

23
2es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**VERIFICACION DE LA ISOHISTOGENICIDAD EN SEIS CEPAS
SINGENICAS DE RATON DE LABORATORIO POR EL
METODO DE TRASPLANTE DE PIEL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

BARRERA CARMONA ISABEL

ASESOR: M. V. Z. CIRO LOMELI Y FLORES

Mexico, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN





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.

**VERIFICACION DE LA ISOHISTOGENICIDAD EN SEIS CEPAS
SINGENICAS DE RATON DE LABORATORIO POR EL
METODO DE TRASPLANTE DE PIEL**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

Barrera Carmona Isabel
Asesor : M.V.Z. Ciro Lomeli y Flores

México, D.F.

1995

DEDICATORIA

Con mucho cariño dedico este trabajo a mis PADRES que con su apoyo incondicional y sus consejos me han formado como Mujer y Profesionista, enseñándome que solo trabajando y esforzandome se pueden lograr las metas propuestas en esta vida. Y que la mejor herencia que se puede dar es el estudio. A mis hermanos, para que no se detengan en el camino que se han trazado y lleven a buen término todos sus estudios.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi asesor MVZ Ciro Lomeli y Flores, por su apoyo y ayuda incondicional para la realización de este trabajo.

A mis amigos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., pero muy en especial a mi tío Victor por su cooperación y apoyo en este trabajo.

y

A una persona muy especial Arturo por su apoyo y compañía.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS Y DISCUSION	12
CONCLUSIONES	17
LITERATURA CITADA	19
CUADROS	24
FIGURAS	36

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS Y DISCUSION	12
CONCLUSIONES	17
LITERATURA CITADA	19
CUADROS	24
FIGURAS	36

RESUMEN

BARRERA CARMONA ISABEL. Verificación de la isohistogenidad en seis cepas singénicas de ratón de Laboratorio por el método de trasplante de piel (Bajo la dirección de : MVZ Ciro Lomeli y Flores). Se llevó a cabo la verificación de la isohistogenidad de seis cepas singénicas de ratón de laboratorio mediante el método de trasplante de piel siguiendo la técnica descrita por Billingham y Medawer ⁽⁵⁾. Se utilizaron un total de 36 ratones hembras con una edad promedio de 10.8 semanas y un rango de variación de 6 a 13 semanas, pertenecientes a las sublíneas AnN, byJ y J de la cepa BALB/c, dos líneas congénicas resistentes de la cepa BALB/c cuyos loci diferenciales son H-2b y H-2k provenientes de las cepas C57BL/6 y C3H respectivamente, y la cepa endogámica A/J. Se realizaron un total de seis isotrasplantes, es decir trasplantes entre individuos pertenecientes a la misma cepa y seis autotrasplantes dentro del mismo individuo, como controles positivos, para cada una de las cepas verificadas; el periodo de observación se extendió a 100 días. Se aceptaron el 100% de los isotrasplantes lo cual es indicativo de que los individuos verificados son isohistogénicos entre sí, dentro de cada una de las cepas probadas. Ninguno de los autotrasplantes fue rechazado, lo cual corrobora la eficacia de la técnica quirúrgica aplicada. El trasplante de piel es el método inmunogenético de verificación genética indicado para verificar la pureza de las cepas endogámicas ya que su resultado depende del efecto de decenas de loci y cientos de genes. Sin embargo, lo único que indica en este caso es que los individuos que aceptaron los trasplantes son isohistogénicos entre sí. Para afirmar categóricamente la autenticidad de cada una de las cepas son necesarias otras pruebas complementarias que corroboren la presencia de los marcadores característicos del perfil genético de cada una de las cepas.

INTRODUCCION

Los ratones domésticos (*Mus musculus*) se emplearon por primera vez en estudios experimentales en el siglo XVII. Esta época fue escenario de una importante transición en la historia de la biología, desde Aristóteles hasta este momento su principal objetivo había sido la descripción y clasificación de los fenómenos naturales. La nueva biología es una ciencia experimental, basada en la capacidad del hombre para plantear preguntas acerca del estado vivo y después idear formas de responder a tales preguntas (30).

Este cambio fundamental en el énfasis de la biología fue proclamado por los brillantes estudios de William Harvey (1578-1657) sobre la reproducción animal y la circulación sanguínea. Puesto que los ratones fueron empleados repetidamente en los detallados estudios de anatomía comparada entre animales vertebrados e invertebrados, que son el cimientó del trabajo de Harvey, los ratones han formado parte integral del método experimental desde su principio (12).

El principal problema y cualidad de la experimentación es el control; el cual debe ejercerse de manera rigurosa de modo que permita al experimentador estar seguro de que la variable dependiente es función única y exclusiva de la variable independiente y no de otros eventos (variables extrañas) que acontecen al azar, es decir, sin control por parte del experimentador y que pueden afectar los resultados del experimento invalidándolos (13).

Esto plantea un problema singular cuando el sujeto de estudio es un animal y su respuesta biológica al procedimiento experimental es la expresión de múltiples factores genéticos y medio ambientales y de sus complejas interacciones en todo momento, desde la concepción hasta la muerte (5). Esta problemática fue reconocida por los científicos enfocando sus esfuerzos hacia la construcción de poblaciones animales con una constitución genética definida (cepas endogámicas), la eliminación y/o control de los factores físicos y químicos del medio ambiente (incluida la alimentación) y la eliminación de los microorganismos capaces de causar enfermedad (28).

La importancia de la "raza" como un factor que gobierna la susceptibilidad a los tumores trasplantables y la sugerencia de que tal susceptibilidad puede heredarse fue identificada por primera vez a principios de siglo en los trabajos de Jensen, quien propagó exitosamente un carcinoma alveolar espontáneo a través de 19 generaciones, empleando una sola estirpe a la que describe como "ratones blancos" y que seguramente eran relativamente consanguíneos debido a que se habían mantenido como una colonia cerrada durante muchos años, cuando intentó trasplantar ese tumor a otras estirpes de ratones fracasó. Leo Loeb realizó hallazgos similares cuando trasplantó un tumor originado en los ratones japoneses Waltzing a otros ratones de la misma estirpe, estos ratones habían sido criados en el lejano oriente (por razones religiosas) mediante endocruzamientos durante muchas generaciones ya que sabían empíricamente que las características Waltzing (sordera congénita) era recesiva, conduciéndolos probablemente a una alta consanguinidad (20).

Estos hallazgos pusieron en evidencia la necesidad de contar con cepas endogámicas de ratones para estudiar la genética del cáncer, lo cual condujo a Clarence Cook Little en 1909 a iniciar el proceso de consanguinidad en ratones portadores de los genes del color del pelaje "dílute" (d), "brown" (b) y "non-agouti" (a) ascendientes de la actual cepa DBA, ampliamente utilizada en investigación científica en la actualidad en sus dos sublíneas principales de descendencia, DBA/1 y DBA/2 (9).

