



Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Bioterio de la Universidad de Los Andes

Determinación de la condición genética de la cepa consanguínea (*BALB/c//BIOULA*) y verificación de algunos parámetros fisiológicos

Trabajo Especial de grado presentado por el Br. Williams Enrique Torres Becerra ante la ilustre Universidad de Los Andes para optar al título de Licenciado en Biología

Abril 2009

“Trabajo realizado en el Laboratorio de Control Genético de Roedores del Bioterio de la Universidad de Los Andes y financiado por el Centro de Desarrollo, Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes mediante el Proyecto N° C-1377-06-03-A.”

“Gracias a la vida que me ha dado tanto.....”

V.P

«Hay hombres que luchan un día y son buenos, otros luchan un año y son mejores, hay quienes luchan muchos años y son muy buenos, pero están los que luchan toda la vida, y esos son los imprescindibles»

B. Brecht

Agradecimientos

A Jesús de Nazaret por sus enseñanzas.....

A mis padres María y Agustín por haberme educado y confiar en mí hasta el final.

A mis hermanos Ariana, Josué, Samuel y Alexander por siempre estar allí.

A la profesora Rosa De Jesús por darme un espacio en el bioterio, ser tan paciente y tolerarme estaré eternamente agradecido

Al profesor Néstor González por estar siempre tan atento y por haberme enseñado tantas cosas.

A los profesores Arístides Arellán y la profe Ivany Lozano y sus hijas por haber sido como una familia para mí.

A los profesores, Gustavo Fermín, Luisana Avilán, Jhon Cruz y al laboratorio de Fisiología Animal por todo el apoyo recibido.

A mi amiga y camarada Dennys Uzcátegui por ser tan comprensiva y compartir tanto.
GRACIAS.....

Al personal del bioterio por su aporte a este trabajo.

A mis amigos y compañeros de estudio Héctor, Ramón, Erick, William, Alfredo, Neyda, Yolanda, Masyelli, Yesenia, Vanesa.

A mi familia de Mérida por haberme abierto las puertas de su casa, Maritza, Alcides, Alcides Manuel y Ángelo.

A Sioly y Dulce gracias por tanta colaboración.

A la ciudad de Mérida y a la ilustre Universidad de Los Andes porque allí me formé, y soñé tanto y ahora es una realidad.....

Resumen

Las cepas consanguíneas de ratones usadas en la investigación deben presentar dos características importantes tales como homocigosis en el 99% de los alelos e isogenicidad en el 99% de los *loci* de la colonia. Cuando se hace referencia a una homocigosis tan elevada en el genoma se habla de pureza genética. Una alteración de ésta puede darse por el apareamiento entre ratones de una cepa consanguínea con otros de un grupo no consanguíneo, produciéndose entonces ratones heterocigotos, por lo que se habla de una contaminación genética de las cepas consanguíneas. La presencia de la condición heterocigótica altera las características particulares de las cepas consanguíneas y por tanto modifican sus respuestas fisiológicas, conduciendo a resultados no esperados en las pruebas realizadas en estos animales. El uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para el análisis de microsatélites, es una herramienta valiosa para determinar heterocigosis en las cepas consanguíneas. Este estudio tiene como objetivo determinar si las cepas de ratones consanguíneos *BALB/c//BIO* producidas en el Bioterio de la Universidad de Los Andes después de 25 generaciones de producción mantienen su condición de homocigosis. Par el desarrollo de la PCR se realizó la extracción del ADN mediante el uso de la enzima Bromelina (Ananase 20mg/ml). Se determinó la calidad de ADN de los animales del núcleo de fundación, mediante espectrofotometría y electroforesis. A continuación se estandarizó la técnica de la PCR por microsatélite usado, realizando curvas de concentraciones de $MgCl_2$. Luego se realizó la identificación de los alelos de nueve microsatélites y se compararon sus productos de amplificación con lo reportado en la base de datos del laboratorio *The Jackson Laboratory*, los resultados obtenidos, nos dan garantía de la condición homoalélica de la cepas consanguínea *BALB/c* que se produce en el Bioterio de la Universidad de Los Andes. Se evaluaron parámetros fisiológicos y zootecnicos como: tamaño de la camada, ganancia peso talla, y pruebas bioquímicas y química sanguínea, que al compararlos con bases de datos internacionales determinaron que la condición fisiológica de los animales de la cepa *BALB/c* producida en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, y que están dentro de los estándares reportados para la cepa mencionada.

Palabras clave: cepas consanguíneas, PCR, microsatélites, ratones.

Abstract

The inbred strain of mouse used in the research need to have two important characteristics such as homozygous at 99% of the alleles and inbreeding at 99% of the *loci* from the colony. When it refers to a homozygous so high on the genome we talk of genetic purity. One change of the genetic purity can happen for the mating between inbred strain mouse with others of an inbred groups, resulting then heterozygous mouse, that why we talk about a genetic contamination of the inbred strain. The presence of the heterozygous condition change the particular features of the inbred strain and therefore modify their physiological response, driving to non expected results in the made test on this animals. The use of Polimerase Chain Reaction (PCR) for the microsatellite analysis, it is a value tool to determinate heterozygosity on the inbred strain. This investigation have the purpose of determinate if the inbred strain of mouse *BALB/c//BIO* resulting on the Bioterio of the Universidad de Los Andes after 25 result generations, keep their condition of homozygous. For the development of the PCR we made the extraction of DNA using the Bromelina enzyme (Ananase 20mg/ml). It determinated if the quality of DNA of the animals of the foundation nucleus, using electrophoresis and spectrophotometry. Followed we standardized the PCR technic by used microsatellite, doing concentration curves of $MgCl_2$. Then we did an identification of the allele of 9 microsatellites and compare them with their products of amplification with the information results on the data base of *The Jackson Laboratory*, the outcoming results give us warranty of the homoallelic condition of the inbred strain *BALB/c* that the Bioterio de la Universidad de Los Andes produces. We evaluated physiological and zootechnics parameters such as: size of the brood, increase of weight and size, biochemical proof and blood chemistry, that compare to the international data base determinate the physiological condition of the animals of the strain *BALB/c* produced on the Bioterio de la Universidad de Los Andes, and that they are on the standars reports for the named strain.

Key Words: Inbred strain, PCR, microsatellite, mouse.

Lista de siglas y abreviaturas

ADN	Acido Desoxirribonucleico
ALT	Alanina aminotransferasa
ARN	Acido Ribonucleico
cm	Centímetro
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Acido diamino tetracético
ER	Enzima de restricción
F	Coefficiente de consanguinidad
GOT	Transaminasa glutamato/oxalacetato
GPT	Transaminasa glutamato/piruvato
H2	Complejo Mayor de Histocompatibilidad del ratón
Kb	Kilobases
Kd	Kilodaltón
µl	Microlitro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
MΩ	Miliomnios
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismos de los Fragmentos de Restricción
rcf	Fuerza centrifuga relativa
SSR	Secuencias simples repetidas
SNP	Nucleótidos simples polimórficos
TBE	Tris-Borato EDTA
U	Unidades de enzima
VNTR	Numero Variable de Repeticiones en Tándem

Índice General

Agradecimientos	I
Resumen	II
Lista de siglas y abreviaturas	III
Índice General	IV
Índice de Figuras	VII
Índice Tablas	VIII
Capítulo I	1
Introducción	
Ventajas del uso del ratón en la investigación	2
Cepas de Ratones Consanguíneas	3
Condición genética de los ratones consanguíneos	6
Características de la cepa consanguínea <i>BALB/c</i>	7
Factores que afectan la condición genética de los ratones consanguíneos.	9
○ Mutaciones espontáneas	
○ Deriva génica y selección	
○ Contaminación génica	
Detección de alteraciones en la contaminación génica (monitoreo genético)	11
○ Caracteres reproductivos	
○ Análisis de marcadores moleculares	
○ Marcadores microsatelites analizados mediante PCR	
Análisis de características fisiológicas de los ratones de laboratorio	16
○ Variables fisiológicas: crecimiento, ganancia en peso y talla	
○ Parámetros zootécnicos: caracteres reproductivos	
○ Variables fisiológicas Parámetros hematológicos	
○ Variables fisiológicas Parámetros bioquímicos	
Capítulo II	21
Hipótesis	
Objetivos	22
○ Objetivos Generales	

○ Objetivos Específicos	
Justificación del Proyecto y aplicabilidad de los resultados	23
Capítulo III	24
Metodología	
I. Extracción de ADN genómico de ratones de la cepa consanguínea <i>BALB/c//BIOULA</i> , a partir de tejido de oreja mediante digestión con Ananase (comunicación personal profesor Néstor González).	24
II. Estimación de la cantidad y calidad del ADN genómico extraído mediante espectrofotometría y electroforesis.	26
III. Optimización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación de los microsatélites: <i>D1Mit17</i> , <i>D1MIT14</i> , <i>D5Mit254</i> , <i>D6Mit160</i> , <i>D10Mit10</i> , <i>D11 Mit2</i> , <i>D11mit31</i> , <i>D13 Mit13</i> y <i>D15 Mit63</i> .	26
IV. Formación de un banco de ADN extraído de tejido de oreja de la cepa de ratones <i>BALB/c//BIOULA</i> para su control genético.	28
V. Identificación los alelos para cada uno de los microsatélites seleccionados, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa	28
VI. Análisis de Características Fisiológicas de la Cepa de Ratones <i>BALB/c//BIOULA</i>	29
VI.1 Variable Fisiológica: crecimiento (ganancia de peso y talla).	30
VI.2 Parámetros zootécnicos: Caracteres Reproductivos	30
VI.3 Variable Fisiológica: Parámetros Hematológicos	30
VI.4 Variable Fisiológica: Parámetros Bioquímicos	32
Capítulo IV	38
Resultados	
I. Formación del banco de ADN de los ratones del núcleo de fundación de la cepa consanguínea <i>BALB/c//BIOULA</i> , mediante la extracción del ADN del tejido de la oreja	37
II. Optimización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación de los microsatélites: <i>D1Mit17</i> , <i>D1MIT14</i> , <i>D5Mit254</i> , <i>D6Mit160</i> , <i>D10Mit10</i> , <i>D11 Mit2</i> , <i>D11mit31</i> , <i>D13 Mit13</i> , y <i>D15 Mit63</i> .	39
III. Identificación los alelos para cada uno de los 09 <i>loci</i> de los microsatélites seleccionados en las cepas de ratones consanguíneos (<i>BALB/c//BIOULA</i>)	40
IV. Análisis de Características Fisiológicas de la Cepa de Ratone <i>BALB/c//BIOULA</i>	46

IV.1. Variable Fisiológica: crecimiento (ganancia de peso y talla).	47
V.2. Variable Fisiológica: Parámetros Hematológicos	49
V.3. Variable Fisiológica: Parámetros Bioquímicos	49
Capítulo V	51
Discusión y Conclusiones	
Capítulo VI	55
Referencias bibliográficas	
Anexo	60
Tabla Pedigree	

Índice de Figuras

Figura		Pág.
Figura 1.	Cepas puras son desarrolladas por el apareamiento continuo.	4
Figura 2:	Esquema que ilustra la composición de una región microsatélite en una cadena de ADN	13
Figura 3.	Uso de los microsatélites como marcadores moleculares	15
Figura 4.	Aisladores usados para la producción del núcleo de fundación de los ratones de la cepa <i>BALB/c//BIOULA</i>	24
Figura 5	ADN genómico de oreja de ratón. Electroforesis en gel de agarosa 0.9 %.	37
Figura 6	Curva de concentración de Cloruro de Magnesio para el microsatélite <i>D11Mit2</i> (112 pb).	39
Figura 7	Productos de amplificación para el microsatélite <i>D1Mit17</i>	41
Figura 8	Productos de amplificación para el microsatélite <i>D15Mit63</i>	42
Figura 9	Productos de amplificación para el microsatélite <i>D5Mit254</i>	42
Figura 10	Productos de amplificación para el microsatélite <i>D6Mit180</i>	43
Figura 11	Productos de amplificación para el microsatélite <i>D1Mit14</i>	44
Figura 12:	Productos de amplificación para el microsatélite <i>D11Mit31</i>	44
Figura 13	Productos de amplificación para el microsatélite <i>D10Mit10</i>	45
Figura 14	Productos de amplificación para el microsatelite <i>D13Mit13</i>	45
Figura 15	Productos de amplificación para el microsatelite <i>D11Mit2</i>	46
Figura 16.	Curva de crecimiento dede los ratones de la Cepa <i>BALB/c//BIOULA</i> ., de acuerdo a la ganancia en tamaño (cm)	48
Figura 17	Curva de crecimiento delos ratones de la Cepa <i>BALB/c//BIOULA</i> ., de acuerdo a la ganancia en peso (g)	48

