


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a seated woman, likely the Virgin Mary, holding a child. Above her is a crown. To the left and right are lions rampant. Below the central figure is a horse. The seal is surrounded by the Latin motto "ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERA".

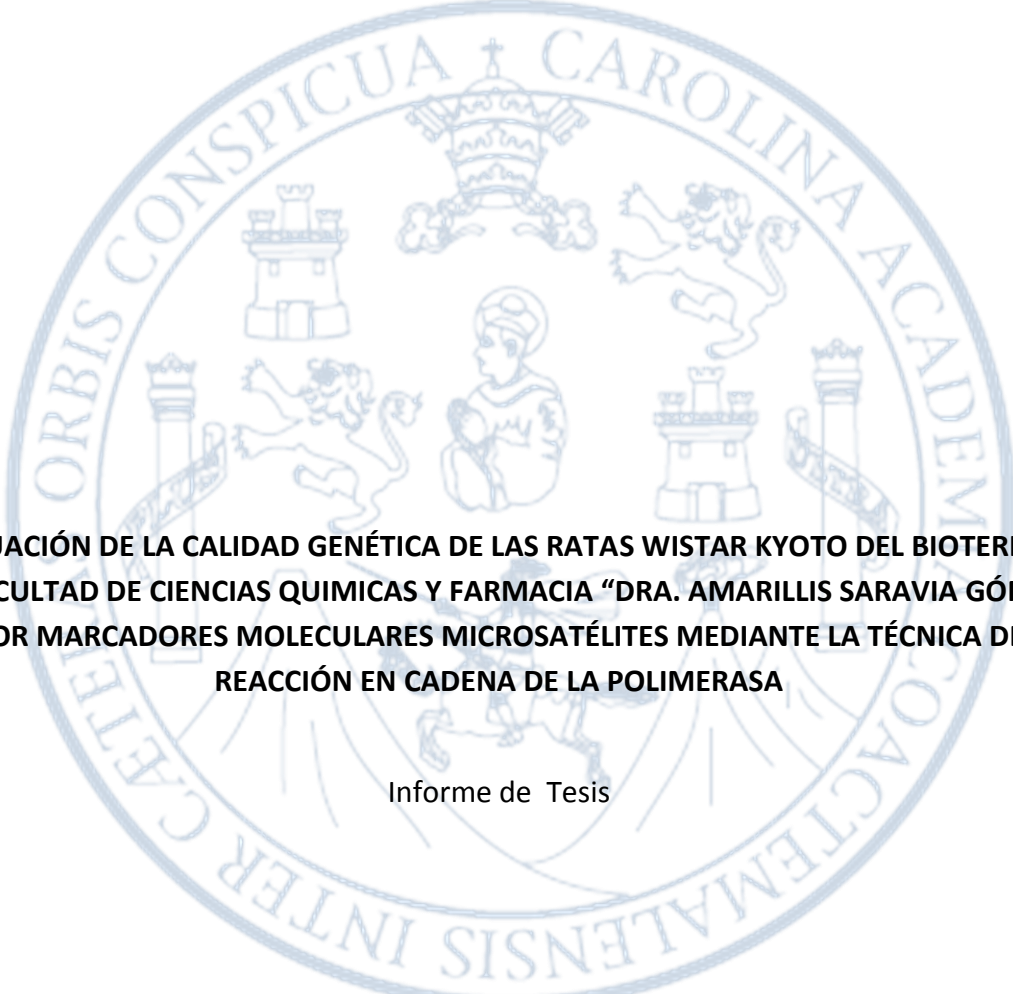
**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD GENÉTICA DE LAS RATAS WISTAR KYOTO DEL BIOTERIO DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA “DRA. AMARILLIS SARAVIA GÓMEZ”
POR MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES MEDIANTE LA TÉCNICA DE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

Rudy Alfonso Marroquin Rosales

Químico Farmacéutico

Guatemala, Agosto de 2016

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD GENÉTICA DE LAS RATAS WISTAR KYOTO DEL BIOTERIO DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA “DRA. AMARILLIS SARAVIA GÓMEZ”
POR MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES MEDIANTE LA TÉCNICA DE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

Informe de Tesis

Presentado por:

Rudy Alfonso Marroquin Rosales

Para optar al título de:

Químico Farmacéutico

Guatemala, Agosto de 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreína Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

DEDICATORIA

- A DIOS** Por permitirme lograr esta meta, por sus bendiciones, sabiduría y fortaleza, sin Él esto no fuera posible.
- A MI PADRES** Rosa Lidia Rosales y Alfonso Marroquin, por su apoyo incondicional, por la motivación constante, este logro también es de ustedes.
- A MIS HERMANOS** Kevin, Katherine, Daniel y Daniela, esto es la prueba de que todo lo que ustedes se propongan lo pueden lograr.
- A MIS ABUELOS** Mercedes Figueroa (QEPD), Agustina Pérez (QEPD) y José Luis Rosales (QEPD), aunque ya no se encuentren acá, ustedes también permitieron este logro.
- A MI ABUELA** Rosario Aguirre, por su apoyo y sus consejos.
- A MI FAMILIA Y AMIGOS** Por su cariño y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Por la formación académica y permitirme un desarrollo personal y profesional.

A MI ASESORA

Licda. Dulce Saldaña, por su tiempo, apoyo, indicaciones y asesoría.

A MI REVISORA

Licda. Lucía Arriaga, por su apoyo y tiempo en la revisión del trabajo de investigación.

AL DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO

Por el préstamo de equipo para la realización del trabajo de investigación.

AL LIC. RODRIGO VARGAS

Por su tiempo e indicaciones en la parte experimental.

AL PERSONAL DEL BIOTERIO

Por su tiempo y apoyo en la realización de la parte experimental del trabajo de investigación.

A TODOS MIS AMIGOS

En especial a: Laura, Analiz, Ivonne, Abigail, Byron, Vanesca, Mercedes, Ana Lucía, Luis, ustedes son parte importante de este logro, gracias por todo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes.....	4
3.1 La experimentación animal.....	4
3.1.1 El animal experimental como reactivo biológico.....	5
3.1.2 Genética y control genético.....	6
3.2 Tipos Genéticos.....	7
3.2.1 Líneas consanguíneas.....	7
3.2.1.1 Características de las líneas consanguíneas.....	8
3.2.1.2 Mantenimiento de las líneas consanguíneas.....	9
3.2.1.3 Líneas Isogénicas.....	11
3.2.1.4 Líneas consómicas.....	11
3.2.2 Líneas no consanguíneas.....	12
3.3 Las ratas Wistar Kyoto.....	13
3.4 Métodos de control genético.....	15
3.4.1 Marcadores bioquímicos.....	16
3.4.2 Marcadores inmunológicos.....	16
3.4.3 Análisis de color del pelaje.....	17
3.4.4 Marcadores de carácter reproductivo.....	18
3.4.5 Marcadores de ADN.....	19
3.4.5.1 Marcadores moleculares de microsatélites.....	19
3.4.5.2 Análisis de polimorfismo de un solo nucleótido.....	21
3.4.5.2 Análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción.....	22
3.4.5.4 Análisis de minisatélites.....	22
3.5 Estudios previos realizados internacionalmente.....	22
3.6 Estudios previos llevados a cabo en Guatemala.....	25
4. Justificación.....	27
5. Objetivos.....	28

6. Hipótesis.....	29
7. Materiales y Métodos.....	30
7.1 Universo.....	30
7.2 Muestra.....	30
7.3 Materiales.....	30
7.4 Métodos.....	32
7.4.1 Metodología toma de muestra a partir de tejido de oreja.....	32
7.4.2 Extracción de ADN mediante el PureLink Genomic DNA MiniKit.....	32
7.4.3 Determinación de cantidad de ADN extraído.....	35
7.4.4 Determinación de la integridad del ADN extraído.....	35
7.4.5 Reacción en cadena de la polimerasa para los microsatélites.....	35
7.4.6 Preparación de la mezcla para PCR.....	36
7.4.7 Ciclos de incubación para la mezcla.....	37
7.4.8 Identificación de alelos para los microsatélites evaluados.....	37
7.5 Análisis estadístico.....	38
8. Resultados.....	39
9. Discusión de Resultados.....	41
10. Conclusiones.....	47
11. Recomendaciones.....	48
12. Referencias.....	49
13. Anexos.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 Diagrama de la genealogía de Wistar Kyoto.....	14
Figura No.2 Composición de una región microsatélites en una cadena de ADN.....	20
Figura No.3 Uso de microsatélites como marcadores moleculares.....	20
Figura No. 4 Diagrama del proceso de extracción de ADN con PureLink Genomic DNA MiniKit.....	34
Figura No.5 Resultados electroforesis Integridad del ADN extraído de la colonia de ratas Wistar Kyoto.....	39
Figura No.6 Electroforesis de productos de amplificación del Microsatélite D1Mgh6 de la colonia de ratas Wistar Kyoto.....	40
Figura No.7 Electroforesis de productos de amplificación del Microsatélite D17Mit3 de la colonia de ratas Wistar Kyoto.....	40
Figura No. 8 Muestras de tejido para extracción de ADN.....	54
Figura No. 9 Proceso de extracción y purificación de ADN.....	54
Figura No. 10 Electroforesis microsatélite D1Mgh6 con poca formación de productos.....	55
Figura No. 11 Electroforesis microsatélite D1Mgh6 con formación de productos inespecíficos.....	55
Figura No. 12 Diagrama de microsatélites ubicados en el Cromosoma 17 de la rata.....	56
Figura No. 13 Diagrama de manejo reproductivo recomendando para la cepa Wistar Kyoto.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.1 Características de los oligonucleótidos iniciadores para la evaluación genética de las ratas Wistar Kyoto.....	36
Tabla No.2 Cantidad y concentración de reactivos en la mezcla de PCR para amplificación de microsatélites.....	36
Tabla No. 3. Determinación de cantidad y pureza de ADN extraído de la colonia de ratas Wistar Kyoto mediante espectrofotometría UV-vis.....	39

1. RESUMEN

El control de calidad genético de los animales de experimentación utilizados en los bioterios debe ser prioritario debido a que estos son reactivos biológicos que deben estar caracterizados en su genotipo y fenotipo, para asegurar que los estudios con animales de experimentación tengan reproducibilidad y además validez científica. El bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala “Dra. Amarillis Saravia Gómez”, cuenta con ratas de la raza Wistar Kyoto las cuales son utilizadas en diferentes investigaciones, sin embargo nunca se han caracterizado genéticamente.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la pureza genética de las ratas Wistar Kyoto para los microsatélites D1Mgh6 y D17Mit3, mediante la comparación de la longitud de los microsatélites con el tamaño reportado en el Rat Genomic DataBank y de los productores: NIH (Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos) y Charles River, además de determinar la condición de homocigosis de la colonia. La determinación de la calidad genética se llevó a cabo mediante la determinación de los polimorfismos de secuencia simple repetida (microsatélites) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los resultados obtenidos del análisis genético demostraron que la colonia de ratas Wistar Kyoto cumple con el tamaño estimado para el microsatélite D17Mit3 (201 pb) según la base de datos genómicos de la rata y con lo reportado para la colonia de ratas Wistar Kyoto de los laboratorios Charles River y los NIH. Sin embargo no cumple con el tamaño estimado para el microsatélite D1Mgh6 (147 pb). Debido a que únicamente se evaluaron dos microsatélites no se puede asegurar que la colonia de ratas Wistar Kyoto carece de sus características genéticas, debido a que se necesita hacer un estudio más amplio evaluando un mayor número de microsatélites para hacer una caracterización genética significativa. También se determinó que la colonia de ratas Wistar Kyoto tiene una condición homocigota y homoalélica para los microsatélites D17Mit3 y D1Mg6, lo que confirma un correcto manejo reproductivo consanguíneo de la colonia.

2. INTRODUCCIÓN

Los animales de laboratorio son un reactivo biológico indispensable en la experimentación, utilizados en una amplia variedad de investigaciones. Estos son engendrados, producidos y mantenidos en condiciones controladas y deben ser capaces de dar una respuesta confiable y reproducible (Mai, 2012).

El bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala “Dra. Amarillis Saravia Gómez”, es el único centro de investigaciones preclínicas que cumple con los parámetros establecidos y responde a diversos convenios como bioterio a nivel nacional; actualmente cuenta con dos especies de roedores utilizados en investigación: la rata Wistar Kyoto y el ratón *Mus musculus*. Las ratas Wistar Kyoto son los animales más utilizados en una gran variedad de investigaciones, siendo los principales ensayos de determinación de efecto farmacológico de plantas autóctonas y ensayos toxicológicos.

Por su amplia utilización, en los últimos años se han publicado diversos trabajos en relación a la calidad genética, entre ellos, algunos casos de líneas y colonias de ratones y ratas que han perdido sus características genéticas, conllevando a la desvalorización de los resultados obtenidos, pérdida de tiempo y de recursos. El control de calidad de los animales de experimentación es de especial importancia para garantizar la validez y la reproducibilidad de los resultados de las investigaciones. Cualquier alteración no detectada en su genoma puede implicar una alteración de sus características fenotípicas, lo cual, al no ser detectado a tiempo, pueden hacer que la cepa se aleje progresivamente de su patrón genético inicial hasta alcanzar diferencias inaceptables (Martínez, Osorio et al., 2007).

La determinación de polimorfismos de secuencia simple repetida (microsatélites), los cuales son regiones de ADN que contienen di, tri, o tetra nucleótidos repetidos que son encontrados al azar en el genoma, son utilizados como marcadores moleculares en una gran variedad de aplicaciones en el campo de genética, como pueden ser parentescos y estudios de poblaciones. Esto se debe a su capacidad para generar una huella genética personal o perfil genético (Brida & Riley, 2008).

El análisis de microsatélites es el método mejor recomendado para el control genético; por lo cual se planteó llevar a cabo la determinación de dos microsatélites “D1Mgh6 y D17Mit3” en ratas Wistar

Kyoto del bioterio. Para lo cual se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional determinando así el polimorfismo que muestran los microsátélites D1Mgh6 y D17Mit3 mediante el análisis del número de alelos y condición genética; además se llevó a cabo una comparación de los tamaños (pares de bases) teóricos característicos según el banco genómico de la rata y de las ratas Wistar Kyoto de los productores Charles Rivers e Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH).

3. ANTECEDENTES

3.1 LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

La experimentación animal se define como una actividad que tiene como misión evidenciar o aclarar fenómenos biológicos sobre especies animales determinadas. No obstante, también es toda acción de carácter científico o experimental que pueda llegar a suponer un ataque al estado de bienestar del animal, susceptible de causarle dolor, sufrimiento, angustia o agravio.

Se entiende que un experimento empieza cuando se inicia la preparación del animal para su uso y termina cuando se acaban las observaciones a realizar sobre el mismo. El uso de los animales como reactivos biológicos en el contexto de la investigación científica ha aportado numerosos beneficios. La importancia de estos usos para la humanidad está resumida por el National Research Council (EEUU). Entre otros muchos ejemplos, han contribuido de manera directa a incrementar la esperanza de vida del hombre, en la producción y validación de vacunas, en el estudio de las enfermedades, etc.