Para 1914 C.C. Little había desarrollado una explicación de la base genética del rechazo de tumores, mostrando que el patrón de susceptibilidad podía ser entendido con base en que la aceptación era dependiente de un cierto número de genes que actúan de un modo dominante de heredabilidad. Esta teoría fracasó en definir la naturaleza de los hipotéticos genes de susceptibilidad, en ese tiempo se creyó que las células neoplásicas diferían de las células normales y que esto evocaba una respuesta inmune dirigida contra esta diferencia. Sin embargo, esto no explicaba porque los tumores no se rechazaban cuando eran trasplantados dentro de la misma cepa (24).

En 1933 Haldane postuló que la inmunidad estaba dirigida contra aloantígenos en vez de antígenos específicos contra el tumor, predijo que en otros tejidos existían diferencias antigénicas semejantes a las diferencias de grupos sanguíneos y que el tumor que crecía en un tejido conservaba las características aloantigénicas de ese tejido y posteriormente especuló que los aloantígenos del tumor inducen una respuesta inmune en los animales receptores carentes de ellos. El trasplante dentro de una cepa endogámica no induce tal respuesta, porque el donador y receptor del tumor comparten los mismos antígenos (21).

En 1936 Peter Gorer publica dos artículos clásicos en los cuales demuestra que los genes de susceptibilidad al trasplante de tumores eran idénticos a los genes que codifican para aloantígenos y también demostró la base inmunológica del rechazo de tumores, forjando así la base del conocimiento del loci más ampliamente estudiado en el ratón : El Complejo Principal de Histocompatibilidad ó Complejo H-2 (22).

George D. Snell y Jack H. Stimpfling (15) resumieron estos conocimientos en las llamadas 5 leyes o máximas del trasplante de tejidos que son :

1.- Los trasplantes entre individuos de cepas endogámicas (isotrasplantes) se aceptan.

2.- Los trasplantes entre individuos de diferentes cepas endogámicas (alotrasplantes) se rechazan.

3.- Los trasplantes de individuos progenitores hacia la prole híbrida (F1) se aceptan, pero los trasplantes en sentido inverso se rechazan. Los individuos híbridos F1 son el resultado del apareamiento entre 2 cepas altamente consanguíneas (12).

4.- Los trasplantes de individuos pertenecientes a la generación filial 2 (F2) o subsecuentes hacia individuos de la generación filial 1 (F1) se aceptan.

5.- En los trasplantes de las cepas parentales hacia los individuos de la generación filial 2 (F2), los rechazos son más frecuentes que las aceptaciones.

Estas leyes con sus excepciones son vigentes y su comprensión ha permitido enormes avances médicos y biológicos; en la actualidad son rutinarios los trasplantes ortotópicos y heterotópicos de corazón y riñón, y se encuentran en etapas muy avanzadas de desarrollo los trasplantes de muchos otros órganos y tejidos e incluso, los trasplantes entre individuos de diferentes especies llamados xenotrasplantes (29).

Además de las aplicaciones ya mencionadas, el trasplante de tejidos se utiliza rutinariamente para verificar la isohistogenicidad de las cepas endogámicas, ya que cuando los individuos difieren en los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) el trasplante se rechaza en menos de 21 días y cuando los individuos difieren en los genes del Complejo Menor de Histocompatibilidad (CMH) el rechazo ocurre después de los primeros 21 días, dependiendo del número de alelos en que difieran, de su combinación particular y del sentido de la dirección del trasplante. Es por esta razón que el trasplante de tejidos es considerada la "reina de las pruebas de verificación genética" de las cepas endogámicas, porque corroboran decenas de loci y cientos de genes, ampliamente distribuidos en todo el genoma del ratón (27).

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. se inició en el año de 1982 un proyecto para mantener y desarrollar cepas de ratón de laboratorio genéticamente definidas, desde entonces el número de cepas, estirpes y colonias que se mantienen se han incrementado constantemente como se muestra en la figura 1 (18).

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 (27); 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), esta no corresponden a las esperadas en la cepa en cuestión (2,10,11,14,16,19,23) 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 (32); los efectos de esta última exceden con mucho en sus alcances a las divergencias que resultan de las dos primeras causas. Por las razones anteriormente expuestas periódicamente se verifica la autenticidad de las cepas endogámicas que se mantienen en el I.I.B. de la U.N.A.M., los resultados se han publicado en algunos trabajos (1,6,8).

HIPOTESIS

Al llevar a cabo el trasplante de piel para verificar la autenticidad de las cepas endogámicas de ratones de laboratorio se espera :

- Si los trasplantes se rechazan dentro del lapso de 21 días posteriores a la intervención quirúrgica será indicativo de diferencias genéticas en el CPH; si el rechazo ocurre después de los 21 días posteriores al trasplante las probables diferencias serán en el CMH. En ambos casos la autenticidad de la estirpe está en tela de juicio debido a las causas ya mencionadas (32).
- Si el trasplante es aceptado y no se observan evidencias de rechazo durante el periodo de observación de 100 días será indicativo que los animales son isohistogénicos, y según el criterio propuesto por Snell y Stimpfling (15) deben considerarse pertenecientes a una cepa singénica.

OBJETIVOS

En el presente trabajo se lleva a cabo la verificación de la condición isohistogénica de las seis cepas endogámicas de ratón que se describen en el cuadro 1 mediante el trasplante de piel entre individuos pertenecientes a la misma cepa (isotrasplantes). Es decir, se comprobará si los individuos representantes de cada una de las sublíneas de descendencia de cada una de las cepas endogámicas enlistadas son singénicas. Como control positivo se realizarán autotrasplantes (trasplante de piel de la superficie dorso-lateral derecha a la superficie dorso-lateral izquierda del mismo animal), en cada uno de los animales verificados.

MATERIAL Y METODOS

A. MATERIAL

Se utilizarán un total de 36 ratones hembras cuya edad promedio será de 10.8 semanas, con un rango de variación de 6 a 13 semanas, pertenecientes a tres sublíneas de la cepa endogámica BALB/c, y a dos líneas congénicas resistentes cuya primera parental es la cepa BALB/c y las cepas donadoras son C57BL/6 y C3H, respectivamente y por último la cepa endogámica A/J.

Las cepas y subcepas a verificar, la generación filial y el número de individuos empleados se muestran en el cuadro 1. Los animales se alojaron en jaulas de policarbonato tipo caja de zapato que ofrecen una superficie de 364 cm² y protegidos con filtros de poliéster tipo Kraft (+). Se alimentaron con una dieta especial para roedores (++) y agua *ad libitum* filtrada (+++) por ósmosis reversible y acidificada hasta ajustar el pH a 2.5 (24,8,17,25,26).

Los animales se mantienen en instalaciones convencionales ventiladas mediante la extracción forzada del aire en donde la temperatura varía entre 18 y 26° C (29). Los ciclos de luz obscuridad serán de 12/12 hrs.

(+) Allentown Caging Equipment Co, Inc.; Allentown, N.J.

(++) Harlan Teklad Laboratory Diets. Madison W.I.

(+++) Millipore S.A. de C.V., México, D.F.

B. METODO

1. SELECCION DE LOS ANIMALES VERIFICADOS

Se seleccionaron seis hembras de cada una de las cepas por verificar, de entre 6 y 13 semanas de edad, todas pertenecientes a las colonias fundadoras y a la misma generación filial de tal forma que haya representantes de cada una de las sublíneas de descendencia a partir de ancestros comunes, en no más de cinco generaciones ancestrales.