Índice de tablas

Tabla	Título	Pág.
Tabla 1	Resumen de las características de los <i>lo9ci</i> microsatélites	27
Tabla 2	Valores de densidad óptica y concentraciones obtenidas, para cada una de las muestras de ADN del banco de <i>BALB/c//BIOULA</i>	38
Tabla 3	Condiciones de la mezcla de reacción utilizada en el desarrollo de las PCR	40
Tabla 4	Valores de algunos parámetros zotécnicos obtenidos del registro de tarjetas de producción de la cepa de ratones consanguíneos <i>BALB/c</i> .	47
Tabla 5	Valores obtenidos a partir de la evaluación fenotípica de la cepa de de ratones consanguíneos <i>BALB/c</i> , mediante el análisis de parámetros hematológicos.	49
Tabla 6	Valores obtenidos de los diferentes parámetros bioquímicos evaluados en la colonia de ratones consanguíneos <i>BALB/c//BIOULA</i>	50

Capítulo I

Introducción

Las relaciones entre el hombre y el ratón datan desde los inicios de las sociedades agrarias cuando éstos eran una simple conexión adversa. Sin embargo durante 1700 y 1800 la gente comenzó a interesarse en el ratón ya que mostraba variación en el color del pelaje. Seguidamente al trabajo realizado de Mendel sobre la herencia en guisantes a inicios del siglo XX, fue realizado por varios investigadores distintos trabajos aplicando los conceptos planteados por Mendel en ratones y de ésta forma nació la genética del ratón. Uno de estos investigadores fue Clarence Cook Little, quien requirió estandarizar ratones para su investigación sobre la herencia de la coloración del pelaje y la susceptibilidad a padecer cáncer, y en 1909 desarrolló la primera cepa pura de ratones la cual logró por apareamientos sucesivos entre generaciones, de esta manera produjo la primera línea de ratón consanguínea o isogénica, la *DBA* (*D: dilute, B: brown, A: non-agouti*), desde entonces se han mantenido en producción y ésta ha proporcionado una valiosa comprensión de la genética de los mamíferos y de sus enfermedades.

La mejor forma de entender la patología de las enfermedades humanas es el estudio directamente con humanos, sin embargo esta práctica no es moralmente aceptada, los cultivos de tejidos ofrecen una alternativa y pueden dar algún discernimiento dentro de los intrincados procesos celulares, pero semejantes procesos *in vitro* representan una gruesa simplificación de la compleja herencia del organismo completo y carece de proximidad genética. El uso modesto del ratón ha servido por más de 100 años y seguirá sirviendo como mínimo otro siglo, a los estudios de la genética.

Ventajas del uso del ratón en la investigación

Las ventajas del uso del ratón incluye el tamaño pequeño, el corto período generacional, y la fácil manipulación genética . El genoma del ratón comprende 2.5 GB que se despliegan a lo largo de 19 cromosomas, esto implica 30.000 genes identificables, realizando comparación con el de los genes humanos: el 99 % son homólogos y el orden de éstos es altamente conservado, al igual que en el genoma humano; solo un pequeño porcentaje del ADN codifica para genes funcionales, y entre 7000 y 10000 genes son asociados con enfermedades específicas en el hombre, esto proporciona un modelo preciso y efectivo para la investigación de terapias específicas. Para la medicina experimental el ratón es un organismo modelo que ofrece muchas ventajas con respecto a otros modelos genéticos tales como la mosca (*Drosophila melanogaster*); el nematodo (*Caenorhaditis elegans*), ambos con sus genomas secuenciados totalmente; e inclusive con respecto a la rata.

Se estima que el 95 % de los animales usados en la investigación biomédica son roedores, de los cuales 90 % son ratas y ratones, 2 % son hamsters, 2% son cobayos y 1% otras especies. Otras ventajas además de las mencionadas anteriormente, que ofrecen los ratones, son las siguientes:

- Al tratarse de un mamífero, una gran parte de los procesos bioquímicos son muy similares al hombre, aunque no hay que perder de vista que no se trata de un ser humano en miniatura.
- Tiene un tiempo generacional relativamente muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida de cautiverio en los bioterios, lo que permite controlar las variables experimentales en las experimentaciones.
- Comparte con el hombre el privilegio de ser la especie de mamífero mejor estudiada desde el punto de vista genético.

- Existe una cantidad enorme de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénitas, además de miles de mutaciones y un gran número de arreglos cromosómicos disponibles.
- Es el único animal que posee sistemas eficientes de células embrionarias pluripotenciales (“ES cells”) para generar quimeras, lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (por ej.: el sistema *Cre/loxP*).
- Finalmente, el trabajo acumulado durante un siglo de investigaciones ha resultado en el conocimiento de una inmensa cantidad de fenotipos mutantes, de las características de las cepas y de los mapas genéticos. (Benavides y Guénet, 2003).

El desarrollo de cepas consanguíneas ha proporcionado modelos estandarizados y uniformes en el desarrollo de estudios en áreas como la genética, fisiología y la patología, estudios toxicológicos, como también han sido usadas herramientas novedosas de biotecnología y la bioinformática.

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

Cepas de Ratones Consanguíneas

Se considera una cepa consanguínea de acuerdo a las reglas adoptadas, por el comité sobre la nomenclatura genética estandarizada para el ratón, en el año de 1978: “aquella que ha sido apareada hermanos con hermanos por veinte o más de 20 generaciones consecutivas, y es derivada de una sola pareja reproductora ancestral” (Green, *et al.*, 1981; Festing, 1993).

Una cepa de ratones se considera consanguínea cuando alcanza un coeficiente de consanguinidad cercano al 100% (Figura 1). El coeficiente de consanguinidad, es la probabilidad de que dos genes sean idénticos por descendencia (Falconer and McKay, 1981), es decir, que los dos genes que aportan un carácter particular, sean copias de uno de los genes de un ancestro común. El coeficiente de consanguinidad, simbolizado por F , es una propiedad de un individuo, sin embargo, la consanguinidad afecta profundamente la composición genética de una población y en las circunstancias adecuadas puede conducir a la formación de cepas puras en el que todos los individuos son prácticamente idénticos genéticamente.

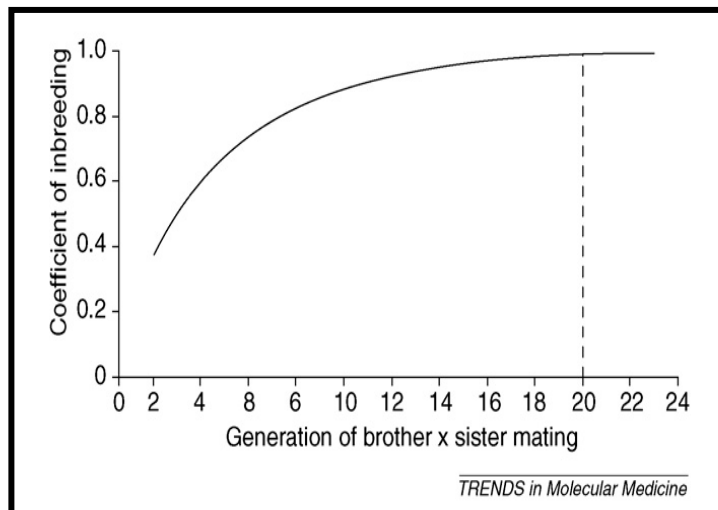


Figura 1. Cepas puras son desarrolladas por el apareamiento continuo. Después de 20 generaciones, cualquier superviviente es teóricamente 98,7% homocigotos en todos los *loci*.

La consanguinidad se expresa siempre en relación con un punto arbitrario en el que el coeficiente de consanguinidad se supone igual a cero; la magnitud de los efectos de la consanguinidad dentro de la población, dependerán de los antecedentes de la misma y de la medida en que la consanguinidad se haya logrado. Para que una cepa sea considerada como consanguínea F debe ser igual a 99%, el cual es el valor alcanzado en la generación 20 de endocria, para que este valor alcance el 100% deben transcurrir unas 150 generaciones (Stanfield, 1992; Silver 1995).

Las cepas consanguíneas presentan varias características generales que le confieren

importancia científica. Estas características son: homocigosis, isogéinicidad 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 sus genes. Solo existirán genes en un estado heterocigoto en un 1%, denominado heterocigosis residual (Nomura, *et al.*, 1985; Festing, 1993; Silver, 1995, Benavides y Guénet, 2003).

Isogéinicidad o Igualdad Genética: isogénico significa que todos los individuos de una cepa consanguínea determinada son genéticamente idénticos en un 99% de sus *loci*. Esta característica garantiza que en una experiencia en la cual se utilicen animales consanguíneos, tanto los animales sometidos a los tratamientos, como los controles, utilizados serán genéticamente idénticos. Esta característica facilita los injertos de piel y de tumores entre miembros de una misma cepa (Nomura, *et al.*, 1985; Festing, 1982; 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 características heredables tales como polimorfismo, características cualitativas o cuantitativas, tales como: peso corporal, tamaño de las camadas y otras conductas (Nomura, *et al.*, 1985; Festing, 1982; 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, de 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, *et al.*, 1985; Festing, 1982; 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, *et al.*, 1985; Festing, 1982; 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, *et al.*, 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 *et al.*, 1985; Festing, 1982; 1993; Silver, 1995; Benavides y Guénet, 2003).

Condición genética de los ratones consanguíneos

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).

La pérdida de las características fenotípicas de los ratones consanguíneos, causada

por cruzamientos entre animales pertenecientes a cepas diferentes resulta de una alteración genética, lo que conlleva a serios problemas a nivel de las pruebas realizadas con ellos (Kahan, *et al.*, 1987; Benavides, 1999); las mutaciones y la deriva génica también pueden influenciar en la alteración genética de los ratones consanguíneos (Nomura, *et al.*, 1985).

La condición genética de los ratones consanguíneos se relaciona entonces con la falta de autenticidad génica en las colonias resultando en una pérdida económica considerable ya que se pierde tiempo experimentando con éstos, así como también información ya que los resultados que se obtienen en éstos no son reproducibles (Kahan, *et al.*, 1987). Los ratones de las cepas consanguíneas proveen un modelo genéticamente bien definido, con la ventaja de alta reproducibilidad de los resultados, lo cual no está disponible en ratones de líneas no consanguíneas.

Las principales ventajas en el uso de ratones genéticamente estandarizados o consanguíneos son: 1) la existencia de cepas disponibles comercialmente a nivel internacional; 2) extensa homología entre ratones y humanos; 3) la facilidad para controlar la producción y 4) el más reciente uso en la ingeniería genética (Hickman-Davis, 2001).

Entre las cepas consanguíneas conocidas como clásicas se encuentran la cepa *BALB/c*, la *C57BL/6*, la *DBA* y la *C3H/He*.

Características de la cepa consanguínea *BALB/c*

La cepa *BALB/c* fue desarrollada en el año 1913, procedentes de ratones no consanguíneos “*Bagg albino*”, algunos de estos animales fueron adquiridos por Mc Dowell y transferidos posteriormente a Snell en el año 1932 (quien le añade a la nomenclatura la letra *c*, indicando la condición homocigota recesiva a nivel de este alelo mutado); ratones de esta cepa fueron introducidos en el Bioterio de la

Universidad de Los Andes en el año de 1995, provenientes del Centro Nacional de Producción de animales de laboratorio (CENPALAB) de Cuba, quienes previamente la habían llevado a ese Centro desde el laboratorio de producción animal de Hannover (Alemania).

La condición albina de estos ratones está dada por la presencia del genotipo: A/A , B/B , c/c y DD). El gen A : controla la distribución del pigmento en el pelo. El alelo silvestre A produce un fenotipo denominado agutí, el cual es un tono grisáceo, con aspecto moteado, este es un color muy frecuente en los mamíferos. El gen B , determina el color del pigmento, los dos alelos principales son B , que produce el pigmento negro y b , que da lugar a pigmento marrón. El alelo A en combinación con B , produce el color normal agutí, pero produce un color continuo en combinación con a/a . El gen C , es el alelo silvestre del gen C que permite la manifestación del color, éste alelo en condición homocigota recesiva impide tal manifestación. La constitución c/c presenta una condición epistástica que es específica para los otros genes de color, por lo tanto, animales c/c son albinos. Los albinos son frecuentes en muchas especies de mamíferos y se han descritos también en aves serpientes y peces. En la mayoría de los casos, el gen determina la síntesis de la enzima tirosinasa, que produce la melanina. Un alelo de este gen en conejos c^h (Himalaya) hace que el pigmento se deposite solo en las extremidades corporales.