En la actualidad la experimentación animal sigue desempeñando un papel de primer orden en muchos ámbitos (Boada, Colom & Castelló, 2011):

- En agroalimentación: genes de interés agronómico, diseño de plantas transgénicas, etc.
- En sanidad humana y animal: diagnóstico de enfermedades, obtención de vacunas, tratamiento de enfermedades, etc.
- En biotecnología: sistemas biológicos de producción de proteínas, bioseguridad, etc.
- En medio ambiente: detección de contaminantes, bioseguridad, etc.
- En investigación genómica: análisis estructural y funcional de genomas, mapeo físico y genético de genomas, nuevas tecnologías para su análisis funcional, modelos animales de enfermedades humanas, etc.
- En medicina y farmacia: modelos de patología molecular, ingeniería biomédica para el diagnóstico clínico, xenotransplantes (por ejemplo de cerdo y primates a humanos).
- En oncología: mecanismos de la progresión tumoral, desarrollo de nuevos marcadores, control, invasión y metástasis, estrategias terapéuticas, predicción de radiosensibilidad, etc.

- En enfermedades infecciosas: bacterianas - resistencia a antibióticos, métodos de diagnóstico rápido, persistencia, inmunosupresión, víricas (hepatitis o inmunodeficiencia) y parasitarias (leishmaniosis, paludismo, etc.).
- En neurociencias: bases de las enfermedades neurodegenerativas, regeneración y reparación del tejido nervioso, mecanismos del dolor, estrategias terapéuticas, etc.
- En enfermedades cardiovasculares: biopatología de la pared vascular, cardiopatías, isquemia, hipertensión arterial, etc.
- En investigación farmacéutica: diseño, síntesis y acción biológica de nuevos agentes terapéuticos, farmacología y toxicología y biotransformación (Boada, Colom & Castelló, 2011).

3.1.1 El animal experimental como reactivo biológico

Se trata de un animal cuya calidad genética y ambiental ha sido controlada y asegurada y, por tanto, es capaz de dar una respuesta fiable y reproducible a la pregunta experimental. Se suman a ello todas las consideraciones de cuidado para el bienestar de cada uno según especie y sus requerimientos etiológicos, de manera que no se generen alteraciones o adaptaciones que modifiquen el modelo animal, alterando la respuesta investigativa.

Para obtener este tipo de animal es necesario conocer el concepto de “barrera” (que comprende las medidas y condiciones bajo las cuales se producen y reproducen los animales en los bioterios), para garantizar que mantenga condiciones definidas, tanto desde el punto de vista genético como sanitario.

El concepto de “homogeneidad del reactivo biológico” implica definir las condiciones del animal en cuanto a características somáticas (peso, sexo y edad), genéticas (igualdad o similitud biológica de su información genética a partir del mantenimiento de una tasa de consanguinidad elevada) y sanitarias según los requerimientos del experimento: axénicos (sin gérmenes), gnotoxénicos (con gérmenes controlados) o estándares con flora nativa (Cardozo, Osorio et al., 2007).

3.1.2 Genética y control genético

Afianzado el concepto de reactivo biológico, los aspectos relacionados con la homogeneidad y/o definición genética de los animales son de incuestionable importancia. No es posible utilizar en el laboratorio cuya genética no sea conocida o completamente definida, puestos que podría responder a condiciones desconocidas por el investigador y sesgar de ese modo sus resultados.

Es requisito universalmente exigido que el animal utilizado en investigación biológica o biomédica sea obtenido de un centro de producción certificado; resulta inadmisibles la utilización de animales de granja o de centros de zoonosis para esta clase de investigación, y aun para docencia.

Las características genéticas son relevantes para seleccionar los animales de acuerdo con los objetivos experimentales. Existen distintos tipos de colonias y cepas, por esta razón, es fundamental que el investigador conozca sus diferencias y desarrolle criterios de selección, inclusión o exclusión con relación a sus proyectos.

Es esencial una investigación de las características genéticas para seleccionar los animales, con el fin de elegir los portadores de caracteres consistentes con los objetivos experimentales. Deben considerarse las diferencias conocidas entre especies, colonias o cepas que incluyen: expectativas de vida, anatomía, tamaño corporal, sistemas fisiológicos y metabólicos, requerimientos nutricionales, susceptibilidad a enfermedades, características comportamentales, susceptibilidad a xenobióticos, entre otras. Es muy importante conocer la historia genética completa de los animales antes de comenzar a trabajar (Cardozo, Osorio et al, 2007).

Por otro lado, la posibilidad de reproducir las experiencias está limitada por su propia variabilidad, sobre esta base el empleo de animales homogéneos asegura la fiabilidad de la respuesta esperada. Así nace el concepto de “homogeneidad del reactivo biológico” y sus diferentes tipos (Boada, Colom & Castelló, 2011):

- Homogeneidad somática: Igualdad de sexo, peso, edad. Fácil en roedores y difícil en animales grandes (carnívoros, primates, herbívoros).
- Homogeneidad genética: Obtenida por una tasa de consanguinidad elevada.

- Homogeneidad sanitaria: Tendencia a evitar posibles perturbaciones debidas a estados patológicos no deseados, que influyen en la expresión genética del animal (genotipo), condicionando a largo plazo el fenotipo y a corto plazo el estado físico.

El objetivo final es la obtención de animales “biológicamente estandarizados”, sometidos a controles constantes. A este concepto habría que añadir el de estandarización de las variables ambientales del espacio vital ocupado por el animal: temperatura, ventilación, humedad, luz y las variables de comportamiento o etología. Estos factores pueden afectar la estandarización del animal y, como consecuencia, los resultados experimentales.

3.2 TIPOS GENÉTICOS

Con relación a sus tipos genéticos, los animales se clasifican en: colonias exocriadas (outbred stocks), cepas endocriadas (inbred strains); híbridos, colonias parcialmente endocriadas, cepas endocriadas apareadas al azar, cepas endocriadas recombinantes, mutantes, cepas congénitas, cepas coisogénicas y subcepas y desviación genética (Boada, Colom & Castelló, 2011).

3.2.1 Líneas consanguíneas (inbred strains)

Una población es consanguínea cuando sus progenitores comparten uno o varios antecesores comunes. En otras palabras, la consanguinidad es el acoplamiento entre individuos emparentados. En el orden de los roedores, la consanguinidad es muy frecuente en el estado salvaje, debido a que viven en territorios relativamente pequeños y las migraciones son poco frecuentes. Las poblaciones de roedores de laboratorio son también relativamente consanguíneas debido a que su tamaño es limitado y el apareamiento entre animales emparentados es muy frecuente.

Una línea (o cepa) consanguínea es aquella que resulta del acoplamiento sistemático e ininterrumpido entre hermanos y hermanas, por más de 20 generaciones (las cuales se numeran F1, F2, F3 etc.). Para asegurar la consanguinidad de la línea, es muy importante que todos los animales descendan de un único par de progenitores. En el caso de no disponer de hermanos de ambos sexos, se puede recurrir a una cruce excepcional (sólo una vez) del tipo padre/madre por cría (Benavides y Guénet, 2003).

Durante el desarrollo de una línea consanguínea se puede encontrar con el fenómeno denominado depresión endogámica en el cual se observa una baja en la fertilidad y una menor adaptación al

medio, obstáculos que llevan, a veces, a la pérdida de la línea. La depresión endogámica se debe al hecho que, por azar, durante el desarrollo de la consanguinidad, ciertos alelos desfavorables son puestos al estado homocigoto; en las poblaciones salvajes, los individuos en cuestión son contra-seleccionados y desaparecen.

En el ratón y la rata, la depresión endogámica no es tan severa como en otras especies de mamífero y ocurre solamente en las primeras generaciones de la endocría, desapareciendo completamente una vez que una línea consanguínea ha sido establecida. De hecho, es relativamente sencillo derivar líneas consanguíneas a partir de ratones salvaje capturados en la misma área geográfica. Por un lado, la práctica sistemática de la consanguinidad disminuye la frecuencia de los genotipos heterocigotas y paralelamente, el número limitado de progenitores genera una progresión hacia el estado homoalélico (una sola variante alélica presente), donde algunos alelos (en principio al azar) son fijados en ese grupo de animales.

De esta forma, cada línea consanguínea representa una colección única de genes (alelos) imposible de repetir. El aumento de la consanguinidad es la principal consecuencia de la cruce entre hermanos y la podemos medir por el coeficiente de consanguinidad (F) (no confundir con el número de generaciones de la consanguinidad: F1, F2, F3). El coeficiente F es la probabilidad de que dos alelos en un locus dado (en un individuo) sean idénticos por descendencia, es decir que ambos sean la réplica de un mismo alelo ancestral. Para considerar a una línea como consanguínea, ésta debe tener por lo menos un $F = 98,7\%$, valor alcanzado en la generación número 20 de endocría. Este valor alcanza el 100% (todos los loci homocigotas) en aquellas líneas con más de 150 generaciones, como es el caso de la mayoría de las líneas clásicas de laboratorio (Benavides & Guénet, 2003).

3.2.1.1 Características de las líneas consanguíneas

Las principales características de las líneas consanguíneas son: (i) isogenicidad, (ii) homocigosis, (iii) individualidad, (iv) uniformidad fenotípica y (v) estabilidad genética a largo plazo.

La isogenicidad, o igualdad genética, es sin dudas la característica más importante de estas líneas. El hecho de que todos los individuos pertenecientes a una línea sean idénticos genéticamente, facilita el intercambio de tejidos, como ser células del sistema inmune o células tumorales. En el

caso del ratón, esto permitió el gran desarrollo de la oncología y la inmunología experimentales a partir de los años 1940 (Benavides & Guénet, 2003; Festing, 1982).

La homocigosis hace referencia a que todos los animales de una cepa consanguínea son homocigotos en un 98%- 99% de todos sus genes. Solo existirán genes recesivos en un estado heterocigoto en un 1 - 2% denominado heterocigosis residual. Por lo tanto, los individuos que pertenecen a una línea consanguínea no son equivalentes a una colección de gemelos idénticos, ni tampoco a un grupo de animales clonados, ya que éstos son heterocigotas en muchos de sus loci (Benavides & Guénet, 2003).

La individualidad, determinada por la asociación de los caracteres fijados en cada línea particular, genera una individualidad con respecto a sus cualidades, rasgo que habrá que tener en cuenta a la hora de la elección de una línea para un trabajo de investigación. En este aspecto las líneas consanguíneas se dividen en aquellas de uso general y las de uso especial (o particular, las líneas de uso general son aquellas líneas que se encuentran ampliamente distribuidas y son usadas en diferentes disciplinas, más que en un tipo de estudio particular. La sensibilidad a ciertas enfermedades infecciosas, la tendencia a desarrollar enfermedades autoinmunes (como el lupus y la diabetes) y la susceptibilidad a los carcinógenos son sólo algunos ejemplos de la gran utilidad de estas líneas como animales de laboratorio de uso particular (Benavides & Guénet, 2003; Nomura y col., 1985).

La uniformidad hace posible la comparación de resultados experimentales entre animales de diferentes laboratorios y además, debido a su relativa estabilidad genética, a lo largo del tiempo. El número de líneas consanguíneas censadas es actualmente 478 para el ratón y 234 para la rata, lo que da una idea de la enorme cantidad de información y bibliografía que se maneja (Zuñiga y col., 2000).

3.2.1.2 Mantenimiento de las líneas consanguíneas

Para el mantenimiento de las líneas consanguíneas se recomienda un sistema basado en un núcleo reproductor (foundation stock colony) y una o más colonias de multiplicación o expansión (multiplication colony). El núcleo de reproducción es lo más valioso debido a que es la fuente de animales puros, genéticamente controlados. Este núcleo de reproducción está formado

normalmente por 10 a 20 parejas monogámicas. Las principales medidas de manejo para prevenir la contaminación genética por cruza no deseadas son las siguientes (Benavides & Guénet, 2003):

- (i) Separación física de las colonias reproductoras, en particular los núcleos de fundación, en aisladores o en cuartos separados.
- (ii) Si la separación física no es posible, distribuir las líneas de acuerdo a su color de pelaje.
- (iii) Se debe elegir un sistema de cría que minimice el movimiento de animales entre cajas y cuartos.

En este aspecto, las parejas monogámicas o los tríos estables son la mejor opción. Es importante tener presente que, dentro del núcleo reproductor, debe haber una línea de ancestro principal, pero con la menor cantidad posible de ramificaciones. Para lograr este objetivo se recomiendan dos sistemas de producción:

(i) De línea única y (ii) de líneas paralelas. En el sistema de línea única, las nuevas parejas reproductoras se seleccionan de un número limitado de jaulas (no más de 30) e, idealmente, se las somete a un control de la pureza genética. Lo más importante es que todos los animales de la generación presente desciendan de una única pareja ancestral, no más de cinco generaciones atrás. En el sistema de líneas paralelas (modificado), la exigencia de perpetuar una línea única es menos estricta, lo que facilita un poco el manejo. Normalmente, se mantienen tres líneas en paralelo, usando entre 5 y 10 parejas por línea. Luego de cuatro generaciones, se seleccionan un macho y una hembra (hermanos), los cuales serán la pareja ancestral de las próximas cuatro generaciones. A partir de esta nueva pareja se vuelven a abrir tres líneas (tres hembras y tres machos de la misma camada) y se las mantiene por cuatro generaciones, y así sucesivamente. Este sistema está basado en el supuesto de que es casi imposible que se produzca una contaminación genética simultáneamente en las tres líneas. Para evitar accidentes, la pareja seleccionada debería pasar por un estricto control de calidad genética. Muchos encargados de animalarios seleccionan estos animales teniendo en cuenta el comportamiento reproductivo (por ejemplo el número de crías por hembra por semana), aunque es una medida discutible (Benavides & Guénet, 2003).

3.2.1.3 Líneas Isogénicas

Las cepas o líneas isogénicas (coisogénicas) difieren de sus cepas parentales consanguíneas en un único locus, generalmente debido a la fijación de una mutación espontánea inicialmente reconocida por un fenotipo observable. Cuando estos mutantes son separados de su cepa parental consanguínea, el sujeto isogénico retendrá su fenotipo mutante, pero adquirirá una mutación de fondo no encontrada en las cepas parentales. Por eso es recomendado que las cepas mutantes sean renovadas por el cruzamiento con la cepa parental aproximadamente cada 10 generaciones para asegurar que la cepa mutante se mantiene verdaderamente isogénica con la cepa parental original

Una alternativa es el desarrollo de un stock de embriones criopreservados derivados de cruces de renovación y periódicamente usarlos en colonia. Cuando una colonia isogénica es perfectamente mantenida exhibirá características idénticas a su cepa parental, desviándose únicamente en el único alelo específico mutante. Este alelo mutante puede ser confirmado por el fenotipo distintivo o por el examen directo de cambios en el genoma que crearon el alelo mutante (Fox, Anderson et al., 2015).

3.2.1.4 Líneas consómicas

Las líneas consómicas son líneas en las cuales se introduce un cromosoma entero (en vez de un segmento) en una línea receptora, también por medio de retrocruzas. Son conocidas también como líneas con sustitución de cromosoma (Benavides & Guénet, 2003).