2. ANESTESIA

Los animales se anestesiaron con Pentobarbital Sódico (+) administrado en dosis de 62 mg/Kg. por vía intraperitoneal (7), para lo cual se prepara una dilución 1:10 del medicamento con una solución amortiguadora de fosfatos (31), y se ajusta el pH a 7.3.

3. TECNICA QUIRURGICA

Los animales anestesiados, con el área torácico dorsal de piel rasurada y antiséptica se colocan en posición decúbito ventral sobre una plataforma de poliestireno, recubierta de papel aluminio estéril; el área que se intervendrá se cubre con un campo quirúrgico desechable estéril.

El área de piel seleccionada se eleva con unas pinzas de disección hasta formar un cono, el cual se secciona con un escalpelo realizando un solo movimiento; la porción de piel seccionada se coloca sobre una gasa estéril empapada en solución amortiguadora de fosfatos (31) también estéril, raspando gentilmente la superficie interna de la misma para (+) Anestesia Laboratorio Smith Kline Beecham.

eliminar todo vestigio de pániculo adiposo; se realiza la misma operación en la región dorso-lateral izquierda del tórax. La piel retrada del lado derecho se coloca sobre la herida del lado izquierdo del mismo animal y la piel retrada del lado derecho se coloca sobre la herida del lado izquierdo del siguiente ratón y así sucesivamente hasta completar los seis ratones de cada una de las cepas. Este procedimiento se ilustra en la figura 2.

La piel trasplantada se sutura con seda del No. 6 "O" mediante puntos separados, se aplica un antiséptico tópico y se cubre con gasa estéril. La herida permanece cubierta durante la primera semana después de la intervención, momento en el cual se retira la gasa; al décimo día se retiran los puntos y el trasplante se observa diariamente durante un periodo de 100 días desde la intervención quirúrgica, llenando la información requerida en las hojas de control correspondientes.

4. EVALUACION

El tiempo de sobrevivencia de los trasplantes se hace de acuerdo al método propuesto por Jan Klein ⁽¹²⁾ llamado Tiempo Medio de Sobrevivencia y que representa el tiempo necesario para el rechazo de la mitad de los isotrasplantes (tres). Todos los autotrasplantes se deben aceptar, cualquier rechazo será indicativo de un procedimiento quirúrgico deficiente y todo el grupo se deberá repetir.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las cepas verificadas se mantienen en el I.I.B.: siguiendo un sistema de consanguinidad estrecha en líneas paralelas modificado según Hedrich en 1981 (12), para lo cual los animales se perpetúan mediante endocruzas siguiendo el Método de Apareamiento BSI (entre hermanos carnales). Se sigue el criterio de que todos los individuos de cualquier generación filial pueden encontrar una pareja ascendiente común en un máximo de cinco generaciones, para evitar diferencias en los sujetos experimentales atribuibles al efecto medio de los genes.

La organización de las colonias de crianza es de acuerdo al "Sistema de Señales de Tránsito" propuesto por Lane - Petter (9) que se muestra en la Figura 3, de esta manera el número máximo de generaciones que pueden transcurrir entre los individuos pertenecientes a la colonia fundadora descendientes de una sola pareja y los individuos empleados en el laboratorio es de diez generaciones, evitándose así diferencias genéticas ocasionadas por la deriva génica, la aparición de genes cripticos o la mutación.

Para verificar la isohistogenicidad de las cepas enlistadas en el Cuadro I, se tomaron al azar 6 individuos hembras pertenecientes a las generaciones filiales indicadas, y que fuesen representantes de las diferentes sublíneas de descendencia como se muestra en las tablas genealógicas de las Figuras 5,6,7,8, 9 y 10. Cada uno de los ratones pertenecientes a las colonias fundadoras es identificado mediante perforaciones del pabellón auricular que corresponden a los números de un código preestablecido, llamado número de registro principal; los apareos monogámicos (un macho:una hembra)

se identifican con números consecutivos, los números de registro principal de los animales verificados y el número del apareo de sus progenitores se muestran en el Cuadro 2.

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) (Figura 4), es un conjunto de genes que en el ratón se encuentran localizados en el cromosoma 17 y se designa Complejo H-2; tiene diversas funciones relacionadas con el reconocimiento de lo propio y lo extraño y la respuesta inmune tanto humoral como celular. Este segmento cromosómico se divide en 7 regiones que se clasifican de acuerdo a la homología estructural y funcional de sus productos fenotípicos en tres clases designadas con los números romanos I al III.

Los antígenos Clase I son heterodímeros de naturaleza glicoprotéica anclados a la superficie celular, la cadena más larga pesa 45 KD y presenta 3 dominios extramembranales designado $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, la cadena corta pesa 12 KD es llamada $\beta 2$ microglobulina y solo presenta un dominio extramembranal; estas moléculas se expresan prácticamente en todas las células del organismo y le confieren a este la identidad de lo propio ya que el reconocimiento antigénico se hace en el contexto de estas moléculas. Cuando existen diferencias aloantigénicas como en el trasplante de piel entre individuos de diferente cepa (alotrasplante) se evoca una respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos que tiene como consecuencia el rechazo del tejido trasplantado. Los haplotipos H-2 y los alelos Qa-9 de las cepas verificadas se muestran en el Cuadro 3. Estos antígenos son codificados por los genes de las regiones K, D/L, Qa y Tla.

Para realizar los trasplantes se seleccionó el método descrito por R.E. Billingham y P.B. Medawer (5) debido a que había sido empleado previamente para medir el grado de homocigosis en cepas endogámicas (10), a que la piel es el único tejido que fácilmente se puede trasplantar en forma ortotópica, a que su destino se puede observar diariamente y a que su evolución se puede corroborar mediante el examen histológico de biopsias repetidas sin perjudicar el bienestar del animal receptor.

Los trasplantes ortotópicos se realizaron utilizando la piel dorso-lateral del tórax, de acuerdo al esquema recíproco cíclico descrito por Bailey y Usama en 1960 (3), con una modificación consistente en llevar a cabo un autotrasplante que funcionó como control positivo de la eficacia de la técnica quirúrgica, los individuos donadores y receptores de los iso y autotrasplantes, así como de la dirección de los mismos de cada una de las cepas verificadas se muestran en los Cuadros 4,5,6,7,8 y 9.

Se realizaron un total de 36 isotrasplantes, de los cuales se aceptaron 34 y no se rechazó ninguno, la diferencia numérica es debida a que 2 ratones, 1 de la cepa BALB/cJ y otro de la cepa C.CB6-H-2b/11B murieron a la inducción anestésica, por lo tanto, el 100% de los isotrasplantes fueron aceptados y ninguno fue rechazado, lo cual indica que los individuos pertenecientes a las colonias fundadoras de las cepas verificadas son isohistogénicos entre si, como se muestra en el Cuadro 10.

