

47
2ej.

**VERIFICACION GENETICA DE LA CEPA SINGENICA C57BL/10 Y LA
LINEA CONGENICA RESISTENTE B10.BR-H-2^k DE RATON DE
LABORATORIO POR METODOS INMUNOGENETICOS.**

Tesis presentada para la obtención

del título de

Médico Veterinario Zootecnista

ante la División de Estudios Profesionales

de la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México

por

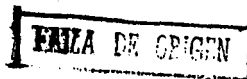
José Juan Carreño Rosas

Asesor: MVZ Ciro Lomeli y Flores

México, D.F.

1991

I





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>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	6
RESULTADOS.....	12
DISCUSION.....	12
LITERATURA CITADA.....	17
CUADROS.....	21
FIGURAS.....	27
GLOSARIO.....	36

RESUMEN

CARREÑO ROSAS JOSE JUAN. VERIFICACION GENETICA DE LA CEPA SINGENICA C57BL/10 Y LA LINEA CONGENICA RESISTENTE B10.BR H-2^k DE RATON DE LABORATORIO POR METODOS INMUNOGENETICOS (bajo la dirección del: Dr. Ciro Lomeli y Flores).

La investigación científica moderna requiere de la disponibilidad de varios tipos genéticos de ratones para que los resultados sean más valiosos para el campo particular de interés. Sin embargo con cierta frecuencia se reporta que al analizar el conjunto de características que mejor revele una muestra al azar del genoma (perfil genético) este no corresponde al esperado en la cepa en cuestión debido a tres causas: mutación, heterocigosis residual o miscegenación; El objetivo del presente trabajo fue la verificación de los alelos de histocompatibilidad de las cepas C57BL/10 y B10.BR H-2^k utilizando como controles a las cepas C57BL/6J y C.3H H-2^k respectivamente. En estas cepas se calculó el coeficiente de endogamia y la eficiencia reproductiva (número de crías por hembra por semana). La verificación de los alelos de histocompatibilidad se hizo utilizando los métodos de inmunofluorescencia indirecta, citotoxicidad, cultivo mixto de linfocitos y trasplante de piel. Para calcular el coeficiente de endogamia se utilizó la fórmula de Wright (1931). y la eficiencia reproductiva se calculó en base al número de crías por hembra por semana. Los animales de la cepa C57BL/10 y B10.BR H-2^k se perpetuaron en un proceso de consanguinidad estrecha siguiendo un esquema de línea única durante cuatro generaciones alcanzándose un incremento en el coeficiente de consanguinidad del 59%. La capacidad reproductiva de las cepas mencionadas mejoro substancialmente, debido a las condiciones brindadas en el bioterio así como a la selección y manejo. Las técnicas

inmunológicas mostraron que la cepa singénica C57BL/10 haplotipo H-2^b mostro ser portadora de antígenos codificados por los alelos H-2^k y la cepa congénica resistente B10.BR H-2^k de los antígenos codificados por los alelos H-2^b. En este trabajo se concluye que es factible perpetuar y propagar las cepas endogámicas de ratón de laboratorio C57BL/10 y B10.BR H-2^k. La verificación de los alelos de las cepas C57BL/10 y B10.BR H-2^k mediante el uso de marcadores inmunogenéticos empleando como controles a las cepas C57BL/6J Y C.C3 H-2^k indican un caso evidente de miscegenación por entrecruzamiento "ilegítimo" de las cepas probadas.

I. INTRODUCCION

La investigación científica moderna requiere de la disponibilidad de varios tipos genéticos de ratones de laboratorio (exogámicos, singénicos, endogámicos congénicos resistentes, endogámicos congénicos recombinantes, endogámicos recombinantes, mutantes) (11) para lograr que los resultados sean más valiosos para el campo particular de interes.

En la actualidad es reconocido que la descripción correcta del animal usado en un experimento es esencial para que los resultados de este sean reproducibles (23); muchos trabajos se interpretan a la luz de la información conocida de las características de las cepas empleadas (+). Sin embargo, con cierta frecuencia se reporta que al analizar el conjunto de características que mejor revele una muestra al azar del genoma (perfil genético), estas no corresponden a las esperadas en la cepa en cuestion (2, 7-10, 14, 15, 18, 19,) ocasionando considerables pérdidas en términos económicos de productividad científica y de validez de los resultados experimentales. Las diferencias reportadas pueden encontrar sus orígenes en la mutación, la heterocigosis residual y la contaminación genética o miscegenación (25); los efectos de esta última exceden con mucho en sus alcances a las divergencias que resultan de las dos primeras causas.

Los bioterios del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (IIB-UNAM), son unidades de apoyo a la investigación científica y a la enseñanza cuyas actividades pueden agruparse como : Servicio, Investigación y difusión de la Ciencia de los Animales de Laboratorio.

El término Servicio se refiere a la provisión oportuna de animales en la cantidad, con la calidad y las características biológicas que lo demanda la comunidad académica del Instituto. La mayoría de los animales son producidos en el mismo Instituto, los gatos y conejos son adquiridos de proveedores externos.

La labor de investigación científica se desarrolla en forma colaborativa con algunos grupos interesados en la base genética de la respuesta inmune y en forma independiente en materia de Medicina de los animales de laboratorio; y la difusión de este campo de conocimiento

se hace a través de cátedras, seminarios, residencias y capacitaciones, además del continuo asesoramiento a investigadores en asuntos tales como: modelos animales, técnicas de experimentación etc.(+)

Los Bioterios del I.I.B. se encuentran separados en dos unidades. El Bioterio "A" desarrolla y mantiene cepas de ratas además de alojar cuyos, conejos y gatos. Por otra parte desde 1982 el bioterio "B" funciona como uno de los principales reservorios genéticos de mamíferos de laboratorio de este país, desarrollando y manteniendo estirpes genéticamente definidas de ratón, verificados mediante técnicas de laboratorio.

Las especies, cepas y tipos genéticos de los animales empleados en el Instituto durante el año de 1989, se muestran en el cuadro I (++)

+ Lomeli F. C.: Programa conceptual de actividades y procedimientos operacionales de los bioterios del I.I.B. UNAM.

Antecedentes.

En 1987 se recibieron del Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud, la cepa singénica de haplotipo H-2^b C57BL/10 (B10) y dos líneas congénicas resistentes en las cuales la primera "parental" era B10 y las cepas donadoras habían sido C57BR y DBA/2. Estas estirpes se designan B10.BR-H-2^k (B10.BR) y B10.D2-H-2^d (B10.D2). Estos animales habían sido importados de Estados Unidos de Norteamérica y mantenidos sin ningún registro genealógico o prueba de verificación genética y nos fueron enviados para su perpetuación y propagación. Se recibieron un macho y tres hembras de la cepa B10, cuatro parejas de la línea congénica B10.BR y un macho y dos hembras de la línea congénica B10.D2.

Debido al escaso número de animales no se verificaron sus alelos diferenciales, decidiéndose reproducirlos hasta obtener el número suficiente de animales para llevar a cabo las pruebas de control genético.

