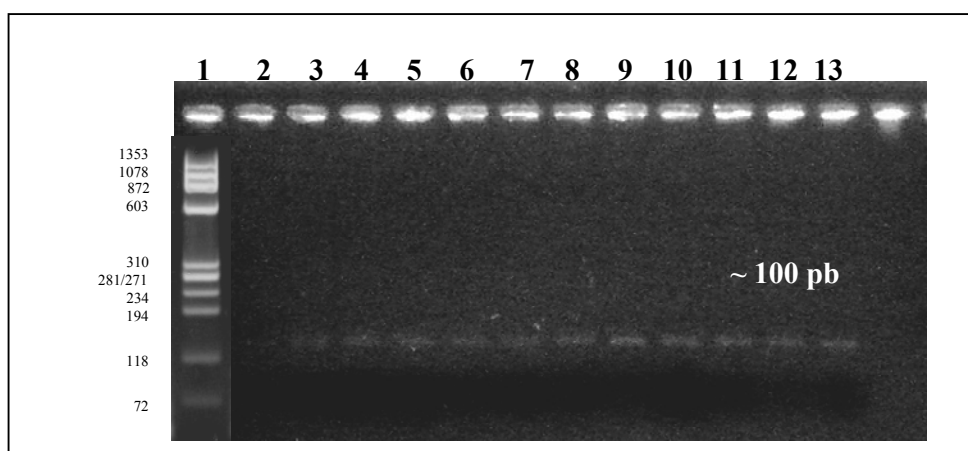


Figura 14: Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*. **Carril 1:** marcador Φ X 174 *Hae* III. **Carril 2:** Control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 3:** Control positivo. **Carriles 4 al 13:** productos de amplificación de microsatélite *D12Mit181*, para los ADN en estudio.

RESULTADOS

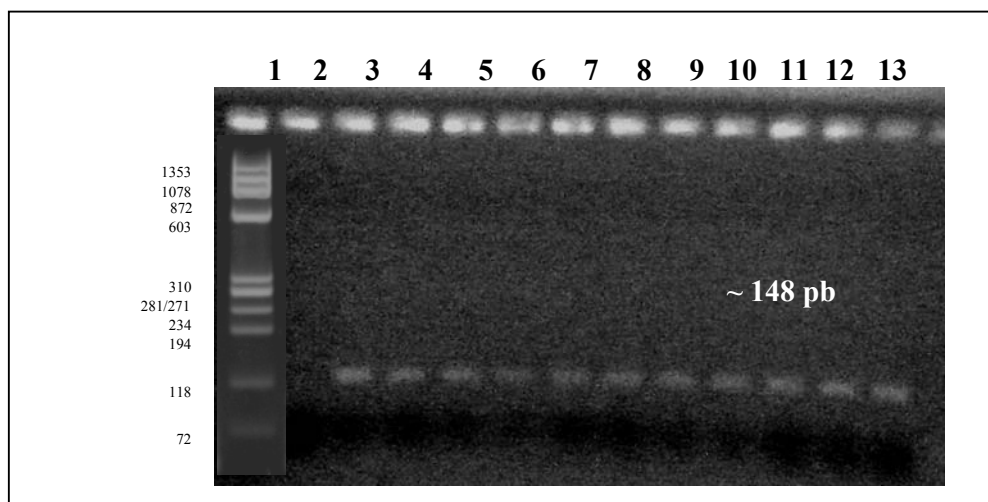


Figura 15: Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*. **Carril 1:** marcador Φ X 174 *Hae* III. **Carril 2:** Control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 3:** Control positivo. **Carriles 4 al 13:** productos de amplificación de microsatélite *D19Mit84*, para los ADN en estudio.

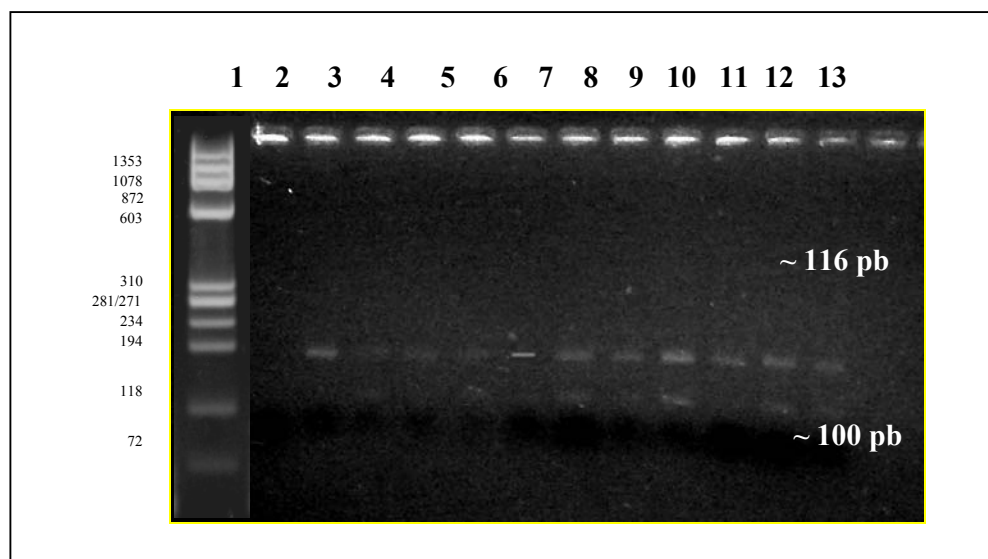


Figura 16: Productos de amplificación observados en gel de agarosa 2,5% cepa de de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*. **Carril 1:** marcador Φ X 174 *Hae* III. **Carril 2:** Control negativo (mezcla de reacción sin ADN). **Carriles 3:** Control positivo. **Carriles 4 al 13:** productos de amplificación de microsatélite *D19Mit84*, para los ADN en estudio.

