

1
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CONTROL DE CALIDAD GENETICA EN RATONES
SINGENICOS Y CONGENICOS POR UN METODO
MORFOMETRICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MARIA ISABEL ACOSTA ARELLANO

ASESORES: M.V.Z. CIRO LOMELI Y FLORES
LIC. DANIEL ZARABOZO ENRIQUEZ DE RIVERA

MEXICO, D. F.

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODOS	11
Material.....	11
Método Morfométrico.....	13
Análisis estadístico.....	14
RESULTADOS	20
Comprobación	34
DISCUSION	37
CONCLUSIONES	41
LITERATURA CITADA.....	43

RESUMEN.

ACOSTA ARELLANO, MARIA ISABEL. Control de calidad genética en ratones singénicos y congénicos por un método morfométrico (bajo la dirección de: Ciro Lomeli y Flores y Daniel Zarabozo Enríquez de Rivera).

En la investigación científica es de suma importancia la utilización de animales genéticamente definidos, para que los resultados sean reproducibles, deben realizarse controles de calidad genética en forma rutinaria. Por esta razón para certificar la autenticidad de las cepas de ratones en el Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, se realizó un estudio tomando como patrón el método desarrollado por Festing, basado en la utilización de las características morfométricas de la mandíbula derecha de los ratones Mus musculus. Se estudiaron dos grupos de animales; el primero de ellos constituido por tres cepas singénicas y el segundo por descendientes de la cepa BALB/c, siendo estos dos sublíneas singénicas (BALB/cJ y BALB/cAnN) y dos líneas congénicas (BALB/cH-2^b y BALB/cH-2^k). Para el análisis de los datos se utilizó el programa de computación "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS), en una máquina Burroughs, empleando Análisis Discriminante y las Funciones Discriminantes Canónicas. Con el análisis discriminante se

tener un carácter multivariable, para ésto se estableció un vector de 13 medidas. Se empleó el análisis de las variables canónicas para reducir dimensionalmente el problema, con el objeto de poder graficar y observar el grado de parentesco entre cepas y sublíneas. En los animales no relacionados ancestralmente (cepas singénicas con haplotipo independiente) se obtuvo un 100% de clasificación correcta y en los animales relacionados ancestralmente (sublíneas singénicas y líneas congénicas) un 68.04% , entre los grupos estudiados. Los resultados obtenidos demuestran que la técnica aporta datos de gran exactitud en las cepas singénicas de origen diferente. La sensibilidad para diferenciar disminuye en las sublíneas de las cepas singénicas y líneas congénicas descendientes de ancestros comunes. La exactitud de la técnica depende de lo estrecho de la interrelación de parentesco entre cepas, líneas y sublíneas. Por lo tanto el método osteométrico empleado, es útil en la verificación genética de cepas singénicas no interrelacionadas ancestralmente, pero su utilidad para el análisis de las sublíneas y líneas congénicas de una estirpe se reduce, por lo cual se sugiere el empleo de otros grupos de marcadores para estos casos.

INTRODUCCION

Los animales de elección para realizar gran parte de la investigación científica biomédica son las cepas endogámicas de ratón, es decir, el producto de más de 20 generaciones de cruces entre hermanos carnales. La uniformidad genética así obtenida, permite el uso de números menores de animales con una mayor precisión en la medición de los efectos del tratamiento (9).

A principios de este siglo se redescubrieron las leyes mendelianas y las teorías de Darwin, basándose en éstas, Castle en 1901 realizó estudios acerca de la "evolución experimental" trabajando con la herencia del color en ratones. Little en 1909, siguiendo los experimentos de Castle, desarrolló por consanguinidad la primera cepa de ratones homocigotos siendo ésta la DBA, designada así por ser portadora de los alelos de color del pelaje dilute (d), brown (b), non-aguti (a), los que fenotípicamente son grises (17).

Jensen en 1903 fue capaz de trasplantar un carcinoma alveolar espontáneo en una estirpe de ratones que describe como "blancos", éstos probablemente eran consanguíneos.

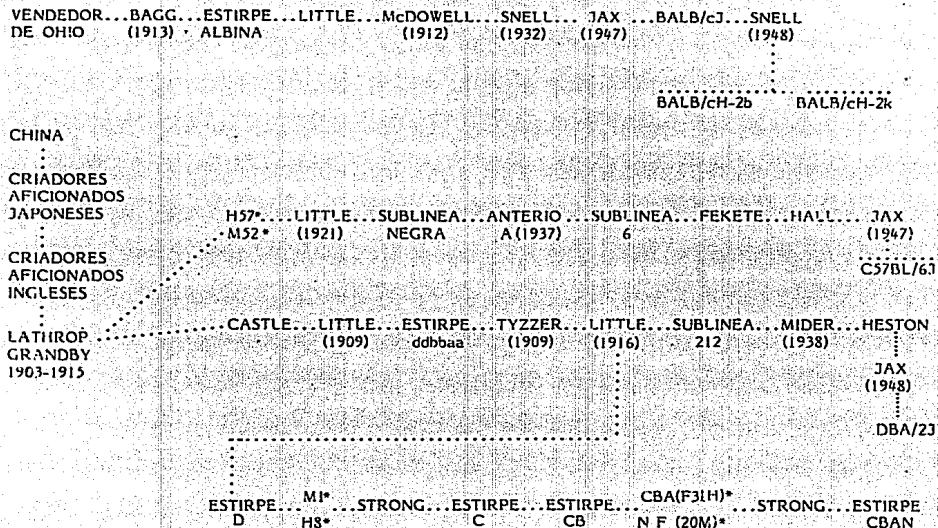
Little en 1906 observó que la herencia juega un papel importante en la incidencia de tumores, de esta forma realizó la crianza de los primeros ratones homocigóticos de los que se tiene conocimiento (17).

En 1908 Loeb fue capaz de trasplantar un tumor espontáneo en ratones Waltzing que se habían mantenido en forma consanguínea en el lejano oriente por razones de índole religiosa. Cuando trasplantaba los tumores a otras colonias éstos no se rechazaban lo que sugirió que se trataba de animales altamente consanguíneos.