En el presente trabajo se llevaron a cabo las pruebas conducentes a la identificación de los marcadores inmunogenéticos en los cuales difieren estas estirpes, es decir los antígenos producto de los genes del complejo principal de histocompatibilidad.

Los métodos de laboratorio seleccionados fueron: Inmunofluorescencia indirecta, citotoxicidad directa mediada por complemento, cultivo mixto de linfocitos y transplante de piel.

El objetivo del presente trabajo es la verificación de los alelos de histocompatibilidad de las cepas problema B10 y B10.BR utilizando como controles a las líneas C57BL/6J y C.C3-H-2^k respectivamente. Así mismo se determinó el coeficiente de endogamia en la cuarta generación en las cepas B10 y B10.BR siguiendo un esquema de cruce de línea única (29); y se calculó el índice de eficiencia reproductiva (número de crías por hembra por semana) en las cepas ya mencionadas.

A) MATERIAL.

1. ANIMALES: Se emplearon un total de 157 ratones que se alojaron en jaulas de policarbonato tipo caja de zapato, que ofrecen un area de piso de 364 cm² y protegidos con filtros de poliester tipo Kraft(+). Se les proporcionó una dieta especial para roedores(++) y *ad libitum* agua filtrada por ósmosis reversible y acidificada hasta alcanzar un pH 2.5 (+++) (16, 22, 27). Se mantuvieron en instalaciones convencionales ventiladas mediante la extracción forzada de aire y en donde la temperatura varia entre los 18 y 26 °C (20). Los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12/12 horas. Los animales empleados para las pruebas de verificación genética tenían doce semanas de edad.

En el cuadro II se muestran las cepas problema, las cepas control, las pruebas realizadas, el número de animales, su edad, sexo y la generación filial.

Las cepas que se emplearon como controles han sido desarrolladas y/o mantenidas en IIB-UNAM durante un mínimo de 20 generaciones y verificadas genéticamente por métodos inmunogenéticos (5), transplante de tejidos y tumores (5) y métodos morfométricos (1)

+ Research Equipment Co. Bryan Tx. U.S.A.

++ Mouse Chow 5015 Ralston Purina St. Louis Mo. U.S.A.

+++ Manual Tecnico Millipore. Millipore S.A. de C.V. Mexico.

B) METODOS.

Para realizar las pruebas mencionadas es necesario disponer de antisueros contra diferentes determinantes antigénicos del sistema H-2 producidos en ratón. Los protocolos de inmunización utilizados se muestran en la cuadro III.

1. Método para la producción de antisueros anti-H-2.

Se extrajo el bazo del ratón de la cepa donadora y se colocó en una caja de Petri con 10 ml de amortiguador salino de fosfatos (ASF) (28), se disgregó con un par de agujas rompiendo el tejido para liberar las células del bazo, procurando hacerlo de forma tal que se pueda obtener el máximo número de células. Se obtuvo el paquete de células y se colocó en un tubo de ensaye cónico de 10 ml (Falcon), se lavaron tres veces centrifugando a 1200 rpm durante 7 minutos, desechando el sobrenadante y resuspendiendo en ASF. Después se resuspendió el paquete celular en 15 ml de ASF, de esta solución se hizo una dilución 1:10 para cuantificar por microscopia el número de células vivas por ml. El conteo de células se hizo empleando una cámara de Neubaver y como colorante vital azul tripano al 10% (13). De la suspensión celular final se hizo una última dilución según el número de células hasta alcanzar una concentración de 5×10^6 de células por ml las que se inyectaron por via intraperitoneal una vez por semana en los ratones de la cepa receptora durante seis semanas consecutivas. Cinco días después de la última inmunización los animales se anestesiaron por inhalación de éter etílico y se sangraron a blanco por el método de incisión del plexo axilar (11).

La sangre se recaudo en frío a 5°C y posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm durante tres minutos en una microcentrifuga (+) para separar el suero del paquete celular.

El suero se guardo congelado a -20°C en alícuotas de 0.5 ml hasta el momento de usarse.

2. Método de Inmunofluorescencia indirecta.

Las células blanco se hicieron reaccionar con el antisuero anti-H-2 cuya reactividad fue revelada mediante un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina (anti-Ig) de raton hecho en cabra conjugado con fluoresceina (++) (17).

+ Microcentrifuga Beckman (B G 7). Fullerton California U.S.A.

++ Sigma Chemical Company St. Louis Mo. U.S.A.

Procedimiento:

Se obtuvieron como controles de H-2 líneas celulares de tumores murinos y células de bazo de distintas cepas de ratones con haplotipo previamente definido. Cada uno de los tipos celulares fueron lavados tres veces con amortiguador salino de fosfatos mas albúmina sérica de bovino al 3% (ASF-ASB). Un millón de células fueron incubadas durante una hora a 4 °C con un antisuero a una dilución de 1:10 en un volúmen final de 100 microlitros del mismo buffer. Posteriormente las células se incubaron con un segundo anticuerpo anti-Ig de ratón hecho en cabra conjugado con isotiosanato de fluoresceína, a una dilución de 1:10. Terminada la incubación las células se lavaron tres veces más con ASF-ASB y la positividad de la reacción fue determinada bajo un microscopio de epifluorescencia (con lámpara de tungsteno). (+)

El porcentaje de células fluorescentes fue determinado contando el número de células positivas con fluoresceína en 100 células contadas en campo claro.

3. Método de citotoxicidad directa mediada por complemento.

Se llevo a cabo un microensayo (26) en el cual cada célula blanco se hizo reaccionar con su respectivo antisuero anti-H-2 en presencia de complemento de conejo (++). La actividad citotóxica de cada antisuero se determino por la viabilidad celular empleando el colorante vital azul tripano (13).

+ Microscopio de Epifluorescencia Zeiss, Carl Zeiss de Mexico

++ LOW-TOX - m RABBIT Complement. Cedarlane Laboratories Hornby, Ontario, Canada.

Procedimiento

Se obtuvo el bazo del ratón y se disgregó con agujas de jeringa hipodérmica (20 G x 22 mm) en presencia de 10 ml de ASF. La suspensión celular se centrifugó a 1200 rpm durante 7 minutos. El paquete celular obtenido se resuspendió en 10 ml de ASF, este procedimiento se repitió dos veces más. Después se hizo una dilución apropiada para cuantificar por microscopia el número de células y en base a este resultado se hizo una dilución final a una concentración de 3×10^5 células por cada 50 microlitros. Este volumen se colocó en cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos (placas "microtest" de fondo plano, Falcon) y se utilizaron tres réplicas para cada dilución.

Se hicieron varias diluciones del antisuero anti-H-2 para determinar la dilución óptima para esta prueba. Se agregaron 50 microlitros de esta dilución a los pozos que contienen las células blanco y se incubaron a 4 °C durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se agregaron 100 microlitros de complemento por pozo y se volvieron a incubar a 37 °C durante 40 minutos. Finalmente se detuvo la reacción colocando la placa a 4 °C y se tomaron 100 microlitros de cada pozo diluyéndolos en un volumen igual de azul tripano al 10%. El conteo se hizo en una cámara de Neubaver bajo el microscopio con el objetivo seco débil.

