

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
CAMPUS IZTACALA

**SISTEMATIZACION DEL MANEJO DE
RATONES TRANSGENICOS DE LA LINEA
MURINA Δ 202**

BO 1338/97
Ej. 3

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGA
PRESENTA

YENIA AZAMAR MARTINEZ

Director de tesis: Dr. Rubén López Revilla
Departamento de Biología Celular
CINVESTAV-IPN

MEXICO, D. F.

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio No. 17 y bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla, en el departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Durante la realización del trabajo la autora fue becaria del Programa Institucional para la Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional.

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme llegar hasta aquí.

Hoy alcancé una meta más de mi vida y empiezo el camino de otra nueva meta. Al hacer un alto y evaluar lo que he logrado hasta el momento, o al levantar la vista hacia nuevos horizontes hay una persona que toda la vida estuvo y estará apoyándome y alentándome a seguir adelante en el difícil camino de la vida: mi mamá, Alicia Martínez Guzmán con todo mi amor.

A MI PAPA

José Antonio Azamar Barrios con amor por sus consejos y su apoyo que me motivaron a seguir este camino.

A MI ESPOSO:

Ricardo Jiménez Suárez con amor por compartir su vida con la mía permitiéndome aprender y conocer cosas nuevas de la vida, por su apoyo, estímulo y comprensión para seguir adelante. Gracias.

A MIS HERMANOS:

Adan y Antonio con amor con quienes he compartido alegrías, tristezas y muchas cosas de mi vida que nunca olvidaré.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de una manera muy especial al Dr. Rubén López Revilla por el apoyo en la realización de este trabajo, por sus consejos, su paciencia y sobre todo por el sinnúmero de enseñanzas que de alguna manera me prepararon para seguir en el camino.

A la Dra. Cecilia Ridaura del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría por el procesamiento y diagnóstico histopatológico de los especímenes incluidos en este trabajo.

Al Dr. Julio Muñoz del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV por su asesoría en la identificación y disección de los músculos de los ratones.

A Carlos García del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV por la tinción de los esqueletos de los ratones y la toma de las radiografías.

A Lucía Chávez Dueñas su gran paciencia y buena disposición para compartir conmigo una pequeña parte de su vida, sus conocimientos y su apoyo en la realización de los experimentos de esta tesis.

A Carlos Ignacio Soto Zárate por compartir conmigo sus conocimientos y por su amistad.

A Adrián Trejo y Crescencio Flores quienes de muchas maneras colaboraron para llevar a cabo este trabajo.

A los miembros del laboratorio: Leticia Neri, Roxana Malpica, José Luis Sánchez, Cesárea Bermúdez, Ulises Sánchez, Rocío Huerta e Ivan Núñez por los momentos que hemos compartido, la convivencia diaria y la amistad que me brindan.

A mis amigos: Nancy, Luis, Lilia, Armando y Jesús por sus consejos, su apoyo, su comprensión, su compañía y por los momentos que nos hicieron felices.

INDICE

DEDICATORIAS	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCION	9
ANTECEDENTES	14
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y METODOS	17
RESULTADOS	27
CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS	41
APENDICES	42

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. COMPONENTES PARA UNA MEZCLA DE PCR (50 μL)	24
TABLA 2. CICLOS DE INCUBACION DE LA PCR	25
TABLA 3. TAMAÑO DE LAS CAMADAS EN CRUZAS T\timesN Y T\timesT	27
TABLA 4. SINDROME DISTROFICO	30
TABLA 5. MACHOS Y HEMBRAS, TRANSGENICOS Y DISTROFICOS EN LAS 35 CAMADAS DE LAS PRIMERAS SEIS GENERACIONES	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. SECUENCIA DEL ANTIGENO T AMPLIFICADA POR PCR. _____	22
FIGURA 2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE $MgCl_2$ SOBRE LA AMPLIFICACION POR PCR. _____	28
FIGURA 3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL TRANSGEN SOBRE LA AMPLIFICACION POR PCR. _____	29
FIGURA 4. IDENTIFICACION DE LOS RATONES TRANSGENICOS POR PCR. _____	29
FIGURA 5. GENEALOGIA DE RATONES TRANSGENICOS Y DISTROFICOS. _____	31
FIGURA 6. RADIOGRAFIAS DEL ESQUELETO DE LOS RATONES DISTROFICOS. _____	32
FIGURA 7. . PREPARACIONES TEÑIDAS DEL ESQUELETO DE UN RATON NORMAL Y UN DISTROFICO. _____	33
FIGURA 8. PESO DE CINCO MUSCULOS PRINCIPALES DE LOS MIEMBROS POSTERIORES DE UN RATON BALB/C Y TRES RATONES DISTROFICOS. _____	34
FIGURA 9. CRECIMIENTO DE RATONES TRANSGENICOS Y DISTROFICOS. _____	35
FIGURA 10. . FOTOMICROGRAFIAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE UN RATON "DISTROFICO". _____	36
FIGURA 11. FOTOMICROGRAFIA DE HIGADO DE UN RATON "DISTROFICO" _____	37