Ocho años después Strong en Cold Spring Harbor, contribuyó a la aparición de las cepas CBA, A, C, y C3H entre otras. Simultáneamente, Little obtuvo a los progenitores de las actuales cepas C57BL/6, C57BL/10, C57/BR etc.. Mc Dowell en Cold Spring Harbor desarrolló las C58 y BALB/c en 1922. En la década de los 40 Snell contribuyó con las sublíneas BALB/cH-2^b y BALB/cH-2^k empleando el método de NX o de retrocruzas, Figura 1, (17).

En la actualidad es ampliamente reconocido que la descripción correcta del ratón o de la rata usados en un experimento es esencial si se pretende que éste sea reproducible. Muchos trabajos se interpretan a la luz de la información previa conocida de las características de las cepas utilizadas (9).

FIGURA 1
DESARROLLO DE LAS CEPAS



*(M- macho; H= hembra)
(16, !)

Aun cuando cada cepa tiene un conjunto único de características como longevidad promedio, incidencia de tumores, conducta, eficiencia reproductiva, grupos sanguíneos, etc., morfológicamente las diferentes cepas pueden ser indistinguibles. Varias de las cepas endogámicas albinas ampliamente usadas no pueden diferenciarse fácilmente de las cepas exogámicas albinas más comunes (1,4).

Existe un número de publicaciones que sugieren que las cepas de ratón y rata han sido contaminadas genéticamente. En la mayoría de los casos ésto resultó en pérdida de datos de investigación científica y en resultados irreproducibles (13).

Hoffman, citado por Festing (13), demostró que 21 de 77 muestras de ratones endogámicos provenientes de institutos de investigación y universidades de Japón presentaban alguna evidencia de contaminación genética, ya fuera que hubiese ocurrido en el pasado o recientemente, los ratones eran homocigotos para los alelos contaminantes y heterocigotos en algunos loci. Esto representa un índice de contaminación de más del 20% de las colonias de ratones que se mantienen en muchas instituciones. Varias de estas contaminaciones surgieron como resultado de la transferencia de una estirpe contaminada de una institución a otra.

1

Groen (12), encontró una sola contaminación genética en 53 colonias de ratones endogámicos mantenidas en Holanda.

En un estudio longitudinal de 38 cepas de ratones mantenidas por criadores comerciales en Inglaterra por un lapso de más de cinco años, se identificaron cinco casos confirmados de contaminación; esto representó una contaminación genética por 26 años colonia (10).

Debido a que actualmente se usan en investigación científica más de mil cepas y estirpes designadas (9), debe citarse el nombre de la cepa o estirpe en los artículos que se publican. Cada vez se hace más notorio que aproximadamente del 4 al 20% de todas éstas pueden estar contaminadas genéticamente, incurriéndose en pérdidas financieras considerables, dando como resultado investigaciones no confiables y pérdida de tiempo y esfuerzo de los investigadores.

Si el nombre de la cepa es reportado correctamente, también debe darse evidencia de que la autenticidad de la misma ha sido comprobada (9).

Existen varios métodos de verificación genética como cruza de prueba o marcadores morfológicos, pruebas para homocigosis de todos los loci de histocompatibilidad, por medio de transplante de tejidos, examen osteométrico de

características esqueléticas, métodos bioquímicos y métodos serológicos (3,9,12,14,15).

Los métodos morfométricos examinan algunas características cuantitativas de cada una de las cepas; estas características deben de ser de alta heredabilidad y suficientemente variables entre cepas para dar una buena oportunidad de que dos cepas que son genéticamente diferentes también difieran en el carácter medido, varias características esqueléticas satisfacen estos requerimientos.

Festing (5), desarrolló una técnica basada en las características morfométricas de la mandíbula derecha. Este es un método de identificación de cepas que funciona bien con cepas endogámicas, híbridos F1 y estirpes exogámicas y determina la probabilidad de que una muestra dada de mandíbulas sea igual o diferente a otra muestra. La técnica es rápida, de bajo costo, muy sensible, fácil de efectuar, no requiere mucha experiencia para realizarla y además se emplean los ratones de desecho destinados al sacrificio, porque han concluido su vida reproductiva (4). Esta técnica ha sido reproducida en numerosas ocasiones (10), se emplea rutinariamente como control de calidad genética en algunos laboratorios Vr.g. Laboratorio Charles River en E.U. y en el Laboratory Animal Center en Inglaterra (6,7,15,19,21).

Todos los métodos de verificación genética son complementarios más que alternativos. En el Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, se han realizado en el pasado métodos para comprobar la autenticidad genética como citotoxicidad, cultivo mixto de linfocitos y transplante de tejidos (3). Como un método complementario a estas pruebas se optó por la utilización de la técnica morfométrica de Festing (4,5).

Hipótesis

Las cepas singénicas del primer grupo son diferentes genéticamente por lo tanto tienen un elevado porcentaje de clasificación acertada.

Las cepas singénicas sublíneas y líneas congénicas del segundo grupo descienden de ancestros comunes por lo tanto tienen un porcentaje de clasificación acertada más bajo que las cepas del primer grupo.

Tanto las cepas del primer grupo como las cepas del segundo grupo no se encuentran contaminadas genéticamente.

Objetivos.

Demostrar por el método morfométrico de Festing la diferencia o la identidad genotípica existente entre las

cepas singénicas, sublíneas y líneas congénicas, BALB/cJ, BALB/cAnN, BALB/cH-2^b, BALB/cH-2^k, C57BL/6J, DBA/2J y CBAN, que se mantienen en el Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM.

MATERIAL Y METODOS.

Material.

Para la verificación genética por el método morfométrico, en este trabajo se utilizaron 167 ratones Mus musculus, pertenecientes a dos sublíneas de una cepa singénica y dos líneas congénicas, descendientes de una estirpe común y tres cepas singénicas provenientes de ancestros diferentes, obtenidos de Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, Tabla 1.

TABLA 1

CEPAS SINGENICAS, SUBLINEAS Y LINEAS CONGENICAS EXISTENTES EN
EL IIBM-UNAM.

<u>Cepa Singénica</u>	<u>Sublínea</u>	<u>Línea Congénica</u>
BALB/c ⁽¹⁾	J	
BALB/c ⁽¹⁾	AnN	
BALB/c ⁽²⁾		H-2 ^b
BALB/c ⁽²⁾		H-2 ^k
CS7BL/6 ⁽²⁾	J	
DBA/2 ⁽²⁾	J	
CBA ⁽²⁾	N	

(1) Estirpes con ancestros comunes.