El colorante vital tiñe a las células muertas al modificarse las propiedades de la membrana celular, las células vivas permanecen sin tefirse; el análisis de los resultados se llevó a cabo determinando el porcentaje de citotoxicidad de cada uno de los distintos antisueros mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 1 - (N - NC / M) \times 100$$

N = Número de células vivas con antisuero y complemento

NC= Número de células vivas con complemento

M = Número de células inicial

4. Método de cultivo mixto de linfocitos.

Se cultivaron células de bazo de los ratones de dos estirpes por verificar y otra control. En cada caso, las células estimuladoras fueron tratadas con mitomicina C (+). La estimulación y transformación blástica se determinó por la incorporación de timidina tritiada (+) con una actividad específica de 6.7 Ci/mmol (24).

Procedimiento:

Se uso como medio de cultivo RPMI 1640 (++) suplementado con antibióticos penicilina 100 U/ml, estreptomycin 50 mg/ml, vitaminas y suero fetal bovino al 10%. La suspensión de células se preparó sacrificando a los ratones por dislocación cervical y diseccionandolos inmediatamente para obtener el bazo de la siguiente forma: El ratón se colocó decubito lateral derecho y se hizo una pequeña incisión en la piel, descubriendo el bazo. Con la ayuda de pinzas y tijeras de microcirugía se extirpó el órgano y se colocó en una caja de Petri con medio de cultivo y se hizo cernir a través de una malla de nylon. La suspensión celular obtenida fue transferida a una jeringa y puesta en tubos cónicos de 50 ml. Las jeringas se lavaron con 5 ml de medio de cultivo; las células se resuspendieron y centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se aspiró y el paquete celular se volvió a resuspender. Esta operación se repitió dos veces más.

El total de células y la viabilidad fueron medidas simultáneamente haciendo una dilución con azul tripano al 10%. Contadas las células se hizo una segunda dilución para obtener una concentración de 2×10^6 células/ml y se colocaron en un volumen de 100 microlitros 2×10^5 células por pozo. Las células estimuladoras fueron tratadas con mitomicina C utilizando 500 microgramos por cada 5×10^6 . Procediéndose a incubar a 37°C durante 40 minutos y posteriormente se lavaron las células tres veces para eliminar la mitomicina C residual. Finalmente se colcaron 2×10^5 células en cada pozo de una placa de 96 pozos con fondo concavo (Falcon).

+ Sigma Chemical Company St. Louis Mo. U.S.A.

++ Medio de Cultivo RPMI 1640 GIBCO. Gaithersburg, MD. U.S.A.

Las células respondedoras (no tratadas con mitomicina C) se colocaron en los pozos a una concentración de 2×10^5 por pozo. Llenas las placas "microtest", se incubaron por un lapso de 5 días a 37°C con 5% de CO_2 y una humedad relativa de 95%. Al quinto día de incubación se adicionó 20 microlitros por pozo de timidina tritiada (1.0 microCurie) y transcurridas 18 horas se cosechó el cultivo en una máquina cosechadora, filtrado con papel de fibra de vidrio (Whatman No. 3). Los fragmentos de papel fueron transferidos a viales con líquido de centelleo (PPO-POPOP) y la lectura se hizo en un aparato para líquido de centelleo (+) comparando la radiactividad total incorporada entre las células de las cepas control y problema.

5. Método del trasplante de piel.

Se han descrito varios métodos para realizar el trasplante de piel (4, 6, 11, 12). El método seleccionado para verificar la isogenicidad intracepa y la heterogenicidad en los alelos diferenciales de las cepas que se probaron, es el trasplante de piel de la cola, descrito originalmente por Bailey y Usama (3). Este método fue modificado para lograr los propósitos del presente trabajo como a continuación se describe: Las hembras seleccionadas que tenían doce semanas de edad se anestesiaron intraperitonealmente con pentobarbital sódico (63 mg/kg de peso vivo) (++) y se colocaron de decubito ventral sobre una superficie estéril. El trasplante se hizo sobre la superficie dorsal del tercio craneal de la cola.

La cola se limpió lo mejor posible, se aplicó alcohol para eliminar todo el exceso de sebo superficial y se desinfectó con una solución 1:10 de un derivado de cuaternarios de amonio (cloruro de benzalconio) (+++). Se preparó el lecho del trasplante removiendo dos delgados cortes de piel de aproximadamente 5 mm de longitud separados entre sí por un centímetro y de la mitad del ancho de la cola (figura 1). Se tuvo cuidado de no cortar demasiado profundo para evitar un sangrado excesivo. El fragmento de piel retirado del lecho caudal sirvió como control colocandolo en el lecho craneal del mismo animal (autotrasplante) y el fragmento retirado del lecho craneal se colocó en otro animal (iso o alotrasplante de prueba), como se ilustra en la figura 2.

+ Beckman (LS 7500). Fullerton California. U.S.A.

++ Anestésal Smith Kline Norden de Mexico.

+++ Benzal, Laboratorios Terrier, Mexico

En tanto se prepararon los lechos para recibir los trasplantes, los fragmentos de piel se conservaron por breve lapso sobre papel filtro estéril empapado en solución salina fisiológica normal estéril y se tuvo cuidado de colocar el corte de piel en su respectivo lecho, de tal forma que los pelos queden en dirección contraria al crecimiento normal del pelo de la cola, para facilitar su posterior identificación; la piel se presionó firmemente y después se colocó un tubo de vidrio con un diámetro ligeramente mayor al de la cola, fijándolo con cinta adhesiva en el extremo caudal del mismo para proteger la zona transplantada como se observa en la figura 3.

El tubo de vidrio se retiró 72 horas después, tiempo en el cual el trasplante quedó adherido firmemente. Se debe evitar la presencia de polvo fino en el material de cama, ya que este interfiere con la cicatrización.

El tiempo de observación del trasplante fue de 89 días y se consideró rechazo agudo cuando la piel transplantada se eliminó en 21 días o menos.

III. Resultados y Discusión

Como se muestra en los cuadros genealógicos IV y V, los animales de las cepas B10 y B10.BR se perpetuaron en un proceso de consanguinidad estrecha siguiendo un esquema en línea única. Siguiendo este proceso de consanguinidad durante cuatro generaciones, se alcanzó un incremento en el coeficiente de consanguinidad del 59%, figura 4.

Como se muestra en la figura 5, la capacidad reproductiva de la cepa B10 y la línea congénica B10.BR mejoraron substancialmente, debido principalmente a las condiciones de vida brindadas en el bioterio, así como también al manejo y selección llevados a cabo.

Con respecto a la línea congénica B10.D2, esta no logró sobrevivir, debido probablemente a que se inició solo con un macho y dos hembras, una de las cuales resultó infértil y la descendencia de la otra fue muy escasa en el número de hembras.

En los animales de las cepas B10 y la línea B10.BR pertenecientes a la segunda generación filial obtenida en el bioterio, se verificó la presencia de los productos fenotípicos H-2 codificados por alelos diferenciales, mediante el método de inmunofluorescencia indirecta según fue descrito en el capítulo de material y métodos.