El alelo c^h puede considerarse una versión del alelo c cuya expresión es sensible al calor. Sólo en las extremidades del cuerpo, que están a una temperatura más baja, el alelo c^h es funcional y puede producir pigmento, en las otras zonas del cuerpo, mas calientes, el alelo se expresa exactamente igual que el alelo “albino” c . El gen D , controla la intensidad de la pigmentación especificada por los otros genes relacionados con el color del pelaje.

Esta cepa se encuentra entre las cinco cepas consanguíneas de ratón más usadas. Dentro de sus características reproductivas se encuentra que presentan un promedio

de cinco crías por camada. Los ratones de la cepa *BALB/c* son usados en la producción de anticuerpos monoclonales, en estudios inmunológicos y parasitológicos entre otros (*The Jackson Laboratory*, 2004).

Factores que afectan la condición genética de los ratones consanguíneos.

La condición genética de consanguinidad puede ser afectada por tres factores: mutaciones espontáneas, deriva genética y por contaminación genética (apareamientos entre ratones de genomas diferentes).

Mutaciones espontáneas: las mutaciones espontáneas se originan por errores o por lesiones espontáneas del ADN, tales como las generadas por desaminación o despurinización. Ocurren aleatoriamente en cualquier momento y en cualquier célula. Por consiguiente el tamaño de un clon mutante es proporcional al momento en que ocurrió la mutación. Las mutaciones suelen provocar pérdida de la función del alelo afectado, bien completamente (mutaciones nulas) o parcialmente (mutaciones rezumantes). Las mutaciones de pérdida de función suelen ser recesivas, algo que queda patente en los heterocigotos, en los que el alelo silvestre suministra suficiente función para producir un fenotipo normal, las mutaciones de ganancia de función suelen ser dominantes, las mutaciones son útiles para estudiar el propio proceso de mutagénesis y para permitir la disección genética de las funciones fisiológicas (Griffiths, *et al.*, 2000).

Deriva genética y Selección: La selección 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 la selección natural y a la selección artificial.

En relación a la primera, ésta 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). También se refiere a las tasas diferenciales de supervivencia las cuales provocan cambios en la frecuencia de ciertos genotipos dentro de la población. La endogamia es un proceso que convierte la variación genética de una población en una genética uniforme, pero en diferentes poblaciones homocigotas, las cuales son llevadas a esta condición por la fijación de alelos elegidos al azar. Mediante la selección natural de un genotipo favorable se producen cambios “dirigidos” de las frecuencias alélicas en cada población. En muchos casos, tales cambios llevan a la homocigocis de un locus en concreto. Por otra parte el heterocigoto puede ser adecuado para un ambiente dado, en lugar de los dos homocigotos, lo cual conduce a un polimorfismo equilibrado (Griffiths, *et al.*, 2000).

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

Tanto la selección natural como la artificial actúan sobre las poblaciones, alterando la frecuencia de los alelos y la predominancia de los caracteres sobre los miembros de la población cambiando la diversidad genética del grupo. Junto con la selección, la deriva genética actúa cambiando las características de las poblaciones.

La deriva genética, la cual es el producto del sorteo de genes durante la transmisión de gametos de los padres a los hijos, tiende a formar una población homocigótica, es decir, tiende entonces a eliminar los genotipos heterocigóticos dentro de las poblaciones. La tasa de cambio depende del grado de heterogeneidad genética y el tamaño efectivo de la población (es decir, el número de individuos que contribuyen

a la próxima generación). Por ejemplo, apareamientos hermanos con hermanas, son conducentes a lograr una tasa de deriva genética rápida. Sin embargo, como la variación genética se agota, la tasa de deriva se reduce. Después de 20 generaciones de hermanos con hermanas de apareamiento, casi toda la variación genética se ha eliminado. Si una nueva mutación se produce en una cepa pura genéticamente, se fija o se elimina rápidamente debido al pequeño tamaño de la población.

Contaminación genética

La calidad de un animal de laboratorio viene determinada por sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas o de cualquier otra índole que definan su fenotipo, el cual es el resultado de la interacción entre su genotipo y el ambiente. Por tanto, dado que el ambiente de los bioterios es homogéneo por estar rigurosamente controlado, las características de un animal de laboratorio derivan principalmente de su patrimonio genético. En consecuencia, el control y la preservación de la calidad genética del animal de laboratorio deben ser prioritarios ya que alteraciones de ésta, por cualquier causa conducirá a resultados no reproducibles (Zuñiga *et al.*, 2000), llevando una alteración de la condición homocigótica u homoalélica a una condición heterocigótica o bialélica, denominada “contaminación genética”; la cual ocurre por el apareamiento de animales que son portadores de genomas diferentes pero con el mismo color de pelaje, lo que conlleva a que no sean percibidas por las personas que les cuidan.

Detección de alteraciones en la condición genética (Monitoreo genético)

Diferentes pruebas se realizan desde la década de los 60 con la finalidad de detectar las alteraciones de la condición de homoalélismo de los ratones consanguíneos, entre éstas se tienen las que monitorean características fenotípicas tales como: color del pelaje, caracteres reproductivos, injertos de piel, caracteres morfológicos, caracteres

bioquímicos e inmunológicos; todas estas pruebas permiten monitorear el genoma de una manera indirecta. A partir de la década de los 80, se utilizan pruebas que permiten monitorear el genoma de una manera directa, tales como: análisis de minisatélites (Heat, *et al.*, 1993); análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (en inglés, *RFLP: Restricción Fragments Length Polimorfism*), (Wang, *et al.*, 1992; Doebley y Wendel, 1989, Foolad, *et al.*, 1995); los Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD), (Williams, *et al.*, 1990); la huella del ADN (*fingerprinting*: en el inglés); el análisis de microsátélites y actualmente los Polimorfismo de un solo nucleótido (en inglés, SNP: *Single Nucleotide Polimorfism*), (Griffith, *et al.*, 1999; Tolwani *et al.*, 2002), estos últimos, actualmente son de mucha importancia en el control genético de animales de laboratorio, ya que ofrecen nuevos marcadores polimórficos aún entre cepas o colonias estrechamente relacionadas, permitiendo identificar contaminación genética (Zweiger, 2002; Petkov, *et al.*, 2004).

A continuación se describirán las pruebas que serán utilizadas en el presente trabajo, para el monitoreo genético de la cepa *BALB/c//BIOULA*, producida en el Bioterio de la Universidad de Los Andes:

Caracteres Reproductivos

El número de crías por camada de los ratones y ratas de laboratorio es una característica propia de cada cepa o colonia. Su promedio es utilizado frecuentemente como un primer indicador de la pureza genética de los animales. Un importante factor de alerta de contaminación genética, será la detección de camadas que difieran ampliamente del promedio establecido para la cepa o colonia. En este caso es aconsejable realizar otros controles más precisos para confirmar en caso de que exista sospecha de alteración de la condición genética (Nomura, *et al.*, 1985; Benavides y Guénet, 2003).

Análisis de marcadores moleculares

El método anteriormente mencionado da información indirecta del genoma de los animales. En la actualidad se utilizan técnicas que se basan en el análisis directo del genoma de los animales, tales como son el análisis de los marcadores moleculares, los que se utilizan para el análisis directo del ADN, es decir, de los rasgos genotípicos, entre los mencionados en la sección anterior, se describirá el análisis de los microsatélites:

Marcadores microsatélites analizados mediante PCR

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (en inglés, SSR: Sequence Simple Repeat), son *loci* polimórficos presentes en el ADN nuclear, que consisten de repeticiones de 1 a 6 nucleótidos, que se ubican uno tras otro y se que se repiten en forma de *tandem*. Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN. La Figura 2, muestra un ejemplo de una secuencia microsatélite no codificante (en rojo), flanqueada por el lado derecho e izquierdo por secuencias (en negro), las cuales son utilizadas como molde para la hibridación de los oligonucleótidos iniciadores o *primers*, en la técnica de PCR.

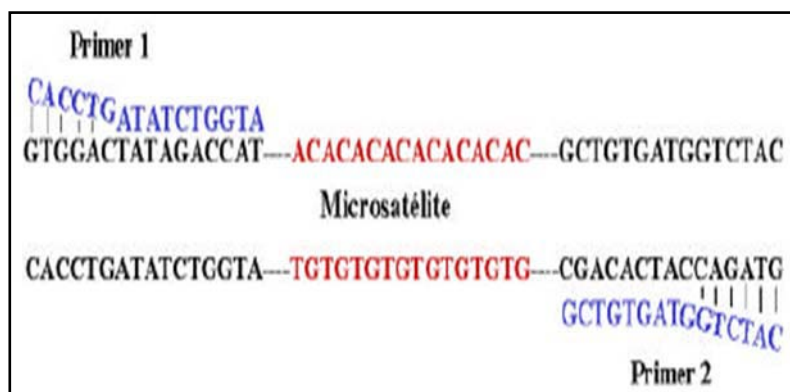


Figura 2: Esquema que ilustra la composición de una región microsatélite en una cadena de ADN (<http://www.Terralia.com/revista12/pagina981.htm>)

El análisis de microsatélites por PCR es una herramienta valiosa (Montagutelli, *et al.*, 1991) para detectar contaminación genética de cepas estrechamente relacionadas como lo son las cepas consanguíneas de ratones, de forma rápida y relativamente económica (Hoffman, 1978; Schalwyk, *et al.*, 1999)

El uso de microsatélites en controles de calidad genética de ratones, presenta varias ventajas sobre las demás técnicas: (a) por ser los microsatélites altamente polimórficos, resulta mucho más fácil la selección de un juego de microsatélites para controlar un grupo de cepas o colonias (Benavides y Guénet, 2003). (b) Muchos de estos polimorfismos se encuentran en el rango de 2 a 40 (pb) y son detectados por la observación de los productos de amplificación por PCR en geles de agarosa o poliacrilamida (Love, *et al.*, 1990); (c) son marcadores codominantes (los heterocigotos se pueden distinguir de los homocigotos y por ello aportan mayor información que los marcadores dominantes; (d) existe gran cantidad de microsatélites, y, (e) todos los microsatélites pueden ser analizados con el mismo protocolo y a partir de cantidades muy pequeñas de ADN, tal como, 50 nanogramos (ng), el cual puede ser obtenido de por ejemplo, unos pocos microlitros (μ l) de sangre o de la punta de la cola de un ratón.

En los últimos años esta técnica ha sido adoptada por la mayoría de los bioterios y grandes productores comerciales de ratas y ratones, como un control genético rápido, eficaz y económico (Benavides, *et al.*, 1998).

Los microsatélites también pueden ser utilizados para estudiar los efectos y el nivel de endogamia (Pemberton, *et al.*, 1999; Sweigart, *et al.*, 1999). El promedio de heterocigosidad de un individuo medido a partir de datos de microsatélites debe reflejar el nivel de endogamia, existen también, nuevos métodos estadísticos avanzados que también han permitido la utilización de marcadores microsatélites en este tipo de estudios (Sweigart, *et al.*, 1999).

En la Figura 3, se muestra un ejemplo del análisis genético mediante microsatélites. Se observan patrones de bandas de los productos de amplificación de los *loci* microsatélites, obtenidos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (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 o bialélica, 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 gen, se presenta una condición de homocigosis o homoalélica.

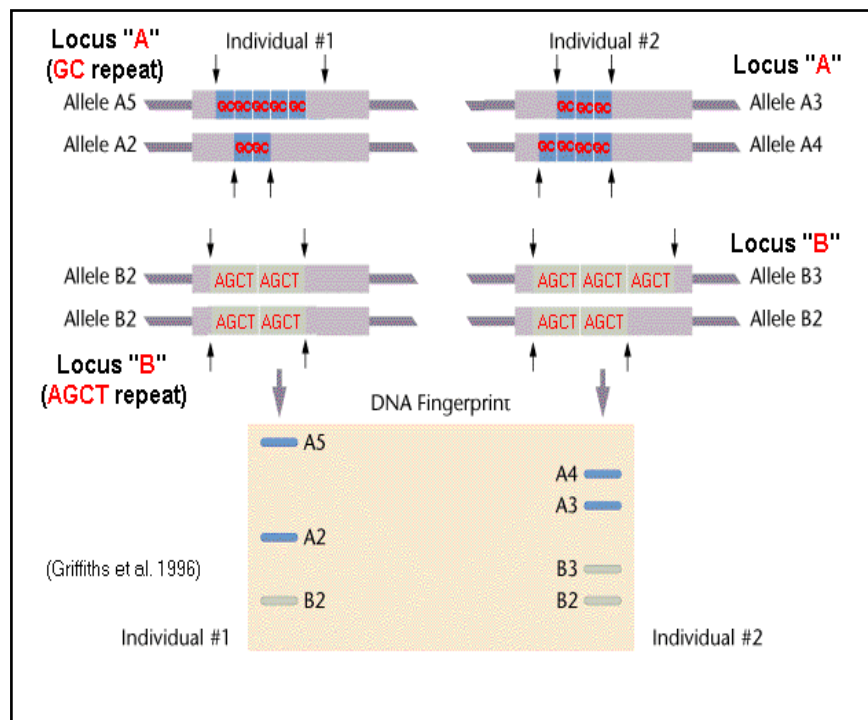


Figura 3. Uso de los microsatélites como marcadores moleculares (Griffiths and Zusuki., 1996)

Análisis de Características Fisiológicas de los Ratones del Laboratorio.