RESULTADOS

En la siguiente Figura 16, se observan los productos de amplificación para el microsatélite *D11Mit2*, en todas las muestras problemas analizadas se encontró condición bialelica en los carriles 4 al 13, diferenciándose este resultado de lo observado para el ADN control en el cual se observa una condición homoalélica.

Características fisiológicas de la cepa *C57Bl/6//Aly//BIO*.

Parámetros zootécnicos: Caracteres Reproductivos

Dentro de los parámetros zootécnicos se tomaron en cuenta el número de crías nacidas por camada, el número de crías destetadas por camada, y el periodo interparto de los 1 años de producción de animales aproximadamente 24 generaciones los datos se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8: Valores de algunos parámetros zootécnicos obtenidos de el registro de tarjetas de producción de la cepa de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*.

Años	*C. N	**C. D	***P. I
1995	5,3	5,3	39
2002	6,5	6,5	65
2004	6,5	6,5	47,8
2005	6,25	5	28,8
2006	4,6	4	61
2007	3,6	3,6	59
****Prom	5.5	5.2	50
*****Prom. Reportado	7,01	6,0	35,03

*C.N crías nacidas por camada. **C.D crías destetadas por camada. ***P.I periodo interpartal. ****Prom promedio total para los 12 años de registros. ***** Prom promedio reportado en la base de datos

RESULTADOS

En la Figura 17 se puede observar la ganancia de peso (g) de las ratones hembras y machos desde la semana del nacimiento hasta la octava semana que alcanzan su etapa reproductiva es decir su madures sexual y en la Figura 18 la ganancia de talla a través del mismo tiempo antes señalado.

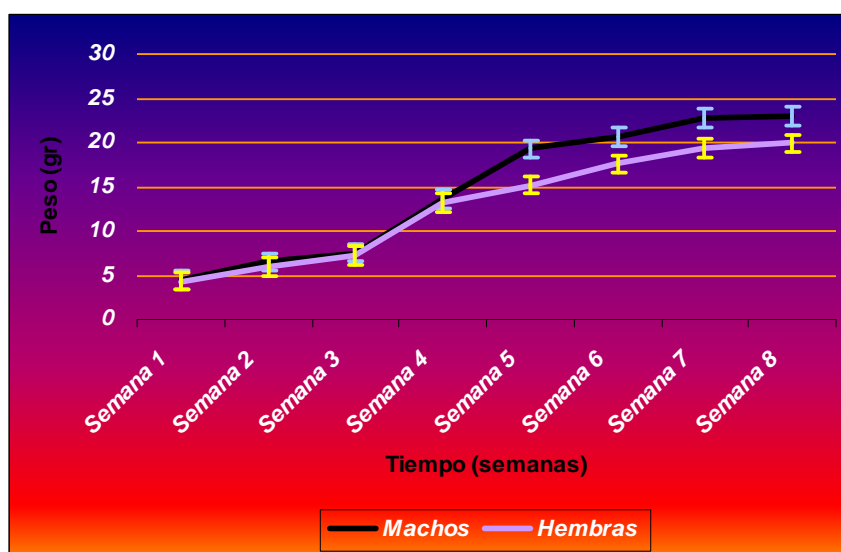


Figura 17: curva de crecimiento de la Cepa_C57Bl/6//Aly//BIO, de acuerdo al peso (g) de machos y hembras del núcleo de fundación

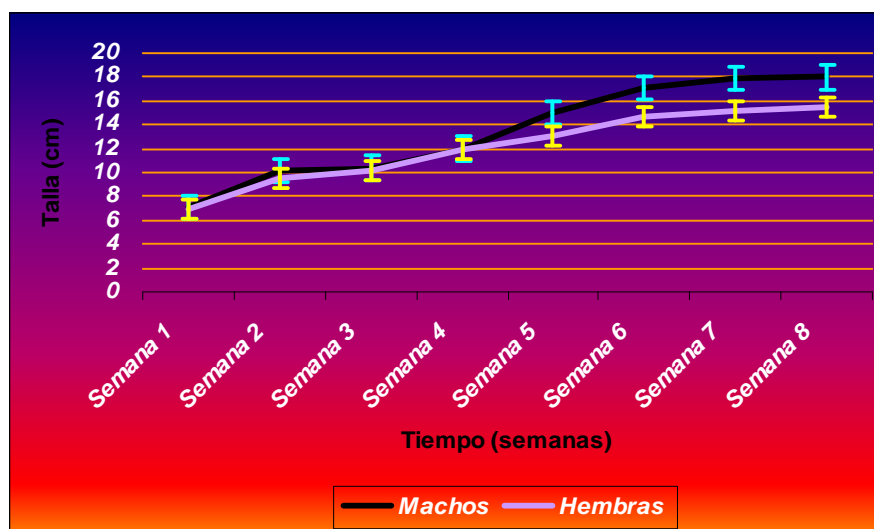


Figura 18: Curva de crecimiento de la Cepa_C57Bl/6//Aly//BIO, de acuerdo a la talla (cm) de machos y hembras del núcleo de fundación

RESULTADOS

A continuación se presenta en la Tabla 9, los datos promedios obtenidos de peso y talla para los ratones machos y hembras de la cepa *C57BL/6//Aly//BIO*, realizados durante dos meses desde la semana del nacimiento.