Igual que para las líneas congénicas, se necesitan por lo menos diez generaciones de retrocruzas para lograrlas. Una de sus formas más simples es utilizar el cromosoma Y como donante o también pueden introducirse cromosomas autosómicos, pero, en este caso, las cruzas deben ser asistidas por marcadores moleculares (normalmente microsatélites). Este tipo de líneas están especialmente indicadas para el estudio de caracteres multigénicos, ya que todas ellas derivan del mismo fondo genético, pero difieren unas de otras únicamente en una pareja cromosómica que es de diferente origen genético. El empleo de cepas consómicas portadoras de genes modificadores de tumor y que, además, hayan sido generadas en un fondo genético que llevan una mutación en un gen mayor de predisposición al cáncer, pueden ayudar a dilucidar cuales son los genes mayores a los que modifican (Benavides & Guénet, 2003; Ochiai et al., 2003).

2.2.2 Líneas no consanguíneas (outbred stocks)

La gran mayoría de las ratas y ratones vendidos en todo el mundo para ser usados en investigación pertenece a grupos de animales no consanguíneos, exocriados o exogámicos (en inglés random bred o outbred). Para ser más exactos, datos recientes muestran que alrededor del 75% de las ratas y ratones producidos comercialmente son animales no consanguíneos (Benavides & Guénet, 2003).

Su gran popularidad se debe especialmente a que son mucho más baratos que las líneas consanguíneas, son muy buenos reproductores y mansos para el manejo de laboratorio, pero es importante destacar que se trata de animales no definidos genéticamente. Para mantener correctamente estos grupos de roedores no deben sobrepasarse del 1% de endocria por generación, tratando de cruzar siempre animales no emparentados. En una colonia cerrada, esto es muy difícil de lograr, por lo tanto dependerá del tamaño inicial de la colonia. Lo ideal es contar con alrededor de 80 parejas reproductoras como fundadores del núcleo; de esta manera el coeficiente de endocria F no llega a superar el 10% dentro de las 20 generaciones. Existen varios sistemas de cría para mantener animales exocriados, dependiendo del número de animales que se tenga en la colonia.

Entre los ratones no consanguíneos más populares esta los Swiss-Webster, CD-1, ICR, y CF-1, todos de uso general. Las ratas Wistar Hannover, Sprague-Dawley (SD), Long Evans (LE) y Zucker (ZUC) son los grupos de ratas no consanguíneas más populares. Las primeras colonias de ratas albinas fueron comenzadas en 1906 en el Wistar Institute, donde se originaron la mayoría de estos grupos exocriados. Por ejemplo, las ratas Long Evans provienen de cruces de ratas Wistar con ratas salvajes (Benavides & Guénet, 2003; Rodríguez, 2008).

Estos grupos de roedores son los que mejor representan la variabilidad genética de una población humana típica; rasgo que puede ser confirmado al estudiar la frecuencia génica de un grupo de genes (isoenzimas) o el porcentaje de heterocigosis de marcadores moleculares (microsatélites). Por esta característica, los grupos de ratas y ratones exocriados son muy usados en toxicología y farmacología, aunque actualmente su uso está cada vez más cuestionado, ya que se puede obtener mayor variabilidad utilizando un conjunto de líneas consanguíneas (Benavides & Guénet, 2003).

Otra forma de generar variabilidad es produciendo híbridos F1 de líneas bien distantes (por ejemplo, unos entre ratones AKR y BALB/c y otros entre las líneas C3H y DBA) y cruzando luego estos híbridos entre sí. A este grupo de animales se los conocen como híbridos multicruza (en inglés, multicross

hybrids). El polimorfismo generado con estas cruzas es muy alto y se acerca al de las poblaciones humanas. Aun así, existen algunas circunstancias donde el uso de grupos no consanguíneos podría estar indicado, como sucedería en experimentos de selección (por ejemplo tamaño corporal), donde una línea consanguínea será completamente inadecuada debido a la falta de variación genética. Además, algunos roedores no consanguíneos pueden ser valiosos modelos de enfermedades humanas, como lo son las ratas Zucker para la obesidad y las ratas BB para la diabetes mellitus (Benavides & Guénet, 2003).

3.3 LAS RATAS WISTAR KYOTO

Las ratas Wistar consanguíneas del laboratorio Wistar de los Estados Unidos fueron originalmente enviados a la Universidad de Tokyo en 1938, desde donde fueron enviadas a la Universidad de Hokkaido en 1944 y luego fueron enviadas al Laboratorio central Animal de la Universidad de Kyoto en 1951. Durante el periodo siguiente a su llegada a Kyoto, las ratas fueron reproducidas de forma no consanguínea en una colonia cerrada.

Debido a la necesidad de tener un control para los estudios con las ratas espontáneamente hipertensas, usadas como modelo experimental de hipertensión. Se llevó a cabo en el National Institutes of Health (NIH) la selección de ratas Wistar y de igual manera en la Universidad de Kyoto, de cualquier forma luego de 10 años de la reproducción hermano/hermana de ratas Wistar-Kyoto (WKY) y la prematura liberación de esta cepa dio como resultado diferencias genéticas significativas entre ratas WKY de diferentes laboratorios. Un gran número de investigaciones han cuestionado las conclusiones de experimentos usando como control ratas Wistar Kyoto.

El control ideal normotenso de la cepa espontáneamente hipertensa (SHRs) debe ser una cepa consanguínea idéntica a la cepa SHR excepto por los genes involucrados en el desarrollo de la hipertensión, es decir una cepa congénica. Como la cepa no existe y puede ser desarrollada solo por técnicas complicadas de ingeniería genética que esperen la identificación de los genes específicos involucrados en la hipertensión (Howes & Louis, 1990).

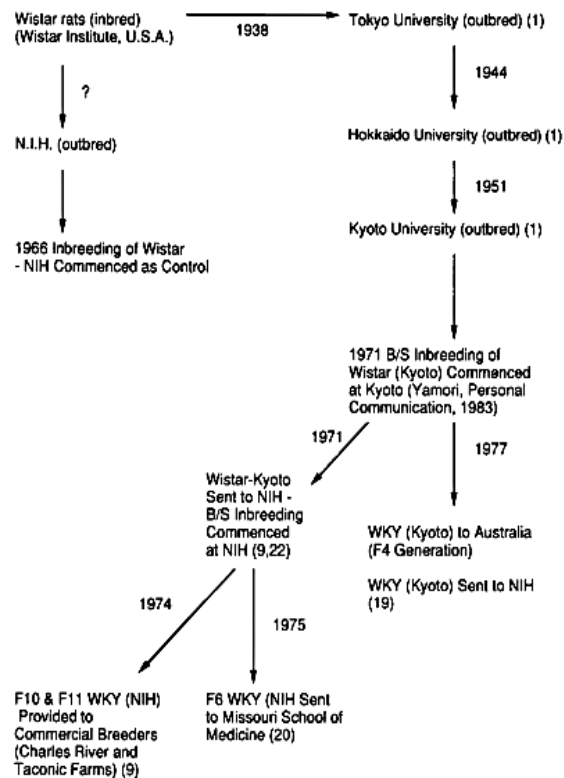
Las dificultades en el desarrollo de control normotensos para los estudios de las cepas SHR fueron reconocidos en los estudios iniciales llevados a cabo por NIH. Se decidió usar un cruce hermano/hermana de cepas Wistar del NIH como control normotenso. La creencia de que el cruce

consanguíneo de las ratas Wistar de la cepa de Kyoto podría ser un control más apropiado para las cepas SHR llevó al desarrollo de la cepa consanguínea de ratas Wistar en 1971 en Japón y el desarrollo de la cepa Wistar Kyoto.

De cualquier manera, debido a que la línea consanguínea SRH fue progresivamente arreglada entre 1959 y 1969, la colonia original de Wistar ha sido mantenida por la continua reproducción no consanguínea, entonces esto permitió la existencia de muchas diferencias genéticas entre las cepas SHR y Wistar, de las cepas Wistar Kyoto por el tiempo de que la reproducción consanguínea de la cepa Wistar que comenzó en 1971 (Howes & Louis, 1990).

A pesar de las variaciones anteriormente mencionadas al menos dos cepas genéticamente distintas de ratas WKY fueron secuencialmente producidas: las ratas WKY de Kyoto y las ratas WKY del NIH. Siendo las ratas WKY de NIH la fuente comercial de ratas WKY en existencia (Howes & Louis, 1990).

Figura No. 1 Diagrama de la genealogía de Wistar Kyoto



Fuente: (Howes & Louis, 1990)

3.4 MÉTODOS DE CONTROL GENÉTICO

El control genético es un conjunto de técnicas que nos permite verificar si los animales que estamos utilizando aún conservan las características genéticas originales de la línea a la cual pertenecen, o han sufrido algún cambio debido a una contaminación genética (por cruzas accidentales). Lamentablemente, estos controles no están diseñados para detectar la presencia de mutaciones espontáneas, ya que al producirse al azar sería necesario evaluar la totalidad del genoma (Melloy y Balk, 1993).

El fundamento de los controles de pureza genética consiste en analizar caracteres cualitativos o cuantitativos (enzimas, marcadores inmunológicos, marcadores de ADN) y compararlos con valores de referencia establecidos internacionalmente para la línea consanguínea. En todos los casos se trata de utilizar marcadores lo suficientemente polimórficos entre líneas como para detectar cruzas accidentales. Según Michael F. Festing (1990), podemos dividir a estos controles en tres categorías

- (i) Caracterización: es para describir el genotipo de una línea nueva, analizando el mayor número de *loci* posible.
- (ii) Control tipo I: se emplea sólo para confirmar el perfil genético de una línea.
- (iii) Control tipo II: se analiza un grupo mínimo de loci seleccionados especialmente para discriminar entre varias líneas.

El último tipo de control es el que debería aplicarse periódicamente en los animalarios de roedores consanguíneos. Ante la inquietud de saber cuándo se debe realizar un control de pureza genética, podemos decir que una colonia debe ser controlada genéticamente fundamentalmente en dos casos (Melloy y Balk, 1993):

- (i) al establecer una colonia nueva
- (ii) cuando se sospecha de contaminación genética.

Más allá de estos casos, un control de rutina debería estar presente en aquellas colonias con alto riesgo de contaminación, como por ejemplo cuando se mantiene más de una línea albina simultáneamente. Las técnicas de control genético se pueden dividir en aquellas que controlan loci individuales y las que lo hacen sobre varios loci simultáneamente. Dentro del primer grupo se encuentran los marcadores bioquímicos, los marcadores inmunológicos, el análisis del color del

pelaje y la tipificación de microsatélites de ADN. Dentro de las técnicas que controlan varios loci simultáneamente se encuentran los injertos de piel, los estudios morfológicos, el comportamiento reproductivo y el fingerprinting de ADN (Dagnaes, 1994).

3.4.1 Marcadores bioquímicos

Este método es muy útil en el control genético de líneas consanguíneas. Con frecuencia existen diferencias más o menos sutiles entre los distintos alelos de los genes que codifican ciertas enzimas (isoenzimas). Se denominan isoenzimas a las diferentes formas moleculares que adopta una determinada enzima y que poseen similares pero no necesariamente idénticas propiedades catalíticas, por ejemplo: esterasa 1 (Es1), esterasa 2 (Es2), esterasa 3 (Es3), es decir que no interfieren en su funcionalidad, pero que hacen que éstas presenten diferencias en su velocidad de migración a través de un gel de electroforesis. Una vez separadas en el gel (almidón o poliacrilamida), las distintas enzimas se visualizan añadiéndoles un sustrato que da un producto coloreado cuando es metabolizado por la enzima. Si analizamos este polimorfismo isoenzimático a un buen número de genes, los resultados permiten la caracterización genética de determinadas líneas o colonias de roedores (Bedel et al., 1997).

Asumiendo el estado isogénico de las líneas consanguíneas, cabe esperar un patrón único de aloenzimas para cada línea en particular, lo que constituye el arma fundamental del control genético. Por medio de esta técnica obtenemos información indirecta, pero precisa, sobre la constitución genética de los animales, pudiendo detectarse contaminación con la sola presencia de patrones anormales para la línea. Los principales inconvenientes de estos marcadores son que deben llevarse a cabo protocolos específicos para cada isoenzima y que requieren de grandes cantidades de tejido (con el consecuente sacrificio de los animales) y de una estricta cadena de frío. A pesar de que esto complica la aplicación rutinaria de estos marcadores, algunos criadores comerciales todavía los utilizan (Benavides y Guénet, 2003).

3.4.2 Marcadores Inmunológicos

El sistema inmunitario provee a los mamíferos de un mecanismo de defensa frente a la invasión por cuerpos extraños y organismos patógenos. El reconocimiento de tales agentes se efectúa a través de los anticuerpos, moléculas proteicas, que se unen en forma específica a los antígenos, los cuales son todas aquellas moléculas que no reconocen como propias. Consecuencia de este

reconocimiento, es también el rechazo de los trasplantes de órganos provenientes de otros congéneres. Existen más de treinta genes distintos implicados en el sistema de histocompatibilidad, dentro de ellos, los pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), denominado complejo H2 en el ratón y complejo RTI en la rata (Snell y Stimpfling, 1966).

Estos antígenos, que intervienen en los mecanismos íntimos de la respuesta inmune y están involucrados en los procesos de rechazo de injertos, se encuentran distribuidos en cientos de loci independientes en el genoma, abarcando virtualmente todos los cromosomas. Los antígenos de histocompatibilidad de clase I (loci H2-K, H2-D, H2-L) y clase II (loci H2-A, H2-E), son las moléculas más polimórficas que se conocen. Los haplotipos estándar para cada línea consanguínea de ratón han sido definidos por serología, conociéndose más de 50 haplotipos diferentes, sin contar mutantes ni ratones salvajes. En términos prácticos, los diferentes haplotipos se analizan por métodos serológicos (test de citotoxicidad o citometría de flujo), para lo cual es indispensable contar con los antisueros o los anticuerpos monoclonales adecuados (Zuñiga et al, 2001).

El fundamento del test de citotoxicidad es la presencia de toxicidad celular mediada por los anticuerpos específicos en presencia de complemento, medida con la utilización de colorantes vitales o por la liberación de cromo radioactivo. Históricamente, el método recomendado fue el que utilizaba las placas de microcitotoxicidad de Terasaki con células provenientes del ganglio linfático. En la actualidad, el citómetro de flujo está reemplazando a las técnicas de citotoxicidad en el análisis de antígenos de los complejos H2 y RT1. Trabaja cuantificando fluorescencia de los antisueros conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) u otras sustancias fluorescentes. Su precisión y velocidad de trabajo son óptimos, pero el costo de estos equipos es muy elevado. También se podrían realizar trabajos de tipificación de estos genes por medio de la utilización de sondas moleculares (RFLP's) o con el uso de un termociclador de PCR e iniciadores específicos. Algunos laboratorios agregan a la lista de marcadores inmunogenéticos a los antígenos de glóbulos rojos del ratón (la serie Ea1 a Ea10) (erythrocyte antigen) y los grupos sanguíneos Rt2, Rt3 y Rt8 de la rata (Benavides y Guénet, 2003).