Como se observa en la figura 6, la cepa B10 presentó una mayor reactividad con el antisuero anti H-2^k aunque también se observa cierta reacción ante el antisuero anti H-2^b; Lo cual posiblemente se deba a la presencia de alelos de ambos haplotipos. Por otra parte la línea congénica B10.BR presentó mayor reactividad con el antisuero anti H-2^b por la presencia de alelos de histocompatibilidad diferentes al establecido por su perfil genético, sugiriendo que el haplotipo de la cepa B10 es H-2^k y el de la cepa B10.BR es H-2^b. Estos resultados preliminares nos sugirieron que ambas cepas de ratones habían sido mezclados.

Para comprobar este hallazgo, se llevaron a cabo las siguientes pruebas inmunológicas, en individuos pertenecientes a la cuarta generación:

a) Citotoxicidad directa mediada por complemento: Como se observa en la figura 7, el porcentaje de citotoxicidad para las células de bazo de la cepa B10, fue mayor en presencia del antisuero anti H-2^k, aunque también se observa un porcentaje bajo de citotoxicidad en presencia del antisuero anti H-2^b y H-2^d.

Por otra parte, las células del bazo de la línea congénica B10.BR, mostraron un mayor porcentaje de citotoxicidad en presencia del antisuero anti H-2^b. Estos resultados sugirieron una vez más la miscegenación de ambas cepas de ratones.

b) Cultivo mixto de linfocitos: Como se observa en la figura 8a, los resultados encontrados mostraron que las células de haplotipos H-2^b o H-2^d fueron estimuladas en una mayor proporción que las células de haplotipo H-2^k, por las células de bazo de la cepa B10 tratadas con Mitomicina C, presentándose una activación y formación de blastos e incorporando mayor cantidad de timidina tritiada.

Por otra parte, las células de haplotipo H-2^k fueron estimuladas en una mayor proporción por las células de bazo de la línea congénica B10.BR tratadas con Mitomicina C, mientras que se solo se encontró un porcentaje menor de activación en las células de haplotipo H-2^d; con respecto a las células de haplotipo H-2^b, el porcentaje de activación fue mínimo, figura 8b.

c) Transplantes: Como se observa en el cuadro VI, ninguno de los autotransplantes en las cepas control fue rechazado, mientras que en los autotransplantes realizados en la cepa B10 y la línea congénica B10.BR, fueron rechazados el 100% y el 33.3% respectivamente, lo que indica ausencia de isogenicidad en estas dos cepas.

En el caso de los isotransplantes, encontramos que utilizando las cepas control C57BL/6J para B10 y C.C3-H-2^k para B10.BR, todos fueron rechazados en un tiempo medio de cinco a nueve días, lo cual indica que la cepa B10 y B10.BR no comparten los mismos antígenos H-2. (figura 9).

Por otra parte, el 100% de los alotransplantes en las cepas B10 y B10.BR fueron rechazados; aunque sin embargo, la fuerza del rechazo, medida como tiempo medio de sobrevivencia varió dependiendo de la combinación particular de alelos en las diferentes direcciones del transplante (cuadro VI). En el caso de la cepa B10 con la cepa C.C3-H-2^k y la línea B10.BR con la cepa C57BL/6J, en ambas direcciones, todos los transplantes fueron rechazados, pero el tiempo medio sobrevivencia fue superior al explicado por diferencias en los productos fenotípicos del complejo principal de histocompatibilidad. Estas diferencias se pueden explicar por la participación de los antígenos menores de histocompatibilidad (21).

Los resultados de las pruebas de verificación genética sugieren que los animales de la cepa singénica B10, presentan el haplotipo H-2^k, sin embargo también se observa la presencia de algunos alelos H-2^b y H-2^d por los ensayos de citotoxicidad y cultivo mixto de linfocitos, sugiriendo además que las líneas congénicas B10.BR y B10.D2 fueron mezclados con esta cepa. Por otra parte, los resultados muestran que la línea congénica B10.BR presenta únicamente el haplotipo H-2^b.

El éxito en el mantenimiento de las cepas endogámicas se apoya en un excelente sistema de cruce el cual debe incluir un método confiable de identificación, sobre todo cuando se manejan diferentes cepas de ratones del mismo color próximos entre sí, los cuales en un momento dado pueden confundirse, como es por ejemplo el caso de las cepas albinas BALB/cAnN, C.B6H-2^b y A/J.

Para que el programa de verificación genética cumpla con su cometido, se debe establecer el perfil genético de las cepas de ratones mantenidas en el bioterio (los marcadores genéticos propios de cada cepa), además de establecer una correcta organización de las colonias de cruce (colonia de fundación, colonia de expansión y colonia de producción), así como el determinar en que momento es conveniente llevar a cabo la aplicación de las

pruebas de verificación, las cuales pueden abarcar la determinación del perfil genético por medio de los marcadores inmunogenéticos (antígenos de histocompatibilidad, antígenos de eritrocitos o antígenos de linfocitos), marcadores bioquímicos (isoenzimas) o por rasgos morfométricos (osteométricos, como es el caso del contorno de la mandíbula (11).

El valor de mantener las cepas endogámicas como tales, es decir con el perfil genético establecido, se fundamenta principalmente, en que la información que arrojan los resultados experimentales se interpreta a la luz de la comparación con la información acumulada de la cepa; si la cepa no es auténtica, la interpretación de los resultados experimentales es errónea. Además los resultados no son reproducibles.

La verificación de los alelos diferenciales en la cepa B10 y la línea congénica B10.BR mediante el uso de marcadores inmunogenéticos, empleando como controles la cepa C57BL/6J y la línea congénica C.C3-H-2^k, indican un caso evidente de miscegenación o contaminación genética, por entrecruzamiento "ilegítimo" de las cepas probadas.

IV. CONCLUSIONES

a) Se demostró la factibilidad de perpetuar y propagar las estirpes endogámicas de ratón de laboratorio B10 y B10.BR durante cuatro generaciones en proceso de consanguinidad que alcanzó un coeficiente de endogamia del 59%.

b) La cepa singénica B10 y la línea congénica B10.BR no comparten los mismos haplotipos H-2 que las cepas control C57BL/6J y C.C3-H-2^k.

c) La cepa singénica B10 mostro ser portadora de los antígenos codificados por los alelos H-2^k y la línea congénica B10.BR de los antígenos codificados por los alelos H-2^b.

d) Probablemente los animales de la cepa singénica y de las dos líneas congénicas fueron cruzados entre sí, ya que se observa el comportamiento de algunos alelos H-2^b en B10 y H-2^d en B10.BR. Y se verificó en las pruebas de transplante, también rechazos a los autotransplantes de la misma cepa.

e) La verificación de los alelos diferenciales en la cepa B10 y la línea congénica B10.BR mediante el uso de marcadores inmunogenéticos empleando como controles la cepa C57BL/6J y línea congénica C.C3-H-2^k, indican un caso evidente de miscegenación o contaminación genética por entrecruzamiento "ilegítimo" de las cepas probadas.

f) El mantenimiento de las cepas genéticamente definidas de animales de laboratorio es un trabajo altamente especializado que requiere además de la verificación continua de los marcadores propios de cada estirpe por métodos de laboratorio, para evitar cuantiosas pérdidas económicas, de productividad científica y de validez de los resultados experimentales.