La autenticidad de las cepas endogámicas de ratones de laboratorio se realiza mediante la corroboración del conjunto de genes que mejor revele su perfil genético, las pruebas de laboratorio que se utilizan para esto son de diferente índole y se agrupan en : morfológicas, inmunogenéticas, bioquímicas, osteométricas, cromosómicas y farmacogenéticas, ninguna es excluyente de la otra, todas son complementarias. En este trabajo se presentan los resultados del método inmunogenético del trasplante de piel, una de las técnicas más ampliamente usadas y más sensibles, de singular utilidad para la verificación de las cepas endogámicas, hasta el momento irremplazable por otras técnicas, ya que con ella se verifican varios cientos de genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad y del Complejo Menor de Histocompatibilidad.

Las desventajas encontradas en la aplicación de este método son el largo periodo de observación (100 días), la utilización de una gran cantidad de jaulas ya que no es recomendable colocar más de dos ratones por jaula, un intenso periodo de capacitación quirúrgica y desde luego que la isohistogenicidad no implica que la cepa sea portadora de los loci aloantigénicos correctos por lo tanto son necesarias pruebas complementarias tales como : las pruebas de progenie, las pruebas serológicas y/o el cultivo mixto de linfocitos, prolijamente descritas por Klein en 1975 (20).

La técnica quirúrgica realizada en este trabajo tiene la ventaja de que el trasplante es fácilmente identificable y fácilmente verificable su desenlace, sin embargo, su correcta ejecución requiere del desarrollo de la habilidad quirúrgica y de los cuidados pre, trans y postoperatorios, por estas razones se decidió modificar el llamado Sistema Recíproco Ci-

clico ⁽¹⁾ y realizar un autotrasplante, colocando el colgajo de piel dorso-lateral izquierdo en el lado derecho del mismo animal (Figura 2).

Como se observa en el Cuadro 11, todos los autotrasplantes fueron aceptados y ninguno fue rechazado, como se mencionó anteriormente dos ratones murieron a la inducción anestésica. El 100% de los ratones receptores de isotrasplantes aceptaron el tejido trasplantado durante el periodo de observación que se extendió a 100 días, ningún ratón rechazó antes o después de los 21 días indicativos de diferencias genéticas en el CPH o el CMH, como se muestra en el Cuadro 12. Por lo tanto, los ratones de las cepas verificadas resultaron ser isohistogénicos intracepa, para afirmar categóricamente la autenticidad de cada una de las cepas, son necesarias otras pruebas complementarias.

Como se observa en el Cuadro 11, todos los autotrasplantes fueron aceptados y ninguno fue rechazado, como se mencionó anteriormente dos ratones murieron a la inducción anestésica. El 100% de los ratones receptores de isotrasplantes aceptaron el tejido trasplantado durante el periodo de observación que se extendió a 100 días, ningún ratón rechazó antes o después de los 21 días indicativos de diferencias genéticas en el CPH o el CMH, como se muestra en el Cuadro 12. Por lo tanto, los ratones de las cepas verificadas resultaron ser isohistogénicos intracepa, para afirmar categóricamente la autenticidad de cada una de las cepas, son necesarias otras pruebas complementarias.

CONCLUSIONES

- El trasplante de piel es el método de elección para la verificación genética de las cepas endogámicas, debido a que se comprueba la isogenicidad del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) localizado en el cromosoma 17 y del Complejo Menor de Histocompatibilidad (CMH) ampliamente distribuido en todo el genoma del ratón.
- La técnica quirúrgica aplicada ⁽⁵⁾ en el presente trabajo ofrece las siguientes ventajas : el trasplante se puede realizar en forma ortotópica, es fácilmente observable, y su evolución se puede seguir mediante el examen histológico de biopsias seriadas. Tiene la desventaja de requerir un gran número de jaulas para alojar a los ratones trasplantados, y de demandar una considerable destreza quirúrgica además del prolongado periodo de observación (100 días).
- Se realizaron un total de 36 isotrasplantes, seis por cada una de las cepas verificadas, lo cual permite afirmar que los individuos probados son isohistogénicos intracepa. Ninguno de los autotrasplantes fue rechazado, lo que demuestra la capacidad para realizar la intervención quirúrgica.
- Los resultados comprueban en forma indubitable la condición singénica de las cepas verificadas y la condición isohistogénica de los individuos probados. Sin embargo, para afirmar categóricamente la autenticidad de estas cepas se sugiere la realización de otras pruebas de verificación genética que incluyan los marcadores que mejor revelen el perfil genético característico de cada una de las cepas.

- El mantenimiento de las cepas genéticamente definidas de animales de laboratorio es un trabajo altamente especializado que demanda la competencia de personal profesional capacitado no solo en los métodos y técnicas de genética aplicada a la crianza, sino también en la realización de las pruebas de laboratorio indispensables para verificar su calidad genética y así evitar las pérdidas económicas, de productividad científica y de validéz de los resultados experimentales que ocurren debido a la variación genética de estos animales.

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., Blankerhorn, 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 (1960) : A rapid method of grafting skin on tails of mice. Reconstr. Surg. Transplant. Bull 25 : 424-425.
- 4.- Baker, J.H., Russell, L.J., Welsbroth, S.H. : The Laboratory Rat., Vol. II, Academic Press Inc., (1980).
- 5.- Billingham, R.E., Medawer, P.B. : The Technique of Free. Skin Grafting in Mammals., Journal of Experimental Biology, 3. 28., (1951).
- 6.- Carreño J.J., Lomeli, C. : Verificación genética de la cepa singénica C57BL/10y y la línea congénica resistente BIO.BR H-2 de ratón de laboratorio por métodos inmunogenéticos, Tesis de Licenciatura. I.I.B. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (1991).

7.- Commission of Life Sciences : Use of laboratory animals in biomedical and behavioral research / Committee on the Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research., National Research Council, Institute of Medicine. Washington, D.C., National Academy. (1988).

8.- 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).

9.- Festing, M.F.W. : Inbred Strains in Biomedical Research, Oxford University Press N.Y. (1979).

10.- Festing, M. : Mouse Strain Identification. Nature, 238 : 351-352. (1972).

11.- Foster, H.L. and Balk, M.W. : Histocompatibility and Isoenzyme differences in Commercially Supplied Balb /C mice reply. Sc. 217 : 381 (1982).

12.- Foster, H.L., Small, J.D. and Fox, J.G. : The mouse in Biomedical Research. 1th, Vol. 1. Academic Press INC., U.S.A. (1981).

13.- Gómez, R.J. : El Método Experimental, ed. Harper & Row Latinoamericana. (1983).