3.4.3 Análisis del color del pelaje

La herencia del color del pelaje en roedores es sumamente compleja: en los ratones se describieron más de 60 genes que afectan la pigmentación del pelo y muchos de ellos interactúa entre sí dando

un vasto número de combinaciones. No obstante, para este análisis se controlan solamente cuatro loci: El locus *C* (cromosoma 7), denominado históricamente locus albino, es el gen de la tirosinasa (*Tyr*), enzima que realiza la oxidación de la tirosina hacia melanina, lo que determina la presencia de pigmentos. El alelo *c* es una mutación en el gen de la tirosinasa (*Tyrc*). El alelo salvaje *C* (dominante) produce un fenotipo con color, pues permite la expresión de los loci *A* y *B* (9 del tipo de color). El alelo *c* (recesivo) reprime la expresión de los loci *A* y *B* dando por resultado un fenotipo albino en los animales homocigotas (*Tyrc/Tyrc*), debido a la ausencia de pigmentos. El locus *D* (cromosoma 9), cuyo nombre actual es *Myo5a* (*myosin Va*), regula la distribución de los gránulos de melanina dentro de los melanocitos. El alelo salvaje *D* (dominante) produce una distribución regular de pigmentos, no afectando el fenotipo final. Se sabe que el alelo *d* (recesivo) es una mutación de este gen (*Myo5ad*) y que produce una distribución irregular de los pigmentos dando como resultado un fenotipo con una notable dilución del color.

El locus *A* (cromosoma 2) controla la cantidad relativa y la distribución de los pigmentos amarillo (feomelanina) y negro/marrón (eumelanina). Este locus presenta dos alelos importantes para los controles genéticos (aunque existen alrededor de 25 alelos diferentes reportados en la literatura): *A* (*agouti*, alelo salvaje) y *a* (*non agouti*, alelo mutado). El locus *B* (cromosoma 4), ahora llamado *Tyrp1* (*tyrosinase related protein*), presenta los alelos *B* (*black*) y *b* (*brown*). Ambos loci (*A* y *B*) se ven afectados por la regulación del locus *C*, que activa o reprime su expresión, y por el locus *D* que determina la dilución del color. Estos loci son los responsables de la determinación del tipo de color (Benavides y Guénet, 2003).

3.4.4 Marcadores de carácter reproductivo

El número de crías por camada de los ratones y ratas de laboratorio es una característica propia de cada línea o colonia. Su promedio es utilizado frecuentemente como un primer indicador de la pureza genética de los animales. Un importante factor de alerta de contaminación genética, será la detección de camadas que difieran ampliamente del promedio calculado para la línea o colonia. En este caso es aconsejable realizar otros controles más precisos para confirmar dicha sospecha (Benavides y Guénet, 2003; Rodríguez, 2008).

3.4.5 Marcadores de ADN

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

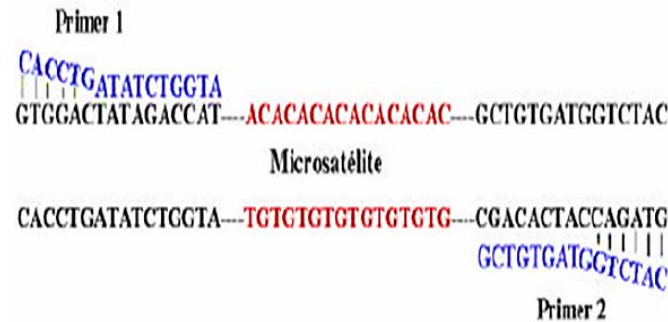
En la actualidad se utilizan técnicas que se basan en el análisis directo del genoma de los animales, tales como son el análisis de marcadores moleculares, entre éstos: polimorfismos de los fragmentos de restricción (*RFLP's*), fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar (*RAPD*), minisatélites; microsátélites; Polimorfismos de Repetición o de longitud (*SSLP'*); la huella del ADN (*fingerprinting*) y los Polimorfismos de un Solo Nucleótido (*SNP's*) (Rodríguez, 2008).

3.4.5.1 Marcadores Moleculares Microsatélites

Los microsátélites son secuencias de 1 a 5 nucleótidos repetidas en *tandem*. Mediante los microsátélites se puede medir la diversidad entre genotipos, amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. El uso de microsátélites ha ido aumentando debido a la producción de bibliotecas de cebadores y la secuenciación automática fluorescente, ambas permiten el diseño de los cebadores que rodean los microsátélites (Brondani y col., 1998).

Los fragmentos generados por amplificación mediante la PCR, son separados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y visualizados radioactivamente o por tinción con nitrato de plata. Los microsátélites son muy atractivos para los genetistas pues combinan varias ventajas como son su codominancia, multialelismo y su alta heterocigosidad. El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos, los microsátélites usan cantidades mínimas de ADN, equivalentes a las que se usan en *RAPD*. Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicos y la variación en la longitud de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas. 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) que sirven de molde para la hibridación de los oligonucleótidos iniciadores en la técnica de PCR (Rodríguez, 2008).

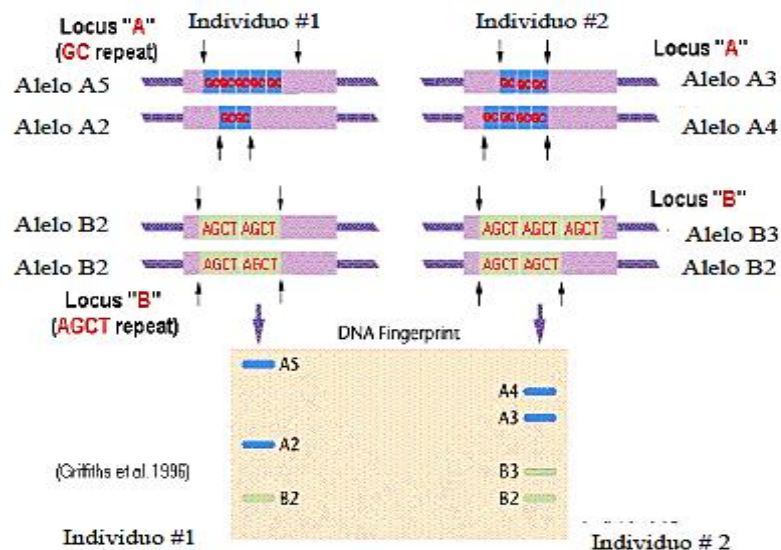
Figura No.2 Composición de una región microsatélites en una cadena de ADN



Fuente: Rodríguez, 2008

En la figura No.3 se muestra un ejemplo del análisis genético mediante microsatélites. Se observan patrones de bandas de PCR de los alelos pertenecientes a los locus A y B de dos individuos diferentes. Como se observa en la figura, el análisis de microsatélites por PCR permite detectar diferencias entre los individuos de una población para un mismo locus. La diferencia en pares de bases entre los alelos de un mismo gen indica una condición de heterocigosis, por ejemplo, para los locus A y B del individuo 2. Cuando no hay diferencias en pares de bases entre los alelos de un mismo *locus*, se presenta una condición de homocigosis (Rodríguez, 2008).

Figura No.3 Uso de microsatélites como marcadores moleculares



Fuente: Griffiths et al, 1996.

En particular, el uso de los microsatélites en controles de calidad genética presenta varias ventajas sobre las demás técnicas (Benavides y Guénet, 2003):

- (i) por ser tan polimórficos resulta más fácil la selección de un juego de microsatélites para controlar un grupo de líneas.
- (ii) su gran abundancia (hay más de 8.000 disponibles para el ratón y la rata).
- (iii) todos los microsatélites pueden ser analizados con el mismo protocolo y a partir de cantidades ínfimas de ADN (50 nanogramos) provenientes, por ejemplo, de unos pocos microlitros de sangre o de una punta de cola.

Normalmente, se debe identificar previamente un grupo de loci (entre 8 y 10 SSLP) que nos permita diferenciar un grupo de líneas consanguíneas de interés y cuyos alelos puedan ser resueltos en geles de agarosa al 4%. En los últimos años esta técnica ha sido adoptada por la mayoría de los animalarios (biotérios) y grandes criadores comerciales de ratas y ratones como un control genético rápido, eficaz y económico

3.4.5.2 Análisis de Polimorfismo de un solo nucleótido

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

2.4.5.3 Análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción.

El estudio de los RFLP se basa en el uso de endonucleasas de restricción (ER), éstas son enzimas que cortan el ADN por sus sitios diana. Cuando el ADN genómico de un animal es cortado con una ER, se producen numerosos fragmentos que pueden separarse por electroforesis. Las variaciones

genéticas causadas por mutaciones espontáneas o por contaminación genómica pueden alterar la localización y el número de las dianas para las ER, alterando así el patrón de bandas en la electroforesis (Zuñiga *et al.*, 2001).

3.4.5.4 Análisis de minisatélites

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

3.5 ESTUDIO PREVIOS REALIZADOS INTERNACIONALMENTE

En el año 1992, Serikawa y otros investigadores determinaron ciento setenta y cuatro loci que contienen secuencias de microsatélites de la base de datos EMBL o el GenBank para producir primers, para la amplificación por PCR y así determinar los sitios marcados de secuencia de microsatélites (SMTSs). Ciento treinta y cuatro microsatélites provenientes de 118 loci fueron asignados a cromosomas específicos usando un panel de cruce híbrido de rata por ratón, además se examinaron las variaciones de los microsatélites en 8 colonias de ratas consanguíneas determinando variaciones en 85 de 107 loci examinados (79.4%).

En el año 1997 Deschepper y otros investigadores, llevaron a cabo la caracterización genética de una nueva colonia de ratas derivadas del cruce entre Wistar Kyoto y Ratas Espontáneamente Hipertensas (REH o SHR en inglés) y la comparación con sus colonias parentales. Los pares de reproducción elegidos para la creación de esta nueva cepa fueron seleccionadas inicialmente en el supuesto de dos fenotipos mutuamente exclusivos, estas nuevas ratas fueron llamadas: WKHA (Wistar Kyoto derivada hiperactiva, pero no hipertensa) y WKHT (Wistar Kyoto derivada hipertensa pero no hiperactiva), las cepas fueron refinadas por el retrocruce estricto hermano - hermana por 25 generaciones. Para asegurar el uso de estas nuevas cepas, se caracterizaron utilizando métodos de control genérico, incluyendo ADN fingerprinting y el análisis de microsatélites. Se encontró que

estas dos nuevas cepas están relacionadas más con sus cepas parentales WKY y SHR que la relación entre ellas mismas. Se determinó que la heterogenicidad de las líneas genéticas nuevas WKHA y WKHT es extremadamente raro lo cual indica que es una línea que puede ser considerada verdaderamente consanguínea, a diferencia de las ratas WKY obtenidas de dos proveedores (Charles River y NIH), determinando que la heterogenicidad de ratas Wistar Kyoto de Charles River pueden ser debida a la aparición espontánea de nuevos alelos y la heterogenicidad de ratas Wistar Kyoto de NIH puede ser debido a la contaminación con alelos de la línea SHR.

En el año 1999 Watanabe y otros investigadores llevaron a cabo la producción de un mapa de híbridos de radiación del genoma de la rata, basándose en microsatélites y marcadores genéticos. Este incluyó 3019 nuevos marcadores de microsatélites y 1714 marcadores de microsatélites con localización genética ya conocida.

En el año 2011 De Jesús y otros investigadores llevaron a cabo en la Universidad de los Andes, Venezuela el uso de marcadores moleculares de microsatélites para determinar la condición de homocigosis y heterocigosis en roedores producidos en el Bioterio de la Universidad de los Andes, el estudio tuvo como objetivo analizar marcadores moleculares microsatélites del ADN extraído de ratones pertenecientes a las colonias de ratones BALB/C//BIOULA, C57BL/6//BIOULA y de ratas BIOULA: Sprague-Dawley, producidas en el Bioterio de la Universidad de Los Andes- Mérida (Venezuela), las cuales se han mantenido durante 16 años (32 generaciones) sucesivos e ininterrumpidos, usando apareamientos hermanos con hermanas en los ratones y empleando el sistema de Robertson en las ratas. Los productos de amplificación de los 14 microsatélites usados en el análisis del ADN de los ratones presentaron una sola hebra y coincidieron en cantidad de pares de bases a lo reportado en la base de datos de *The Jackson Laboratory*, indicando que conservan su condición de homocigosis e isogenicidad. Los productos de amplificación de los siete microsatélites analizados para el ADN de las ratas presentaron sólo en cuatro microsatélites la condición de doble hebra; lo cual, para el total de 32 animales analizados, representa una heterocigosis disminuida de $0,157 \pm 0,214$ sd, con un bajo polimorfismo génico, revelado en el análisis estadístico realizado con el programa PopGen32. El estudio efectuado permitió verificar la condición genética de los animales producidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes-Mérida (Venezuela).

En el año 2013 Yanli y colaboradores llevaron a cabo en la Universidad estatal de New York el estudio de la arquitectura genética de las ratas Wistar-Kyoto y las ratas espontáneamente hipertensas de diferentes fuentes. Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) son una cepa endogámica establecida a partir de ratas Wistar no consanguíneas seleccionadas que manifestaron presión arterial alta. Aunque la cepa SHR desarrolla la hipertensión espontáneamente a la edad de 7-15 semanas, con anterioridad a esta edad se han utilizado y validado como un modelo para el déficit de atención / trastorno de hiperactividad (TDAH), demostrando el núcleo de tres síntomas de TDAH: hiperactividad, impulsividad y falta de atención.

La cepa Wistar-Kyoto (WKY) se estableció desde el mismo origen parental de la cepa wistar como la cepa SHR y como resultado ha sido comúnmente usada como una cepa de control para el SHR. Notablemente, sin embargo, las fuentes de ratas WKY a menudo varía entre los estudios, y una variabilidad significativa en los resultados comparativos donde se emplean estas cepas ha señalado, probablemente que WKY fue distribuida a diferentes criadores antes de ser totalmente homocigota por lo tanto el aumento de la heterogeneidad entre la cepa WKY permite su cuestionamiento acerca de la validez como control para la cepa SHR. En el estudio de los fenotipos ADHD en las cepas SHT, se ha reportado previamente diferencias en el comportamiento y diferencias genéticas entre dos subcepas de WKY, WKY/NHsd (Laboratorios Harlan, UK) y WKY/NCrI (Laboratorios Charles River, Alemania), así como grandes diferencias genéticas entre la cepa SHR. En este estudio se determinó que las tres diferentes subcepas difieren de las otras en un 30% aproximado de su secuencia genómica, basado en el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) los cuales se determinaron usando el Affymetrix genotipado dirigido de rata en panel de 5k array. Estas tres cepas también difieren en su comportamiento significativo de ADHD. La rata WKY/NCrI aunque no hiperactiva, mostró déficits en una atención sostenida similar a las ratas SHR/NCrI, mientras que la cepa WKY/NHsd no exhibió ninguna hiperactividad, impulsividad o falta de atención. Con base en estos resultados, se sugirió que WKY/NCrI sería un modelo útil para el TDAH inatento, mientras las ratas WKY / NHsd deben continuar sirviendo como un adecuado control de la conducta. Como corolario directo, aparentemente contradictorio, los hallazgos no deben ser sorprendentes si diferentes subcepas de Ratras WKY se utilizan como controles para la cepa SHR.