Tabla 9: Peso (g) promedio de los ejemplares pertenecientes a la cepa de de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*.

Peso (g)		Machos ♂ y Hembras ♀ Edad (días)
♂	♀	
4,5	4,3	8-14
6,5	6	15-21
7,5	7,2	22-28
13,6	13,2	29-35
19,3	15,2	36-42
20,6	17,6	43-49
22,8	19,4	50-56
23	19,9	57-63

Determinación de los parámetros hematológicos

La Tabla 10, presenta los valores promedios obtenidos en el análisis hematológico correspondiente a: hematocrito, hemoglobina, conteo leucocitario (glóbulos blancos) y el recuento diferencial (neutrófilos, linfocitos y eosinófilos), realizado a los ratones de la cepa consanguínea *C57Bl/6//Aly//BIO*, a los dos meses del nacimiento y lo reportado en la base de datos para su comparación.

RESULTADOS

Tabla 10: Valores promedios obtenidos a partir de la evaluación fenotípica de la cepa de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*, mediante el análisis de parámetros hematológicos y valores reportados en la base de datos *The Jackson Laboratory*

Valores Hematológicos	♂ (n=5)	♀ (n=5)	♂	♀
	Encontrados	Encontrados	Reportados	Reportados
Hemoglobina (g/dl)	13,9	13,6	16,2	17,0
Hematocrito (Vol. %)	36%	33,6%	52,1	51,5
Glóbulos blancos (x100mm ³)	6048,4	7022	2,62	3,48
Linfocitos (%)	89,6	88,6	76,7	88,6
Neutrófilos Seg. (%)	10,2	11,4	18,5	7,4
Eosinófilos (%)	0	0	2,6	2,6

Determinación de los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y creatinina)

La Tabla 11, presenta los valores promedios obtenidos en el análisis bioquímico correspondiente a glucosa, colesterol y creatinina realizado a los ratones de la cepa consanguínea *C57Bl/6//Aly//BIO*, a los dos meses del nacimiento y lo reportado en la base de datos para su comparación.

RESULTADOS

Tabla 11: Valores promedios obtenidos a partir de la evaluación fenotípica de la cepa de de ratones consanguíneos *C57Bl/6//Aly//BIO*, mediante el análisis de parámetros bioquímicos y valores reportados en la base de datos *The jackson Laboratory*

Valores bioquímicos	♂ (n=5)	♀ (n=5)	♂	♀
	Encontrados	Encontrados	Reportados	Reportados
Glucosa (mg/dl)	81,9	79,8	156	176
Colesterol (mg/dl)	64,4	65,1	63,7	89,9
Creatinina (mg/dl)	1,4	1,3	1,2	1,3

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Para llevar a cabo los trabajos de investigación donde se necesite un modelo animal se debe garantizar que dicho animal presente un fondo genético sin alteraciones, esto con la finalidad de obtener resultados reproducibles en cualquier parte del mundo. Por esta razón es completamente necesario que se realicen controles genéticos de los animales en los bioterios (establecimientos de producción).

La cepa *C57Bl/6//Aly//BIO* es producida en el Bioterio de la Universidad de Los Andes desde hace 12 años, es decir, aproximadamente 24 generaciones, de la cual no hay registro previos de la condición genética de estos animales para el momento de su ingreso a las instalaciones de BIOULA, y de la cual se evaluaron seis microsatélites por (De Jesús 2006).

En este trabajo se utilizaron, seis microsatélites diferentes a los utilizados en el análisis anterior y uno similar, y se realizó la valoración de diferentes parámetros fisiológicos, lo que permite continuar la caracterización de ésta cepa para tener el background genético propio de la cepa producida en BIOULA.

Para el desarrollo de éste trabajo se planteó como objetivo general, “Estudiar la condición genética y fisiológica de la cepa *C57Bl/6//Aly//BIO* producida en el Bioterio de la Universidad de Los Andes”.

Para el estudio de la condición genética se analizaron siete *loci* microsatélites, utilizando como herramienta la amplificación de los siguientes microsatélites: *D1Mit17*, *D5Mit101*, *D6Mit160*, *D11Mit2*, *D11Mit31*, *D12Mit181*, *D19Mit84*, mediante la técnica de la PCR.

Como para el desarrollo de la amplificación mediante la técnica de la PCR, era necesario contar con un ADN de calidad, se planteó la estandarización de la técnica de extracción de ADN mediante el tejido de la oreja de ratón, para lo cual se utilizó la

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

técnica de extracción usando la enzima de la Ananasa (Profesor Néstor González, comunicación personal). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que las concentraciones obtenidas de ADN por espectrofotometría, oscilaron entre 90 y 480 ng/ μ l (Tabla 5), estas cantidades son apropiadas para realizar la amplificación de secuencias de ADN de ratón por PCR de acuerdo a lo reportado por (Serikawa y col., 1992; Deschepper y col., 1997; Benavides y col., 2000 y Kiran y col., 2007); a pesar de esto, cuando se determinó la interferencia de proteínas o el grado de pureza de las muestras de ADN, mediante el cálculo del cociente A_{260}/A_{280} (el ADN absorbe a 260 nm y las proteínas a 280 nm), se pudo deducir una probable impureza en las muestras, ya que los valores de este cociente se encontraron por debajo de 1.8, y según, (Sambrook y col., 2001), absorbancia menores a ésta, indican que la preparación de ADN no está libre de impurezas. Hubo la necesidad de adicionar entonces a este procedimiento otro paso para aumentar el grado de pureza de las muestras ya que en los primeros ensayos de la estandarización de la técnica de la PCR no se lograba obtener amplificación excepto en las muestras control, lo que se pensó que pudiese ser debido a la presencia de sustancias interfirientes en la muestra de ADN. Formándose así el banco de ADN con las muestras problemáticas.