(2) Estirpes con ancestros diferentes.

Para el estudio se reunieron las cepas por el carácter fenotípico color de capa en dos grandes grupos; el 1 al que pertenecen los ratones de capa de color y ancestros diferentes y el 2 que se formó con los individuos de color blanco y con ancestros BALB/c. Esta división también se realizó tomando en cuenta que los animales del grupo 1 se encuentran en una área del bioterio y los del grupo 2 en otra por lo que no hay posibilidad de contaminación entre grupos.

El seguimiento de éstos fue realizado por Lomeli y Acosta durante 7 generaciones, a partir de 1983 en el propio Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM.

Con el fin de eliminar las variaciones debidas al desarrollo y al dimorfismo sexual, sólo se utilizaron machos de 217 días de edad retirados de las colonias fundadoras, (algunos estudios muestran que después de los 50 días a partir del nacimiento, se excluye el error debido al desarrollo, ya que se ha completado el crecimiento óseo) (6).

Los animales permanecieron en pares monogámicos durante toda su vida reproductiva de 21 semanas, alojados en jaulas de policarbonato, tipo caja de zapatos, que ofrece un área de

piso de 395.25 cm² protegidos con filtros de poliéster rígido tipo Kraft, con agua y alimento* ad libitum.

Los cuartos en que se mantuvieron son convencionales, ventilados mediante extracción forzada de aire con 12 cambios del volumen total por hora, la temperatura ambiente se mantuvo entre 18 y 26°C, proporcionándoles doce horas de luz y doce horas de oscuridad.**

Los animales seleccionados fueron sacrificados como lo describe McDonald (16), se les retiró la piel de la cabeza y se decapitaron. La cabeza se colocó previa identificación en un microambiente adecuado para ser descarnada por acción de escarabajos necrófagos del orden Coleóptera, familia Dermestidae, Dermester ater (2).

Método morfométrico.

La técnica de Festing (4), consiste en colocar la rama derecha de cada mandíbula descarnada y limpia sobre una reducción fotográfica a un cuarto de su tamaño, linealmente, de papel milimétrico de 1 mm, a la cual se le pegan dos portaobjetos para formar la abscisa y ordenada de una gráfica. La mandíbula se coloca bajo un microscopio de

* Mouse Purina Chow Diet 5015 Replacen Purina.

** Lemell, C., Comunicación personal.

disección con el objetivo de bajo poder, para tomar una serie de 13 mediciones como se indica en la Figura 2.

Las mediciones del 1 al 7 son dorsoventrales y las del 8 al 13 son anteroposteriores, en éstas se eliminó el largo del incisivo, Figura 2, (4).

Las medidas utilizadas fueron dadas en unidades arbitrarias con un acercamiento de 0.125 mm, todas ellas con el mismo microscopio y hechas por la misma persona con el fin de eliminar errores de apreciación visual (4).

Análisis estadístico.

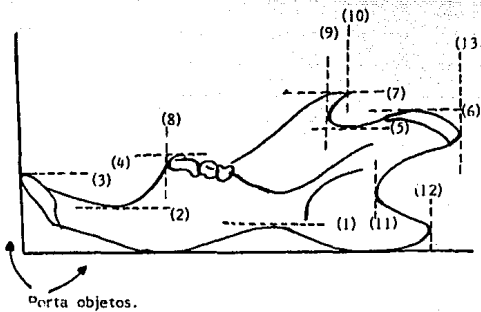
Festing (6) estableció un vector de 13 medidas: Dado el elevado número de variables existentes se utilizó el paquete de programación "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS), para el análisis estadístico.

Gracias al análisis discriminante es posible definir la forma de la mandíbula, el tamaño y la proporción de la misma (6).

Las variables canónicas reducen dimensionalmente el problema, gracias a ellas se puede graficar y observar el grado de parentesco, haciendo la comparación entre pares de

FIGURA 2 (*)

MEDIDAS UTILIZADAS POR FESTING
 PARA EL DESARROLLO DE SU TECNICA.
 VISTA MEDIAL DE LA RAMA DERECHA DE LA MANDIBULA
 DE RATON Mus musculus.



* Festing M. (1982).

cepas no relacionadas y entre cepas y sublíneas relacionadas (6), como se muestra en la Tabla 2.

El análisis discriminante compara un conjunto de variables en dos o más grupos de casos para diferenciar entre ellos (18).

El objetivo matemático es conocer la importancia y la combinación lineal de las variables discriminantes, forzando a los grupos a ser distintos estadísticamente, discriminando entre ellos hasta donde sea posible (18).

El modelo matemático utilizado en el análisis discriminante fue el siguiente:

$$D_i = d_1 Z_1 + d_2 Z_2 + \dots + d_p Z_p$$

donde

D_i es el valor de la i -ésima función discriminante.

d son los coeficientes ponderadores de los valores estandarizados.

Z son los valores estandarizados de las p variables

discriminantes usadas en el análisis, $p=1,2,\dots,13$.

La fórmula general de la ecuación da como resultado las nuevas variables canónicas (18).

El número de funciones discriminantes derivadas en este caso es igual al número de grupos menos uno (siempre y cuando el número de variables sea mayor al número de grupos) (18).

Las funciones discriminantes son consideradas como los ejes de un espacio geométrico para el estudio de la relación espacial entre grupos, sirven para identificar las variables que contribuyen en la diferenciación entre grupos, (17).

El análisis discriminante utiliza el grupo de variables que proveen una discriminación satisfactoria, eliminando las innecesarias (18).

Se seleccionó una segunda variable discriminante para que en combinación con la primera mejorara el valor del criterio de selección (18).

Al graficar existe otra evidencia para la diferenciación entre grupos, el centroide, representado por un asterisco, el cual traza la localización de cada grupo en forma resumida en un espacio dimensional (18).

Entre mas cercanía exista entre un individuo al centroide de una cepa en la gráfica, aumenta la probabilidad de que éste pertenezca a dicha cepa.

La interpretación puede realizarse por un examen visual. El lugar del centroide muestra la relación entre miembros de grupo y el traslape entre ellos.

Una sola variable canónica muestra un traslapamiento entre las cepas. La segunda variable canónica puede mostrar un comportamiento diferente de los puntos.