Existen 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, la respuesta a tratamientos farmacológicos, entre otros. Estas características deben ser identificadas en los diferentes bioterios del mundo, para todas las líneas y cepas de ratones que son usados como animales de laboratorio, de esta manera se caracterizan de acuerdo al medio ambiente en el cual se producen y se mantienen, de manera tal que los valores obtenidos sirven de valores normales para las diferentes experiencias que se desarrollan con éstos y a la vez pueden ser comparados y relacionados, con los que son presentados por otros bioterios. Dentro de las características que se analizan en el presente trabajo, se encuentran:

Variables Fisiológicas: crecimiento (ganancia de peso y talla)

Dentro de las variables fenotípicas que se deben analizar para caracterizar una determinada cepa de ratón consanguínea se encuentra la ganancia de peso y talla de los individuos pertenecientes a una colonia, medidos desde la semana del nacimiento hasta la edad adulta (aproximadamente 2 meses), estas mediciones establecen un patrón de crecimiento que es específico para cada cepa, siendo valorizada como una de las características genéticas de las mismas, encontrándose rangos de valores normales establecidos para las distintas cepas consanguíneas

Parámetros zootécnicos: Caracteres Reproductivos

Dentro de los parámetros zootécnicos se consideran el número de crías nacidas por camada, el número de crías destetadas por camada, y el periodo interparto de los 12 años de producción de animales aproximadamente 24 generaciones

Variables Fisiológicas: Parámetros Hematológicos

Dentro de los parámetros hematológicos, se realizan medidas de los valores de la hemoglobina (Hb), hematocrito (Ht), glóbulos blancos y recuento diferencial, estas pruebas determinan el estudio de la hematología completa, la cual es un parámetro determinado genéticamente e influenciado por el ambiente, por lo que al estudiarlo se debe tener esto en cuenta. A continuación se detalla mayor información con respecto a las pruebas que se encuentran involucradas en la hematología completa:

Hemoglobina

La Hemoglobina (Hb), es una heteroproteína de la sangre, que le proporciona su color característico. Este color puede cambiar dependiendo de su contenido en oxígeno (O₂). La hemoglobina de los vertebrados, excepto la de los ciclóstomos, tiene un peso molecular de 68000 KD y contiene cuatro grupos prostéticos de hierro porfirínico *hemo*, asociados a una proteína, la globina (Eckert, 1998), de color rojo característico, la cual es transportada desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, en mamíferos, ovíparos y otros animales. A la hemoglobina la forman cuatro cadenas polipeptídicas (globinas) a cada una de las cuales se une un grupo hemo, cuyo átomo de hierro es capaz de unirse de forma reversible al oxígeno. Niveles bajos de hemoglobina pueden traducirse en: anemias primarias, cáncer, enfermedades renales, enfermedades autoinmunes, hemorragias, linfomas o problemas de alimentación. Si el nivel de hemoglobina aparece alto puede deberse a: cardiopatías, deshidratación, enfermedades pulmonares crónicas, o estancias en lugares de mucha altitud.

Hematocrito

Se define el hematocrito (Ht) como la fracción de volumen que los eritrocitos o hematíes que ocupan un volumen de sangre. Los hematíes o eritrocitos, 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, 1998). Los valores bajos de hematocritos pueden ser indicio de: anemia (de varias clases), pérdida de sangre (hemorragia), insuficiencia de la médula ósea (debido a radiación, toxina, fibrosis o tumor), destrucción de los glóbulos rojos, leucemia, desnutrición o deficiencia nutricional específica, mieloma múltiple o artritis reumatoide. De acuerdo a la condición fisiológica de los animales, los valores altos de hematocritos pueden ser indicio de: deshidratación (quemaduras o diarreas), eritrocitosis (producción excesiva de glóbulos rojos) o policitemia.

Glóbulos blancos

Los leucocitos o glóbulos blancos, son las unidades móviles del sistema protector del organismo. Se forma en parte en la médula ósea (los granulocitos y los monocitos y unos pocos linfocitos), y en parte en el tejido linfático (los linfocitos y las células plasmáticas). Tras su formación son transportados de forma específica a áreas de infección e inflamación intensas, proporcionando una rápida y potente defensa frente a cualquier agente infeccioso que pudiera entrar al organismo (Guyton y Halll. 1998).

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: neutrófilos: 40-75%, eosinófilos: 5%, basófilos: 0,5%, linfocitos: 20-50%, monocitos: 1-5%.

Cuando fisiológicamente el organismo requiere de aumentar la actividad de cualquiera de los tipos celulares en los tejidos periféricos, aumentará el número y la proporción de ese determinado tipo celular (Stevens y Lowe, 1997).

Variables Fisiológicas: Parámetros bioquímicos

Dentro de los parámetros bioquímicos sanguíneos, es importante conocer los valores de los mismos, ya que además de permitir conocer la condición fisiológica de los animales que se producen en los bioterios, pueden servir de valores normales para las diferentes investigaciones en los cuales se les utiliza; entre estos se encuentran: glucosa, colesterol, creatinina, albúmina, triglicéridos, ácido úrico, calcio y la urea. A continuación se detallan el fundamento de las pruebas realizadas.

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 más importante para la captura y transferencia de energía libre en los sistemas biológicos, el Adenosina 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, *et al.*, 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: dos radicales metilo en las posiciones C-10 y C-13, una cadena alifática ramificada de 8 carbonos en la posición C-17, un grupo hidroxilo en la posición C-3, y, una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6 (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, *et al.*, 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 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

Capítulo II

Hipótesis

Dependiendo de los sistemas de producción que se desarrollan en los bioterios, los ratones pueden ser considerados consanguíneos o no consanguíneos, en relación con los ratones consanguíneos su condición genética puede ser observada cuando los productos de amplificación logrados mediante la técnica de PCR de microsatélites seleccionados, presentan la condición homoalélica, además, que los valores obtenidos al analizar diferentes parámetros fisiológicos, son similares entre los miembros de una misma cepa e igualmente se encuentran entre los rangos reportados en bases de datos como parte del background genético de las mismas. Por tanto, al analizar el genoma de los ratones de la cepa *BALB/c//BIOULA*, producidos en el bioterio de la Universidad de Los Andes, para distintos microsatélites analizados mediante la amplificación con la técnica de la PCR, se podrá observar su condición homoalélica y la cantidad de pares de bases será similar a las reportadas en la base de datos de *The Jackson Laboratory*, además que al medir algunos parámetros fisiológicos, se evidenciará si la condición genética de ésta no ha sido alterada ya que igualmente los valores encontrados serán similares a los reportados en las bases de datos existentes.

Objetivos

Objetivos Generales

Determinar molecularmente la condición genética de homocigocis de los ratones de la cepa consanguínea (*BALB/c//BIOULA*): analizando 9 microsatélites polimórficos usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y evaluando la condición de algunos parámetros fisiológicos de la misma.

Objetivos Específicos

- Estandarizar el procedimiento para la extracción de ADN de tejido.
- Formar el banco de ADN.
- Estandarizar la técnica de la PCR, realizando: curvas de Magnesio y curvas de temperatura de alineación de los oligonucleótidos iniciadores seleccionados.
- Identificar los alelos para cada uno de los *loci* microsatélites en las cepas de ratones consanguíneos (*BALB/c// BIOULA*).
- Evaluar los parámetros fisiológicos: crecimiento, valores hematológicos y bioquímicos sanguíneos.
- Evaluar parámetros zootécnicos: Tamaño de la camada, período interparto.

Justificación del Proyecto y aplicabilidad de los resultados

Para generar una investigación que aporte resultados confiables y reproducibles, cuando se usan animales, es necesario que se vigile la genética de los mismos, de forma que los datos obtenidos en las distintas pruebas, con éstos sean uniformes. Los animales que se producen en el bioterio de la Universidad de Los Andes, son utilizados por investigadores de diferentes universidades e institutos del país, estos animales se encuentran en producción en este bioterio como una colonia cerrada, desde hace aproximadamente 26 generaciones. Con el desarrollo de este trabajo se proporcionarán pruebas prácticas y eficaces de la condición genética que tienen estos animales y de algunos parámetros fisiológicos. Este trabajo, Igualmente aumentará la información que permitirá registrar en las bases de datos internacionales la cepa *BALB/c// BIOULA*, que se produce en el Bioterio de la Universidad, garantizando en parte, a los investigadores el valor científico de sus resultados.

Capítulo III

Metodología

I. Extracción de ADN genómico de ratones de la cepa consanguínea *BALB/c//BIOULA*, a partir de tejido de oreja mediante digestión con Ananase (comunicación personal profesor Néstor González).

La extracción de ADN genómico se realizó a los individuos pertenecientes al núcleo de fundación de la cepa *BALB/c//BIOULA*, ubicados en aisladores (Figura 4) del Bioterio de la Universidad de Los Andes (8 individuos).



Figura 4. Aisladores usados para la producción del núcleo de fundación de los ratones de la cepa *BALB/c//BIOULA*.

El ADN se extrajo partir de tejido de oreja, usando el método propuesto por el Prof. Néstor González, el cual se realiza mediante digestión con Ananase; este método se encuentra estandarizado en el laboratorio de “Control genético de Roedores” del bioterio de la Universidad de Los Andes. El fundamento de esta técnica, consiste en la digestión de la muestra de tejido de la oreja utilizando NaCl 6M y Ananase (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 futuras contaminaciones. Se tomaron fragmentos de oreja de aproximadamente $2 \times 2 \text{ mm}^2$ y se colocaron en tubos eppendorf estériles. Se lavaron los fragmentos de tejido con 500 μl de solución I (anexo 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), contentiva de: 40 μl de solución SDS al 10% y 8 μl de Ananase (20 mg/ml), para conformar la solución B, Las muestras fueron incubadas en estufa a 37 °C durante 2 horas, transcurrido este periodo de tiempo, se aumentó la temperatura a 65 °C por 15 minutos para desactivar la proteasa. Luego, se agregaron 300 μl de NaCl 6M, agitando vigorosamente por inversión hasta observar la homogenización total de la solución, Las muestras fueron centrifugadas en frío durante 30 minutos a 13.400 rcf, se colectó y transfirió el sobrenadante en tubos nuevos y estériles. Se adicionó 1 volumen de isopropanol absoluto (750 μl), se agitó por inversión, y se dejaron las muestras por 12 horas a 4 °C. Se centrifugó nuevamente a 13.400 rcf en frío por 30 minutos. Finalmente, el *pellet* fue recuperado y resuspendido en 50 μl de agua estéril nanopure (18 M Ω). Con la finalidad de mejorar la purificación 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 adicional de precipitación con NaCl y etanol, según Sambrook y cols., (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 15 minutos a 13.000 rcf, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado insoluble con 1 ml de etanol 70% frío, el sobrenadante fue nuevamente descartado y el *pellet* se secó en la estufa a 37 °C, posteriormente fue resuspendido en 50 μl de agua nanopure y almacenado a 4°C.

Estimación de la cantidad y calidad del ADN genómico extraído mediante espectrofotometría y electroforesis.

Para la estimación de la concentración de ADN genómico obtenido mediante el método de extracción con Ananase, 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 and Russell., 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 (SONY modelo DSC-P92. Cyber-Shot 5.0)

II. Optimización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación de los microsatélites: *D1Mit17*, *D1MIT14*, *D5Mit254*, *D6Mit160*, *D10Mit10*, *D11 Mit2*, *D11mit31*, *D13 Mit13* y *D15 Mit63*.

La optimización de la técnica se inició tomando en cuenta los siguientes aspectos: se seleccionaron los siguientes marcadores microsatélites: *D1Mit17*, *D1MIT14*, *D5Mit254*, *D6Mit160*, *D10Mit10*, *D11Mit2*, *D11mit31*, *D13Mit13* y *D15Mit63*. 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 de polimorfismo entre cepas consanguíneas. Otro criterio tomado en cuenta, fue que los microsatélites estuviesen ubicados en diferentes cromosomas. En la siguiente Tabla 1, se muestran las características de los diez microsatélites seleccionados; en la cual se describen: la ubicación, las secuencias correspondientes y la longitud en pares de bases de los fragmentos reportados por la base de datos de *The Jackson Laboratory* para los productos de amplificación logrados en la PCR.