3.6 ESTUDIOS PREVIOS LLEVADOS A CABO EN GUATEMALA

En el año 2009 Samayoa, Mérida y Monterroso llevaron a cabo la caracterización preliminar con microsatélites de la colección guatemalteca de frijol común trepador. El objetivo de este estudio fue caracterizar con microsatélites una colección de 558 accesiones de frijol voluble guatemalteco en el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), en el periodo enero 2008 a junio 2009, con base en seis marcadores microsatélites, se analizaron agrupamientos y diversidad genética dentro de los grupos de frijol. Todos los loci analizados fueron polimórficos, se detectaron 25 alelos con un promedio de 4,12 alelos por marcador. El análisis de similaridad detectó genotipos duplicados que al ser eliminados dio lugar a una colección reducida de 261 muestras diferentes (46,8 % de la original). Los análisis de similaridad y correspondencia identificaron 12 grupos, incluyendo un control andino. La diversidad genética de Nei para la colección reducida fue 0,4310, y la diferenciación genética (Gst) de 0,5747. La diversidad genética entre los grupos (57,5 %) fue mayor que la detectada dentro de los grupos (42,5 %). Las distancias genéticas entre grupos se calcularon en un rango de 0.1566 a 1,6205. Un alto nivel de heterocigosidad fue observado. La conclusión principal del estudio fue que el análisis realizado mostró que la reducción de la colección es una buena estrategia para crear una colección núcleo. Es importante resaltar que esta colección contiene una alta diversidad genética, a pesar de que las accesiones no fueron recolectadas adecuadamente. Las agrupaciones aquí sugeridas son consistentes por lo que pueden ser utilizadas como nueva clasificación de los materiales. Esta colección puede ser de gran utilidad en el estudio del frijol mesoamericano proveniente de Guatemala, para completar investigaciones previas.

En el año 2012 Ariza en su informe final de investigación de la diversidad genética de la *población Artibeus jamaiceicensis* en el biotopo protegido San Miguel la Palotada San José, Petén, llevado a cabo en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP) de la Universidad de San Carlos de Guatemala evaluó dos marcadores microsatélites AJA151 y AJA040. En cuanto a la diversidad alélica, se encontraron 29 alelos diferentes evaluando los dos marcadores moleculares. El número mostrado por cada alelo pertenece al peso molecular en pares de bases. Los alelos más frecuentes oscilaron entre los 200 pares de bases con una ocurrencia del 15%, lo cual indicó que la población es diversa porque estos alelos aparecieron en frecuencias muy bajas. El marcador AJA151 mostró un mayor número de alelos indicando un mayor polimorfismo. En cuanto a la riqueza alélica se encontró para los dos marcadores un número de 12 alelos. Los marcadores moleculares utilizados

(microsatélites), mostraron un total de 22 haplotipos, siendo el AJA151 el marcador con mayor número de haplotipos y el marcador AJA040 mostró haplotipo homocigoto, siendo este el menos variable.

En el año 2013 Mazariegos llevó a cabo la Evaluación de la diversidad genética de *Thalassia testudinun* en poblaciones marino costeras del Atlántico guatemalteco, llevado a cabo en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP) de la Universidad de San Carlos de Guatemala, utilizando tres microsatélites: TGA8, TGA39 Y TCT58. En general se encontraron alrededor de 5 alelos diferentes para cada loci de microsatélites evaluados reportando al menos 8 diferentes alelos para cada loci estudiados en la zona marino-costera de Yucatán. Indicando que las poblaciones guatemaltecas estudiadas, se encuentra una menor diversidad genética en comparación a las costas mexicana. Al evaluar la heterocigosidad se determinó que en general hay un mayor número de heterocigotos en los sitios no perturbados. Para el loci TCT58 se encontró que todos los individuos son homocigotos. Al encontrar más heterocigotos se determina que los individuos tienen alelos diferentes en su genotipo.

En Guatemala no se ha llevado a cabo ninguna investigación del perfil genético o determinación de pureza genética de animales de laboratorio, a pesar de que varias Universidades privadas y varios centros de investigación y facultades dentro de la Universidad de San Carlos realizan continuamente investigaciones utilizando diferentes animales de experimentación , por lo cual la presente investigación permitirá un avance en el campo de la investigación con animales de laboratorio al determinar la condición genética de las ratas Wistar Kyoto del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez”.

4. JUSTIFICACIÓN

Los animales de laboratorio son usados comúnmente como modelo de organismo para el estudio de las enfermedades humanas, para facilitar este estudio se han desarrollado diferentes líneas de animales de laboratorio genéticamente estandarizadas (Bryda & Riley). El bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez”, cuenta con una línea genética de ratas de la raza “Wistar Kyoto”, las cuales son utilizados en una amplia variedad de investigaciones.

Como parte del buen manejo de la colonia de las ratas en un bioterio, es esencial llevar a cabo estudios genéticos para monitorear o detectar algún tipo de contaminación en las líneas genéticas estandarizadas, anteriormente se llevaban a cabo estudios mediante pruebas bioquímicas en las que se sacrificaban a los animales o se utilizaba una gran cantidad de instrumentos y consumían mucho tiempo, con la revolución en las técnicas de análisis de ADN surgió el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el cual permite el estudio del ADN en forma más eficiente.

El llevar a cabo esta técnica permite determinar el grado de pureza genética que poseen las ratas Wistar Kyoto del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez” para los microsatélites D1Mgh6 y D17Mit3, los cuales se encuentran descritos en el banco genómico de la rata y además se han estudiado para determinar variaciones entre ratas Wistar Kyoto de diferente procedencia. Según los resultados obtenidos se puede asegurar que las investigaciones llevadas a cabo se realizan en animales de pureza genética conocida y además son reproducibles y confiables a nivel internacional.

El control de calidad genético de los animales de laboratorio, es un estándar de calidad para los bioterios, por lo cual este trabajo permite que se cumpla con este requisito, llevando a cabo esta determinación de forma rutinaria; además de promover el estudio en el campo de genética de los animales de laboratorio, siendo uno de los campos de alto crecimiento y el futuro de las investigaciones.

5. OBJETIVOS

5.1 General

- Evaluar la pureza genética de las ratas Wistar Kyoto del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez” para los microsatélites D1Mgh6 y D17Mit3 por medio de la técnica de PCR punto final.

5.2 Específicos

- Comparar los microsatélites D1Mgh6 y D17Mit3 de las ratas Wistar Kyoto del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez” con los datos teóricos de los productores NIH y Charles River.
- Determinar la condición de homocigosis de las las ratas Wistar Kyoto del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez” mediante el número de alelos.
- Determinar la extracción efectiva de ADN de rata mediante el análisis de espectrofotometría ultravioleta-visible y de electroforesis.

6. HIPÓTESIS

La colonia de ratas consanguíneas Wistar-Kyoto producidas en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez” han conservado la condición de homocigosis y pureza para los microsatélites D1Mgh6 y D17Mit3.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 UNIVERSO:

Todas las ratas Wistar Kyoto del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez”.

7.2 MUESTRA:

Ocho ratas Wistar Kyoto conformadas por: 2 machos sementales, 3 hembras reproductoras, 2 hijas hembra y 1 hijo macho.

7.3 MATERIALES

7.3.1 Recursos Humanos

Investigador: Rudy Alfonso Marroquin Rosales
Asesora: Licda. Dulce Genoveva Saldaña Santiago
Revisora: Licda. Irma Lucía Arriaga Tórtola

7.3.2 Equipo

- Centrifugadora miniSpin plus Eppendorf©
- Fuente de poder EC 300 XL
- Cámara de electroforesis Owl Easycast B1
- Vórtex Fisher Scientific©
- Microondas
- Espectrofotómetro Genesys 10S
- Baño térmico PolyScience
- Transiluminador Benchtop UV
- Sistema de imagen UVP PhotoDoct-It
- Termociclador 2720 Applied biosystems©
- Balanza semianalítica Metler Toledo
- Refrigeradora

7.3.2 Reactivos

- Etanol absoluto (Merck©)
- Cloruro de sodio (Merck©)
- Etanol 70%
- Buffer TBE 10X
- Lidocaína sin epinefrina
- RediLoad© (Invitrogen)
- Gel de agarosa grado biología molecular (Merck©)
- Platinum PCR SuperMix (Invitrogen)
- GelRed© Nucleic Acid Gel Stain 3X
- Microsatélites D1Mgh6 y D17Mit3 (Integrated DNA Technologies)
- Agua ultrapura libre de ADNasas
- Escalera 100 pb y 1 Kb (Promega)
- Reactivos Kit de extracción de ADN PureLink Genomic DNA Mini Kit©:
 - PureLink Buffer de lisis/unión
 - PureLink Buffer de digestión
 - PureLink Buffer de Lavado 1
 - PureLink Buffer de Lavado 2
 - PureLink Buffer de elución (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA)
 - Proteinasa K 20 mg/mL
 - ARNasa A 20 mg/mL

7.3.3 Cristalería y materiales

- Tubos eppendorff de 0.5 ml y 1.5 mL
- Micropipetas de 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L y 10 mL
- Microceldas de espectrofotómetro
- Beaker de 10 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Puntas de micropipeta de 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L y 10 mL
- Jeringas de tuberculina 1 cc

- Pinzas y jeringas quirúrgicas estériles
- Columnas y tubos colectores del PureLink Genomic DNA Mini Kit de extracción
- Frascos de vidrio opacos de 250 mL
- Frascos de vidrio de 250 y 500 mL

7.4 MÉTODOS

7.4.1 Metodología toma de muestra a partir de tejido de oreja para extracción de ADN

- Seleccionar las ratas a utilizar y llevar a cabo la limpieza y esterilización de la oreja con alcohol 70%.
- Tomar el área de la oreja a muestrear e inyectar por vía subcutánea aproximadamente 0.2 cc de Lidocaína sin epinefrina, esperar por aproximadamente 5 minutos.
- Con una pinza presionar la oreja (si el animal muestra sensibilidad a la presión, esperar más tiempo) y con una tijera quirúrgica previamente esterilizada cortar un fragmento aproximado de 2 x 2 mm.
- Colocar cuidadosamente el fragmento en tubo eppendorff de 1.5 mL y proceder inmediatamente a la extracción de ADN, si no se puede llevar a cabo la extracción congelar a -20°C, considerando la posible fragmentación del ADN.

7.4.2 Extracción de ADN mediante el PureLink® Genomic DNA Mini Kit

Preparación del lisado

- Preparar baño térmico u horno a 55 °C.
- Adicionar a cada uno de los tubos que contienen la muestra de oreja, 180 µL de PureLink® Buffer de digestión y 20 µL de Proteinasa K, asegurar que el tejido quede totalmente inmerso en la solución.
- Incubar a 55°C con agitación ocasional durante 12 horas, la digestión está completa cuando no se observa tejido sólido en la solución.
- Luego del proceso de digestión si se observa algún material particulado, centrifugar el lisado a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente, cuidadosamente transferir el sobrenadante a un tubo eppendorff.

- Agregar 20 µL de ARNasa A al lisado, mezclar rápidamente en vórtex durante 2 segundos e incubar al tubo por 2 minutos a temperatura ambiente.

Unión de ADN a la columna

- Agregar 200 µL del PureLink® buffer de lisis/unión y mezclar en vórtex por 2 segundos.
- Agregar 200 µL de etanol absoluto al lisado, y mezclar en vórtex por 5 segundos.
- Quitar la columna de extracción del tubo colector y agregar la mezcla anterior a la columna (esta tiene un volumen aproximado de 640 µL).
- Colocar la columna en el mismo tubo colector y centrifugar a 10,000 g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el tubo colector y colocar la columna en un nuevo tubo colector.

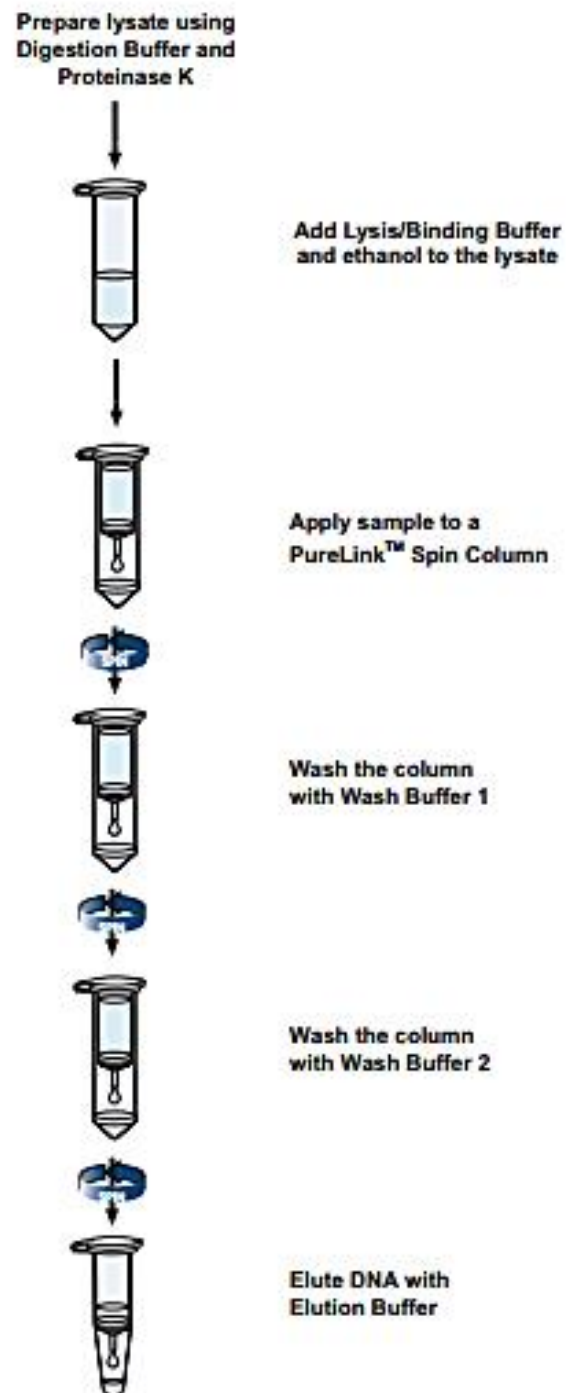
Lavado del ADN

- Agregar 500 µL de buffer de lavado 1 a la columna.
- Centrifugar la columna a 10,000 g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el tubo colector y colocar en un nuevo tubo colector.
- Agregar 500 µL de buffer de lavado 2 a la columna.
- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente, descargar el tubo colector.

Elución del ADN

- Colocar la columna en un tubo eppendorff de 1.5 mL.
- Agregar 100 µL de PureLink buffer de elución a la columna.
- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto, centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
- La solución contenida en el tubo corresponde a ADN purificado.
- Llevar a cabo una segunda elución usando nuevamente 100 µL de PureLink buffer de elución en un nuevo tubo eppendorff estéril.
- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1.5 minutos a temperatura ambiente.
- Guardar el ADN purificado a -20°C si no se utilizare en un periodo corto de tiempo.