Al combinar las dos variables canónicas, las diferentes poblaciones se separan más en un plano bidimensional. Las primeras dos o tres variables canónicas muestran en elevada proporción la variación entre cepa.

Un sujeto de estudio en forma individual puede ser localizado en un espacio bidimensional por un punto. Un conjunto de puntos representa una sola cepa.

La distancia existente entre dos centroides en la gráfica de cepas diferentes, da una idea de la proporción de la divergencia existente entre ellas.

El propósito de construir las variables canónicas es reducir dimensionalmente el problema. De esta manera se puede recurrir a la representación gráfica de los datos (los valores de las variables canónicas).

Las cepas mas relacionadas genéticamente entre sí, tienden a ocupar el mismo espacio y las cepas menos relacionadas, o no relacionadas, aparecen más separadas unas de otras.

TABLA 2
PARES DE CEPAS ESTUDIADAS

Cepas del grupo 1

CS7BL/6J	DBA/2J
CS7BL/6J	CBA/N
DBA/2J	CBA/N

Cepas del grupo 2

BALB/cAnN	BALB/cJ
BALB/cAnN	BALB/cH-2b
BALB/cAnN	BALB/cH-2k
BALB/cJ	BALB/cH-2b
BALB/cJ	BALB/cH-2k
BALB/cH-2k	BALB/cH-2b

Cepas del grupo 1 no están relacionadas genéticamente.
Cepas del grupo 2 están relacionadas genéticamente.

RESULTADOS

Resultados.

Análisis estadístico del grupo 1.

Las medias y desviaciones estándar del grupo 1 son:

TABLA 3
MEDIAS Y DESVIACIONES ESTANDAR DEL GRUPO 1

CEPAS	VARIABLES				
	V1	V2	V3	V4	V5
1	7.13±1	17.8±1.2	24.26±.69	33.5±1	39.13±1.6
2	6.83±1	16.0±.8	22.64±1.4	30.38±1	39.48±1.1
3	7.45±1	16.16±.6	22.9±1.0	31.6±.8	39.45±.9
	V6	V7	V8	V9	V10
1	44.26±1.4	49.86±1.6	33.4±1.3	70.26±1.6	74.8±1.6
2	43.87±1.7	48.8±1.6	33.8±1.3	69.67±1.2	74.0±2.4
3	44.36±1.2	48.18±.6	23.0±2.8	66.18±2.2	68.72±3
	V11	V12	V13		
1	83.73±2	94.26±2	100.8±2.6		
2	81.45±1.9	90.83±1.7	95.16±4.5		
3	80.72±2	93.27±3.4	94.9±4.1		

En el grupo 1 las variables con mayor valor para discriminar entre grupos y en orden decreciente fueron V4, V10, V12, V5, V3, V9, V8, V2, V13, V6 y V7, como se aprecia en la Tabla 4.

El análisis discriminante va incluyendo las variables hasta encontrar la mejor combinación de éstas, se detiene en forma automática como se observa en la Tabla 5.

En este análisis se observa que hay diferencias estadísticas entre los pares de cepas del grupo genético ($P < 0.01$), lo que es indicativo de que existe diferencia genética entre todos los pares de cepas del grupo 1.

En el grupo 1 se ubicaron 72 casos de los cuales el 100% fueron clasificados correctamente, Tabla 11.

Se obtuvieron dos variables canónicas (g-1) con lo que se graficó el mapa territorial. Figura 3.

Claves utilizadas en el mapa territorial grupo 1

Clave	Interpretación
CEPA 1	C57BL/6J
CEPA 2	DBA/2J
CEPA 3	CBAN
*	Centroide de grupo

Las áreas pertenecientes a cada cepa se encuentran perfectamente definidas y la distancia entre los centroides es amplia.

El método discrimina con un 100% de confiabilidad entre los pares de cepas 1,2 1,3 y 2,3 como se puede observar en la Tabla 11.

TABLA 4

VARIABLES DEL PRIMER GRUPO CON MAYOR VALOR DISCRIMINANTE

<u>VARIABLES</u>	<u>F</u>	<u>SIGNIFICANCIA.</u>
V4	54.90	0.0000**
V10	31.08	0.0000**
V12	19.03	0.0000**
V5	0.5655	0.5707ns
V3	17.58	0.0000**
V9	26.87	0.0000**
V8	5.092	0.0087**
V2	26.45	0.0000**
V13	20.07	0.0000**
V6	00.64	0.5276ns
V7	21.33125	0.0000**

ns no significativo.

** altamente significativo.

TABLA 5

VALORES DE F Y SIGNIFICANCIA.
PARES DE CEPAS DEL GRUPO 1.

ANALISIS	VARIABLES	PARES DE CEPAS FORMADOS		
		1,2	1,3	2,3
1	4	109.19	20.956	09.168
		00.000	00.000	00.000
2	4,10	53.867	36.627	29.200
		00.000	00.000	00.000
3	4,10,12	48.579	26.960	38.205
		00.000	00.000	00.000
4	4,5,10,12	50.578	25.341	28.436
		00.000	00.000	00.000
5	3,4,5,10	56.759	20.440	27.737
	12	00.000	00.000	00.000
6	3,4,5,9	47.596	18.478	26.965
	10,12	00.000	00.000	00.000
7	3,4,5,8	43.368	18.227	22.867
	9,10,12	00.000	00.000	00.000
8	2,3,4,5	42.491	16.762	20.099
	8,9,10, 12	00.000	00.000	00.000
9	2,3,4,5	37.417	15.752	19.593
	8,9,10 12,13	00.000	00.000	00.000
10	2,3,4,5	33.494	14.794	19.221
	6,8,9,10 12,13	00.000	00.000	00.000
11	2,3,4,5	29.942	15.002	19.033
	6,7,8,9, 10,11,12	00.000	00.000	00.000