VI. LITERATURA CITADA

1. Acosta, A. I.: Control de calidad genética en ratones singénicos y congénicos por un método morfométrico, Tesis de Licenciatura. I.I.B. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1989.
2. Acton, R. T. , Blankenhorn, E. P. , Douglas, T. C. and Owen, R. D.: Variation among sub lines of inbred AKR mice. Nat. New. Biol., 245: 8-10 (1973).
3. Bailey, D. W. and Usama, B.: A rapid method of grafting skin on tails of mice. Transplant. Bull. 7: 424 (1960).
4. Brown, A. M.: Skin grafting of mice using the waldemar type punch. J. Anim.Tech. Assoc., 14: 11 (1963).
5. Fernández, R. H.: Definición del perfil genético por métodos serológicos de las cepas de ratones mantenidos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis de Licenciatura. I.I.B. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1985.
6. Festing, M. F. W. and Grist, S.: A simple technique for skin grafting rats. Lab. Anim., 4: 255 (1970).
7. Festing, M.: Mouse Strain identification. Nature., 238: 351-352 (1972).
8. Festing, M. F.: Genetic monitoring of laboratory mouse colonies in the Medical Research Council Accreditation Scheme for the suppliers of laboratory animal. Lab. Anim., 8: 291-299 (1974).

9. Festing, M.: A multivariate analyses of sub line divergence in the shape of mandible in C57BL/Gr mice. Gen. R., 21: 291-299 (1974).
10. Foster, H. L. and Balk, M. W.: Histocompatibility and Isoenzyme differences in Commercially Supplied Balb/C mice a reply. Sc., 217: 381 (1982).
11. Foster, H. L., Small, J. D. and Fox, J. G.: The Mouse in Biomedical Research. 1th ed. Academic Press INC. , U.S.A., 1981.
12. Fox J. G. Cohen, B. J. and Loew, F. M.: Laboratory animal medicine. Academic Press INC., London 1984.
13. Garvey, J. S. Cremer, N. E. and Susسدorf, D. H.: Methods in immunology, 3th ed. W. A. Benjamin Inc. U.S.A. 1979.
14. Graff, R. Valeriate, F. and Medoff, G.: Brief communication marked Histoincompatibility Between and within Sub lines of AKR mice used in syngenic leukemia model. J of The Nat. Cancer inst., 55: 1015-1016 (1975).
15. Groen, A.: Identification and genetic monitoring of mouse inbred strains using biochemically polymorphisms. Lab. Anim., 11: 209- 214 (1977).
16. Hall, E. H. and White, W. J. and Lang C. M.: Acidification of drinking water: its effects on selected biologic phenomena in male mice. Lab. Anim. Sc., 30: 643-651 (1980).
17. Johnstone, A. and Thorpe, F.: Immunochemistry in practice. Blackwel Sc. Publ., 1th. ed. 1982.

18. Kahan, B., Averbach, R., Alter, B. J. and Bach, F. H.: Histocompatibility and isoenzyme differences in commercially supplied Balb/C mice. Sc., 217: 379-381 (1982).
19. Krog, H. H. and Moutier, R.: Identification of inbred strains of mice. J. Hered., 69: 66-70 (1978).
20. Lomeli, F. C.: Temperatura macroambiental no controlada en instalaciones no convencionales para animales de laboratorio. Memorias IV Congreso Nacional de AMEAL A.C. Queretaro, Qro. 1987.
21. Loveland, B. and Simpson, E.: The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor. Imm. Today., 7: 223-229. (1986).
22. Mcpherson, C. W.: Reduction of Pseudomona aeruginosa and coliform bacteria in mouse drinking water following treatment with hydrochloric acid or chlorine. Lab. Anim. Care., 13: 737-744 (1963).
23. Melby, Jr. E. and Balk, M. W.: The importance of laboratory animal genetics, health and the environment in biomedical research. Academic Press., U.S.A. 1983.
24. Simpson, E : Micromethods for induction and assay of mouse mixed lymphocyte reactions and cytotoxicity. Eur.J.of Immunol., 5: 451-455 (1975).
25. Spiegel, S. and Erichsen, S. and Sollefeld.: Animal Quality and models in Biomedical Research. Fisher Stuttgart., 1981.
26. Weir, M. D.: Handbook of experimental immunology Blackwell Scientific Publications vol 4: U.S.A. 1984.

27. Wensinck, R. VanBekum, D.W. and Renaud, H.: The prevention of Pseudomona aeruginosa infections in irradiated mice and rats., Radiation Res., 7: 491-499 (1957).

28. Williams, C. A. and Merrill, C. W.: Methods in immunology a immunochemistry. 1th. ed. vol.III Academic Press INC. U. S. A. 1968.

29. Wriht, S.: Evolution in Mendelian population. Genetics., 16: 97-159 (1931).

CUADRO I

ESPECIES, CEPAS Y TIPOS GENETICOS DE LOS ANIMALES EMPLEADOS EN EL IIB-UNAM DURANTE 1989.

ESPECIE	CEPA	TIPO GENETICO
RATON	A/J	SINGENICOS
"	BALB/cJ	"
"	BALB/cAnN	"
"	C57BL/6J	"
"	C3HeB/FeJ	"
"	DBA/2J	"
"	C. B6-H-2 ^b	ENDOGAMICOS
"	C. C3-H-2 ^k	CONGENICOS
"		RESISTENTES
"	CB6F1	HIBRIDOS F1
"	B6CF1	"
"	B6D2F1	"
"	CD2F1	"
"	CD1	EXOGENICOS
RATAS	W1STAR	EXOGENICAS
"	SPRAGUE-DAWLEY	"
HAMSTERS	DORADO	EXOGENICOS
GATOS	DOMESTICOS	CRIOLOS
CONEJOS	NUEVA ZELANDA. BLANCO	EXOGENICOS

++ Lomelí F. C.: Informe anual de actividades, Bioterios del I.I.B. UNAM., 1989.

CUADRO II

CEPAS PROBLEMA, CEPAS CONTROL, PRUEBAS QUE SE REALIZARON NUMERO DE ANIMALES, EDAD, SEXO Y GENERACION FILIAL DE LOS RATONES QUE SE UTILIZARON PARA LLEVAR A CABO EL PRESENTE TRABAJO.

RATONES		PRUEBAS INMUNOGENETICAS															
		INMUNOFLUOR. INDIRECTA				CITOTOX. DIRECTA				CML				TRANSPL. DE PIEL			
		N	E	S	GF	N	E	S	GF	N	E	S	GF	N	E	S	GF
CEPAS PROBLEMA	B10	5	12	♀	4	6	12	♀	4	4	12	♀	4	14	12	♀	4
	BR	5	12	♀	4	6	12	♀	4	4	12	♀	4	14	12	♀	4
	B6	5	12	♀	18	14	12	♀	18	5	12	♀	18	10	12	♀	18
CEPAS CONTROL	C	5	12	♀	18	14	12	♀	18	5	12	♀	18	-	-	-	-
	C.C3	12	12	♀	18	14	12	♀	18	5	12	♀	18	10	12	♀	18

N=Número de animales, E=Edad, S=Sexo, GF=Generación filial B6: C57BL/6J, C: BALB/cAnN, C.C3: C.C3-H-2^k, CML: Cultivo mixto de linfocitos.