RESUMEN

Los animales transgénicos tienen secuencias de DNA foráneo que han sido incorporadas al genoma de las células de la línea germinal, por lo que se heredan y se expresan en la progenie. La sustitución génica dirigida permite estudiar la expresión genética, desarrollar modelos de enfermedades humanas, producir animales especiales y proteínas terapéuticas. En este trabajo 1) se describieron los procedimientos que se han estandarizado para el cuidado y manejo de la línea transgénica murina $\Delta 202$, 2) se optimizó el método de amplificación por la reacción de polimerización en cadena (PCR) y 3) se ejemplificaron algunas de las características principales de los ratones transgénicos como modelos de enfermedad humana y describimos los métodos rutinarios que empleamos para analizarlos. La línea murina $\Delta 202$ porta el gen del antígeno T de SV40 (un oncogen inmortalizante) en estado heterocigótico, acoplado al “enhancer” de metalotioneína murina I que asegura su transcripción en el hígado. Para mantener la línea murina se cruzaron ratones transgénicos F1 (derivados de cruces de animales transgénicos heterocigotos con animales no transgénicos), con ratones no transgénicos de la cepa Balb/c. Los ratones transgénicos se identificaron con un par de oligonucleótidos de 21 bases que limitan un tramo de 728 pares de bases en la secuencia del gen del antígeno T de SV40 que se genera solamente cuando se usa como molde el DNA genómico de los animales transgénicos. De los animales transgénicos se ha obtenido una nueva línea de hepatocitos que se está analizando para determinar su potencial en ensayos de toxicidad *in vitro*. También se presentan los datos generales de una enfermedad neurológica que se observó inesperadamente en nuestra colonia transgénica; estos animales desarrollaron atrofia progresiva en las extremidades posteriores así como disminución del peso corporal. Dicha atrofia es aparente a las seis semanas de edad y se ha presentado en animales de generaciones subsecuentes. Con este trabajo se han sentado las bases para continuar el estudio de la línea $\Delta 202$ y otras líneas transgénicas murinas.

INTRODUCCION

Los animales transgénicos contienen secuencias de DNA nuevas o foráneas que se introducen en el genoma del huevo, se heredan, se expresan en la progenie y permiten desarrollar modelos para estudiar la expresión genética en ciertos tejidos.

También es posible introducir varios genes foráneos en un mismo animal a través de la cruce de animales que porten diferentes transgenes, esto permite conocer qué pasa cuando coexistan y se expresen simultáneamente varios genes en la progenie.

Para la producción de animales transgénicos primeramente se aparean machos y hembras. Las hembras quedan preñadas y al sacrificarlas se abren las trompas de Falopio y se obtienen huevos en los que todavía no se han fusionado los dos pronúcleos. Estos huevos se sujetan con una pipeta de succión (se usa un microscopio de contraste de fase invertido) y se microinyectan con una pipeta que se introduce cerca del pronúcleo masculino y está calibrado de modo que con el toque de un botón inyecta los vehículos de clonación que portan genes foráneos (Watson et al. 1992).