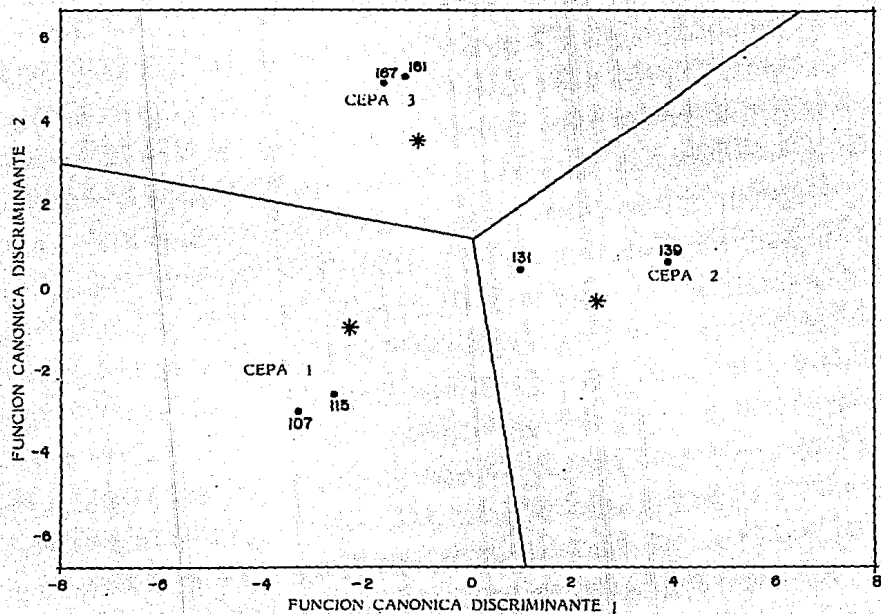
En la columna pares de cepas formados, la cifra superior se refiere al valor de la F estadística y la cifra inferior es el valor de la significancia.

TABLA 6

COEFICIENTES NO ESTANDARIZADOS DE LAS FUNCIONES CANONICAS
DISCRIMINANTES GRUPO 1

VARIABLES	FUNCION 1	FUNCION 2
V2	-0.3877553	-0.1541557
V3	-0.4201320	0.1373981
V4	-0.5415756	-0.2851034
V5	0.5749819	0.2700503
V6	-0.1557376	0.3637363
V7	.49393E-01	-0.3409046
V8	0.2542522	0.2086277
V9	0.1148305	-0.5142199
V10	0.1615909	-0.433913
V12	-0.4201362	0.1430353
V13	-0.603E-01	0.1478838
(CONSTANTE)	31.89019	31.51845

FIGURA 3
MAPA TERRITORIAL GRUPO 1



Análisis estadístico del grupo 2

Las medias y desviaciones estándar del grupo 2 son.

TABLA 7

MEDIAS Y DESVIACIONES ESTANDAR DEL GRUPO 2

<u>CEPA</u>	<u>V1</u>	<u>V2</u>	<u>V3</u>	<u>V4</u>	<u>V5</u>
4	5.56±.84	16.34±.77	24.39±.89	31.30±.97	39.21±1.1
5	6.09±.42	17.18±.83	24.39±1.2	31.63±1.8	39.27±.98
6	5.71±.71	16.43±.83	24.00±.61	31.78±.62	39.50±.88
7	5.83±.81	17.16±1.0	24.75±1.1	32.33±1.1	39.83±.56
	<u>V6</u>	<u>V7</u>	<u>V8</u>	<u>V9</u>	<u>V10</u>
4	45.83±1.6	48.87±1.6	35.04±1.3	72.17±1.6	76.17±1.9
5	46.18±1.5	50.00±1.2	34.09±1.2	69.82±2.0	74.18±2.5
6	45.35±1.3	49.64±1.2	35.35±1.1	72.92±1.3	77.50±1.4
7	45.54±1.5	49.33±.96	35.33±1.3	73.33±1.4	77.00±1.4
	<u>V11</u>	<u>V12</u>	<u>V13</u>		
4	86.52±1.4	96.34±1.6	102.86±1.8		
5	84.82±2.4	94.36±8.4	101.18±2.2		
6	87.28±1.2	96.93±1.2	102.36±2.8		
7	85.50±8.5	96.83±2.0	103.17±1.6		

Al efectuar el segundo análisis se obtuvo que en el grupo 2 las variables de mayor valor para discriminar en orden decreciente fueron V9, V2, V3, V7, V5, V6, V4, V11 y V13. Al aumentar el valor de la significancia disminuye el poder discriminante entre los pares de cepas, Tabla 8.

Al analizar las diferentes combinaciones de variables, se aprecia que dentro de los pares 4,6 4,7 y 6,7 no se encuentran diferencias significativas ($p > .01$) en la mayoría de los análisis. Dentro de los pares restantes se observaron diferencias significativas ($p < .01$) en todos los análisis. Esto indica que entre más se acerque el valor de P a $.05$ la relación entre los pares de cepas aumenta y a la inversa, entre más se aleje el valor de p a $.05$ los grupos se separan entre sí indicando una disminución en la semejanza entre cepas, como se aprecia en la Tabla 9.

El porcentaje promedio de miembros de grupo correctamente clasificados es de 100% en el grupo 1, (cepas 1, 2, 3) y de 68.04% para los miembros del grupo 2 (cepas 4, 5, 6, 7).

Con la utilización de las 2 primeras variables canónicas se obtuvo el mapa territorial para el grupo 2, Figura 4.

Claves utilizadas en el mapa territorial del grupo 2.

Clave	Interpretación
CEPA 4	BALB/cAnN
CEPA 5	BALB/cJ
CEPA 6	BALB/cH-2 ^b
CEPA 7	BALB/cH-2 ^k
*	Centroide de grupo

TABLA 8.

VARIABLES UTILIZADAS EN EL SEGUNDO ANALISIS EN FORMA
DECRECIANTE SEGUN SU IMPORTANCIA

VARIABLES	F	SIGNIFICANCIA
V9	22.77	0.0000**
V2	6.010	0.0009**
V3	2.767	0.0462*
V7	3.291	0.0240*
V5	2.174	0.0963ns
V6	1.431	0.2389ns
V4	4.478	0.0055**
V11	1.453	0.2325ns
V13	3.560	0.0172 *

ns no significativos ($p > .05$)

* significativos. ($p < .05$)