Luego de éste paso, al realizar las electroforesis en geles de agarosa al 0,9% (Figura 7), para comprobar la integridad del ADN, se encontró que éste tenía la calidad requerida para realizar el estudio planteado, ya que presentaba bandas nítidas, bien definidas y con un peso molecular de aproximadamente de 22.630 pb.

A pesar de este paso, sin embargo, aún se observó que el cociente era menor de 1,8. La contrariedad de los resultados encontrados entre el análisis espectrofotométrico y el análisis electroforético en geles de agarosa, puede ser debido a que la estimación de la concentración de ADN de alto peso molecular, por el método espectrofotométrico estándar, no es confiable en un 100%, ya que la solución de ADN es homogénea y usualmente muy viscosa, lo que hace difícil tener una muestra representativa para su análisis, además dicha estimación no es precisa, si la muestra contiene cantidades significativas de proteínas, fenoles u otros ácidos nucleicos. Es conveniente realizar

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

adicionalmente al análisis espectrofotométrico, con el análisis del ADN en geles de agarosa y su posterior coloración con bromuro de etidio (BrEt); este método es mucho más preciso, ya que permite visualizar la integridad del ADN, y esto precisamente fue lo observado; además que permite calcular la cantidad del mismo, cuando se le compara con algún ADN patrón de concentración conocida.

Una vez estandarizado el método para la obtención de ADN se formó el banco con las muestras de tejido tomadas de los animales del núcleo de fundación de la cepa consanguínea *C57Bl/6//Aly//BIO* a estudiar.

La especificidad de la PCR depende de la estabilidad del complejo de hibridación, la cual se determina por la cantidad de muestra de ADN, la temperatura de alineación de los oligonucleótidos iniciadores y de la concentración de los reactivos en la mezcla de reacción (Larzul, 1990), específicamente la concentración del cloruro de magnesio. Con respecto a la cantidad de ADN, fue utilizado lo reportado por (De Jesús 2006), quien utilizó la cantidad de 20ng/μl de ADN.

Con respecto a la concentración de $MgCl_2$, éste es uno de los pasos más importantes, ya que determina el rendimiento del proceso de amplificación. En el caso, de concentraciones muy altas evitan la desnaturalización de la doble hélice, estabilizando alineamientos incorrectos de los oligonucleótidos iniciadores al templado, ocasionando respectivamente interferencia con el éxito de la PCR y generando bandas inespecíficas que no corresponden con los productos de amplificación esperados (Gibbs, 1990). Por otra parte, concentraciones muy bajas de $MgCl_2$, 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). Con respecto a la optimización de la concentración de Cloruro de Magnesio, entonces, se determinó como óptima la concentración de 3 mM, la misma fue determinada mediante la realización de curvas de $MgCl_2$ para cada uno de los microsatélites empleados; el resultado obtenido para esta prueba se encuentra reflejado en la Figura 9 para el *DIMit17*, dicha concentración también resultó ser óptima para el resto de los microsatélites evaluados en este trabajo

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

y es la utilizada en los trabajos de (Serikawa y col., 1992; Benavides y col., 2000; Deschepper y col., 1997 y Kiran y col., 2000).

La temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos iniciadores empleados para la amplificación de los siete *loci* microsatélite, fueron las reportadas por las casa comerciales de los mismo. Para el cálculo de esta temperatura se tomó la regla de la temperatura de alineamiento: $T_m^\circ = \text{al promedio de la } T_m \text{ de ambos cebadores} - 5^\circ\text{C}$. Las temperaturas empleadas según los resultados fueron las adecuadas ya que no se observaron productos de amplificación inespecíficos. Las temperaturas de alineación empleadas para cada uno de los cebadores fueron las siguientes: 53 °C para *D1Mit17*, *D5Mit101*, *D11Mit2*, y de 55°C para *D6Mit180*, *D11Mit31*, *D12Mit181*, *D19Mit84* (Tabla, 7).

En el análisis de los *loci* de los microsatélites analizados, se observó para la cepa *C57BL/6//Aly//BIO*, una condición homoalélica (una sola banda) e isogénica, para seis de los siete microsatélites estudiados: *D1Mit17*, *D5Mit101*, *D6Mit180*, *D11Mit31*, *D12Mit181*, *D19Mit84*, Figuras 10, 11, 12, 13, 14 y 15 respectivamente, al comparar dichos amplificados con su control correspondiente y con lo reportado por la base de datos de *The Jackson Laboratory*, se observan diferencias en la longitud de los mismos con respecto a la longitud real de las muestras problemas calculadas mediante sus RF. En relación al microsatélite *D1Mit17*, se puede observar en la Figura 10, que el producto de amplificación del control presenta similitud con lo reportado por la base de datos consultada (170 pb), sin embargo, los productos de amplificación de los ADN problemas presentan una cantidad de pares de bases de 152 pb. Con respecto al microsatélite *D6Mit180*, lo reportado por la base de datos consultada fue de 115pb, lo que coincide con lo encontrado en el análisis realizado. Con respecto al microsatélite *D5Mit101*, la base de datos reporta una cantidad de pares de base de 130pb, éste valor se observó para el producto de amplificación de ADN control, sin embargo para las muestras problemas el valor fue de 128 pb.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Con respecto a los microsatélites *D11Mit31*, *D12Mit181* y el *D19Mit84* las cantidades de pares de bases que reporta la base de datos consultada son de 138 pb., de 100 pb., y de 148 pb., respectivamente, coincidiendo con los valores hallados en la prueba realizada para los ADN problemas.