7.- **Commission of Life Sciences : Use of laboratory animals in biomedical and behavioral research / Committee on the Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research., National Research Council, Institute of Medicine. Washington, D.C., National Academy. (1988).**

8.- **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).**

9.- **Festing, M.F.W. : Inbred Strains in Biomedical Research, Oxford University Press N.Y. (1979).**

10.- **Festing, M. : Mouse Strain Identification. Nature, 238 : 351-352. (1972).**

11.- **Foster, H.L. and Balk, M.W. : Histocompatibility and Isoenzyme differences in Commercially Supplied Balb /C mice reply. Sc. 217 : 381 (1982).**

12.- **Foster, H.L., Small, J.D. and Fox, J.G. : The mouse in Biomedical Research. 1th, Vol. I, Academic Press INC., U.S.A. (1981).**

13.- **Gómez, R.J. : El Método Experimental, ed. Harper & Row Latinoamericana, (1983).**

- 14.- Graff, R., Valeriate, F., and Medoff, G. : Brief communication marked Histocompatibility between and within Sub lines of AKR mice used in syngenic leukemia model. J. of The Nat. Cancer Inst., 55 : 1015-1016 (1975).
- 15.- Green, E.L. : Biology of the Laboratory Mouse., Dover Publications I.N., (1975).
- 16.- Groen, A. : Identification and genetic monitoring of mouse inbred strains using biochemically polymorphisms., Lab. Anim., 11 : 209-214 (1977).
- 17.- Hall, E.H., 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).
- 18.- Jiménez, H.V., Lomeli, C. : Provisión de roedores de laboratorio a la Comunidad Científica del I.I.B. de la U.N.A.M., Análisis retrospectivo de 1982 a 1992., Tesis de Licenciatura. I.I.B. Universidad Nacional Autónoma de México (1994).
- 19.- 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).
- 20.- Klein, J. : Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex, Springer Verlag Berlin (1975).
- 21.- Klein, J. : Natural History of the Major Histocompatibility Complex., John Wiley and Sons, N.Y. (1986).

- 22.- Klein, J. : Seeds of teine : Fifty years ago Peter Gorel discovered the h-2 Complex **Immunogenetics** 24 : 331-338 (1986).
- 23.- Krog, H.H. and Moutier, R. : Identification of inbred strains of mice. **J. Hered.** 69 : 66-70 (1978).
- 24.- Little, C.C. : A possible Mendelian Explanation for a type of inheritance apparently non-Mendelian in nature. **Science**, 40 : 904-906 (1914).
- 25.- Lomeli, F.C. : Temperatura microambiental no controlada en instalaciones no convencionales para animales de laboratorio. Memorias IV Congreso Nacional de **AMEAL** A.C. Queretaro, Qro. (1987).
- 26.- Mapherson, C.W. : Reduction of *Pseudomonas aeruginosa* and coliform bacteria in mouse drinking water following treatment with hydrochloric acid of chlorine. **Lab. Anim. Care.** 13 : 737-744 (1963).
- 27.- Melby, Jr. E. and Balk, M.W. : The importance of laboratory animal genetics, health and the environment in biomedical research. **Academic Press, INC.** (1983).
- 28.- Pérez, T.R. : Existe el Método Científico, Historia y Realidad. ed. **Fondo de Cultura Económica, México** (1990).

29.- Rhoads, J.E., Garrott, J.A. : Principios y Práctica de Cirugía., ed. Interamericana, 4a. Edición (1970).

30.- Romero, L.A., Lomeli, C. : Establecimiento de una colonia de ratas (Rattus norvegicus albinus) Cepa Consanguinea COBS SHR/NCrL Br., Tésis de Licenciatura FMVZ Universidad Nacional Autónoma de México, (1978).

31.- Rondoni, P. : Compendio de Bioquímica., 5a. ed., Ed., Labor, (1983).

32.- Spiegel, S. and Erichsen, S. and Sollefeld. : Animal Quality and Models in Biochemical Research., Fisher Stuttgart, (1981).

**CUADRO 1 : CEPA, SUBCEPA, GENERACION FILIAL Y
NUMERO DE INDIVIDUOS VERIFICADOS**

CEPA	SUBCEPA	GENERACION FILIAL	No. INDIVIDUOS
BALB / c	AnN	29	6
BALB / c	J	2	6
BALB / c	b y J	28	6
C.B6-H-2b	IIB	29	6
C.C3-H-2k	IIB	29	6
A	J	13	6

**CUADRO 2 : CEPA, No. REGISTRO PRINCIPAL, SEXO, EDAD,
IDENTIFICACION DEL APAREO DE LOS PADRES**

CEPA	No. REGISTRO PRINCIPAL	SEXO	EDAD (Semanas)	IDENTIFICACION DEL APAREO DE LOS PADRES
BALB / cAnN	4809	H	7	234
	4851	H	13	231
	4865	H	13	233
	4888	H	13	238
	4872	H	10	229
	4888	H	8	235
BALB / cbyJ	3413	H	17	271
	3414	H	17	271
	3420	H	17	278
	3421	H	17	272
	3427	H	14	275
	3430	H	14	275
BALB / cJ	135	H	12	16
	140	H	12	18
	151	H	11	21
	153	H	11	13
	155	H	9	14
	163	H	8	15
C.B6-H-2b/1B	3163	H	13	224
	3177	H	10	222
	3183	H	10	223
	3186	H	10	226
	3189	H	10	226
	3195	H	9	225
C.C3-H-2M/1B	2903	H	6	232
	2904	H	6	232
	2840	H	6	229
	2854	H	6	228
	2893	H	6	227
	2898	H	6	227
A / J	1222	H	11	107
	1225	H	11	107
	1228	H	11	111
	1233	H	11	111
	1234	H	11	110
	1238	H	11	110

H = Hembra

**CUADRO 3 : ALELOS DEL CPH EN LAS
CEPAS VERIFICADAS**

CEPA	H - 2	Qa - 9
BALB / cAnN	d	-
BALB / cbyJ	d	-
BALB / cJ	d	+
C.B6-H-2b/IIB	b	+
C.C3-H-2k/IIB	k	+
AJ	k/d	+

CUADRO 4 : CEPA, TIPO DE TRASPLANTE, INDIVIDUO DONADOR Y RECEPTOR

CEPA	DONADOR	PIEL DORSO-LATERAL	PIEL DORSO-LATERAL	RECEPTOR	TIPO DE TRASPLANTE
C.86-H-2b/1B	3163 *3163	I D	D I	3177 3163	HOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	3177 3177	I D	D I	3183 3177	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	3183 3183	I D	D I	3186 3183	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	3186 3186	I D	D I	3189 3186	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	3189 3189	I D	D I	3195 3189	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	3195 3195	I D	D I	3163 3195	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE

I = Izquierda

D = Derecha

* = Individuo muerto a la inducción anestésica

CUADRO 5 : CEPA, TIPO DE TRASPLANTE, INDIVIDUO DONADOR Y RECEPTOR

CEPA	DONADOR	PIEL DORSO-LATERAL	PIEL DORSO-LATERAL	RECEPTOR	TIPO DE TRASPLANTE
BALB/cJ	135 135	I D	D I	140 135	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	140 140	I D	D I	148 140	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	148 148	I D	D I	151 148	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	151 151	I D	D I	153 151	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	153 153	I D	D I	155 153	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	155 155	I D	D I	135 155	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE

I = Izquierda

D = Derecha

• = Individuo muerto a la inducción anestésica

CUADRO 5 : CEPA, TIPO DE TRASPLANTE, INDIVIDUO DONADOR Y RECEPTOR

CEPA	DONADOR	PIEL DORSO-LATERAL	PIEL DORSO-LATERAL	RECEPTOR	TIPO DE TRASPLANTE
BALB/cJ	135 135	I D	D I	140 136	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	140 140	I D	D I	148 140	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	148 +148	I D	D I	151 148	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	151 151	I D	D I	153 151	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	153 153	I D	D I	155 153	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	155 155	I D	D I	135 155	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE

I = Izquierda

D = Derecha

+ = Individuo muerto a la inducción anestésica

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

29

CUADRO 6 : CEPA, TIPO DE TRASPLANTE, INDIVIDUO DONADOR Y RECEPTOR

CEPA	DONADOR	PIEL DORSO-LATERAL	PIEL DORSO-LATERAL	RECEPTOR	TIPO DE TRASPLANTE
C.C3-H-2M1B	2903 2903	I D	D I	2904 2903	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	2904 2904	I D	D I	2940 2904	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	2940 2940	I D	D I	2954 2940	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	2954 2954	I D	D I	2993 2954	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	2993 2993	I D	D I	2998 2993	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	2998 2998	I D	D I	2903 2998	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE

I = Izquierda
D = Derecha

CUADRO 7 : CEPA, TIPO DE TRASPLANTE, INDIVIDUO DONADOR Y RECEPTOR

CEPA	DONADOR	PIEL DORSO-LATERAL	PIEL DORSO-LATERAL	RECEPTOR	TIPO DE TRASPLANTE
BALB/cAnN	4809 4809	I D	D I	4851 4809	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	4851 4851	I D	D I	4865 4851	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	4865 4865	I D	D I	4869 4865	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	4869 4869	I D	D I	4872 4869	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	4872 4872	I D	D I	4889 4872	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	4889 4889	I D	D I	4809 4889	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE

I = Izquierda
D = Derecha

CUADRO 8 : CEPA, TIPO DE TRASPLANTE, INDIVIDUO DONADOR Y RECEPTOR

CEPA	DONADOR	PIEL DORSO-LATERAL	PIEL DORSO-LATERAL	RECEPTOR	TIPO DE TRASPLANTE
BALB/cbyJ	3413 3413	I D	D I	3414 3413	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	3414 3414	I D	D I	3420 3414	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	3420 3420	I D	D I	3421 3420	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	3421 3421	I D	D I	3427 3421	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	3427 3427	I D	D I	3430 3427	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	3430 3430	I D	D I	3413 3430	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE

I = Izquierda
D = Derecha

CUADRO 9 : CEPA, TIPO DE TRASPLANTE, INDIVIDUO DONADOR Y RECEPTOR

CEPA	DONADOR	PIEL DORSO-LATERAL	PIEL DORSO-LATERAL	RECEPTOR	TIPO DE TRASPLANTE
AJJ	1222 1222	I D	D I	1225 1222	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	1226 1226	I D	D I	1226 1226	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	1226 1226	I D	D I	1233 1226	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	1233 1233	I D	D I	1234 1233	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	1234 1234	I D	D I	1236 1234	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE
	1234 1234	I D	D I	1222 1234	ISOTRASPLANTE AUTOTRASPLANTE

I - Izquierda
D - Derecha

CUADRO 10 : RESULTADO DE LOS ISOTRASPLANTES

CEPA	ISOTRASPLANTES					COMENTARIOS
	TOTAL	ACEPTADOS		RECHAZADOS		
		No.	%	No.	%	
BALB/cAnN	6	6	100	0	0	
BALB/cbyJ	6	6	100	0	0	
BALB/cJ	6	5	100	0	0	Un ratón murió a la inducción anestésica
C.B6-H-2b/11B	6	5	100	0	0	Un ratón murió a la inducción anestésica
C.C3-H-2M/11B	6	6	100	0	0	
A/J	6	6	100	0	0	

CUADRO 11 : RESULTADO DE LOS AUTOTRASPLANTES

CEPA	AUTOTRASPLANTES					COMENTARIOS
	TOTAL	ACEPTADOS		RECHAZADOS		
		No.	%	No.	%	
BALB/cAnN	6	6	100	0	0	
BALB/cbyJ	6	6	100	0	0	
BALB/cJ	6	5	100	0	0	Un ratón murió a la inducción anestésica
C B6-H-2n/1B	6	5	100	0	0	Un ratón murió a la inducción anestésica
C C3-H-2n/1B	6	6	100	0	0	
A/J	6	6	100	0	0	

CUADRO 11 : RESULTADO DE LOS AUTOTRASPLANTES

CEPA	AUTOTRASPLANTES					COMENTARIOS
	TOTAL	ACEPTADOS		RECHAZADOS		
		No.	%	No.	%	
BALB/cAnN	6	6	100	0	0	
BALB/cbyJ	6	6	100	0	0	
BALB/cJ	6	5	100	0	0	Un ratón murió a la inducción anestésica
C.B6-H-2b/1B	6	5	100	0	0	Un ratón murió a la inducción anestésica
C.C3-H-2b/1B	6	6	100	0	0	
A/J	6	6	100	0	0	

CUADRO 12 : CEPAS, TRASPLANTES ACEPTADOS Y RECHAZADOS ANTES Y DESPUES DE LOS 21 DIAS

CEPA	TRASPLANTES (EN 100 DIAS DE OBSERVACION)		
	ACEPTADOS %	RECHAZADOS (%)	
		< 21 DIAS	>21 DIAS
BALB/cAnN	100	0	0
BALB/cbyJ	100	0	0
BALB/cJ	100	0	0
C.B6-H-2b/1IB	100	0	0
C.C3-H-2k/1IB	100	0	0
A/J	100	0	0