** altamente significativos ($p < .01$)

TABLA 9

VALORES DE F Y SIGNIFICANCIA.
PARES DE CEPAS DEL GRUPO 2

ANA- LISIS	VARIA- BLES	PARES DE CEPAS FORMADOS					
		4,5	4,6	4,7	5,6	5,7	6,7
1	9	25.0390	02.8857	06.3351	47.8270	56.9110	00.8495
		00.0000	00.0927	00.0135	00.0000	00.0000	00.3951
2	2,9	19.6260	01.4302	06.9072	31.2940	28.7870	04.3538
		00.0000	00.2445	00.0016	00.0000	00.0000	00.0156
3	2,3,9	18.0020	00.9832	04.5946	27.1510	23.2890	03.0408
		00.0000	00.4043	00.0048	-0.0000	-0.0000	00.0329
4	2,3,9 7	15.7400	01.6624	03.4704	20.5790	19.0020	02.7672
		00.0000	00.1657	00.0110	-0.0000	-0.0000	00.0321
5	2,3,5 7,9	13.0240	01.3453	03.5090	16.7510	17.8950	03.3821
		00.0000	00.0252	00.0061	00.0000	00.0000	00.0076
6	2,3,5 6,7,9	10.9170	02.2691	03.5928	14.3310	14.9980	02.8314
		00.0000	00.0440	00.0031	-0.0000	00.0000	00.0144
7	2,3,4 5,6,7 9	09.6072	02.0377	03.9669	12.2280	12.8290	02.8411
		00.0000	00.0592	00.0008	-0.0000	00.0000	00.0102
8	2,3,4 5,6,7 9,11	08.3223	01.7827	03.8165	10.6450	11.3430	03.0894
		00.0000	00.0915	00.0007	-0.0000	00.0000	00.0041
9	2,3,4 5,6,7 9,11,13	07.3469	01.9201	03.4818	09.9644	10.2600	02.7650
		00.0000	00.0597	00.0011	00.0000	00.0000	00.0069
10	2,3,4 6,7,9 10,11,13	06.6284	02.1577	03.1000	08.9792	09.1897	02.8420
		00.0000	00.0284	00.0021	00.0000	00.0000	00.0043

En la columna pares de cepas formados, la cifra superior se refiere al valor de la F estadística, la cifra inferior es el valor de la significancia.

TABLA 10

COEFICIENTES NO ESTANDARIZADOS DE LAS FUNCIONES CANONICAS
DISCRIMINANTES GRUPO 2

<u>VARIABLES</u>	<u>FUNCION 1</u>	<u>FUNCION 2</u>	<u>FUNCION 3 .</u>
V2	0.5645502	-0.8345799	-0.1213209
V3	-0.5755895	0.4014936	0.1874461
V4	.20588E-01	-0.4935883	-0.2324898
V5	-0.4725145	-0.6362269	0.365E-01
V6	.8703E-01	0.1113675	0.3131198
V7	0.3438023	0.3298291	-0.6416985
V9	-0.6022058	-0.1638817	0.1944583
V10	.31916E-02	0.1485854	-0.4213587
V11	.17493E-02	.95505E-01	-.4061E-01
V13	0.112830	-.1944E-01	0.2524195 .
<u>(CONSTANTE)</u>	<u>33.09998</u>	<u>17.82413</u>	<u>16.60156 .</u>

FIGURA 4
MAPA TERRITORIAL GRUPO 2

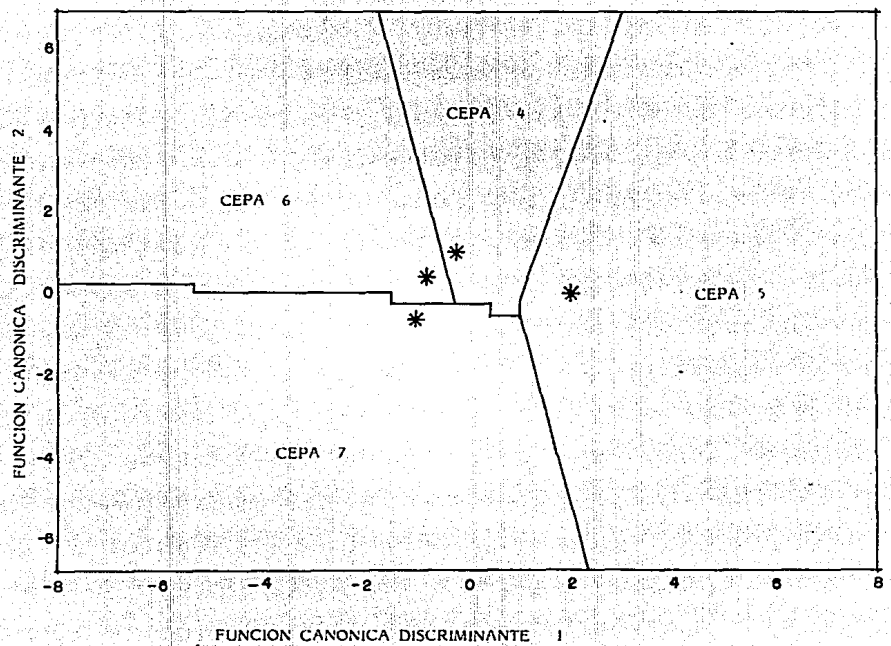


TABLA 11

NUMERO DE CASOS Y PORCENTAJE DE ASIGNACION CORRECTA

Cepas	1	2	3	4	5	6	7	# total	% clasificaci ^o n correcta
1									
C57BL/6J	30	0	0					30	100.0
	100%	0%	0%						
2									
DBA/2J	0	31	0					31	100.0
	0%	100%	0%						
3									
CBA/N	0	0	0					11	100.0
	0%	0%	100%						
Promedio grupo 1*									100.0
4									
BALB/cAnN				17.2		4	0	23	73.9
				73.9%	8.7%	17.4%	0%		
5									
BALB/cJ				2	18	0	2	22	81.8
				9.1%	81.8%	0%	9.1%		
6									
BALB/cH-2b				6	2	16	4	28	57.1
				21.4%	7.01%	57.1%	14.3%		
7									
BALB/cH-2k				3	1	5	15	24	62.5
				12.5%	4.2%	20.8%	62.5%		
Promedio grupo 2*									68.0

* Promedio del porcentaje de clasificaci^on acertada por grupo.

Las cepas 1, 2 y 3 pertenecen al grupo 1.

Las cepas 4, 5, 6 y 7 pertenecen al grupo 2.

Comprobación.