CUADRO III

CEPAS, CELULAS, DOSIS Y NUMERO DE INMUNIZACIONES PARA
LA PRODUCCION DE ANTISUEROS ANTI-H-2.

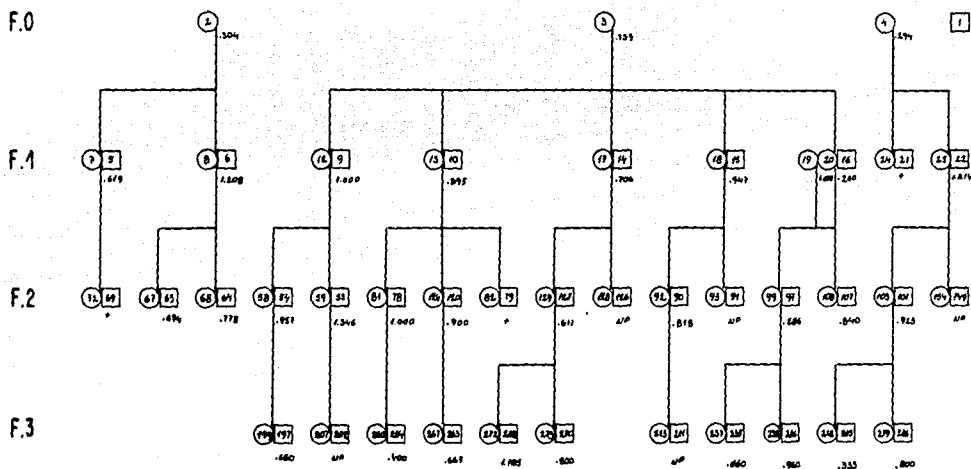
ANTISUERO CONTRA	CEPA DONADORA	CEPA RECEPTORA	INMUNOGENO	DOSIS X10 ⁶	*No. DE INMUN.
H-2 ^b	B6	C	Cels. de bazo	5	6
H-2 ^d	C	B6	Cels. de bazo	5	6
H-2 ^k	C.C3	B6	Cels. de bazo	5	6

C: BALB/cAnN, B6: C57Bl/6J, C.C3: C.C3-H-2^k.

*Numero de Inmunizaciones.

CUADRO IV

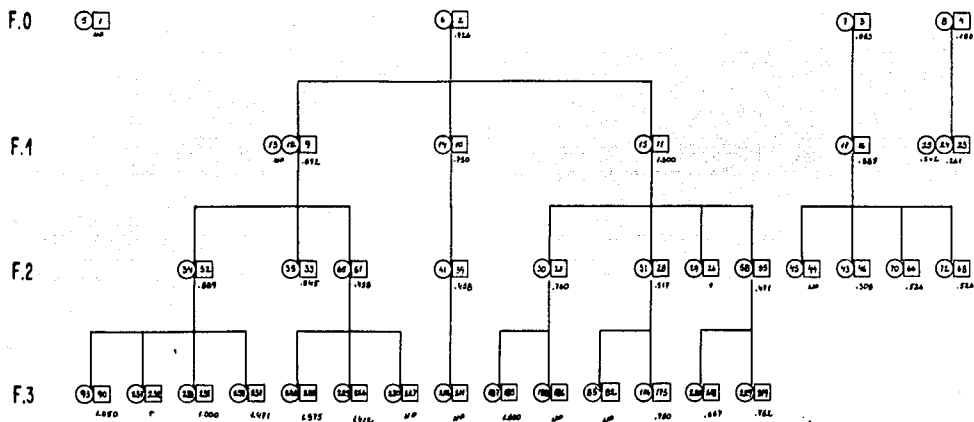
Cuadro Genealógico de la Ceba Endogámica C57BL/10



F=generación filial, O=macho, □=hembra. Los números encerrados son la identificación del animal y el inferior el número de crías/hembra/semana.

CUADRO V

Cuadro Genealógico de la Ceba Endogámica B10.BR H-2^k



F=generación filial, O=macho, □=hembra. Los números encerrados son la identificación del animal y el inferior el número de crías/hembra/semana.

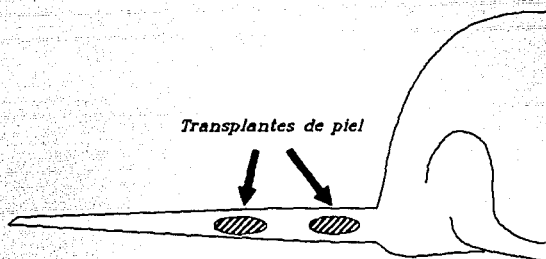
TABLA VI.

VERIFICACION GENETICA DE LA CEPA C57BL/10 Y LA LINEA CONGENICA B10.BR POR EL METODO DE TRANSPLANTE DE PIEL.

TIPO DE TRANSPLANTE	CEPA DONADORA	CEPA RECEPTORA	TIEMPO MEDIO DE SOBREV. DEL TRANSPLANTE	% DE RECHAZO
	B6	B6	82	0
	C.C3	C.C3	82	0
AUTO	B10	B10	5	100
	B10.BR	B10.BR	82	33
	B10.BR	C.C3	9	100
	C.C3	B10.BR	5	100
ISO	B10	B6	9	100
	B6	B10	5	100
	B10.BR	B10	24	100
	B10	B10.BR	7	100
ALO	C.C3	B10	26	100
	B10	C.C3	24	100
	B10.BR	B6	35	100
	B6	B10.BR	36	100

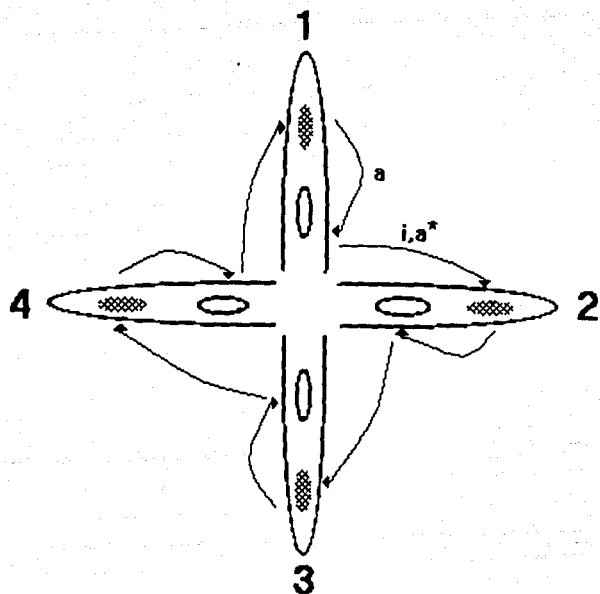
Auto= Autotransplante, Alo= alotransplante, Iso = Isotransplante Animales transplantados B6: C57BL/6J, B10: C57BL/10, C.C3: C.C3-H-2^b.

TRANSPLANTE DE PIEL.