Figura No. 4: Diagrama del proceso de extracción de ADN con PureLink Genomic DNA MiniKit



Fuente: Life Technologies Corporation, 2012

7.4.3 Determinación de la cantidad de ADN extraído de la colonia Wistar Kyoto mediante espectrofotometría.

- Diluir 20 μL de ADN purificado en 980 μL de Tris-HCl 10 mM pH 8.0.
- Realizar medidas de absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nm, en espectrofotómetro UV-VIS, utilizando microceldas con un camino óptico de 1 cm.
- Utilizar como blanco Tris-HCl pH 8.0.
- Calcular la relación A260/A280 un valor mayor a 1.6 garantiza una desprotección aceptable de la muestra.
- Calcular la concentración de ADN ($\mu\text{g}/\text{ml}$) mediante la fórmula:

$$[\text{ADN } \mu\text{g}/\text{ml}] = A_{260} \times 50 \times \text{dilución de la muestra}$$

(Donde el número 50 representa una constante relacionada con una solución de ADN doble hélice, cuya concentración es de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con $A_{260} = 1$).

7.4.4 Determinación de la integridad del ADN extraído de la colonia Wistar Kyoto

- Preparar 50 ml de gel de agarosa al 0.9% (p/v), empleando como disolvente y para la corrida electroforética buffer TBE 1X, haciendo uso de la cámara de electroforesis Owl Easycast B1.
- Tomar 6 μL de muestra de ADN purificado y mezclar con 2 μL de RediLoad[®] (buffer de carga) y sembrar en cada uno de los pozos.
- Sembrar 7 μL de escalera de 1 Kb (Promega).
- Realizar la electroforesis a 90 Voltios durante 80 minutos.
- Retirar el gel de agarosa cuidadosamente y revelar mediante inmersión con 100 mL de GelRed [®]3X, almacenar en lugar con poca iluminación por 30 minutos.
- Visualizar bandas en Transiluminador Benchtop UV a 254 nm.
- Llevar a cabo el registro fotográfico mediante el sistema de imagen UVP PhotoDoct-It.

7.4.5 Reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de los microsatélites D1Mgh6 y D17Mit3

La selección de los marcadores microsatélites: D1Mgh6 y D17Mit3, se llevó a cabo en base al estudio llevado a cabo por Deschepper y colaboradores en el año 1997, en donde se evaluaron 432 microsatélites en ratas Wistar Kyoto y otras cepas relacionadas, en los cuales los microsatélites

D1Mgh6 y D17Mit3, entre otros mostraron un polimorfismo elevado y lograron su amplificación. Los microsatélites fueron sintetizados por la empresa Integrated DNA Technologies.

Tabla No.1 Características de los oligonucleótidos iniciadores para la evaluación genética de las ratas Wistar Kyoto

Nombre del microsatélite	Secuencia	Tamaño estimado
D1Mgh6	Forward 5'-TGCATGCCACAGTACACAT- 3' Reverse 5'-CCAAGCACACTAATGCCTGA- 3'	145 pares de bases
D17Mit3	Forward 5'-TAAGGTCCCTCCAGACTCCA- 3' Reverse 5'-TGGGCAGAGAACAGCAGTC- 3'	201 pares de bases

Fuente: banco genómico de la rata

7.4.6 Preparación de la mezcla para PCR

Llevar a cabo la preparación de la mezcla para PCR midiendo las siguientes cantidades de reactivos:

Tabla No.2 Cantidad y concentración de reactivos en la mezcla de PCR para amplificación de microsatélites.

Reactivo	Cantidad por tubo	Concentración
Platinum PCR SuperMix (Promega): <ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpo anti-Taq ADN polimerasa unido a Taq ADN polimerasa recombinante • Tris-HCl pH 8.4 • Cloruro de magnesio • dNTPs 	43 µl	1U Taq ADN polimerasa 22 mM Tris-HCl 1.65 mM MgCl ₂ 220 µM dNTPs
Oligonucleótidos Iniciadores (10 µM) Forward	0.5 µl	0.1 µM
Reverse	0.5 µl	
<i>RediLoad</i> 10x	5 µl	1 x
ADN purificado	1 µl	0.1 µg

Fuente: modificado de Rodríguez, 2008.

7.4.7 Ciclos de incubación para la mezcla según Rodríguez, 2008

- Llevar a cabo la programación de los ciclos de incubación en Termociclador 2720 Applied biosystems®, los ciclos de desnaturalización, elongación y extensión final se mantienen constantes entre los dos oligonucleótidos iniciadores, las variaciones corresponden únicamente a la temperatura de alineación.

1 ciclo/ desnaturalización

95 °C por 4 minutos

30 ciclos / elongación

94 °C por 45 segundos

51 °C – 52°C por 45 segundos*

72 °C por 30 segundos

1 ciclo / elongación final

72 °C por 4 minutos

*La temperatura de alineación para el D1Mgh6 es de 51°C y la temperatura de alineación para el microsatélite D17Mit3 es de 52°.

7.4.8 Identificación de alelos para los microsatélites evaluados

- Llevar a cabo la preparación de 50 ml de gel de agarosa al 2.5% (p/v), haciendo uso para la preparación y corrida electroforética buffer TBE 1X.
- Tomar 8 µl del producto final del PCR y sembrar directamente en cada uno de los pozos.
- Sembrar 6 µl de escalera de 100 pb (Promega).
- Correr electroforesis a 110 V durante 75 minutos.
- Retirar el gel de agarosa cuidadosamente y revelar mediante inmersión con 100 mL de GelRed ©3X, almacenar en lugar con poca iluminación por 30 minutos.
- Visualizar bandas en Transiluminador Benchtop UV a 254 nm.
- Llevar a cabo el registro fotográfico mediante el sistema de imagen UVP PhotoDoct-It.
- Analizar la longitud de los productos amplificados mediante la comparación con la escalera de 100 pb.

7.5 Análisis estadístico

Debido a que la cepa Wistar-Kyoto es una cepa homocigota, se determinará únicamente el número de alelos en cada gel de PCR para los microsatélites, para confirmar su homocigosidad e isogenicidad, la cual debe ser de un 99%.

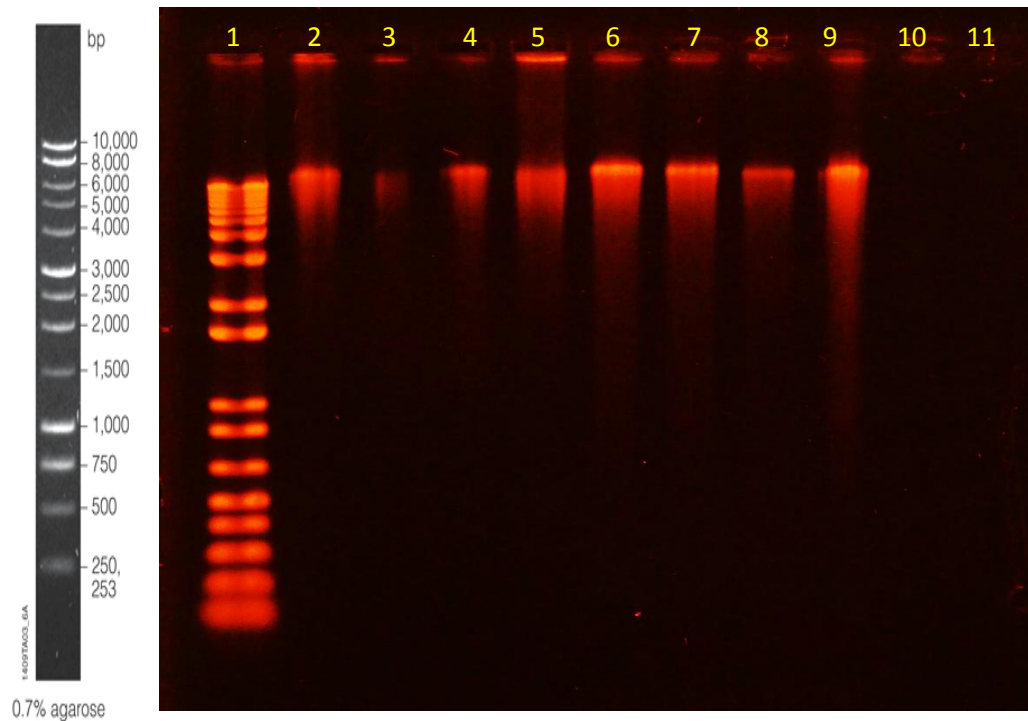
8. RESULTADOS

Tabla No. 3. Determinación de cantidad y pureza de ADN extraído de la colonia de ratas Wistar Kyoto mediante espectrofotometría UV-vis.

No.	Muestra	ABS λ 260 nm	ABS λ 280 nm	Relación 260/280	cantidad ADN extraído μ g
1	RH1 ♀	0.023	0.009	2.56	11.5
2	RH2 ♀	0.011	0.008	1.38	5.50
3	RH3 ♂	0.032	0.010	3.20	16.0
4	RR1♀	0.037	0.014	2.64	18.5
5	RF1 ♀	0.025	0.020	1.25	12.5
6	RF2 ♀	0.026	0.015	1.73	13.0
7	RS1 ♂	0.026	0.014	1.86	13.0
8	RS2 ♂	0.022	0.009	2.44	11.0

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Análisis Aplicado Edificio T-11, USAC.

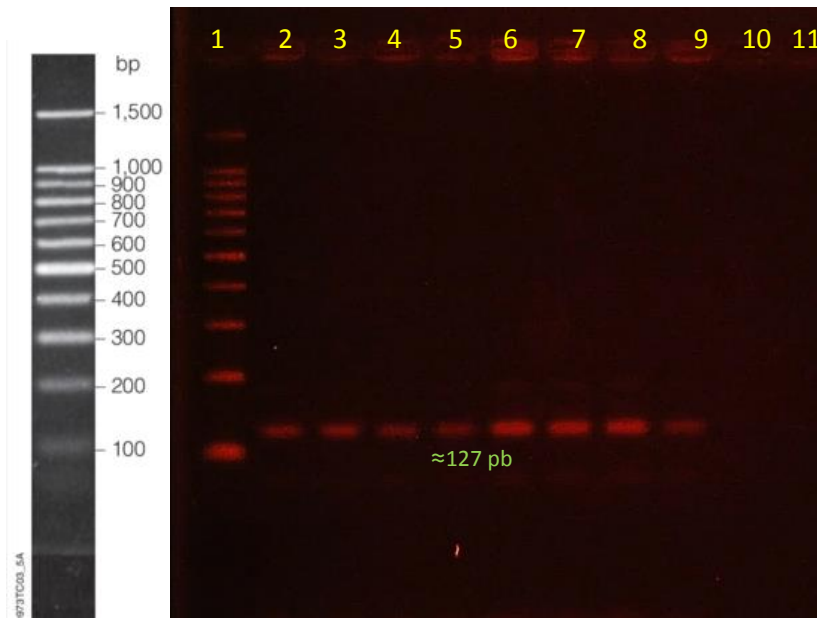
Figura No.5 Resultados electroforesis: Integridad del ADN extraído de la colonia de ratas Wistar Kyoto



Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Farmacogenómica y Farmacogenética, USAC.

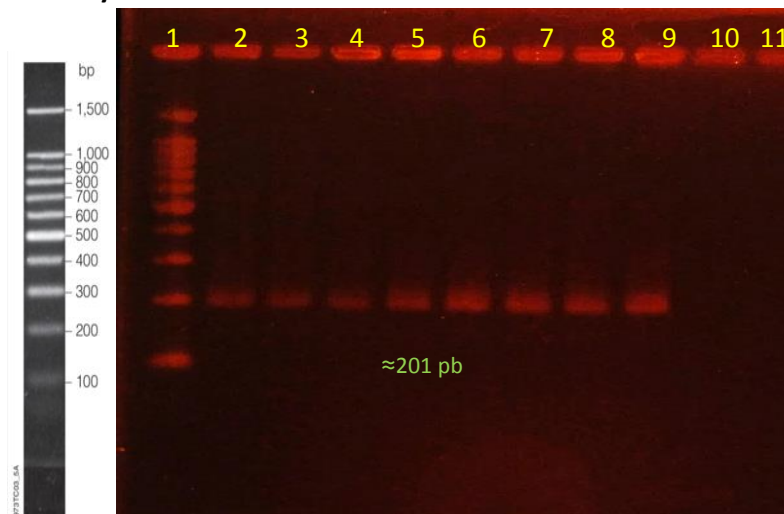
Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0.9 % a 90 v por 75 minutos, pozo 1: escalera 1kb, pozo 2-9 muestras de ADN ratas Wistar Kyoto, pozo 10: control negativo (sin ADN) y pozo 11: vacío.

Figura No.6 Electroforesis de productos de amplificación del Microsatélite D1Mgh6 de la colonia de ratas Wistar Kyoto.



Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Farmacogenómica y Farmacogenética, USAC. Productos de amplificación observados en gel de agarosa al 0.9 % a 110 v por 75 minutos, pozo 1: escalera 100pb, pozo 2 -9 productos de amplificación microsatélite D1Mgh6 de ratas Wistar Kyoto, pozo 10: control negativo (sin ADN), pozo 11: vacío.

Figura No.7 Electroforesis de productos de amplificación del Microsatélite D17Mit3 de la colonia de ratas Wistar Kyoto.



Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Farmacogenómica y Farmacogenética, USAC. Productos de amplificación observados en gel de agarosa al 0.9 % a 110 v por 75 minutos, pozo 1: escalera 100pb, pozo 2 -9 productos de amplificación microsatélite D17Mit3 de ratas Wistar Kyoto, pozo 10: control negativo (sin ADN), pozo 11: vacío.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el trabajo con animales de laboratorio es necesario garantizar la calidad de estos, con la finalidad de asegurar la validez y reproducibilidad de los resultados obtenidos. En el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez” se han llevado a cabo estudios de experimentación por muchos años utilizando principalmente ratas Wistar Kyoto (WKY) en ensayos de determinación de efecto farmacológico de plantas autóctonas y ensayos toxicológicos. Sin embargo nunca, se han llevado a cabo estudios acerca de la caracterización genética o controles de calidad para asegurar que la cepa de ratas Wistar Kyoto del bioterio es una colonia de animales homocigotos, como es denominada por los laboratorios internacionales en los cuales se producen.

Para llevar a cabo la evaluación genética de las ratas WKY se hizo la determinación de polimorfismos de secuencia simple repetida (microsatélites), las cuales son regiones de ADN que contienen di, tri, o tetra nucleótidos repetidos que son encontrados al azar en el genoma, llevando a cabo este análisis mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este es uno de los métodos mejor recomendados como control de calidad genética, debido a su capacidad para generar una huella genética personal o perfil genético, además que presenta variaciones características entre diferentes poblaciones y especies (Brida & Riley, 2008).