Para reproducir el trabajo y situar un ratón x en la cepa a la que pertenece y corroborar su identidad, se debe obtener la mandíbula derecha y realizar las mediciones de las mejores variables. Como ejemplo se tomó el primer grupo, en este caso se emplearon las 11 variables de más utilidad señaladas en la Tabla 5; cada valor crudo de la variable se multiplica por el coeficiente no estandarizado correspondiente a la primera función canónica discriminante del grupo 1, (Tabla 6), a cada variable se le aplica el mismo tratamiento y se suman como se muestra en la siguiente fórmula:

Para datos crudos

$$VC_1 = d_{11}V_1 + d_{12}V_2 + \dots + d_{1p}V_p + k_1$$

$$VC_2 = d_{21}V_1 + d_{22}V_2 + \dots + d_{2p}V_p + k_2$$

donde

VC_1 = primera variable canónica

VC_2 = segunda variable canónica

d = coeficiente no estandarizado de la función
canónica discriminante

V = valor morfométrico de la variable en crudo

k_1 = constante del coeficiente no estandarizado de la primera función canónica discriminante

k_2 = constante del coeficiente no estandarizado de la segunda función canónica discriminante

Sustituyendo en VC_1 para el sujeto 115

$$\begin{aligned} VC_1 = & (0.39177(20)) + (0.46320(24)) + (0.63670(34)) + \\ & + (0.77679(40)) + (0.24581(44)) + (0.07614(52)) + \\ & + (0.4107(34)) + (0.18458(70)) + (0.36027(76)) + \\ & + (-0.92469(94)) + (-0.22749(100)) \\ VC_1 = & -2.2123 \end{aligned}$$

De igual forma, pero sustituyendo por la segunda función canónica, se obtiene la segunda discriminante canónica, con ayuda de estos valores cada cepa se localiza en áreas determinadas. Se tomaron al azar dos individuos de cada cepa y se graficaron en el mapa territorial Figura 3, siendo éstos:

CEPA	SUJETO	FUNCION 1	FUNCION 2
1	115	-2.2123	-2.5270
1	107	-3.3196	-2.9900
2	139	3.8414	-0.4586
2	131	2.0460	-0.2318
3	161	-1.2011	4.9671
3	167	-1.1452	4.6885

Al observar los valores de las variables canónicas obtenidas se aprecia que en la cepa 1 las funciones canónicas 1 y 2 se localizan en coordenadas negativas; para la cepa 2, en la primera función se obtienen puntajes positivos y en la segunda, puntajes negativos; para la cepa 3 en la primera función valores negativos y en la segunda positivos.

DISCUSION

Festing (6) en su análisis de clasificación, obtuvo porcentajes entre 37.9 y 54.5% de asignación correcta, mientras que en este trabajo el análisis de las cepas descendientes de Balb/c (grupo 2) se reporta un 68% de clasificación acertada. El aumento en el porcentaje de clasificación correcta se debe a que el tamaño de la muestra en la que se realizó el estudio es mayor a la muestra de Festing. También hay que tomar en cuenta que se trata de material biológico por lo que los cambios genotípicos son impredecibles pues ocurren en forma natural. La diferencia entre las medias de las variables en las sublíneas son mínimas, resultado de la manifestación de la heterocigosis residual, alguna mutación, contaminación o a factores ambientales.

COMPARACION DE LOS VALORES DE LAS MEDIAS DE LAS CEPAS C57BL

	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V9	V10	V12	V13
C57BL*	16.8	23.1	31.4	37.6	42.1	48.3	66.0	71.0	91.4	95.6
C57*	17.2	24.3	30.8	38.0	44.0	49.4	66.5	72.3	94.1	96.5
C57BL/6J	17.8	24.2	33.5	39.13	44.2	49.8	70.2	74.8	94.2	100.0

* Cepas del presente trabajo.

**Cepas utilizadas por Festing.

Cuando se aplicó el análisis de discriminantes canónicas a las cepas singénicas del grupo 1, se obtuvo un 100% de

clasificación correcta, mientras que en las cepas singénicas, sublíneas y líneas congénicas fue de 68%. La diferencia en los porcentajes de clasificación correcta está íntimamente relacionada con el origen genético de los animales de estudio.

Los animales del primer grupo pertenecen a las cepas C57/6, DBA y CBA que son líneas consanguíneas o singénicas por ser cada una de éstas el producto de la cruce de hermanos carnales por más de 20 generaciones y el resultado obtenido es una homocigosis. Sus líneas de ascendencia nunca se cruzan, carecen de ancestros comunes y por esta razón en la discriminación entre las cepas se obtiene un 100% de diferenciación y clasificación acertada de las mismas. En el mapa territorial se observa que cada cepa ocupa una área diferente y bien definida dentro de la gráfica, no existe traslapamiento entre ellas y en la visualización de los centroides se aprecia que éstos están separados unos de otros, como consta en la Figura 3, lo que corrobora que dichos animales carecen de relación genética entre individuos de cepas diferentes.

Los resultados obtenidos en el grupo 2 fueron: de 97 casos, el 68.4% se clasificaron correctamente y el 31.6% se designaron en forma incorrecta a otras cepas. El alto porcentaje de individuos mal clasificados se debe a la similitud en todas las cepas originarias de BALB/c. En este

grupo las cepas BALB/cAnN y BALB/cJ muestran un porcentaje de clasificación correcta más alto por ser sublíneas separadas desde hace un siglo aproximadamente, su genoma ha sido modificado por mutación y heterocigosis residual dando diferencias en la constitución genética. Las cepas BALB/cH-2^u y BALB/cH-2^k tienen un elevado porcentaje de asignación incorrecta entre ellas, debido a que son líneas congénicas resistentes o línea CR, que comparten el mismo genotipo a excepción del cromosoma 17 que tiene un fragmento diferente en el complejo principal de histocompatibilidad H-2. Para lograr una línea congénica se realiza una primera cruce entre dos cepas diferentes, una llamada primera parental o cepa endogámica asociada que aporta el fondo genético, la segunda es la cepa donadora que puede o no ser endogámica (aporta el loci diferencial). Posteriormente se selecciona a los hijos portadores del loci diferencial y se retrocruzan con la cepa primera parental, durante doce generaciones. Después se realiza una cruce entre heterocigotos, de éstos se seleccionan los homocigotos para H-2 o el loci diferencial y se intercruzan durante 20 generaciones consecutivas (16).