**Fig. 1. ESQUEMA EN DONDE SE MUESTRA LA LOCALIZACION DE LOS
TRANSPLANTES EN LA COLA DEL RATON**

A)



B)

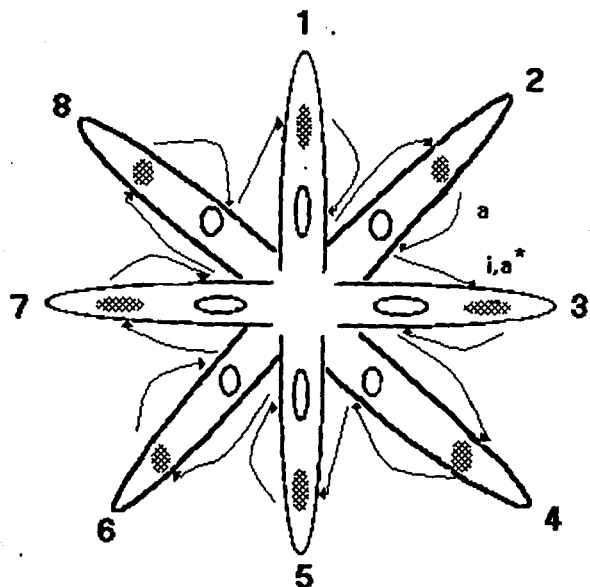


Figura 2. Sistema Circular Modificado para Transplante de Piel.

Se usaron grupos de 4 animales (a) y de 8 animales (b).
Ovalo = Transplante, a = Autotransplante
a* = Alotransplante I = Isotransplante

ESTOY EN LA ESPERANZA
SALUD DE LA ESPERANZA

FORMA DE PROTECCION AL
TRANSPLANTE

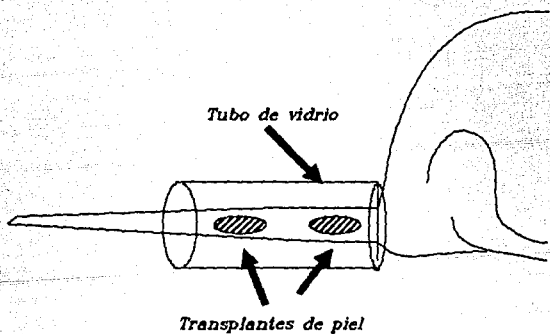


Fig. 3. ESQUEMA QUE MUESTRA LA COLOCACION DEL TUBO
DE VIDRIO PARA PROTEGER LOS TRANSPLANTES DE PIEL

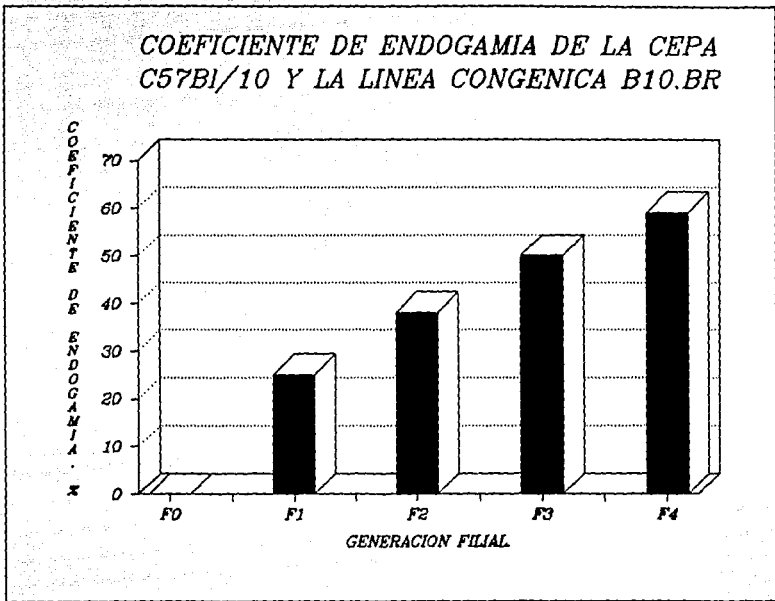


Figura 4. Coeficiente de endogamia de la cepa singénica C57BI/10 y la línea congénica resistente B10/BR. (Wright, 1931) (29).

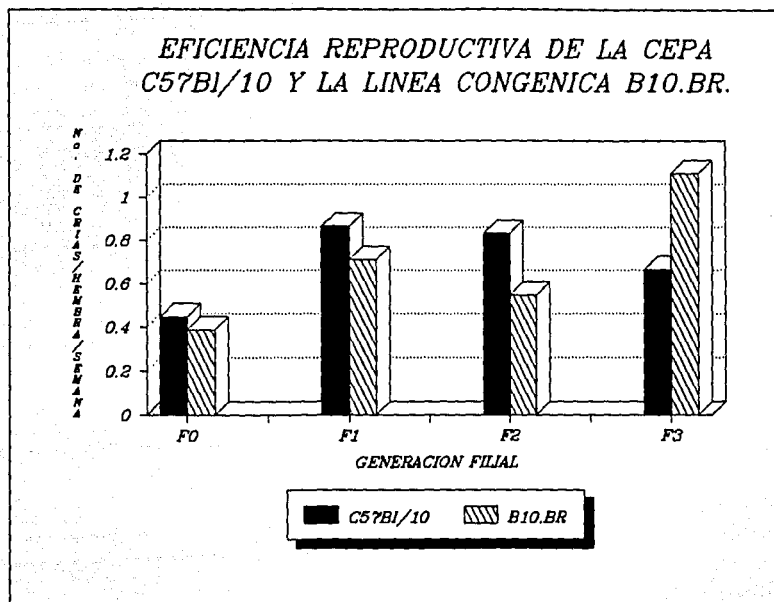


Figura 5. Número de crias destetadas por hembra apareada por semana de vida reproductiva de la cepa singénica C57BL/10 y la línea congénica resistente B10.BR.

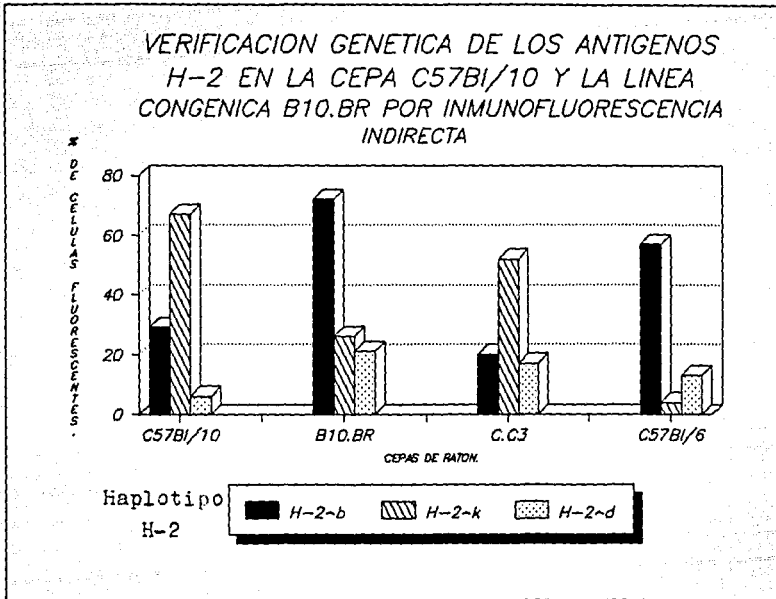


Figura 6. Porcentaje de células de bazo reactivas de las cepas problema C57BL/10 y B10.BR y de las cepas control C.C3 y C57BL/6J a los antisueros anti H-2 marcados con fluoresceína.