Con respecto al microsatélite *D11Mit2*, el producto de amplificación control presentó una condición homoalélica (112 pb), sin embargo, se encontró para todas las muestras problemas una condición bialélica, es decir, 2 bandas en el producto de amplificación, una de 116 pb y la otra de 110pb.

La definición de las cepas consanguíneas enuncia que: “una cepa consanguínea es aquella que se ha logrado mediante apareamiento de hermanas con hermanos durante 20 o más generaciones consecutivas, procedentes de una sola pareja reproductora”; de acuerdo a la definición, la cepa consanguínea *C57BL/6//Aly//BIO*, producida en el bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), tiene 24 generaciones produciéndose mediante apareamientos de hermanas con hermanos y la misma tiene su origen en una única pareja reproductora, es decir, de acuerdo a la Figura 1, los ratones de la cepa *C57BL/6//Aly//BIO*, deben ya tener fijados en condición homocigota al menos el 99% de sus alelos, existiendo un 1% de condición heterocigótica. Cuando en un análisis con microsatélites se observan productos de amplificación de dos bandas, se habla de la existencia de contaminación genética, sin embargo, en este caso no se considera posible que la presencia de la doble banda se deba a problemas de contaminación genética, debido a que desde que la pareja única que le dio origen a la colonia llegó al bioterio en el año 1995, se alojó inmediatamente en aisladores (Figura 6), y durante los 13 años que se han mantenido en producción en el bioterio, toda ésta se ha realizado dentro de los mismos, por lo que la mezcla con otros animales de genoma diferente ha sido imposible. Por lo antes expuesto, se hace el siguiente planteamiento en la búsqueda de una explicación a la presencia de estos dos alelos, existe la posibilidad de que la pareja reproductora inicial no tenía la condición de homocigosis característica de la cepa, esto no puede ser comprobado porque no existen registros iniciales de tal condición, se pudiese pensar entonces, que en el proceso de

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

fijación de alelos a través de las generaciones siguientes, el que caracteriza al microsatélite *D11Mit2*, ha permanecido en el 1% de la condición heterocigótica propuesta para las cepas consanguíneas con menos de 100 generaciones de apareamientos consecutivos entre hermanos, condición ésta que es observada en el producto de amplificación para éste microsatélite. Según la literatura, el cromosoma 11 de los ratones es equivalente al cromosoma 17 de los humanos, en el cual se localizan genes implicados en enfermedades tales como el cáncer de mamas, la neurofibromatosis y el gen de la proteína denominada *H2AX*, la cual se encarga de la reparación de los daños producidos al ADN, que conducen a la formación de tumores; esta proteína también actúa durante el reordenamiento genético normal que tiene lugar en las células inmunes cuando éstas se preparan para combatir un virus y otras amenazas (Alt, 2003).

En estudios realizados por (Alt, 2003), con ratones *knock-out* para los genes *H2AX*, encontró que éstos sólo presentaban una proporción baja de cáncer y al trabajar con ratones *knock-out* doble que carecían de *H2AX* y de *p53* (este último gen produce un centinela molecular proteico que suprime la proliferación de células que tienen ADN dañado), resultaba en un aumento dramático de tumores. El resultado de la eliminación de ambas copias de *H2AX* y de *p53*, resultó en un aumento dramático en el índice de tumores que aparecía más allá de lo que se observaba con sólo una deficiencia de *H2AX*, y mucho más de lo observado con sólo una deficiencia de *p53* (Alt, 2003). Estos tumores se desarrollaban tan rápidamente que en unos pocos meses todos los ratones morían. Observó también que, a animales a los cuales les faltaba sólo una de las dos copias del gen *H2AX*, es decir, que se encontraban en condición homocigota para este gen, el proceso del desarrollo del cáncer era más acelerado, la posibilidad de que sólo la mitad de los niveles de la proteína *H2AX* -llamada "*haploinsuficiencia active instability genomic*", se podría explicar más fácilmente porque la proteína no es una enzima, es una proteína estructural. Por lo tanto, si al menos la mitad está presente, podría causar problemas en la supervisión de rupturas de ADN y en la incorporación de los componentes de la maquinaria de reparación, de manera que es posible pensar en que evolutivamente la condición homocigota en algunos alelos del cromosoma 11 no es factible ya que conllevaría a la muerte de los ratones, condición ésta que se pudo

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

haberse evitado posiblemente por la selección artificial, de quienes han manejado la colonia de producción.

Ante esta situación, es sin embargo importante resaltar, que en este tipo de análisis genético, deben estudiarse la mayor cantidad de marcadores moleculares posibles y sobre todo, que dichos marcadores sean informativos para el estudio. Por lo que es recomendable, continuar analizando el cromosoma 11 para completar la información hallada en este trabajo.