Los huevos microinyectados se dejan incubar todo el día y a la mañana siguiente se reimplantan en una madre adoptiva pseudoembarazada que se puso a copular al mismo tiempo que la madre real, pero con un ratón vasectomizado (no las impregna), de este modo inducen los cambios hormonales que preparan a las hembras pseudoembarazadas sincrónicamente con las que sí se embarazaron. La incubación después de la microinyección tiene por objeto identificar a los embriones dañados irreversiblemente que no siguen progresando a 4, 8, 16 células y, al día siguiente de tenerlos en la incubadora se ve cuáles crecieron y sólo éstos se reimplantan. Después de reimplantar los embriones viables se esperan los 20 días restantes de gestación para que nazcan los animales resultantes (Watson et al. 1992; Capecchi, 1994; Boyd et al. 1993).

Los animales transgénicos permiten desarrollar modelos para estudiar la expresión genética en ciertos tejidos. Por ejemplo, ver qué pasa cuando se expresa un gen normal de

la misma especie o de otra especie. Los “superratones”, que tienen el doble de tamaño que los normales se construyeron como animales transgénicos que expresan el gen de la hormona de crecimiento humana en el hígado (Palmiter *et al.* 1982). En este caso se vio que pasaba al expresarse un gen humano en el hígado de otra especie animal, órgano en el que normalmente se expresa dicho gen.

Mucha información sobre el papel de los genes *in vivo* deriva de animales transgénicos que sobreexpresan tales genes. Este tipo de experimentos depende de la naturaleza de los productos polipeptídicos codificados por los genes, así como de la especificidad e intensidad de la expresión. Los transgenes usualmente son diseñados para lograr la sobreexpresión en cierto tipo celular de un órgano; generalmente son quiméricos y están formados por una mezcla de secuencias estructurales y funcionales heterólogas que regulan el lugar, el momento y el nivel de la actividad transcripcional del transgén (Merlino *et al.* 1994).

Se puede poner el transgén de interés acoplado a un gen reportero con el que se puede ver la expresión del reportero sin necesidad de ver la del transgén. Se puede poner otro gen que permite la selección cuando uno está diseñando el vehículo; antes de ponerlo en los animales lo puede uno probar en células en cultivo y usarlo para seleccionar las células por cotransformación. La cotransformación por selección previa con un gen que da resistencia a un antibiótico es un mecanismo muy simple para aumentar la frecuencia del transgén que a uno le interesa ver seleccionado (Watson *et al.* 1992).

Otro aspecto importante para el que se emplean animales transgénicos es la generación de modelos de enfermedades humanas mediante la técnica de “*knock out*”. Por recombinación homóloga de los vehículos de clonación en los que los transgenes están flanqueados por secuencias que se recombinan en sitios cromosómicos específicos, se pueden producir animales heterocigotos para el transgén (alelo mutado) que se introduce deliberadamente en el huevo. Luego pueden cruzarse los heterocigotos transgénicos para obtener homocigotos. Existen ya varios modelos de enfermedades en líneas de animales que portan transgenes defectuosos que han sustituido a los normales.

También se pueden usar animales transgénicos para producir proteínas específicas o terapéuticas (como el factor VIII de la coagulación y algunas hormonas) que deben

sufrir modificaciones postraduccionales imposibles de duplicar en sistemas bacterianos. Para producir algunos de estos animales se dirige la expresión de los transgenes a la glándula mamaria, de modo que las proteínas terapéuticas de interés sean secretadas en la leche, de la cual pueden aislarse en su forma madura y activa (Watson et al. 1992)

Si se cuenta con oligonucleótidos iniciadores que permitan generar productos de amplificación del transgen, la identificación mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR) además de ser técnicamente más simple, es más sensible que el Southern blot (Mullis y Faloona 1987).

Una técnica poderosa, sencilla y rápida para amplificar segmentos del genoma es la reacción de polimerización en cadena (PCR)(Shizhong, 1990).

La PCR aprovecha ciertas características de la replicación del DNA. La DNA polimerasa usa cadenas sencillas de DNA como molde para la síntesis de nuevas cadenas complementarias. Este molde de DNA de cadena sencilla se puede producir por simple calentamiento del DNA de cadena doble para iniciar la síntesis. Por lo tanto, el punto de inicio (primer) de la síntesis de DNA se puede especificar suministrando un oligonucleótido que fortalece el molde en ese punto. Esta es la primera característica importante de la PCR, la DNA polimerasa puede sintetizar una región específica de DNA.