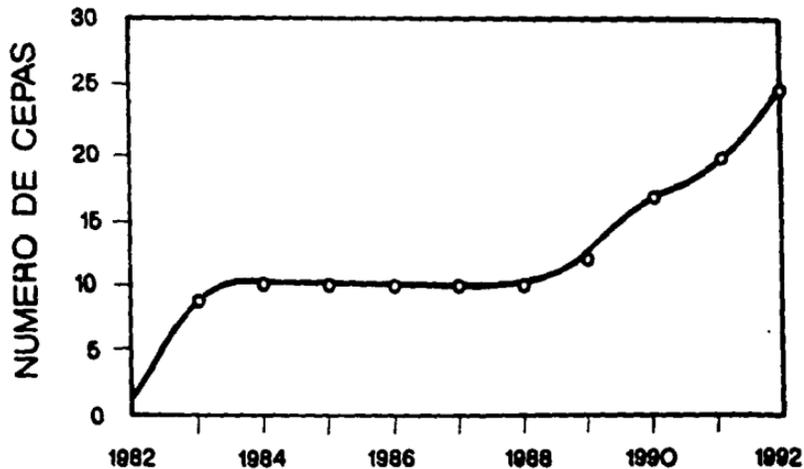


Figura. 1 TENDENCIA EN EL NUMERO DE CEPAS DE RATON EN EL I. I. B. UNAM. DE 1982 A 1992

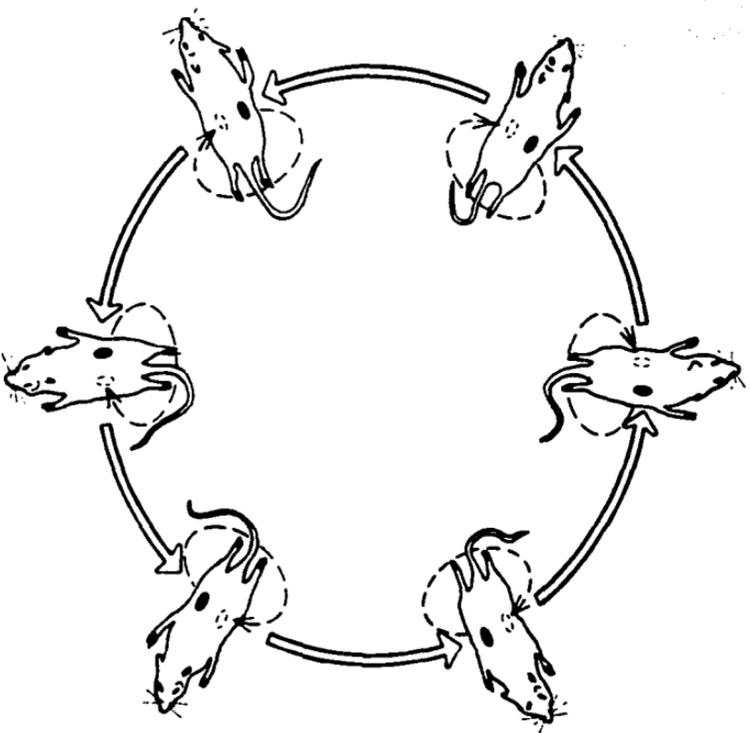


Figura 2 DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO SEGURO PARA REALIZAR LOS ISOTRASPLANTES (●) Y LOS AUTOTRASPLANTES (⋯)

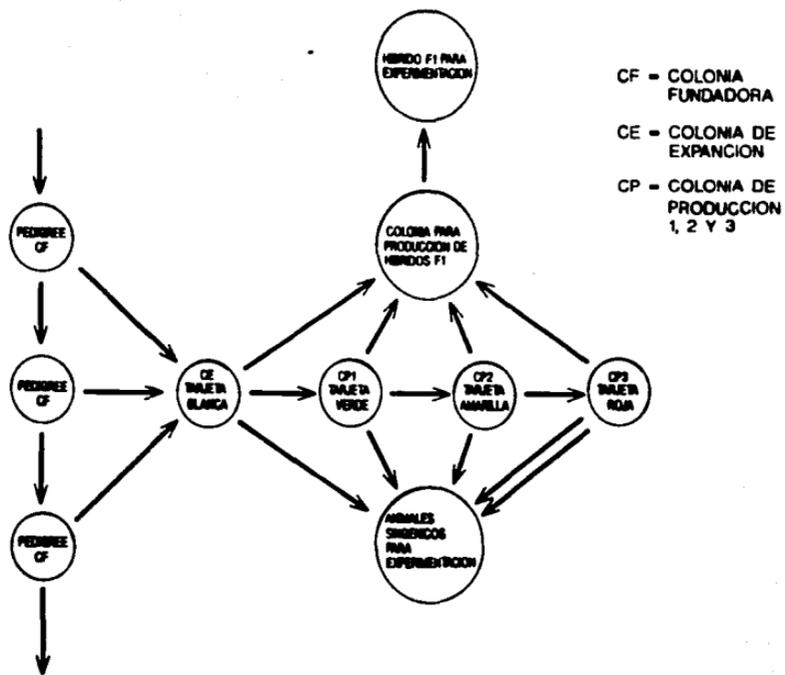


FIGURA 3 ORGANIZACION DE LAS COLONIAS DE CRIANZA EN EL I. I. B; U. N. A. M.

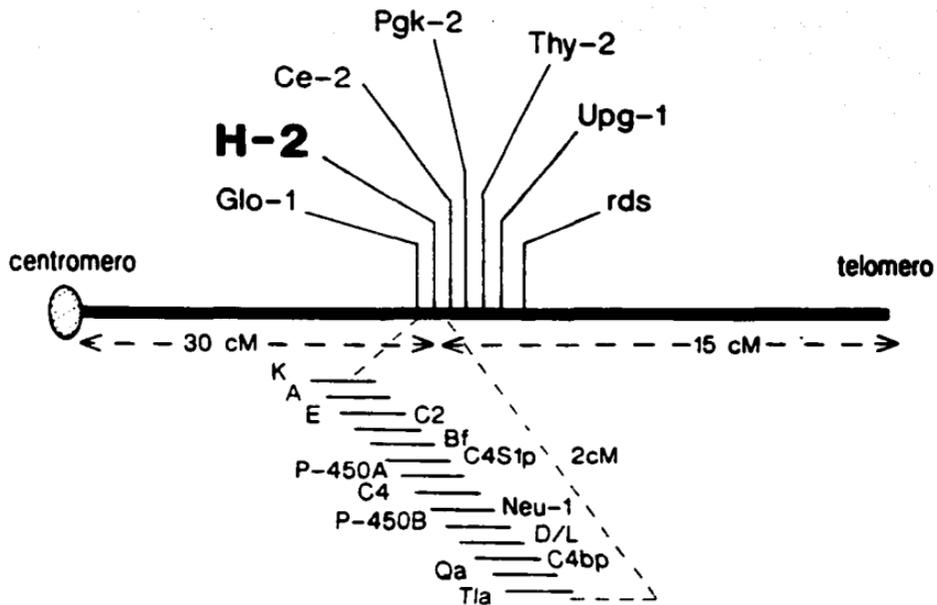


Figura 4 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD DEL RATON (COMPLEJO H-2) LOCALIZADO EN EL CROMOSOMA 17. LAS LETRAS INDICAN LAS REGIONES