<u>CEPA ASOCIADA</u>	<u>CEPA DONADORA</u>	<u>LINEA CONGENICA</u>
BALB/c	C57BL/6	BALB/cH-2b
BALB/c	C3H	BALB/cH-2k

En el mapa territorial obtenido con dos discriminantes canónicas se observa una separación considerable entre los centroides de las cepas BALB/cAnN, BALB/cJ y BALB/cH-2^u. Esta

distancia disminuye entre los centroides de BALB/cAnN, BALB/cH-2^b y BALB/cH-2^k. El comportamiento de los centroides es el resultado de la relación de parentesco entre las cepas, la distancia existente entre los centroides de cada grupo va directamente proporcional al grado de parentesco entre cepas, líneas y sublíneas.

El método morfométrico de Festing funciona con las cepas singénicas donde se obtuvo un 100% de clasificación correcta. En las cepas singénicas, sublíneas y líneas congénicas de ancestros comunes, el porcentaje de clasificación acertada disminuyó hasta un 68%. Se puede afirmar que este método para dichas cepas no funciona por sí solo como un control de calidad genético confiable.

Para un control de calidad genética la técnica de Festing, por sí sola es deficiente por lo que es necesaria la combinación de varios métodos como los inmunológicos que diferencian el H-2, entre estos se cuentan: trasplante de tejidos o de tumores, cultivo mixto de linfocitos y citotoxicidad mediada por células, para las cepas congénicas (3); para las sublíneas, marcadores bioquímicos como el método de gel de polianilamida. Con la utilización de varios métodos se puede obtener un perfil genético más acertado de los individuos en estudio.

CONCLUSIONES

Las cepas C57BL/6J, DBA/2J y CBA/N son diferentes entre sí. El porcentaje de asignación correcta entre los miembros de las cepas en el grupo 1 es de 100%, por lo que se concluye que los animales de cada cepa son homocigotos. Cuando se compara entre cepas se observa que no comparten el genotipo por lo que se descarta una contaminación genética.

Las cepas singénicas, congénicas y sublíneas descendientes de BALB/c son similares genéticamente entre ellas por lo que disminuye el porcentaje de clasificación acertada a 68%. Los porcentajes elevados de mala clasificación en las cepas BALB/cH-2b y BALB/cH-2k son debidas a la similitud genética entre cepas y no a una contaminación.

La técnica utilizada es lo suficientemente sensible para distinguir entre cepas singénicas.

La utilización del método morfométrico de Festing debe emplearse acompañado de otros métodos de verificación genética, cuando se trate de cepas relacionadas genéticamente, ya que una técnica aislada por sí sola no

proporciona la información suficiente para la identificación de un grupo de animales con características genéticas iguales.

LITERATURA CITADA

- 1.- Altman, P.L., and Katz, D.D.: Inbred and genetically defined strains of laboratory animals. (eds.), Feder. Am. Soc. Exp. Biol., Bethesda, Maryland, 1979.
- 2.- Cendrero, L.: Zoología Hispanoamericana Invertebrados. Porrúa, México, 1971.
- 3.- Fernández, R.H.: Definición del perfil genético por métodos serológicos de las cepas de ratones mantenidas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM. Tesis de licenciatura. Fac. Biol., Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 1985.
- 4.- Festing, M.F.W.: Mouse strains identification. Nature, 238: 351-352 (1972).
- 5.- Festing, M.F.W.: Mouse strains identification by mandible analysis. In Laboratory animal drug testing, 5th ed. Spiegel, Stuttgart, 1972.
- 6.- Festing, M.F.W.: A multivariate analysis of subline divergence in the shape of the mandible in C57BL/Gr mice. Genet. Res. Camb., 21: 121-132 (1973).
- 7.- Festing, M.F.W.: Genetic releability of commercially breed laboratory mice. Lab. Anim., 8: 265-270 (1974).
- 8.- Festing, M.F.W.: Genetic monitoring of laboratory mouse colonies in the medical research council accreditation scheme for the suppliers of laboratory animals. Lab. Anim., 8: 291-299 (1974).
- 9.- Festing, M.F.W.: Genetic contamination of laboratory animal colonies. An increasingly serious problem. Ilar news, 25: (4): 6-10 (1980)

- 10.- Fasting, M.F.W. and Lovell, D.P.: Routine genetic monitoring of commercial and other colonies in the U.K. using mandible shapes. Five years of experience. Spiegel, Erichsen, S. and Solleveld, H.A., Stuttgart, 1980.
- 11.- Flaherty, L.: Congenic strains. The mouse in biomedical research. Academic Press, N.Y. London, 1981.
- 12.- Groen, A.: Identification and genetic monitoring of mouse inbred strains using biochemical polymorphisms. Lab. Anim., 11: 209-214 (1977).
- 13.- Hoffman, H.A., Smith, K.T., Crowell, J.S., Nomura, T. and Tomita, T.: Genetic quality control of laboratory animals with emphasis on genetic monitoring. Spiegel A., Erichsen, S. and Solleveld, H.A., Stuttgart, 1980.
- 14.- Krog, H.H.: Identification of inbred strains of mice Mus musculus I. Genetic control of inbred strains of mice using starch gel electrophoresis. Biochem. Genet., 14: 319-326 (1976).
- 15.- Lane, P. and Pearson, A.E.G.: The laboratory animal- principles and practice. Academic Press, New York, 1972.
- 16.- Mc Donald, L. E.: Report of the AUMA panel on euthanasia. J. Am. Vet. Med. Assoc., 173: 59-72 (1978).
- 17.- Morse III, H.C.: The laboratory mouse- A historical perspective. The mouse in biomedical research. Academic Press Inc., N.Y. London, 1981
- 18.- Nie, N., Bent, D.H. and Hadlat, H.C.: Statical package for the social sciences. 2nd ed. Mc Graw Hill. New York, 1970.
- 19.- Rivers, C.: Genetic monitoring. Charles River Digest, 21: (3): (1982).

- 20.- Staats, S.: Inbred and segregating inbred strains. edited by: Foster, L.H., Small, J.D. Fox, J.G. eds. The mouse in biomedic research Vol. 1 Academic Press, N.Y. London., 1971.
- 21.- Wickramaratne, B.A. : The skeletal profile and dentition of some inbred strains mice. J.Anat., 117: (3): 565-573 (1974).