Varios autores (Altman y Katz, 1979; Nomura y col., 1984; Silver, 1995; Benavides y Guénet, 2003) señalan que para la caracterización de las cepas consanguíneas se deben analizar los parámetros reproductivos, ya que éstos monitorean múltiples *loci*, dentro de estos parámetros se recomiendan: el número de crías por camada, ya que éste parámetro es característico de cada cepa y se encuentra determinado genéticamente. Se analizaron los datos registrados en las tarjetas de producción de los últimos años, no solo se tomó en cuenta el número promedio de cría por camada, sino también el número promedio de crías destetadas por camada y el periodo interpartal. Para el análisis de éstos registro se compararon con lo reportado por bases de datos de la IFFA CREDO, el cual es un laboratorio internacional, encontrándose que los valores de la colonia producida en BIOULA, son similares a los reportados en el manual de la IFFA CREDO, los valores obtenidos fueron de 5,5(C.N); 5,2(C.D) y 50(P.I), y las registradas en el manual son 7,01(C.N); 6,0(C.D) y 35,03(P.I).

Otros parámetros estudiados para caracterizar la cepa fueron los parámetros fisiológicos en los cuales encontramos ganancia de peso y talla (crecimiento) y las pruebas hematológicas y bioquímicas sanguíneas.

Para el caso de la ganancia de peso se pudo observar un aumento continuo a los largo de las ocho semanas del estudio, tiempo en el cual se alcanza la edad adulta. En esta edad no se observó diferencias en el peso entre machos y hembras ya que el peso promedio de estos animales en estado adulto se encontró en un rango entre 25 y 30 g.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La ganancia de peso se comparó con lo reportado por la base de datos reportados por *The Jackson Laboratory*, observándose que la curva para la ganancia de peso obtenida en este estudio (figuras 5 y 16) fue similar a la reportada por este laboratorio. En la curva de ganancia en talla tanto para machos como para las hembras se observó la misma tendencia que para la ganancia de peso, es decir, ocurrió un crecimiento continuo hasta la edad adulta, estos valores no se compararon con ninguna base de datos, ya que ninguna la reporta.

En relación a los valores de hematocrito y hemoglobina para dicha cepa se encontró un 35% (valor promedio) para machos y hembras para el primer parámetro y 13,8g/dl para el segundo parámetro, para los ratones producidos en BIOULA, sin embargo, al compararlos con los valores que reporta la base de datos *The Jackson Laboratory*, éstos se encuentran en niveles inferiores ya que en el caso de la hemoglobina está reportado un rango entre 16 y 17g/dl, y en el caso del valor del hematocrito el reportado está alrededor de 51 y 52%. A pesar de la diferencia encontrada se puede decir que los valores encontrados para los animales de BIOULA, son característicos de éstos ya que las condiciones de alimentación que tienen los animales de laboratorio en el país son diferentes a la de otros países, además que en éstos la dieta de los animales usados para la experimentación es estandarizada. Estos valores son entonces los que deben ser tomados en cuenta por los investigadores como los valores estándar, y no los reportados en la bibliografía internacional.

Con respecto al valor de glóbulos blancos cuyo valor obtenido fue de 6048,4 para los machos y de 7022 (100mm^3) no son semejantes con los reportados.

El recuento diferencial de la cepa *C57BL/6//Aly//BIO*, rindió valores que se desvían un poco de los valores reportados para la cepa *C57BL/6*, en donde el porcentaje de linfocitos de 82,6% (valor promedio para machos y hembras), es un poco menor al 93% hallado para nuestra colonia (ver tablas 2 y 10). Mientras que, los valores de neutrofilos (6,6%), eosinofilos(0%), de nuestra cepa, fueron menores con respecto a los reportados para el grupo de comparación.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Con respecto a los parámetros bioquímicos tanto de glucosa (80,0 mg/dl) como coleserol (64,7) también fueron menores con respecto a los reportados en las base de datos caso contrario ocurrió con el valor encontrado para la creatinina un valor promedio para machos y hembras de 13.5g/dl muy cercano al valor promedio reportado que es de 12.5g/dl (tablas 3 y 11). Como ya se dijo estos valores encontrados difieren un poco de lo reportado pero están dentro de los rangos característicos de los mamíferos, además depende de la alimentación y las condiciones físico natural del entorno en donde se encuentran dichos animales

Según los resultados obtenidos en este estudio podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- ✓ La condición homoalélica de la cepa consanguínea *C57BL/6//Aly//BIOU*, fue demostrada para 6 de los microsatélites analizados en este trabajo, lo cual complementa lo reportado por (De Jesús 2006), quien analizó 6 microsatélites que presentaron igualmente la condición de homoalelismo. La cepa presenta entonces una condición homoalelica para un total de los 11 microsatélites analizados, en ambas pruebas. Se toman en cuenta 11 debido a que el microsatélite *DIMit17* fue monitoreado en ambos trabajos.
- ✓ En el análisis molecular dos de los microsatélites analizados presentaron diferencias en los pares de bases con respecto a lo reportado en la base de datos, lo que conlleva a pensar en que los ratones producidos en BIOULA, son una sub-cepa de la cepa *C57BL/6* original.
- ✓ Deben continuarse analizando más microsatélites para determinar si la condición de bialelismo encontrada en la amplificación del *D11Mit2*, esta incluida en el 1% de heterocigosis residual característica de los ratones consanguíneos.
- ✓ Debe realizarse otros estudios moleculares que permitan hacer una mejor caracterización de éstos ratones producidos en BIOULA entre estos el

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

secuenciamiento de los productos de amplificación que no son similares a los reportados por las bases de datos.