Tabla 1: Resumen de las características de los 9 loci microsatélites: *D1Mit17*, *D1MIT14*, *D5Mit254*, *D6Mit160*, *D10Mit10*, *D11 Mit2*, *D11mit31*, *D13 Mit13* y *D15 Mit63*.

Nombre Primer	Cromosoma	Secuencia base de datos (www.jacksonlaboratory.com)	Longitud (pb)
D1 Mit17 ***	1	5'-GTGTCTGCCTTTGCACCTTT -3' 5'-CTGCTGTCTTTCCATCCACA -3'	176
D1Mit14	1	5'-GCCAGACAGGGCTACATTGT-3' 5'-AGACTGAACTCTGGCCTCCA-3'	132
D5 Mit254	5	5'-GTGCAGGCCTGAATTGAAAT-3' 5'-CAAAGTGCCTGTGCATGTG-3'	124
D6 Mit160	6	5'-AAGAGGACAGGCTAGTCTCGG-3' 5'-AGCAAAGCTGAAAAGAAAGGG-3'	135
D10 Mit10	10	5'-CCAGTCTCAAAACAACAACAAC-3' 5'TTGCACCTAGATTGCCTGA-3'	128
D11Mit2	11	5'-TCCCAGAGGTCTCCAAGACA-3' 5'-CCACAGTGTGTGATGTCTTC-3'	112
D11Mit31	11	5'-GCCTGAATTCACATGGTGG-3' 5'-AGAATAAGTAAACCCAGCTGCG-3'	150
D13Mit13	13	5'-CTGTGGTAAGTCCAGATTTG-3' 5'-GGAAAGAGTAGGAAGATGCC-3'	138
D15Mit63	15	5'-ACCAATGATCGTTGATGCCT-3' 5'-TAATTTACACTAGCAAAACAAA-3'	124

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.

Para la optimización de las concentraciones de cloruro de magnesio, se realizaron curvas, usando el par de oligonucleótidos iniciadores D1Mit17 (Tabla 1 ***). Se probaron cinco diferentes concentraciones: 0 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.5 mM y 3.5 mM.

Con respecto a la temperatura óptima de alineación, se emplearon las temperaturas descritas por el proveedor para cada par de oligonucleótidos iniciadores, se tomó en cuenta para esto la regla de la T_m° = temperatura promedio del proveedor de ambos cebadores $- 5^{\circ}\text{C}$.

III. Formación de un banco de ADN extraído de tejido de oreja de la cepa de ratones *BALB/c//BIOULA* para su control genético.

Se recolectaron las muestras del tejido de los animales que formaban parte del núcleo de fundación, para el momento de la toma de muestras se siguió el procedimiento de extracción de ADN genómico estandarizado y descrito anteriormente, se determinó la calidad y la cantidad de cada una de las muestras mediante espectrofotometría y se realizó la verificación de la integridad en geles de agarosa 0.9%, luego estas muestras fueron colocadas en tubos estériles y almacenadas a -20°C .

IV. Identificación los alelos para cada uno de los microsatélites seleccionados, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para la amplificación de los alelos de los 10 *loci* microsatélites seleccionados, se utilizó el ADN genómico proveniente del banco de ADN (*BALB/c//BIOULA*) formado previamente. Fueron un total 8 muestras provenientes de igual número de animales, para el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa, se utilizó una

concentración de ADN de 50 ng, concentración ésta obtenida a partir de una curva de concentración de ADN. La amplificación de cada uno de los *loci* se realizó con un termociclador *Applied Biosystems*, 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 presentaran en el siguiente capítulo, en la sección de resultados.

La identificación de los *loci* microsatélites se realizó comparando el producto de amplificación obtenido para cada muestra de ADN de la cepa en estudio, con el producto de amplificación obtenido del ADN control correspondiente y posteriormente se establecieron comparaciones con la información reportada en la base de datos de *The Jackson Laboratory*. Estos amplificados fueron corridos en geles de agarosa 3,0 % a 90 voltios por 75 minutos, posteriormente fueron corridos en geles de poliacrilamida 8%.

V. Análisis de Características Fisiológicas de la Cepa de Ratones BALB/c//BIOULA

Para la realización del análisis de algunos parámetros fisiológicos que conllevaran a determinar algunas características fisiológicas de los ratones de la cepa *BALB/c//BIOULA*, se eligieron al azar una camada de ratones, contentiva de 10 crías: 5 hembras y 5 machos. A estos animales se pesaron y se midieron a partir de una semana de nacidos, hasta la octava semana, en la cual éstos habían alcanzado madurez fisiológica. Luego de finalizadas las ocho semanas se procedió al sangrado y posteriormente a la evaluación de algunos parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos. Estos resultados fueron comparados con los reportados en las bases de datos de laboratorios internacionales tal como *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. Los datos obtenidos deben corresponderse con lo esperado para la cepa en estudio, los

mismos deben encontrarse en un rango de valores a través de las generaciones, de esta manera se garantiza la integridad y calidad del animal que se produce.

V.1. Variable Fisiológica: crecimiento (ganancia de peso y talla).

La medición del crecimiento fue realizada en base a la ganancia en talla y peso de estos 10 ejemplares, la misma se efectuó desde los 8 días del nacimiento de las crías, hasta que éstas alcanzaron la madurez sexual o el estado adulto. Las medidas de peso y talla fueron realizadas semanalmente durante un periodo de dos meses (8 semanas), con una balanza marca SF-400 con una precisión de 5000x1g, y una regla común de medición, los valores obtenidos se reportaron en unidades de peso (gramos: g) y longitud (centímetros: cm) respectivamente.

V.2. Parámetros zootécnicos: Caracteres Reproductivos

Se realizaron análisis de las tablas de control del número de crías nacidas por camada, el número de crías destetadas por camada, y el periodo interparto de los 12 años de producción de animales aproximadamente 24 generaciones.

V.3. Variable Fisiológica: 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 para realizar la extracción de sangre mediante punción retro-orbital, posteriormente fueron sacrificados en una cámara con éter de petróleo. 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 *BALB/c//BIOULA*, se encontró 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 rcf. Finalmente se hizo la lectura con la ayuda de un lector de hematocrito.

Hemoglobina

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

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

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

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

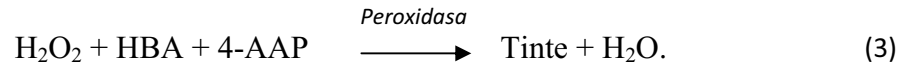
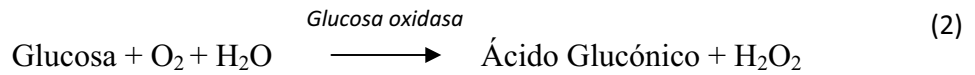
Para realizar el recuento diferencial celular, se prepararon láminas portaobjetos con extendido de sangre tratada con anticoagulante y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se fijó el extendido con metanol puro y se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, cada lámina fue teñida con 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.

V.4. Variable Fisiológica: 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 *BALB/c//BIOULA*, 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 hidrógeno 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:

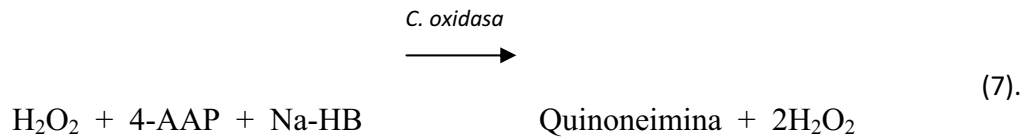


Para llevar a cabo este análisis, se realizó la reconstitución del reactivo, esto se realizó agregando 0,1 ml de enzimas y 0,1 ml de sustrato en 10 ml de solución tampón. Una vez reconstituido el reactivo, se mezclaron 2 ml del mismo con 20 µl de suero, se incubó durante 10 minutos a 37°C en baño de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

$$\frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de patrón}} \times \text{Concentración de patrón} = \text{glucosa (mg/dl)} \quad (4)$$

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 (H₂O₂). Esta última oxida al cromógeno en perenniza de peroxidasa produciendo un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra analizada. La reacción se describe a continuación:



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 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 resultados se efectuó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de patrón}} \times \text{Concentración de patrón} = \text{Colesterol Total (mg/dl)} \quad (8)$$

Albúmina

La albúmina presente en el suero reacciona con el verde bromocresol en medio ácido, formando un complejo coloreado cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra analizada. Se mezcló fuertemente 10 µl de suero con 3 µl reactivo de trabajo, se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C), luego se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 630 nm. El cálculo realizado fue el siguiente:

$$\frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de patrón}} \times 4 = \text{Albúmina} \quad (9)$$

Triglicéridos

Los triglicéridos son desdoblados por una lipasa produciendo glicerol y ácidos grasos. El glicerol a su vez es fosforilado en presencia de una glicerol quinasa y oxidado por una glicerol fosfato oxidasa con producción de agua oxigenada. Esta última oxida al cromógeno en presencia de la peroxidasa produciendo un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra.

Para realizar la prueba se reconstituye el reactivo, se vierte el contenido total en los viales de la enzima y el sustrato en la solución tampón. Se reconstituyen cantidades parciales del reactivo, y se prepara agregando 0.25 ml de sustrato y 0.25 ml de enzima por cada 10 ml de solución tampón. Para el uso, se mezcló 10 µl de suero o plasma con 1ml de reactivo reconstituido, se incubó por 10 min a 35-37°C, luego se midió las densidades ópticas a 500 nm, y para el cálculo se procedió de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times \text{concentración patrón} = \text{Triglicéridos (mg/dl)} \quad (10)$$

Ácido Úrico

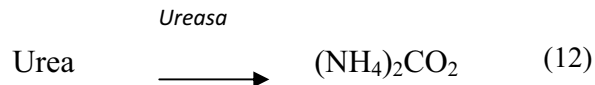
El ácido úrico es oxidado enzimáticamente por la uricasa produciendo alantoína en presencia de la peroxidasa produciendo un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de ácido úrico en la muestra analizada. Para la reconstitución del reactivo, se colocó el contenido total del vial de la enzima y del vial del sustrato en la botella de la solución tampón. Para reconstituir cantidades

parciales de reactivo se preparó agregando 0.1 ml de enzima y 0.1 ml de sustrato por cada 10 ml de tampón. Para el uso, se mezcló 50 µl de suero, con dos mililitros de reactivo reconstituido, se incubó por 10 min a 35-37 °C, luego se leyó la absorbancia a 520 nm. El cálculo de los resultados se hicieron de la siguiente manera:

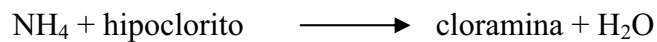
$$\text{D.O de la muestra/D.O patrón} \times \text{concentración patrón} = \text{Acido úrico (mg/dl)} \quad (11)$$

Urea

La ureasa transforma la urea en carbonato amónico



El amonio a su vez reacciona con el hipoclorito del medio alcalino produciendo cloramina, la cual a su vez reacciona con el reactivo fenólico en presencia de un catalizador para generar un compuesto azulado que se puede determinar espectrofotométricamente (reacción de berthelot)



Capítulo IV

Resultados

I. Formación del banco de ADN de los ratones del núcleo de fundación de la cepa consanguínea *BALB/c//BIOULA*, mediante la extracción del ADN del tejido de la oreja

Como se presentó en la sección de métodos, se realizó la extracción del ADN de 8 ratones que forman el núcleo de fundación de la cepa *BALB/c//BIOULA*, usando la enzima comercial Ananase, la calidad de las muestras de ADN analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,9%, son presentadas en la Figura 5, en la cual pueden observarse bandas correspondientes a 23.000 pb aproximadamente, para todas las muestras.