Obtener ADN de buena calidad es necesario para llevar a cabo la técnica planteada, por lo cual fue necesario determinar las características del ADN extraído, como se observa en la Tabla No. 3 se presentan los resultados obtenidos de la extracción de ADN haciendo uso del PureLink® Genomic DNA Mini Kit, mediante la medición por espectrofotometría UV-vis; la cantidad de ADN extraído se encontró en el rango de 5.5 – 18.5 µg, las variaciones con respecto a la cantidad de ADN se deben principalmente a la cantidad de muestra de oreja tomada, puesto que es necesaria la rápida manipulación de la muestra para evitar la contaminación, por lo que no se pudo determinar con exactitud la medida de 2 x 2 mm siendo mayor o menor en algunas muestras (Ver figura No. 8 en anexos), además se debe tomar en consideración la edad de las ratas y sus variaciones anatómicas interindividuales siendo unas muestras de oreja más delgadas y otras más gruesas. La cantidad de ADN extraído en todas las muestras fue óptimo y permitió llevar a cabo la técnica de PCR, ya que se requiere de 10 a 200 ng de ADN para llevar a cabo una amplificación por PCR (Benavides & Guénet, 2003).

La cantidad de ADN extraído no es el único parámetro que se debe tomar en cuenta para determinar la calidad del ADN, por lo cual se llevó a cabo el cálculo del cociente A260/A280, esta metodología se basa en que el ADN absorbe a una longitud de 260 nm y las proteínas a una longitud de onda de 280 nm (Sambrook y col, 2001), una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, valores menores indican la presencia de proteínas. Como se observa en la tabla 1, la mayoría de muestras tienen valores mayores a 1.8, a excepción de la muestra 2, 5 y 6 que tienen valores menores, esto significa que las muestras no están totalmente libres de proteínas que pueden interferir e impedir la amplificación, sin embargo en el estudio llevado a cabo por Rodríguez en el año 2008 en el monitoreo genético de ratas Sprague-Dawley utilizó muestras de ADN con valores menores a 1.8 y no tuvo ningún problema en la amplificación de los microsatélites, de igual forma en este estudio las muestras con valores bajos del cociente A260/A280 lograron la amplificación por PCR. La presencia de proteínas en estas muestras pueden deberse a variaciones durante el proceso de purificación del ADN, ya que si de alguna forma en la columna no se ejerció la suficiente presión mediante la centrifugadora durante el lavado de ADN su pudieron quedar atrapadas en la matriz (figura No. 9 en anexos) algunas proteínas que luego eluyeron con el ADN en procesos posteriores.

Además de los procedimientos llevados a cabo por espectrofotometría también se determinó la integridad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9%, el resultado de esta prueba se observa en la figura No.5, todas las muestras analizadas tienen ADN observándose una banda arriba de 10, 000 pares de bases la cual corresponde al ADN completo de la rata, con esta prueba se pueden corroborar los datos obtenidos en la espectrofotometría ya que en el pozo 3 se observa muy poca intensidad, esto es debido a que la cantidad de ADN de la muestra es la menor con 5.5 µg; idealmente en una muestra de ADN íntegra se debería observar una banda estrecha cercana al pozo, como se observa en los pozos 2, 3, 4, 5 y 8; sin embargo en los pozos 6, 7 y 9 el ADN muestra una cola, lo que corresponde a cierto grado de fragmentación de ADN, este resultado no altera los datos obtenidos en la investigación debido que la fragmentación es mínima y la principal desventaja de tener ADN fragmentado es cuando se necesita llevar a cabo la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular (Romero, Díaz, Rendón y Rocha, 2014), ya que los microsatélites a amplificar tiene un tamaño de 100- 200 pb, esto no representa ningún problema.

La fragmentación del ADN en estas muestras puede deberse a varios factores, el más importante podría ser la edad de los animales ya que a mayor edad más daño oxidativo por radicales libres (Rodríguez y Céspedes, 1999), puesto que estas muestras corresponden a las ratas identificadas como RF1, RF2 y RS2 los cuales representan a las hembras reproductoras y machos sementales de mayor edad.

La optimización de las condiciones para llevar a cabo la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR es un proceso importante para garantizar los resultados obtenidos, abarcando este proceso dos variables principales: la concentración de los reactivos y los ciclos de incubación. Para la optimización de la concentración de los diferentes reactivos a utilizar en la solución de amplificación, únicamente se optimizó la cantidad de los oligonucleótidos iniciadores y la cantidad de ADN purificado a utilizar, debido a que la concentración de los demás reactivos (cloruro de magnesio, dNTP's, Taq Polimerasa y buffer) esta estandarizada al hacer uso del Platinum© PCR SuperMix, cuya concentración final de estos reactivos concuerda con la concentración utilizada por De Jesús y col. en el año 2011; con respecto a la concentración de los oligonucleótidos iniciadores se utilizó al inicio una concentración final de 0.2 μM , sin embargo al hacer la amplificación del microsatélite D1Mgh6 se observó que quedaron muchas primers sin hibridación como se observa en la figura No. 10 de anexos, por lo cual la concentración se disminuyó a 0.1 μM y fue una concentración con la que se logró una amplificación adecuada sin la formación de subproductos. En cuanto a la concentración del ADN se utilizaron 100 ng, esta concentración es la utilizada en el estudio llevado a cabo por Tomoji M., Voigt B. y colaboradores en el año 2006, también fue la concentración correcta para lograr una amplificación adecuada en esta investigación.

Con respecto a los ciclos de incubación se probaron tres temperaturas de alineación para la optimización de la amplificación del microsatélite D1Mgh6, este parámetro es muy importante en la optimización de las condiciones del PCR, ya que si la temperatura de alineamiento es muy baja, se obtiene un PCR menos específico y si es muy alta, la especificidad será mayor, pero si es demasiado alto no se amplificará ningún producto, pues la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios será poco estable y la polimerasa no podrá iniciar la síntesis (Romero, Díaz, Rendón y Rocha 2014), como se observa en la figura No. 10 de anexos, con una temperatura de 56°C se observa la poca formación de productos y en la figura No. 11 de anexos, donde se utilizó una temperatura de alineación de 50 °C se observa la formación de otros productos de

amplificación no específicos, la temperatura de alineación ideal para el microsatélite D1Mgh6 finalmente fue de 52°C, ya que se observa un buen rendimiento de amplificación y no hay productos inespecíficos y es la que corresponde a los resultados de la figura No. 6. Con respecto al microsatélite D17Mit3 no se tuvo tantos inconvenientes con la modificación de la temperatura de alineación ya que se lograron amplificar productos con diferentes temperaturas sin embargo, se observa la formación de una buena cantidad de producto con una temperatura de 52°C. Los demás parámetros utilizados en el ciclo de incubación fueron los reportados por Rodríguez, 2008.

La elección de los oligonucleótidos iniciadores D1Mgh6 y D17Mit3 se basó en los datos reportados en el Rat Genome Database (<http://rgd.mcg.edu>) estos se encuentran en el cromosoma 1 y 17 de la rata respectivamente (Ver figura No. 12 de anexos), además que muestran un alto grado de polimorfismo y tienen diferentes variaciones en su longitud dependiendo de la cepa de ratas a estudiar y también se han evaluado específicamente en otros estudios en ratas WKY (Serikawa, Kuramoto y Col., 1992) (Deschepper y Col., 1997) (Tomoji, Voight y col., 2006).

Como se observa en la figura No. 6 la electroforesis para el microsatélite D1Mgh6, los productos de amplificación de las 8 ratas de la cepa WKY (pozos 2- 9) muestran una condición monomórfica y homocigota, con un tamaño estimado para el microsatélite de 127 pares de bases al compáralo con la escalera (pozo 1). Según la base de datos genómicos de la rata (Rat Genome Database) las variaciones reportadas para el microsatélite en diferentes cepas de ratas son: 127, 129, 137, 141 y 145 pares de bases, debido a que la cepa que se está evaluando corresponde a ratas Wistar Kyoto el tamaño del microsatélite debe de ser de 145 pares de bases, por lo cual la cepa de ratas Wistar Kyoto del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez” no corresponde al tamaño específico del microsatélite para la cepa.

De igual forma al compararlo con estudio llevado a cabo por Deschepper y colaboradores en el año 1997, en el cual se reportan las variaciones que pueden existir en las ratas Wistar Kyoto obtenidas de dos proveedores (Charles River e Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos), el microsatélite D1Mgh6 debe corresponder a un tamaño de 145 pares de bases para una condición homocigota para las ratas WKY de los NIH y una condición heterocigota con un tamaño de 145 y 147 pares de base para las ratas WKY del proveedor Charles River. También en el estudio de (Tomoji, Voight y col., 2006) se determinó que existe una gran variabilidad genética con respecto a los

microsatélites de las cepas de ratas WKY obtenidas de diferentes laboratorios de producción de animales de laboratorio.

La variación en la longitud del microsatélite con respecto a la esperada puede deberse a mutaciones por deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN (Romero, Rendón y col., 2014) en la primera pareja o en las primeras generaciones de ratas WKY del bioterio, causando de esta manera una disminución en el número de pares de bases de 145 a 127.

En la figura No. 7 se observan los productos de amplificación del microsatélite D17Mit3, presentando una condición monomórfica y homocigota para las muestras de rata WKY que corresponde a los pozos 2-9, las variaciones reportadas para este microsatélite según el Rat Genome Database son: 187, 191, 193, 195, 199, 201, 211 y 213 pb, los productos del microsatélite como se observan en la figura tienen un tamaño aproximado de 201 pb al compararlo con la escalera (pozo 1), además el tamaño de 201 pb corresponde al reportado para la cepa de ratas WKY. Al compararlo con el estudio de (Deschepper y col, 1999) las variaciones para el microsatélite D17Mit3 corresponden a 201 pb para las ratas WKY de NIH y a 201 y 205 pb representando una condición heterocigota para las ratas WKY de los laboratorios Charles River; por lo cual las ratas WKY de bioterio sí cumplen con este parámetro de calidad genética para la cepa.

El resultado obtenido con el microsatélite D1Mgh6 no significa que la cepa WKY del bioterio ya no se pueda utilizar en estudios de experimentación, ya que en la investigación llevada a cabo por (Moreno, 2008) en el que se estudió la condición genética de la cepa de ratones C57B1/6 se evidenció que los microsatélites mostraron variabilidad con respecto al tamaño estimado, con el teórico esperado para la cepa. De igual manera con el estudio llevado a cabo por Rodríguez en el año 2008 donde se llevó a cabo el monitoreo genético y fenotípico en ratas no consanguíneas Sprague-Dawley donde se determinó que la cepa no ha conservado la variabilidad que caracteriza a estos roedores y algunos microsatélites no cumplieron con el tamaño estimado para la cepa. En ambas investigaciones se evaluaron un promedio de 8 microsatélites, por lo cual deberían de evaluarse más microsatélites para tener un panorama general de la cepa y su variación con respecto a lo reportado por las bases de datos. Además, se debe considerar que la cepa WKY ha variado con respecto a sus características genéticas debido al manejo de la colonia desde su origen (Howes &

Louis, 1990) y que los estudios actuales demuestran que existe variabilidad en los microsatélites de la rata WKY de diferentes laboratorios productores (Tomoji, Voight y col, 2006).

Finalmente, en la figura No. 13 de anexos se observa un diagrama con el manejo reproductivo recomendado para las ratas WKY mediante el sistema de líneas paralelas. A pesar que como se mencionó anteriormente las ratas WKY tienen una condición homocigota para los microsatélites evaluados, no se cuenta con ningún sistema establecido en el manejo reproductivo de la colonia, por lo que se plantea el sistema mencionado anteriormente, este se basa en el manejo de tres líneas en paralelo, usando entre 5 y 10 parejas por línea. Luego de cuatro generaciones, se seleccionan un macho y una hembra (hermanos), los cuales serán la pareja ancestral de las próximas cuatro generaciones (Benavides y Guénet, 2003; Festing, 1979). En el diagrama de la figura No. 12, el círculo de color azul que corresponde a la F?1 (se utiliza el símbolo “?” debido a que no se conoce cuál es la generación actual de las ratas WKY y se denominarán a las generaciones partiendo desde el supuesto que la generación actual es la número uno), representa a la pareja ancestral que dio origen a las ratas WKY evaluados en este estudio, se recomienda formar las parejas señaladas en la F?2 según se observa en los círculos verdes, morado y anaranjado. A partir de estas 3 líneas se deben seleccionar 5 parejas reproductoras para que se utilicen como núcleo de expansión, de donde los hijos de estas parejas puedan ser utilizados para la experimentación. Además de que se escogerá una pareja de la misma camada para formar la F?4 y luego de esta se tomará una pareja para formar la F?5, de donde finalmente se sacará un pareja que será el ancestro para formar un nuevo núcleo de fundación.

10. CONCLUSIONES

- Las ratas Wistar Kyoto de bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez” cumplen con el tamaño estimado para el microsatélite D17Mit3 (201 pb) según la base de datos genómicos de la rata y con lo reportado para la cepa de ratas Wistar Kyoto de los laboratorios Charles River y los NIH.
- Las ratas Wistar Kyoto de bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez” no cumple con el tamaño estimado para el microsatélite D1Mgh6 (147 pb) según la base de datos genómicos de la rata y con lo reportado para la cepa de ratas Wistar Kyoto de los laboratorios Charles River y los NIH.
- Las ratas Wistar Kyoto de bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez” tienen una condición homocigota y homoalélica para los microsatélites D17Mit3 y D1Mg6, lo que refiere un manejo consanguíneo correcto de la colonia.
- El método de extracción de ADN a partir de tejido de oreja fue efectivo obteniendo ADN en el rango de 5.50 a 18.5 µg, con variaciones entre muestras con respecto a la calidad e integridad.
- Las ratas Wistar Kyoto del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez”, pueden utilizarse en estudios de experimentación donde no sea necesario tener un modelo poblacional, debido que la cepa tiene una condición homocigota.

11. RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo el control genético de forma periódica por lo menos 2 veces al año, para asegurar que se ha mantenido la condición de homocigosis en la cepa.
- Llevar a cabo la determinación de la condición genética de las ratas Wistar Kyoto para 8 microsatélites más entre los que se recomiendan: D1Mgh5, D2Mit15, D3Mgh8, D1Mit3, D10Mit4, D4Mgh1, D5Rat41 y D9Mit3 para tener un perfil genético más amplio y que pueda compararse de una mejor manera con los estándares internacionales.
- Adquirir diferentes cepas de ratas ya que en la mayoría de estudios de experimentación y laboratorios productores de animales mencionan que la raza Wistar Kyoto se utiliza únicamente como grupo control en estudios de hipertensión con la cepa de ratas espontáneamente hipertensas (SHR).
- Utilizar adecuadamente el mapa de reproducción planteado, por parte del personal técnico del bioterio, llevando un registro del mismo.
- Realizar un estudio similar para determinar la calidad genética de la especie *Mus musculus*, con la cual también se cuenta en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Dra. Amarillis Saravia Gómez”.

12. REFERENCIAS

Aoki K. & Okamoto K. (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal* Vol. 27.