- ✓ Se cumplieron los objetivos planteados para la caracterización genética y fenotípica de los ratones C57BL/6//Aly//BIOU producidos en BIOULA.
- ✓ Los resultados obtenidos sirven para iniciar la base de datos de estos animales, para ser reportados ante el Comité de Nomenclatura de los ratones de laboratorio como una sub-cepa y de esta manera los investigadores usuarios de los mismos puedan reportarlos en sus publicaciones con la garantía de que los resultados de sus investigaciones sean reconocidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ace Animals, Inc (2006). **Información disponible sobre ratones C57BL/6:**
<http://www.aceanimal.com/C57BL/6.htm> [Consulta: 24 Noviembre 2007].

Allain, C. (1974). Método enzimático para la degradación de colesterol en la sangre.
Clinical Chemistry. 20: 470-475.

Alt FW (2000). Gene Rearrangement, DNA Repair, Genomic Stability, and Cancer.
<http://www.hhmi.org/research/investigators/alt.html#top>

Alt FW (2003). DNA-Repair Machine Maintains Genomic Stability
<http://www.hhmi.org/news/alt2.html>.

Altman PL. and Katz DD (1979). Eds **Inbred and genetically hinged quality defined strains of laboratory animal. Part I. Mouse and Rat. Part II. Hamster, Guinea Pig, Rabbit and Chicken.** Federation of American societies for Experimental Biology. Bethesda Maryland. Pagina: 330.

Ayala, M., Anguiano, E., Plascencia, J., Galindo, J., De la Peña, J., Villagómez, D., Sánchez, D., Schweminski, S., Taylor, J., Guerrero, Luis., Merlos, M., Topete, R., Duifhuis, T. (2006). Selección Asistida con Marcadores Genéticos Moleculares (DNA) para el color del pelaje negro en Caballos pura raza Española. Instituto de Biotecnología Animal. 716- 719.

Bailey DW. (1982). **How pure and inbred strains of mice?** Immunology Today. 3: 210- 214.

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benavides F., and Guénet J-L. (2003). Eds. **Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones.** Universidad de Alcalá. Laboratory animal Ltd. SECAL. 90- 312

Bonhomme F., Britton-Davidian J., Chapman V., Moriwaki K, Nevo E., and Thaler L. (1983). **Biochemical Diversity and Evolution in the Genus Mus.** Biochemical genetics 22: 275- 303.

Brondani, R.; Brondani, C.; Tarchini, R. and Grattapaglia, D. (1998). Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. Theoretical and Applied Genetics. 97: 816- 827

CIENCIA Al DIA Internacional (2007) Glosario: C:\Documents and Settings\USUARIO\Mis documentos\tesis\Ciencia al Día Internacional - Glosario.htm. [Consulta: 24 Noviembre 2007].

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

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.

Doebley, J. and Wendel, J.D. (1989). Application of RFLPs to plant systematics. In : Helentjarus, T.; Barr, B. (Eds.) Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. New York, U.S.A. Cold Spring Harbor Laboratories. 57- 67

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Festing M.F.W. (1982). **Genetic contamination of laboratory animal colonies: an increasingly serious problem.** Institute laboratory Animal Research News: 25: 6- 10

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

Festing m.F.W. (1993). **Genetic quality control in laboratory rodents.** Aging Clinical Experimental Research. 5: 309- 315.

Foolad, M.R.; Arulsekhar, S.; Becerra, V. and Bliss, F.A. (1995). A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. Theoretical and Applied Genetics. 91: 262- 269

Gibbs, R. (1990). **DNA amplification by the polymerase chain reaction.** Anal. Chem. 62: 1202- 1214

Guyton, A y Hall, J. (1997). **Tratado de Fisiología Médica.** Interamericana McGRAW-Hill. Novena edición. México. D.F.

Green Mc., Beechey CV., Davisson EP., Evans EP Lane PW., Lyon mF., Roderick TH., searle aG., Shreffler dc., Staats j., Taylor BA and Womack JE. (1981). **Genetic Variants and Starins of Laboratory Mouse.** Gustav Fisher Verlag. Stuttgart. NY. Capitulo1: 1-7

Griffths AJF., Gelbart WM., Miller JH. and Lewontin RC (1999) Ed. **Modern Genetic Analysis.** WH. FEEMAN AND COMPANY. New York. 570.

Heat, D.D.; Iwama, G.K. and Devlin, R.H. (1993). PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes. Nucleic Acids Research. 21: 5782- 5785.

Hedrich H.J (1990) **Genetic monitoring of inbred strain of rat rat. Manual on colony management basic monitoring techniques and Genetic variants of the**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

laboratory rats. International Council Laboratory Animal Science. Gustav Fischer Stuttgart. New York.

Institute of Laboratory Animals Resources. Division of biological Sciences. Assembly of life Science. National Research Council. (1979). **Laboratory animal management: genetics.** Institute of laboratory animals resource. National Academy of Science. Washinton. D.C. News: 23:1

Kahan B., Auerbach R., Alter BJ. and Bach FH. (1987). **Histocompatibility and isoenzyme difference in commercial supplied BALB/c mice.** Science. 217: 379- 381.

Katzir, N.; Danin-Poleg, Y.; Tzuri, G.; Karchi, Z.; Lavi, U. and Cregan, P. (1996). Length polymorphism and homologies of microsatellites in several *Cucurbitaceae* species. Theoretical and Applied Genetics. 93: 1282- 1290.