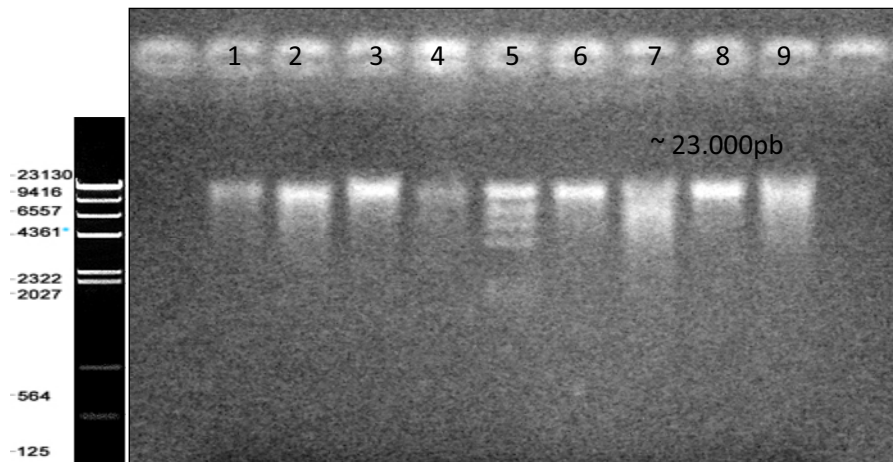


Figura 5: ADN genómico de oreja de ratón. Electroforesis en gel de agarosa 0.9 %. Carriles 1-4 y 6-9 muestras de ADN de tejido de ratón *BALB/c//BIOULA* del núcleo de fundación. Carril 5, marcador de peso molecular Fago Lambda *Hind III*

Las bandas se presentan como unas bandas nítidas y definidas, observadas con poca degradación, por lo que puede considerarse que es un ADN de calidad óptima que mantiene su integridad, apreciándose la efectividad del método usado para la

obtención de un ADN genómico a partir de tejido de mamíferos.

En cuanto a la cuantificación del ADN extraído por este método se puede observar en la Tabla 2, que se lograron concentraciones de ADN que oscilan entre 121 y 764 $\mu\text{g/ml}$, como también se logró un cociente (A_{260}/A_{280}) entre 1.21 y 2.12 indicando que las muestras presentaron una alta desproteinización.

Tabla 2: Valores de densidad óptica, relación A_{260}/A_{280} y concentraciones obtenidas, para cada una de las muestras de ADN del banco de *BALB/c//BIOULA*.

Ejemplar	$A_{260\text{ nm}}$	$A_{280\text{ nm}}$	A_{260}/A_{280}	ADN $\mu\text{g/ml}$
♀18	0.0764	0.0359	2.12	764
♂18	0.0304	0.0193	1.57	304
♀28	0.0679	0.0417	1.62	679
♂28	0.0404	0.0234	1.72	404
♀48	0.0292	0.0227	1.28	292
♂48	0.0455	0.0356	1.27	455
♀58	0.0413	0.0340	1.21	413
♂58	0.0632	0.0386	1.63	632

En la selección de los animales a utilizar para la extracción del ADN a partir de tejido de oreja de ratón, se tomó en cuenta la carta *pedigree* (Anexo ***) del núcleo de fundación de la colonia, seleccionando los ejemplares que lo conforman. El banco de ADN se conservará en el Bioterio de la Universidad de los Andes, bajo condiciones adecuadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo 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.

II. Optimización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación de los microsatélites: *D1Mit17*, *D1MIT14*, *D5Mit254*, *D6Mit160*, *D10Mit10*, *D11 Mit2*, *D11mit31*, *D13 Mit13*, y *D15 Mit63*.

Una vez formado el banco de ADN con las muestras a monitorear y comprobada la calidad de las mismas, se procedió a optimizar las condiciones para la amplificación de los microsatélites; para lo cual se determinó la concentración adecuada de Cloruro de Magnesio, mediante una curva de concentración. En la Figura 7, puede observarse la curva de concentración de Cloruro de Magnesio obtenida para el microsatélite *D11Mit2*, ésta presentó para las concentraciones 1,5; 2,5 y 3,5 mM, bandas nítidas y definidas, este resultado fue similar para todos los microsatélites utilizados en el monitoreo de los ratones de la cepa *BALB/c//BIOULA*, por lo que se seleccionó la concentración de 2,5 mM para realizar el ensayo.

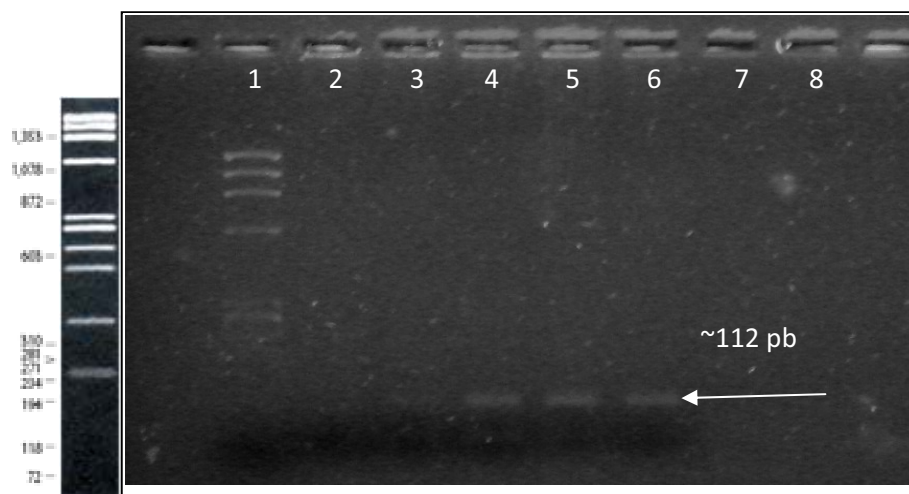


Figura 6: Curva de concentración de Cloruro de Magnesio para el microsatélite *D11Mit2* (112 pb). **Carril 1.** Marcador de peso molecular Φ X174 RF DNA *Hae* III. **Carril 2.** Concentración de Mg^{+2} 0 mM. **Carril 3.** 1 mM. **Carril 4.** 1,5 mM. **Carril 5.** 2,5 mM. **Carril 6.** 3,5 mM

En la Tabla 3, se muestran las condiciones de la mezcla de reacción que se utilizaron en el desarrollo de la PCR para cada uno de los microsatélites utilizados en el

análisis realizado.

Tabla 3. Condiciones de la mezcla de reacción utilizada en el desarrollo de las PCR

Buffer (10X)	1X
dNTP's (12,5mM)	200 μ M
Primers (30μM)	
Forward	0.2 μ M
Reverse	0.2 μ M
MgCl (25 mM)	2.5mM
Taq polimerasa (5U/μl)	1 Unid/ μ l
ADN (50 ng)	100 ng
Agua dest. Estéril	

III. Identificación los alelos para cada uno de los 9 loci de los microsatélites seleccionados en las cepas de ratones consanguíneos (BALB/c//BIOULA)

La identificación de los alelos para cada uno de los 9 loci microsatélites analizados, se realizó con la finalidad de evaluar la condición de homocigosidad e isogenicidad de los 8 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*, *D15Mit63*, *D11Mit2*, *D1Mit14*, *D13Mit13*, y *D10Mit10* 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 hebra 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 y con ADN de ratones de la cepa *BALB/c* extraído en el año 2001 de ratones del IVIC), con el respectivo marcador molecular al igual que con los datos reportados en la base de datos *The Jackson Laboratory*.

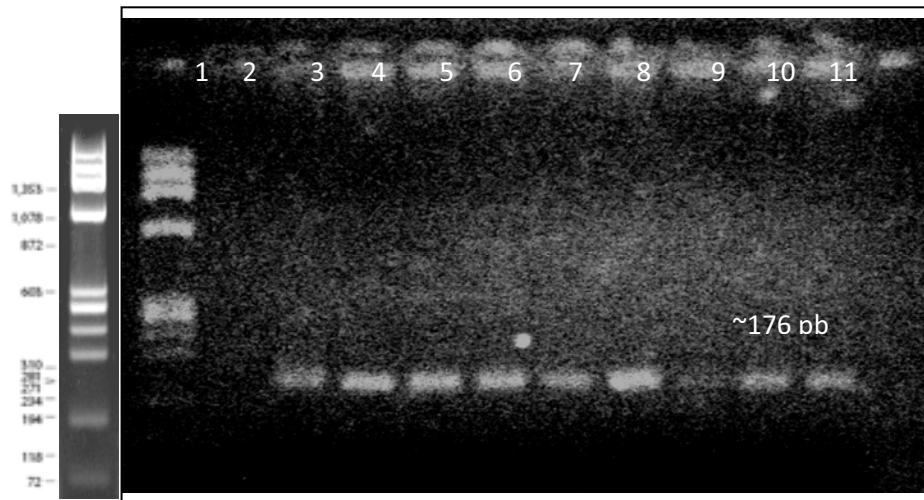


Figura 7: Productos de amplificación para el microsatélite *DIMit17* (176 pb), en gel de agarosa de 3%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular Φ X174 RF DNA *Hae* III. **Carril 2.** Control Negativo. **Carril 3.** Control positivo (ADN de *BALB/c* extraído en el año 2001 de ratones del IVIC). **Carril 4 al Carril 11.** Muestras problemas.

La Figura 7, presenta los productos de amplificación obtenidos para el microsatélite *DIMit17*, en ésta se puede observar una condición homoalélica e isogénica para todas las muestras de ADN analizadas, las cuales presentan una cantidad de pares de bases de aproximadamente 176 pb.

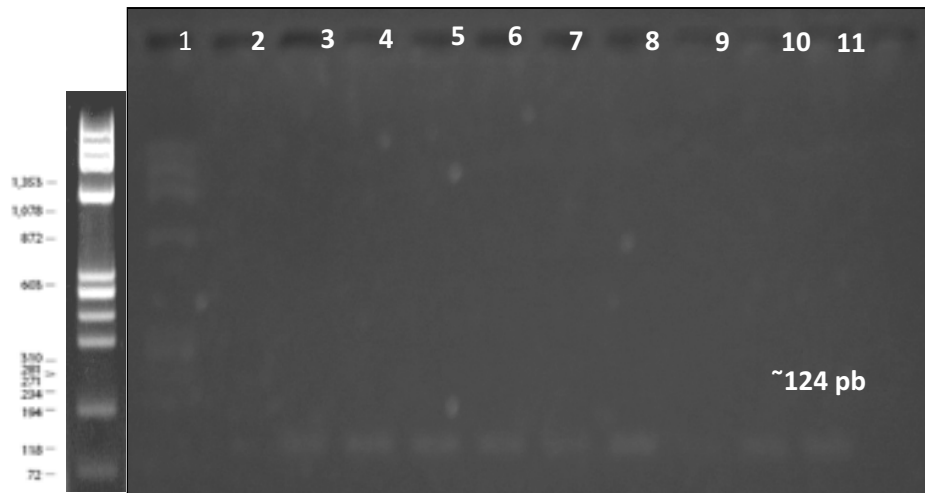


Figura 8: Productos de amplificación para el microsatélite *D15Mit63* (124 pb), en gel de agarosa de 3%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular Φ X174 RF DNA *Hae* III. **Carril 2.** Control Negativo. **Carril 3.** Control positivo (ADN de *BALB/c* extraído en el año 2001 de ratones del IVIC). **Carril 4 al Carril 11.** Muestras problemas.

En la Figura 8 se observan productos de amplificación para el microsatélite *D15Mit63*, el cual presenta una longitud de 124 pb aproximadamente, como también se observa homoalelismo e isogenicidad en todos los individuos analizados

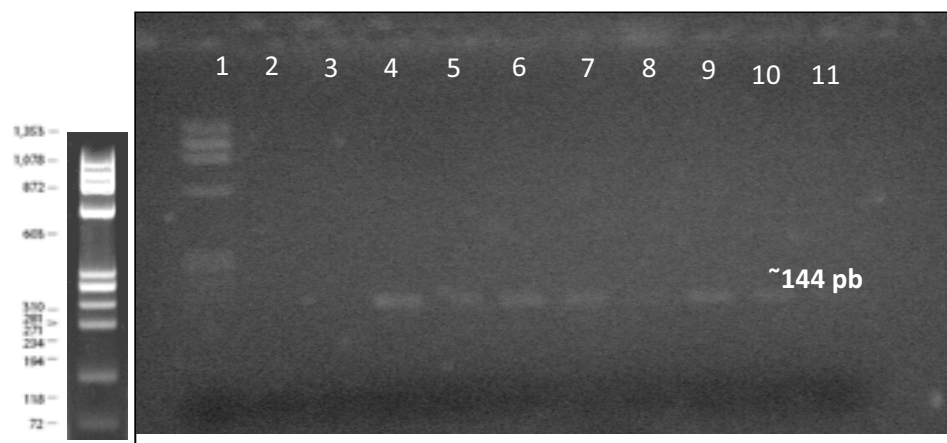


Figura 9: Productos de amplificación para el microsatélite *D5Mit254* (144 pb), en gel de agarosa de 3%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular Φ X174 RF DNA *Hae* III. **Carril 2.** Control Negativo. **Carril 3.** Control positivo (ADN de *BALB/c* extraído en el año 2001 de ratones del IVIC). **Carril 4 al**

Carril 11. Muestras problemas.

En el caso del microsatélite *D5Mit254* (Figura 9), igualmente se observa la condición homoalélica, al igual que los microsatélites anteriores, estas hebras observadas se corresponden aproximadamente con las reportadas en las bases de datos que es de 144 pb.