GENERACION
FILIAL

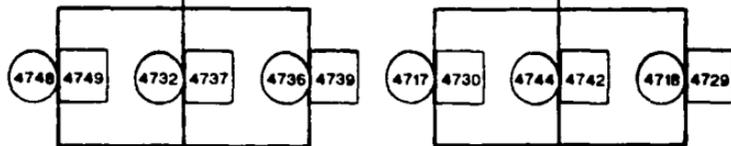
F 26



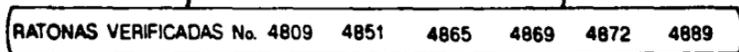
F 27



F 28



F 29



ACOTACIONES: ○ HEMBRA □ MACHO No. NUMERO DE REGISTRO INDIVIDUAL

FIGURA 5 TABLA GENEALOGICA CEPA BALB/cAnN

GENERACION
FILIAL

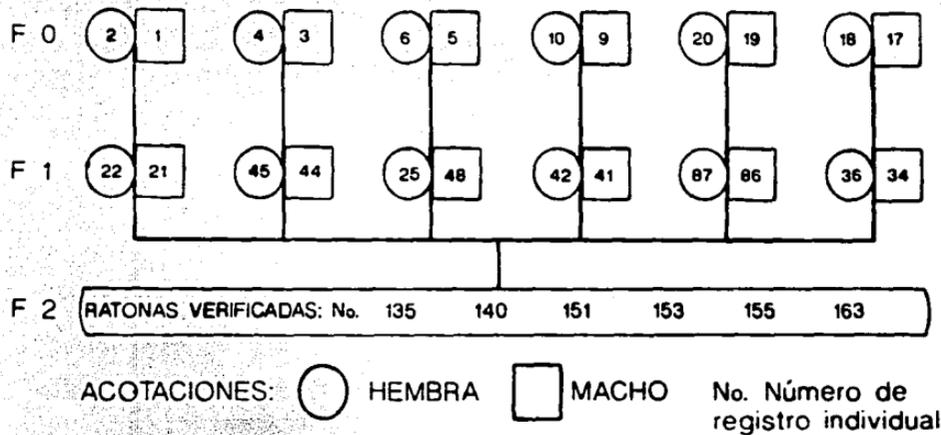


FIGURA 6 TABLA GENEALOGICA CEPA BALB/cJ

GENERACION
FILIAL

F 24



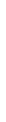
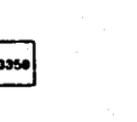
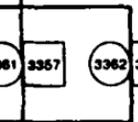
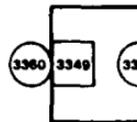
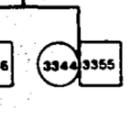
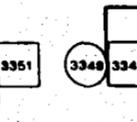
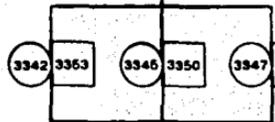
F 25



F 26



F 27



F 28



ACOTACIONES: ○ HEMBRA

□ MACHO

No. Numero de registro Individual

FIGURA 7 TABLA GENEALOGICA CEPA BALB/cbyJ

GENERACION
FILIAL

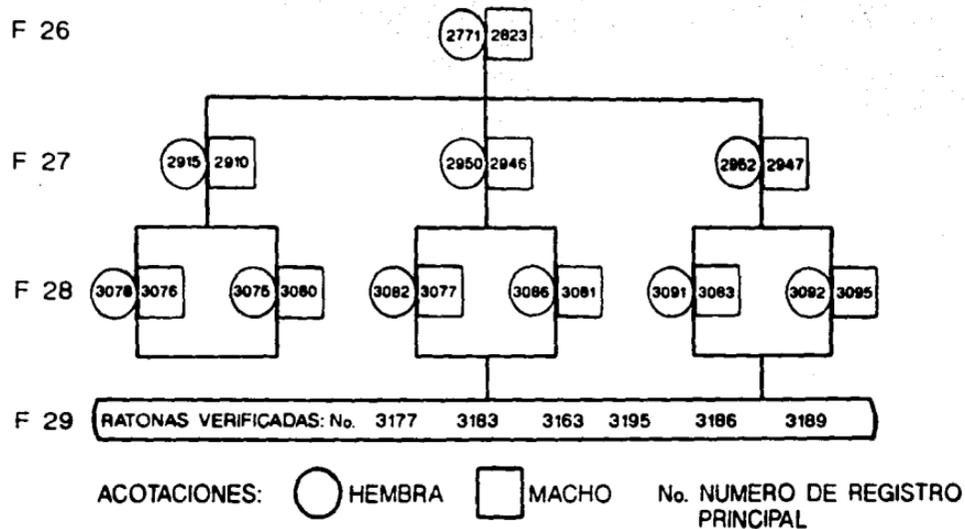
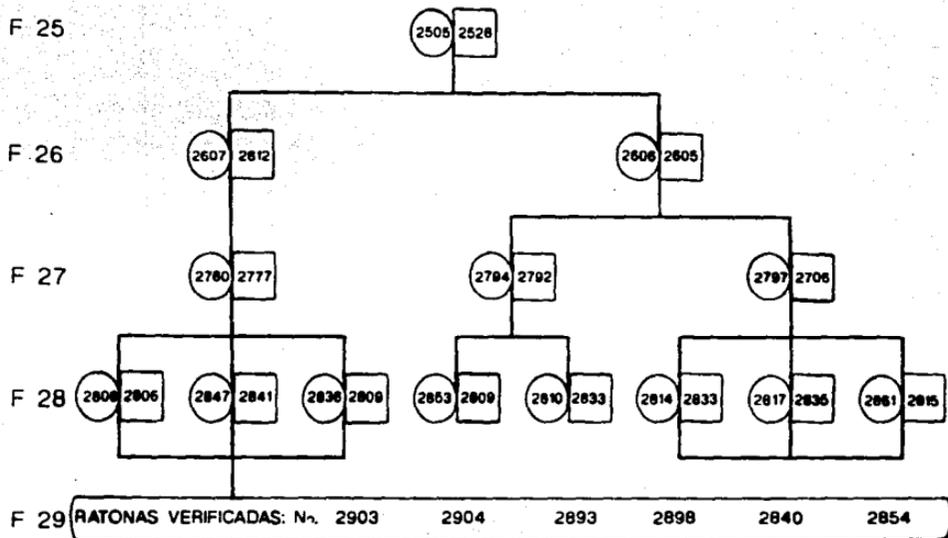


FIGURA 8 TABLA GENEALOGICA CEPA C. B6-H-2^b / IIB

GENERACION
FILIAL



ACOTACIONES: ○ HEMBRA □ MACHO No Número de registro Individual

FIGURA 9 TABLA GENEALOGICA CEPA C.C3-H-2^k / I. I. B.

GENERACION
FILIAL

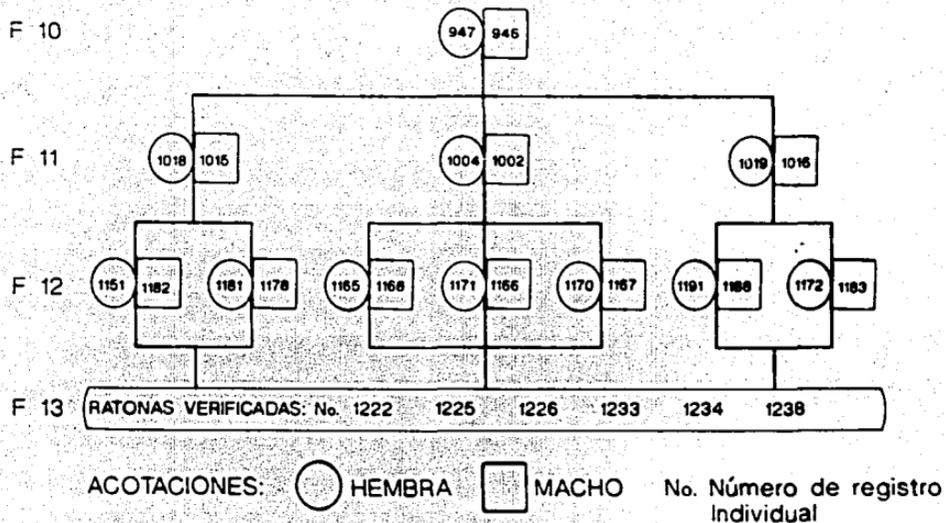


Figura 10 TABLA GENEALOGICA CEPA A/J