VERIFICACION GENETICA DE LOS ANTIGENOS
H-2 EN LA CEPA C57BI/10 Y LA LINEA
CONGENICA B10.BR POR CITOTOXICIDAD.

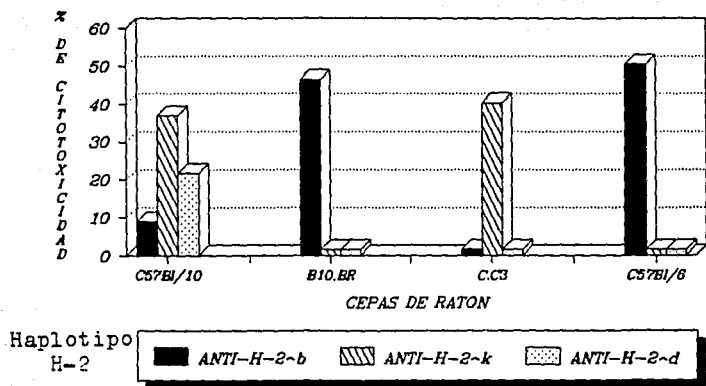
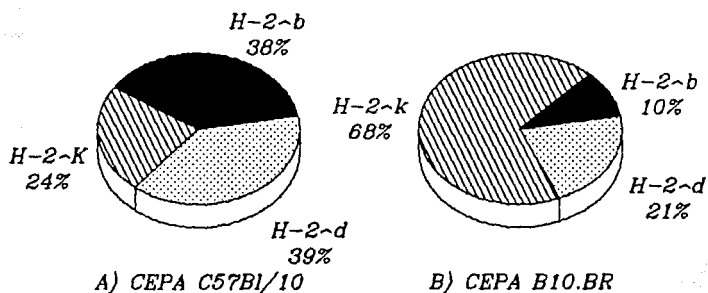


Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia de las células de bazo de las cepas problema y de las cepas control tratadas con anticuerpos anti H-2 y complemento.

VERIFICACION GENETICA DE LOS ALELOS DE
HISTOCOMPATIBILIDAD EN LA CEPA C57BL/10
Y LA LINEA CONGENICA B10.BR POR CML.



Las células de las cepas respondedoras
utilizadas fueron: C57BL/6 (H-2~b);
C.C3 (H-2~k) y BALB/c (H-2~d).

Figura 8. Porcentaje de incorporación de timidina
tritiada en células respondedoras de las
cepas C57BL/6J, C.C3 y BALB/c estimuladas
por células de bazo de las cepas C57BL/10
y B10.BR.

**VERIFICACION GENETICA DE LA CEPA
C57B1/10 Y LA LINEA CONGENICA B10.BR
POR EL METODO DE TRANSPLANTE DE PIEL.**

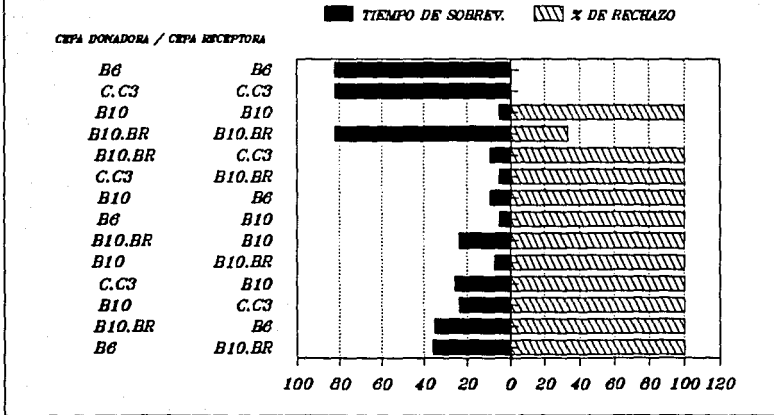


Figura 9. Tiempo de sobrevivencia de los trasplantes dado en días y porcentaje de rechazo en las diferentes direcciones en que se efectuó el trasplante de piel de la cola en los ratones.

GLOSARIO

ALELO: Formas alternativas de un gen contenido en un locus.

ALOTRANSPLANTE: Injerto efectuado entre un miembro de una especie a otro de la misma especie pero genéticamente diferentes.

AUTOTRANSPLANTE: Injerto efectuado de una parte de un individuo y colocado en otra zona del mismo sujeto.

CELULA ESTIMULADORA: Tipo celular (linfocitos), en el cual se encuentra inactivada la mitosis por incorporación de algún agente antimitótico (físico como radiación o químico como la Mitomicina C.) y tiene la función de activar a otra población celular (células respondedoras).

CELULA RESPONDEDORA: Población celular no tratada con agentes antimitóticos que al contacto con otra población celular extraña multiplica su número; llevandose a cabo una respuesta linfocítica.

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD H-2: Complejo de genes que codifican un grupo de antígenos de superficie celular denominados antígenos de transplante o de histocompatibilidad.

COMPLEJO MENOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD: Genes que sintetizan los antígenos menores de histocompatibilidad y que tienen relación con las respuestas inmunes crónicas.

CEPAS ENDOGAMICAS CONGENICAS RECOMBINANTES: Son el resultado de la selección de una recombinación de una retrocruza entre una cepa congénica y una "paterna" con la que difiere en un locus de histocompatibilidad.

CEPAS ENDOGAMICAS RECOMBINANTES: Son construidas por la cruce de individuos de la generación F2 resultado del apareo de dos cepas altamente endogámicas que son mantenidas bajo un estricto sistema de cruce endogámico.

CEPAS CONGENICAS RESISTENTES: Línea idéntica o genéticamente muy similar a una cepa endogámica excepto por la substitución del locus de histocompatibilidad introducido por cruces apropiadas con una segunda cepa endogámica y seleccionada por la habilidad de rechazar transplantes o resistir tumores.

CEPAS EXOGAMICAS: Cepas de ratones mantenidos bajo un sistema de cruce abierto donde los individuos elegidos no tienen relación de parentesco entre sí.

CEPAS SINGENICAS: Son el resultado de la cruce de individuos emparentados entre sí (hermanos) por 20 o más generaciones.

HETEROCIGOSIS RESIDUAL: Es el resultado de "fallas" de la endogamia original que no alcanza el 100% de homocigosis.

ISOTRANSPLANTE: Injerto realizado de un individuo a otro pero con la condición que sean genéticamente iguales.

MISCEGENACION: Término empleado para explicar la existencia de contaminación genética por entrecruzamiento no deseado de cepas de ratones.

MUTACION: Es la presentación de cambios en la secuencia del DNA, por sustitución, delección, o inserción de una o más bases de nucleótidos.