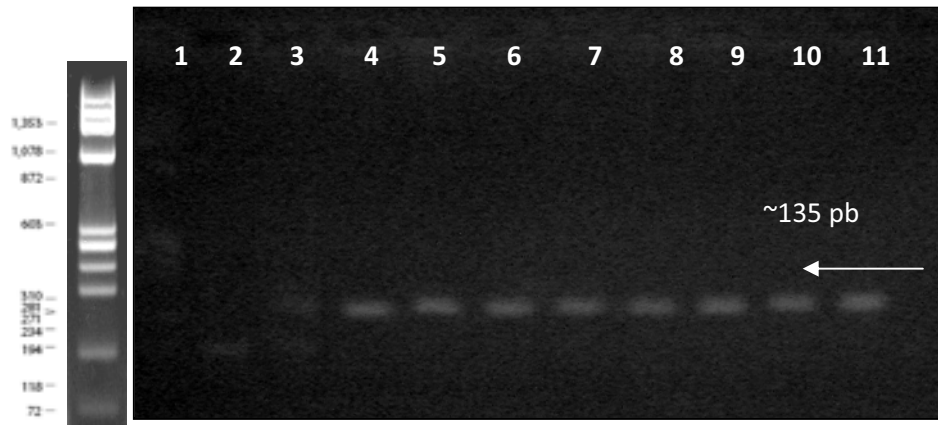


Figura 10: Productos de amplificación para el microsatélite *D6Mit180* (135 pb), en gel de agarosa de 3%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular Φ X174 RF DNA *Hae* III. **Carril 2.** Control Negativo. **Carril 3.** Control positivo (ADN de *BALB/c* extraído en el año 2001 de ratones del IVIC). **Carril 4 al Carril 11.** Muestras problemas.

En la Figura 10, se presenta el resultado de los productos de amplificación del microsatélite *D6Mit180*, para éste microsatélite la longitud del fragmento amplificado se encuentra aproximadamente 135 pb, y esta es la longitud esperada para dicho segmento ya que se corresponde con las reportadas en la bases de datos. Igualmente, se observa una condición homocigota e isogénica.

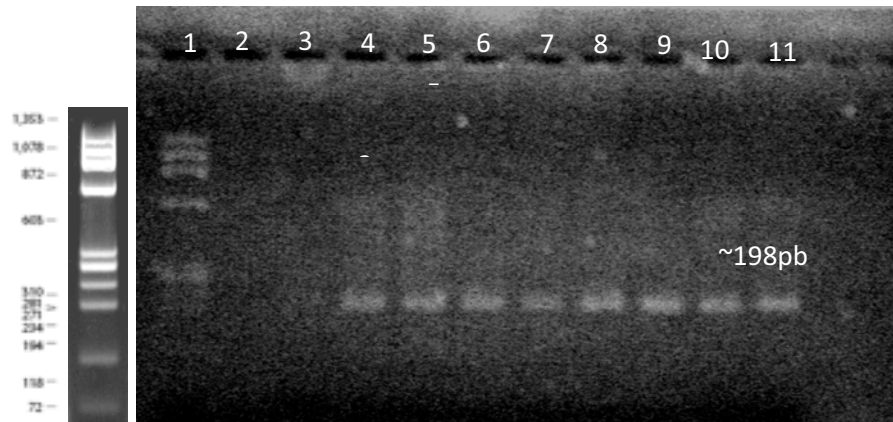


Figura 11: Productos de amplificación para el microsatélite *D1Mit14* (198 pb), en gel de agarosa de 3%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular Φ X174 RF DNA *Hae* III. **Carril 2.** Control Negativo. **Carril 3.** Control positivo (ADN de *BALB/c* extraído en el año 2001 de ratones del IVIC). **Carril 4 al Carril 11.** Muestras problemáticas.

En la Figura 11, se aprecian hebras bien definidas correspondientes a 198 pb de longitud para el microsatélite D1Mit14, mostrando condición homoalélica e isogénica para todos los animales estudiados, y observándose similitud al compararlos con el ADN control positivo usado como referencia.

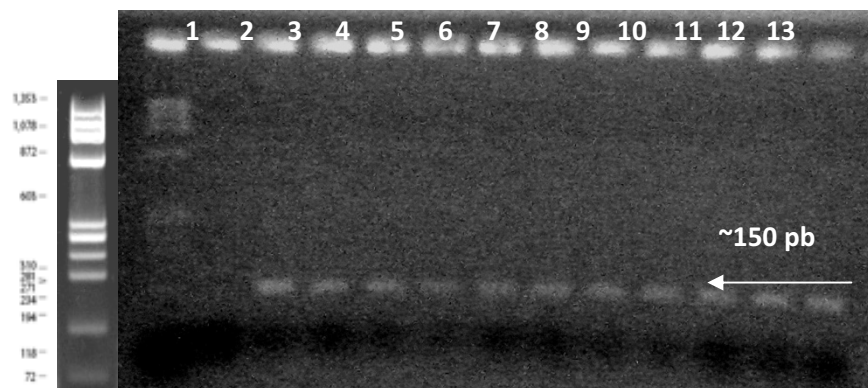


Figura 12: Productos de amplificación para el microsatélite *D1Mit31* (150 pb), en gel de agarosa de 3%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular Φ X174 RF DNA *Hae* III. **Carril 2.** Control Negativo. **Carril 3.** Control positivo (ADN de *BALB/c* extraído en el año 2001 de ratones del IVIC). **Carril 4 al Carril 11.** Muestras problemáticas.

En Figura 12, se observan los productos de amplificación para el microsatélite *D1Mit31*, en todas las muestras de ADN problemáticas analizadas se presenta una

condición homoalelica al igual que en el control positivo con una longitud similar a este.

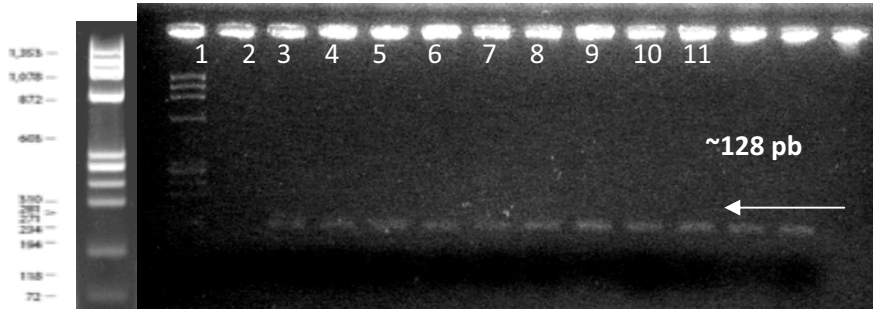


Figura 13: Productos de amplificación para el microsatélite *D10Mit10* (128 pb), en gel de agarosa de 3%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular Φ X174 RF DNA *Hae* III. **Carril 2.** Control Negativo. **Carril 3.** Control positivo (ADN de *BALB/c* extraído en el año 2001 de ratones del IVIC). **Carril 4 al Carril 11.** Muestras problemáticas.

En las Figuras 13 y 14 se muestran bandas nítidas de amplificadas correspondientes a los microsatélites *D10Mit10* y *D13Mit13* respectivamente con longitudes aproximadas de 128 y 138 pb, ambos resultados muestran condición homoalélica e isogénicidad para todos los animales estudiados.

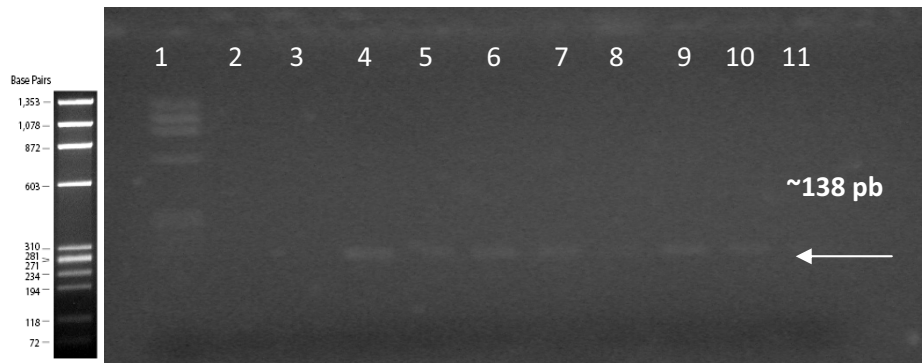


Figura 14: Productos de amplificación para el microsatélite *D13Mit13* (138 pb), en gel de agarosa de 3%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular Φ X174 RF DNA *Hae* III. **Carril 2.** Control Negativo. **Carril 3.** Control positivo (ADN de *BALB/c* extraído en el año 2001 de ratones del IVIC). **Carril 4 al Carril 11.** Muestras problemáticas.

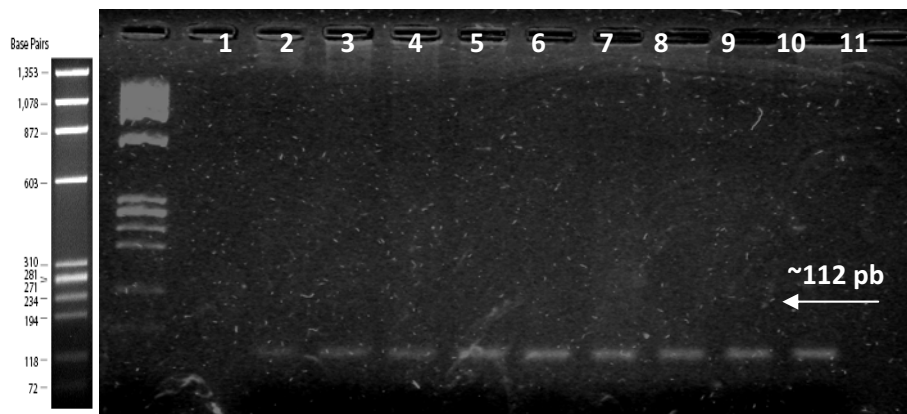


Figura 15: Productos de amplificación para el microsatelite *D11Mit2* (112 pb), en gel de agarosa de 3%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular Φ X174 RF DNA *Hae* III. **Carril 2.** Control Negativo. **Carril 3.** Control positivo (ADN de *BALB/c* extraído en el año 2001 de ratones del IVIC). **Carril 4 al Carril 11.** Muestras problemáticas.

La longitud de las bandas obtenidas para el *loci* microsatélite *D13Mit13* y *D11Mit2* se corresponden aproximadamente con la longitud para dicho segmento reportado así como también es similar a la longitud reportada por el control positivo del año 2001 del IVIC. En todos los *loci* estudiados de todos los animales del núcleo de fundación se observó una condición homoalélica al igual que de isogenicidad para todos los microsatélites evaluados.

IV. Análisis de Características Fisiológicas de la Cepa de Ratones *BALB/c//BIOULA*

IV.1. 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 12 años de producción de animales aproximadamente 24 generaciones los datos se encuentran reportados en la Tabla 4.

Tabla 4: Valores de algunos parámetros zootécnicos obtenidos del registro de tarjetas de producción de la cepa de ratones consanguíneos *BALB/c*

Años	C. N	C.D	P. I
1995	5,0	5.0	38
2002	6,1	6.1	60
2004	6,2	6.2	47
2005	6,25	6.2	28,5
2006	4,8	4.8	61
2007	5.8	5.6	59
Prom	5.7	5.67	48.9

*C.N crías nacidas por camada, C.D: crías destetas por camada. P.I periodo interpartal

IV.2. Variable Fisiológica: crecimiento (ganancia de peso y talla).

A continuación se presenta la ganancia en peso (g) y talla (cm) de los ratones hembras y machos desde la semana del nacimiento hasta luego de haber alcanzado las 8 semanas de madurez.

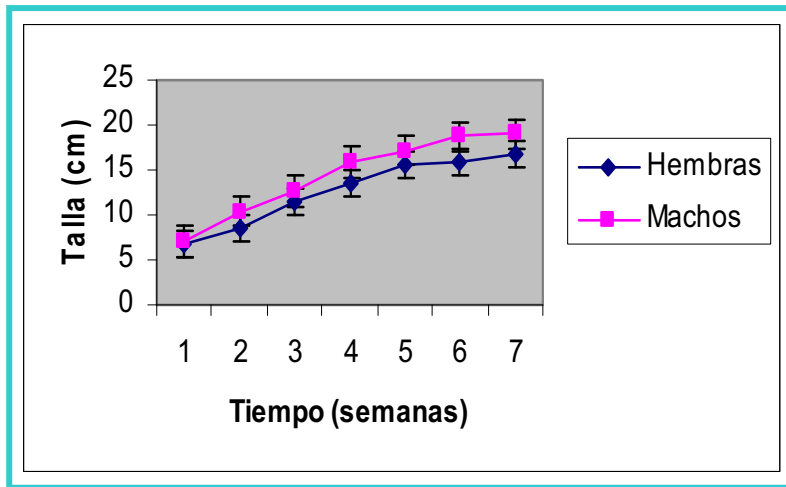


Figura 16: Curva de crecimiento de la Ceba *BALB/c//BIOULA*, de acuerdo a la ganancia en tamaño (cm) de machos y hembras de los animales seleccionados.