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

Klungland, H., Vage, D., Gomez, L., Adalsteinsson, S., Lien, S. (1995). The role of melanocyte- stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. Mamm Genome. 6: 636- 9.

Larzul, D. (1992). **PCR. Un procédé d'amplification.** Ed. Collection Genie-Genetique. Tec & Doc. Lavoisier Editions Medicales internationales. Capitulo 5. 1- 31.

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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Love JM., Knight AM., McAleer MA. And Todd JA. (1990). **Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-based microsatellites.** Nucleic Acids Research. 18(4): 4123- 4130.

Lyon MC., Rastan s. And Brown S. (1996). **Genetics Variants and strains of the Laboratory Mouse.** Oxford University Press. NY. 443.

Manual IFFA CREDO.

Meraz A, y Sanchez C. (2001). **Animales Modificados Genéticamente. La Herramienta del Futuro.** Revista digital Universitaria 1: 3.

Mettler, L y Gregg, T. (1972). **Genética de las poblaciones y evolución.** Union tipográfica Editorial Hiapano-Americana. Distrito Federal. México.

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

Nomura T.; Esaki, K and tomita t. (1984). Eds. **Manual for Genetic monitoring in inbred mice.** Iclas. University of Tokio press. 114.

Paoaioannou VE and Festing MFW. (1980). **Genetic drift in a stock of laboratory mice. Laboratory Animals.** 14: 11- 13.

Paredes, M. and Gepts, P. (1995). Extensive introgression of Middle American germplasm into Chilean common bean. Genetic Resources and Crop Evolution. 42: 29-41

Perl-Treves, R.; Zamir, R.; Navot, D. and Galun, E. (1985). Phylogeny of *Cucumis* based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. Theoretical and Applied Genetics. 71: 430- 436

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ramakrishna, W; Chowdari, K.; Lagu, M.; Gupta, V. and Ranjekar, P. 1995. DNA fingerprinting to detect genetic variation in rice using hypervariable DNA sequences. *Theoretical and Applied Genetics*. 90: 1000- 1006

Robbins, L., Nadeau, J., Johnson, K., Kelly, M., Roselli L., Baack E, Mountjoy, G., Cone, R. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*. 72: 827- 34.

Sambrook, J. y Russell, D. (2001). Ed. **Molecular Cloning. A laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 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.

Silver L, (1995). **Mouse Genetics. Concepts and Applications**. Oxford University Press.

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

Stanfield W., (1992). **Genética**. McGRAW- HILL INTERAMERICANA. México. 287

Trider, P. (1969). Determination of **Glucose in Blood using Glucose Oxidase** *Ann Clinical Biochemistry*. 6- 24

The Jackson Laboratory. (2004). **Mouse Genome Informatic**. Disponible: <http://www.informatics.jax.org>.

Tolwani, RJ., Varma S. and Otto G. (2002). Use of **molecular methods for genetic of an institutional mouse breeding colony**. *Contemporary Topical Laboratory Animals Science*. 41: 23-29.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Wang, Z.Y.; Second, G. and Tanskley, S.D. (1992). Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*. 83: 565- 581

West J., Lyon M. and Peters J. (1985). **Genetic differences between subtrains of the inbred mouse strain 101 and designation of a new strain 102**. *Genetic research*. 46: 349- 352.

Williams, K.G.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalsky, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531- 6533

White, T.J.; Arnheim, N. and ERLICH, H. (1989). The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics* 5: 185- 188

Zuñiga J.M., Tur Marí J.A., Milocco S.N., y Piñeiro R. (2000). Eds. **Ciencia Tecnología en protección y experimentación animal**. McGraw-Hill. Interamericana. Cap. 6: 179-202

APÉNDICE

APENDICE A

Amortiguadores, soluciones y colorantes

✓ **Buffer de lisis para extracción de ADN con Ananase**

NaCl	0,4 M
Bueffer TE	
SDS	10%
Ananase	20ng/ml

✓ **Buffer TE (pH 8,2)**

Tris HCl	10mM
EDTA	1mM

✓ **Buffer Tris-Borato-EDTA 5X (500ml)**

Tris Base	27g
Acido Bórico	13,75g
EDTA 0,5M (pH 8,2)	10ml
Agua destilada estéril	500ml

✓ **Reactivo de Turk**

Violeta de Genciana 1%	1ml
Acido Acetico Glacial	2ml
Agua destilada	100ml

APÉNDICE

✓ **Colorante Giemsa**

Colorante en polvo	1g
Metanol	66ml
Glicerol	66ml

✓ **Solución 1**

Buffer TE + NaCl 0,4 M pH: 8,2

✓ **Solución B**

SDS 10 % + Ananasa 20 mg / ml

APENDICE B

Kit Comerciales Enzimáticos

✓ **HemogloWiner Estándar**

Vial contenido de solución estandarizada de hemoglobina nativa.

✓ **Qualitest Glucosa**

Patrón 100mg/dl de Glucosa: 1 vial con 2,5ml

Enzimas: 2 viales con 2,5ml c/u

Sustrato: 2 viales con 2,5ml c/u

Solución Tampón: 2 botellas con 250ml c/u

✓ **Qualitest Colesterol**

Patrón 200mg/dl de colesterol: 1 vial con 2,5ml

Enzimas: 1 vial con 2,5ml c/u

Sustrato: 1 vial con 2,5ml c/u

Solución Tampón: 2 botellas con 250ml c/u