Ariza M. (2012) Diversidad Genética de la Población de *Arbiteus jamaicensis* en el Biotopo protegido San Miguel la Palotada, San José, Peten. Informe final de Investigación. Subprograma de EDC-Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

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

Benavides F. y Guénet J.L. (2003) *Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá. Madrid.

Boada M., Colom A. & Castelló N. (2011) *La experimentación animal*, recuperado de: ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2011/80084/la_experimentacion_animal.pdf. Consultado el 15 de agosto de 2015.

Brida E. & Riley L. (2008) Multiplex Microsatellite Markers Panels for Genetic Monitoring of Common Rat Strains. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. Pg 36-41.

Brobowska B., Skrajnowska y Tokarz A. (2011) Effect of Cu supplementation on genomic instability in chemically-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Journal of Biomedical Science*. 18:95.

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

Cardozo C., Osorio A., Constanza M. et al. (2007) *El animal como sujeto experimental aspectos técnicos y éticos*. (Primera Edición) Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética. Universidad de Chile.

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

De Jesús R., Martínez N. et al. (2005) Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de ratones consanguíneos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Científica Universidad de Zulia*, vol. XV núm. pp. 134-140.

De Jesús R., Rodríguez N., Torres W., et al. (2011) Uso de marcadores moleculares microsatélites para determinar la condición de homocigosis y heterocigosis en roedores producidos en el bioterio de la Universidad de los Andes, Venezuela. *Revista Avances en investigación*. 15(2): 45 -63.

Deschepper C., Gary P., Hendley E., & Reudelhuber (1997). Genetic Characterization of Novel Strains of Rats Derived from Crosses Between Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats, and Comparisons with Their Parental Strains. *Journal of Laboratory Animal Science*. Vol 47, No 6 pp. 638-646.

Fahey J., Katoh H., Malcom R & Perez A. (2012) The case for genetic monitoring of mice and rats use in biomedical research. *Mamm Genome* 24:89-94.

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

Festing M., (1979) Inbred strains in biomedical research. Macmillan Press, London: Oxford University Press, New York.

Fox G., Anderson L., Glen O., et al. (2015) *Laboratory Animal Medicine, USA: Animal Medicine Series*, Elsevier.

Griffiths A., Gelbart W., Miller J. and Lewontin RC (1999) Ed. *Modern Genetic Analysis*. WH. FEEMAN AND COMPANY. New York. 570.

Howes G. & Louis J. (1990) Genealogy of the spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat strains: Implications for studies of inherited hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 16(Suppl. 7): S1 –S5

Life Technologies Corporation (2012) PureLink Genomic DNA Kits: For purification of genomic DNA, Doc. Part Number 25-1012, Publication Number MAN0000601.

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

Mai S. (2012), Importancia del control genético de animales de laboratorio, Comisión Honoraria de Experimentación Animal, recuperado de: www.urbe.fmed.edu.uy/cursos/animales_experimentación/Genetica.pdf consultado el 03 de mayo de 2015.

Martínez C., Osorio M., Rodríguez E. & Lolas F. (2007) *El animal como sujeto experimental: Aspectos Técnicos y Éticos*. (1ra Edición) Centro interdisciplinario de estudios en Bioética, Universidad de Chile.

Matsumoto K. (2010) Information for rat SSLP, RT1, Polymorphisms of Biochemical markers, Kyoto Sangyo University, recuperado de: http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~koko/rat/rat_info_e.html, consultado el 09 de junio de 2016.

Mazariegos J. (2013) Evaluación de la diversidad genética de *Thalassia testudinum* Banks ex König, en poblaciones marino-costeras del Atlántico guatemalteco. Informe final de Investigación. Subprograma de EDC-Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

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

Moreno Y. (2008) Estudio de la condición genética y fisiológica de la cepa C57Bl/6 //BIOU producida en el Bioterio de la Universidad de los Andes. Trabajo de grado para obtener la licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Venezuela.

Nomura T., Esaki, K and Tomita T. (1985) *Manual for Genetic monitoring in inbred mice*. ICLAS. University of Tokio Press. 114.

Ochiai Y, Tamura Y, Saito Y, Matsuki A, Wakabayashi Y, Aizawa Y, Niwa O, Kominami R. (2003). Mapping of genetic modifiers of thymic lymphoma development in p53-knockout mice. *Oncogene* 20; 22 (7): 1098-102.

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

Romero A., Díaz A., Rendón B. y Rocha M. (2014) Herramienta moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México

Rodríguez K. y Céspedes E. (1999) Estrés oxidativo y Envejecimiento. *Rev. Cubana de investigación Biomédica*. 18 (2): 62 -76.

Rodríguez N. (2008) Monitoreo genético y fenotípico en ratas no consanguíneas Sprague-Dawley producidas en el Bioterio de la Universidad de los Andes. Trabajo de grado para obtener la licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Venezuela.

Samayoa K., Mérida J., Monterroso L. (2009) Caracterización preliminar con microsatélites de la colección Guatemalteca de frijol común trepador. *Revista Agronomía Mesoamericana* 20 (2) 245 - 254.

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

Serikawa T., Kuramoto T., et al. (1992) Rat Gene Mapping Using PCR-Analyze Microsatellites. *Genetics* 131: 701-721.

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

Suckow M., Weisbroth S. & Franklin C. (2006). *The Laboratory Rat*. American Colleague of Laboratory, *Animal Medicine Series*, USA Elsevier.

Tomoji M., Voight B., Tsurumi T., Naoi K., Nakanishi S., Yamasaki K., Kuramoto T. y Serikawa T. (2006) A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSP) markers and genetically defined rat strains. *BMC Genetics* 7:19.

Wang Z. & Storm R. (2006) Extraction of DNA from mouse tails. *Bio Techniques*, Vol 41, No. 4, pp 410 -412.

Watanabe T., Bihoreau T., McCarthy L. (1999) A radiation hybrid map of the rat genome containing 5,255 markers. *Nature America Inc.* Vol 22, 25-36

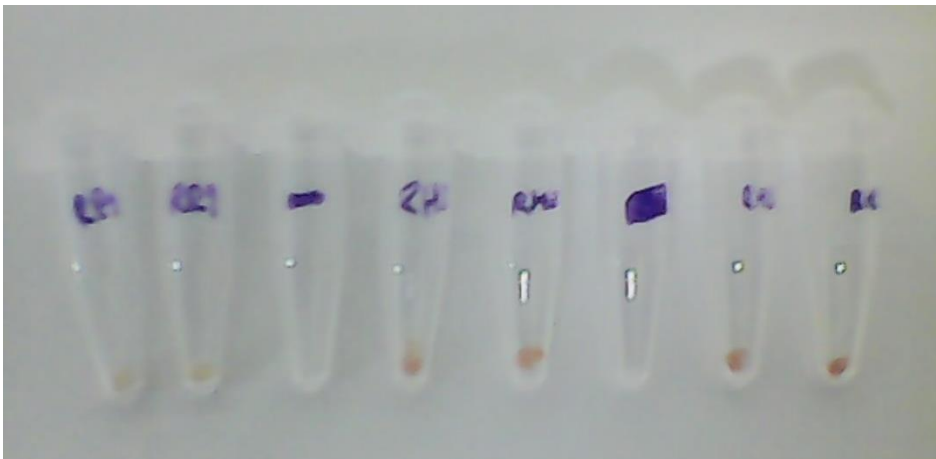
Yanli Z., Middleton F. & Faraone S. (2013) Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrain from different sources. *Physiol Genomics* 45: 528-538.

Zuñiga J., Tur M., Milocco S., Piñeiro R. (2000) *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación Animal*. Mc Gaw Hill Interamericana: Madrid.

13. ANEXOS

Figura No. 8 Muestras de tejido para extracción de ADN

Tubos eppendorff con muestras de tejido de oreja para digestión, con diferentes tamaños de muestra.



Fuente: fotografía tomada en el Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia "Dra. Amarilis Saravia Gómez".

Figura No. 9 Proceso de extracción y purificación de ADN

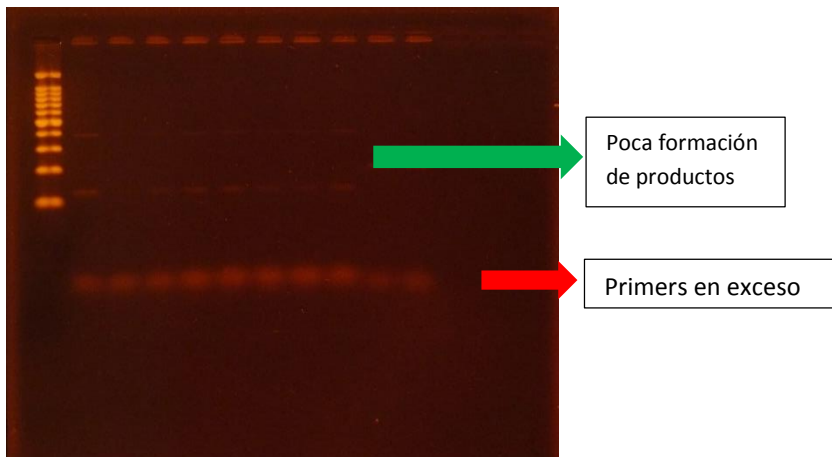
Proceso de purificación de ADN haciendo uso del Genomic DNA MiniKit, en la figura de la derecha se observa cómo se va purificando la solución y en la figura de la izquierda los distintos tubos usados en la purificación.



Fuente: fotografía tomada en el Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia "Dra. Amarilis Saravia Gómez".

Figura No. 10 Electroforesis microsatélite D1Mgh6 con poca formación de productos

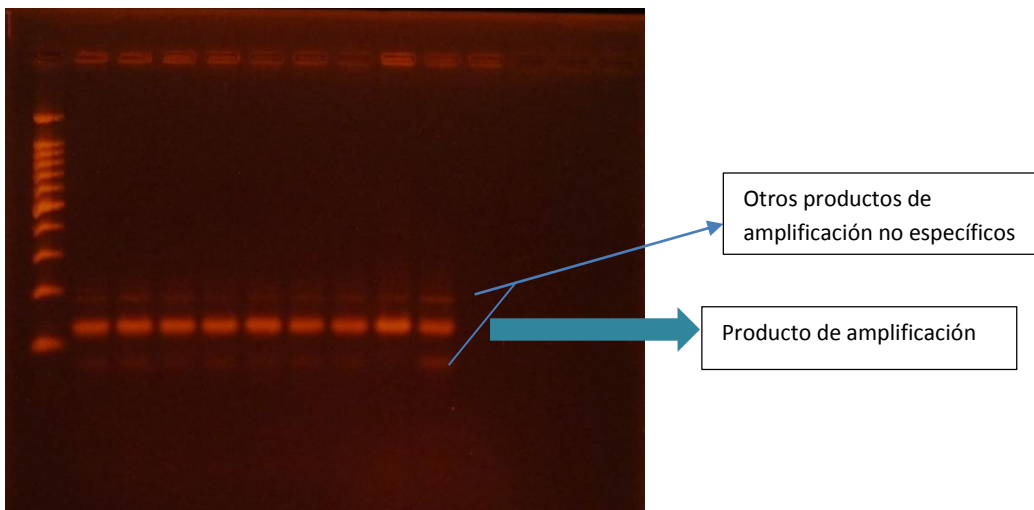
Electroforesis en gel de agarosa a 2.5% para los productos de amplificación de Microsatélite D1Mgh6, donde se observa la poca formación de productos y una gran cantidad de primers.



Fuente: fotografía tomada en el Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia "Dra. Amarilis Saravia Gómez".

Figura No. 11 Electroforesis microsatélite D1Mgh6 con formación de productos inespecíficos

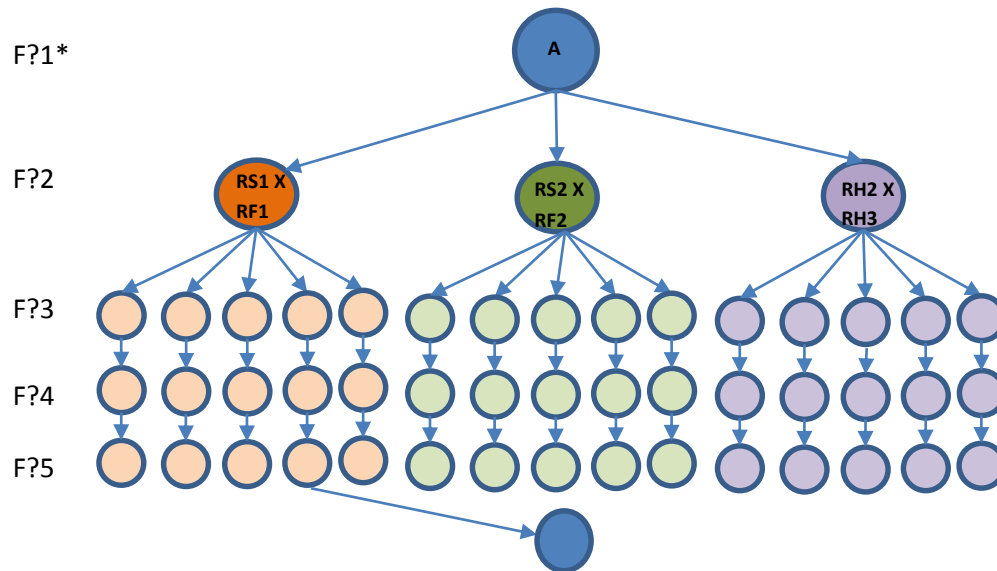
Electroforesis en gel de agarosa a 2.5% para los productos de amplificación de Microsatélite D1Mgh6, donde se observa la formación de otros productos de amplificación debido a la poca especificidad de la temperatura de alineación.



Fuente: fotografía tomada en el Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia "Dra. Amarilis Saravia Gómez".

Figura No. 13 Diagrama de manejo reproductivo recomendando para la cepa Wistar Kyoto

Diagrama del manejo reproductivo de una colonia consanguínea, mediante el sistema de líneas paralelas



Fuente: Benavides y Guénet, 2003.

A: Ancestro común, RS1: Rata semental 1, RF1: Rata femenina 1, RS2: Rata semental 2, RF2: Rata femenina 2, RH2: Rata hija 2, RH3: Rata hijo 3

*Se utilizó el símbolo "?" debido a que no se conoce cuál es la generación actual de las ratas WKY y se denominarán a las generaciones empezando desde 1.




Rudy Alfonso Marín Rosales

Tesista



Lcda. Dulce Geroveva Saldaña Santiago

Asesora



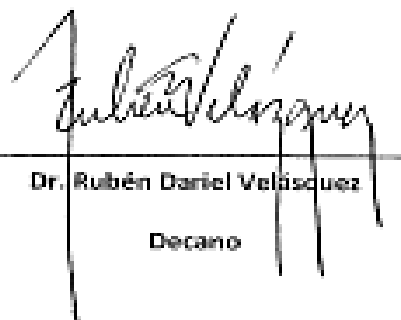
Lcda Irma Lúcia Arriaga Tórtola

Revisora



Lcda. Hada Marieta Alvarado Beteta

Directora de Escuela



Dr. Rubén Daniel Velásquez

Decano