Las dos cadenas de DNA pueden servir como moldes para la síntesis, están provistas de un oligonucleótido (primers) cada una. Para la PCR, los primers son escogidos para flanquear la región del DNA que se amplifica para que la nueva cadena de DNA se sintetice, empezando en cada primer y extendiéndose más allá de la posición del primer de la cadena opuesta. Por lo tanto, el nuevo primer une sitios que son generados en cada cadena nueva de DNA sintetizada. La mezcla de reacción se calienta para separar la cadena original de la nueva, las cuales están disponibles para futuros ciclos de hibridización, la síntesis de DNA y la separación de las cadenas. El resultado neto de la PCR es que al final de n ciclos, la reacción contiene teóricamente un máximo de 2^n cadenas dobles de moléculas de DNA que son copias de la secuencia de DNA entre los primers. Esta es la segunda característica importante de la PCR, la amplificación de una región específica

Actualmente se identifican a los animales transgénicos de la línea $\Delta 202$ mediante PCR empleando como iniciadores a una pareja de oligonucleótidos iniciadores que limitan una secuencia de 728 pares de bases (pb) del antígeno T de SV40 (Bernstein *et al.* 1994). Estos oligonucleótidos fueron diseñados para determinar el RNA mensajero (mRNA) del antígeno T de SV40 en líneas celulares que expresan el transgen; los productos de amplificación se sintetizaron a partir del mRNA por transcriptasa reversa acoplada a la PCR (RT-PCR). Se encontró que los mismos oligonucleótidos funcionan con DNA genómico como molde y podemos discriminar al producto de amplificación del transgen por ser más largo (728 pb) que el del mRNA (436 pb), el cual pierde un intrón durante su maduración.

La técnica histológica es el conjunto de operaciones (fijación, cortes y coloraciones) destinadas a demostrar la disposición estructural de los tejidos.

La fijación tiene como principales finalidades evitar la putrefacción y la autólisis, ya que son la causa de las rápidas modificaciones que experimentan las células al morir.

Para evitar esto es preciso someter a los tejidos a la acción de sustancias que detengan, o reduzcan al mínimo, estas alteraciones. Esto se consigue con reactivos que solidifiquen, por coagulación o precipitación, las sustancias proteicas celulares; al mismo tiempo, esta acción endurece los tejidos, dándoles una consistencia adecuada para su tratamiento posterior.

El método de los cortes consiste en una serie de maniobras destinadas a conseguir secciones delgadas de los órganos y tejidos. La mayoría de los tejidos pueden estudiarse suficientemente gracias a este método en adición a los métodos de fijación y coloración, usando las variantes más útiles según el detalle estructural que se desee resaltar.

Los tejidos poseen una diferenciación óptica difícil de hecho, las imágenes que dan las preparaciones coloreadas son más fáciles de interpretar que las imágenes dadas por las preparaciones incoloras. Estos dos argumentos nos revelan la importancia que tienen en la técnica histológica las coloraciones, para el estudio morfológico de células y tejidos (Estrada, 1982).

Se examinaron histológicamente los siguientes órganos de ratones distróficos: Hígado, médula espinal, cerebro, riñón, corazón, adrenal, timo, diafragma, bazo, músculo estriado (gastrocnemio medial, sartorio y recto anterior).

ANTECEDENTES

1. Línea murina $\Delta 202$

Desde fines de 1995 es mantenida en el CINVESTAV una colonia de la línea murina transgénica $\Delta 202$. Estos ratones transgénicos sobreexpresan un oncogen viral inmortalizante (el antígeno T del virus SV40) en el hígado.

La construcción 202 SVE+21-MGH contiene la región temprana del virus SV40 (sin el promotor viral) y el gen de la hormona de crecimiento humana (hGH), ambos regulados por el promotor de la metalotioneína 1 (MT1) (Palmiter et al., 1985).