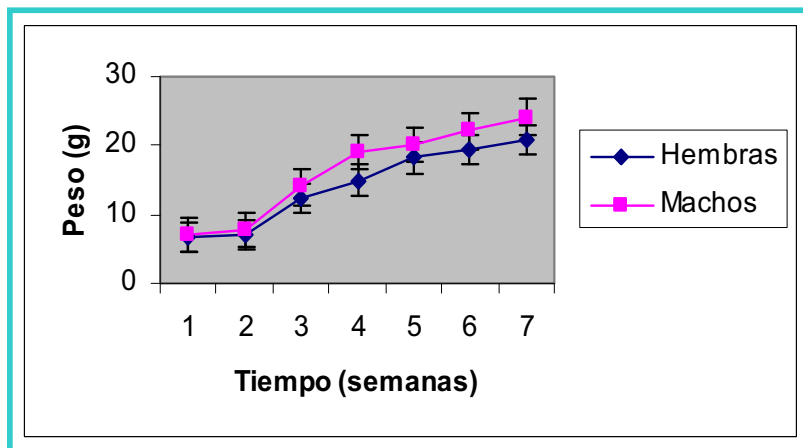


Figura 17: Curva de crecimiento de la Ceba *BALB/c//BIOULA*, de acuerdo a la ganancia en peso (g) de machos y hembras de los animales seleccionados.

IV.3. Variable Fisiológica: Parámetros Hematológicos

La Tabla 5, presenta los valores 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 *BALB/c//BIOULA*, luego de transcurridos dos meses de nacidos.

Tabla 5: Valores obtenidos a partir de la evaluación fenotípica de la cepa de de ratones consanguíneos *BALB/c*, mediante el análisis de parámetros hematológicos.

Valores hematológicos	♂ (n=5)	♀ (n=5)
Hemoglobina (g/dl)	14.3	12.72
Hematocrito (Vol. %)	31	36
Glóbulos blancos (x100mm ³)	6225	4850
Linfocitos (%)	83.5	79
Neutrófilos Seg. (%)	16.5	21
Eosinófilos (%)	0	0

IV.4. Variable Fisiológica: Parámetros Bioquímicos

La Tabla 6, presenta los valores obtenidos en el análisis bioquímico correspondiente a glucosa, colesterol y creatinina realizado a los ratones de la cepa consanguínea *BALB/c*, a los dos meses del nacimiento.

Tabla 6: Valores obtenidos de los diferentes parámetros bioquímicos evaluados en la colonia de ratones consanguíneos *BALB/c//BIOULA*.

Valores bioquímicos	♂ (n=5)	♀ (n=5)
Glucosa (mg/dl)	112.05	115.25
Colesterol (mg/dl)	96.95	123.25
Creatinina (mg/dl)	1.0	1.15
Albúmina (g/dl)	3.775	3.86
Triglicéridos (mg/dL)	229.05	145.5
Acido Úrico (mg/dL)	2.53	1.98
Calcio (mg/dL)	12.04	10.35
Urea (g/dl)	46.24	50.9

Capítulo V

Discusión y Conclusiones

En los bioterios, en donde se producen animales para la experimentación, son necesarios controles que monitoreen las condiciones genéticas de los animales que serán utilizados por los investigadores, ya que es de interés que éstos no pierdan las características correspondientes a los tipos específicos. El control de la pureza genética es de gran importancia pues cualquier alteración no detectada de su patrimonio genético puede suponer también alteración de sus características fenotípicas, conllevando a resultados alterados en los trabajos experimentales realizados con ellos.

El presente trabajo tuvo como objetivo general determinar molecularmente la condición genética de homocigocis para los ratones de la cepa consanguínea (*BALB/c//BIOULA*) producidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, analizando 9 microsatélites polimórficos usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y evaluando la condición de algunos parámetros fisiológicos de la misma.

El análisis de los 10 microsatélites seleccionados, se logró realizando primero la extracción un molde ADN con calidad, usando un método que tiene como ventaja que para la toma de la muestra del tejido de oreja, no es necesario el sacrificio del animal y se le proporciona un mínimo de stress al animal, logrando de esta manera el manejo ético de los mismos. Igualmente, se logró una buena cantidad de ADN en ng/ μ l, ésta osciló entre 121 y 764 ng/ μ l, se logró una alta desproteínización de las muestras, ya que los cocientes (A_{260}/A_{280}) de las absorbancias medidas de todas las muestras se encontró en un rango de 1.21 y 2.12, indicando que las muestras de ADN tenían calidad, lo cual fue comprobado en el ensayo de electroforesis en gel de

agarosa 0.9 %, en el que se observaron hebras nítidas y definidas con una longitud de 23000 pb correspondiéndose a lo esperado para ADN genómico de mamífero (Benavides *et al.*, 2000). Es de destacar que las muestras de ADN fueron almacenadas en solución buffer TBE 10:1, a una temperatura de -20 °C, y luego de un lapso de tiempo superior a 6 meses fueron observadas nuevamente a través de un gel de agarosa al 0,9%, éstas presentaron iguales características que las iniciales, lo que indicó que el método utilizado permite obtener muestras de ADN de calidad. Este paso fue importante, ya que para la realización de ensayos en los que sea necesario contar con ADN de calidad, el método desarrollado lo garantiza.

Para el análisis de los microsatélites mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la estandarización de la concentración del ADN, utilizando una curva de concentración de ADN, hayamos como resultado que la concentración adecuada fue de 100 ng/ul, estando de acuerdo con lo presentado por Serikawa *et al* (1999) y Benavides *et al* (2000), quienes utilizaron en sus trabajos la misma concentración y en la optimización de las concentraciones de magnesio, mediante una curva de concentración usando el rango de concentraciones desde 0 mM hasta 3.5 mM, la concentración de 2.5 mM fue la más adecuada para el ensayo realizado, para todos los microsatélites seleccionados. Las temperaturas de alineación utilizadas fueron las proporcionadas por los proveedores comerciales de los *primers*, y la concentración de los oligonucleótidos iniciadores fue 0.2 µM (Benavides *et al.* 1998 y 2000). Con respecto a la selección de los *primers*, ésta fue realizada siguiendo los criterios presentados por De Jesús, (2005): a partir de la bases de datos de *The Jackson Laboratory* (www.jax.org/), se seleccionaron oligonucleótidos iniciadores ubicados en cromosomas diferentes y distintos a los seleccionados por la autora con la finalidad de aumentar el número de microsatélites utilizados en el monitoreo de la cepa en estudio y sólo se seleccionaron el ***DIMit17*** y el ***D15Mit63***, con la finalidad de corroborar los resultados anteriores.

Las condiciones señaladas en el párrafo anterior, obtenidas en la estandarización de la PCR, fueron aplicadas para el desarrollo de la misma usando todos los microsatélites seleccionados: ***D1Mit17***, ***D5Mit101***, ***D6Mit180***, ***D11Mit31***, ***D15Mit63***, ***D11Mit2***, ***D1Mit14***, ***D13Mit13***, y ***D10Mit10***, y tal como se presentó en los resultados se encontró una condición de homoalelismo (una sola hebra), para todas las muestras de ADN analizadas, lo que conlleva a señalar que los ratones pertenecientes a la cepa *BALB/c//BIOULA*, mantienen una condición homocigota, y que mantiene una condición isogénica, ya que todos los individuos monitoreados presentan la misma cantidad de pares de bases para todos y cada uno de los microsatélites estudiados, no observándose diferencias entre individuos.

Con respecto a lo encontrado en la evaluación de algunas variables fisiológicas: crecimiento, bioquímica sanguínea y hematológicas, al comparar los resultados con lo reportado en bases de datos para estas variables, se observó que el promedio de crecimiento de los ratones de la cepa *BALB/c//BIOULA* producidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, presenta una tendencia de crecimiento similar a la reportada. Se puede observar en los resultados que la desviación estándar es bastante pequeña, conllevando a inferir que a pesar de que las condiciones ambientales (temperatura y alimento, principalmente), en la que se mantienen estos animales en el bioterio de la Universidad de Los Andes, no son iguales a las que reportan los bioterios de los cuales se están tomando los datos para la comparación, éstos mantienen un crecimiento casi idéntico al de los animales producidos por institutos reconocidos

Cabe resaltar que con este trabajo se pretendía proporcionar información correspondiente a la condición genética y fisiológica de los animales de la cepa *BALB/c//BIOULA*, que se producen en el bioterio de la Universidad de Los Andes, las cuales son una fuente de variación que va repercutir de manera directa en las investigaciones realizadas con éstos, ya que el control de estas variables puede conllevar a contar con resultados reproducibles en las experiencias que se realizan

con los mismos, lo cual le confiere confianza a la experimentación. El uso de animales con alteraciones genéticas resulta en considerable pérdida financiera, de tiempo valioso y de datos de investigación errados (Festing y Roderick, 1989; Benavides *et al*, 2000). Estos controles son necesarios en todas aquellas instituciones que produzcan animales para experimentación ya que éstos muestran la condición del animal, en nuestro caso nos sirve para presentar las características invariables de consanguinidad luego de haber transcurridos más de 25 años de producción de hermanos con hermanas. Los resultados obtenidos son conducentes a ratificar que los ratones producidos en el bioterio de la Universidad de Los Andes, poseen la condición de homocigosis y de isogenicidad característica de una cepa consanguínea de ratón, y que la misma de acuerdo con los resultados obtenidos mantiene la condición de la cepa *BALB/c* por lo que puede presentarse con la nomenclatura *BALB/c//BIOULA* en las publicaciones donde éstos han sido utilizados. Los resultados obtenidos demuestran por tanto que el sistema de producción que ha sido desarrollado en la producción de estos animales a sido el adecuado por lo que los investigadores que los usa pueden tener la confianza de que sus investigaciones podrán ser reproducibles y confiables.

Capítulo VI

Referencias Bibliográficas

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

Benavides, F., Glasscock, L., Coghlan, M., Stern, M., Weiss, D y Conti, C. (1999). **PCR based microsatellites analisis for differentiation and genetic monitoring of nine SENCAR mouse strains.** *Laboratory Animals.* 35: 157-162

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

Benavides F., Cazalla D., Fontanals A., Salaverri M., Goldman A. Buggiano V., *et al*, (1998). **Evidence of genetic heterogeneity in a BALB/c mouse colony as determined by DNA fingerprint.** *Laboratory Animals.* 32: 80-85.

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. p.57-67

Eckert, R. (1998) **Animal physiology : mechanisms and adaptations.** New York : W.H. Freeman and Co.Ed

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

Festing m.F.W. (1993). **Genetic quality control in laboratory rodents.** *Aging*

Clinical Experimental Research. 5:309-315.

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

Falconer D. S., Hill and Mackay T. (1981). **Introduction to Quantitative Genetics**. Genetics, Vol. 167, 1529-1536, August 2004.

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. Ch. 1. Pp. 1-7

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

Griffiths A, Zusuki D. (1996) **Introducción al análisis genético** Madrid: Interamericana Mcgraw Hill

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

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. News, Vol. XXIII. No. 1 Fall 1979. National Academy of Science . Washinton. D.C.

Hickman-Davis (2001). Ed. Principios integrales de zoología. México: McGraw-Hill

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 Res. 21: 5782-5785.

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

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

Love 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.

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. (1985). Eds. **Manual for Genetic monitoring in inbred mice.** Iclas. University of Tokio press. Pp 114.

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

Petkov PM.,Cassell MA., Sargent EE., Donnelly CJ., Robinson P., Crew V., Asquit S., Harr RV. And Wiles MV (2004) **Development of a SNP Genotypin panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. Genomic.** 83:902-911

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

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

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

Pp:287

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

Tolwani R.J., 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

The Jackson Laboratory, 2004. **Mouse Genome Informatic**. Disponible: <http://www.informatis.jax.org>.

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**. Theor. Appl. Genet. 83 :565-581

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 Acid Res. 18:6531-6533

Zweiger, G. (2002). **El genoma: transducción, información, anarquía y revolución en las ciencias biomédicas**. México, D.F : McGraw Hill

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. Pp 179-202