Esta construcción fue digerida con endonucleasa *Sma I* para eliminar más de la mitad de la región 5' (exones IV y V e intrones C y D) del gen de la hormona del crecimiento humana (Paul et al., 1988). Con la construcción obtenida, llamada $\Delta 202$, se produjeron animales transgénicos que constituyeron la línea llamada por eso $\Delta 202$ a partir de ratones CD2F1 obtenidos de cruces de animales de la cepa DBA con la cepa Balb/c (Dieter Paul, comunicación personal). Estos animales portan en estado heterocigoto el oncogen viral inmortalizante que codifica el antígeno T de SV40. Esta nueva línea murina fue producida para que el oncogen fuese expresado en el hígado y para tratar de obtener líneas de hepatocitos que mantengan sus características diferenciadas en cultivo. Los animales heterocigotos transgénicos de la línea $\Delta 202$ empiezan a desarrollar tumores principalmente hepáticos a los 3-7 meses y la muerte sobreviene precozmente, antes del año de edad (Paul et al. 1988).

2. Identificación por Southern blot

Los ratones transgénicos deben ser identificados habitualmente mediante la técnica de Southern blot, en la que se emplea DNA genómico aislado de un fragmento de la cola de ratones de al menos tres semanas. El DNA purificado se corta con una endonucleasa de restricción, los fragmentos se separan por electroforesis en geles de agarosa, se transfieren

a membranas de nylon y se hibridan con una sonda radiactiva de secuencia complementaria a la del transgen. Los fragmentos de DNA transgénico que hibridan con la sonda radiactiva dan una señal que consiste en una banda de tamaño característico. Los ratones fundadores de líneas transgénicas usualmente son heterocigotos porque el transgén se incorpora solamente en uno de los dos cromosomas de una pareja de homólogos. Los heterocigotos pueden cruzarse entre sí para obtener homocigotos que, si son viables y fértiles, tienen la ventaja de no requerir ser identificados en cada generación.

Si el transgén en estado homocigótico provoca infertilidad o inviabilidad de los embriones, la línea transgénica puede mantenerse solamente en estado homocigótico y hay que identificar todos los individuos en las camadas de las generaciones filiales (F1), resultantes de cruzar transgénicos heterocigotos con animales no transgénicos. Deben seleccionarse los F1 transgénicos de cada cruce y apartarse para el mantenimiento de la línea o la producción de lotes de animales para experimentación.

Si se cuenta con oligonucleótidos iniciadores que permitan generar productos de amplificación del transgén, la identificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) además de ser técnicamente más simple, es más sensible que el Southern blot (Mullis y Faloona 1987).

3. Síndrome distrófico en la línea $\Delta 202$

A fines de 1995 inesperadamente se observó en el laboratorio del Dr. López Revilla que tres ratones transgénicos, miembros de la tercera generación de la línea $\Delta 202$ desarrollaron parálisis y atrofia de las extremidades posteriores. Esta parálisis parecía seguir una vía ascendente ya que algunos ratones mostraban afectadas, también, las extremidades anteriores.

Este fenotipo “distrófico”, que parece constituir un nuevo modelo de enfermedad neurológica debida a la expresión del transgen, ha aparecido con penetrancia incompleta en las generaciones subsecuentes.

OBJETIVOS

GENERAL

Estandarizar los procedimientos necesarios para el mantenimiento de la línea transgénica $\Delta 202$, que nos permitan realizar investigaciones futuras con la misma y con otras líneas de ratones transgénicos

PARTICULARES

1. Estandarizar los procedimientos necesarios para el manejo de la línea $\Delta 202$ (Apareamientos, cruzas T N, cruzas T T, destete, separación, marcaje, y registros)
2. Identificar los ratones transgénicos de la línea $\Delta 202$ mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR)

MATERIALES Y METODOS

A. Mantenimiento de la línea transgénica $\Delta 202$

1. Línea murina $\Delta 202$

El macho transgénico fundador de la colonia mexicana (79.7) nació el 17 de marzo de 1994 en Hanover. fue traído a México en abril de 1994 y sacrificado el 2 de diciembre de 1994, a los nueve meses de edad.

Para mantener la colonia transgénica cruzamos los ratones F1 transgénicos identificados por PCR con ratones de la cepa Balb/c del bioterio del CINVESTAV

2. Marcaje

Para identificar y manipular a los ratones se enumeraron de la siguiente manera pintándolos de amarillo con ácido picrico en diferentes zonas del cuerpo: 1) sin marca, 2) lomo, 3) cabeza, 4) extremidad posterior derecha, 5) extremidad posterior izquierda, 6) extremidad anterior derecha y 7) extremidad anterior izquierda.

B. Cultivo de hepatocitos

Línea fetal

Con ratones transgénicos de la colonia alemana ($\Delta 202$) se estableció una línea de hepatocitos fetales inmortalizados que expresan el antígeno T de SV40, y se multiplican en el medio MX83, químicamente definido y deficiente en arginina. Estos hepatocitos en cultivo expresan proteínas específicas de hígado (e.g., albúmina, α -fetoproteína y tirosinaminotransferasa).

Esta línea de hepatocitos fetales se mantiene en el laboratorio del Dr. Tomás Mendoza en el Departamento de Farmacología y Toxicología del CINVESTAV.

Línea adulta

A partir de un ratón transgénico adulto hembra nacido en México (designado con la clave 940101) fue establecida una línea de hepatocitos adultos cultivados en medio MX83 en el laboratorio del Dr. Tomás Mendoza, se trataba de una hembra blanca de la primera camada obtenida al cruzar el macho fundador 79.7 con una hembra Balb/c. Nació el 23 de mayo de 1994 y al ser sacrificada el 20 de abril de 1995 (a los 11 meses de edad) tenía aspecto normal, excepto por dos áreas alopecicas en el cuello y en la parte distal del abdomen, de 1.5 cm² y 0.5×0.8 cm respectivamente.

La hembra fue anestesiada para diseccionar el lóbulo izquierdo del hígado, el derecho fue perfundido a través de la vena porta con una solución de colagenasa. El tejido perfundido se desgarró y quedaron grumos, por lo que el cultivo primario fue más bien un explante.

C. Mantenimiento de la colonia transgénica**1. Apareamientos**

Las hembras transgénicas fueron apareadas con una edad de cuatro a seis semanas con machos Balb/c maduros, es decir de al menos seis semanas de edad. Cada macho fue apareado con cuatro hembras Balb/c.

2. Cruzas TxN

Para mantener la colonia murina $\Delta 202$ se cruzaron animales transgénicos (T) (heterocigotos F1) con ratones Balb/c normales (N), estas cruzas se denominaron T×N.

3. Cruzas TxT

También se cruzaron machos transgénicos (T) con hembras transgénicas (T) para la obtención de individuos transgénicos homocigotos, este tipo se identificó como T×T.

4. Destete, separación y marcaje

Las crías fueron sexadas y destetadas a los 21 días de edad, se colocaron separadamente los machos de las hembras en jaulas diferentes para la identificación individual de cada ratón, estos seron marcados utilizando el sistema de muescas (apéndice 8) y la tinción de diferentes zonas del cuerpo con ácido pícrico.

5. Registros

Los datos de los animales se registraron en tarjetas que fueron colocadas en cada jaula dentro de un sobre de plástico transparente: 1) camadas destetadas y sexadas, 2) machos transgénicos adultos, 3) hembras transgénicas adultas, 4) hembras no transgénicas adultas y 5) camadas para identificar animales transgénicos (Apéndices 1-5).

Después del destete y la separación por sexo de los animales de cada camada, en cada jaula colocamos una tarjeta por cada ratón transgénico identificado.

Registramos el curso temporal de la ganacia de peso (g) dos veces por semana de cada uno de los ratones en forma tabular para cada camada (Apéndice 6).

D. Caracterización macroscópica

1. Curvas ponderales

Después del destete, se pesaron los ratones dos veces por semana (lunes y viernes), y con estos datos se elaboraron las curvas ponderales.

2. Estudio del esqueleto

Radiografías. Se tomaron radiografías laterales y ventrodorsales de animales completos con una intensidad de los rayos X de 50 Kv y un tiempo de exposición de 1/60 seg esto se realizó en la unidad de radiología de la FES Cuautitlán UNAM.

Preparaciones teñidas. Con los mismos ratones se realizó la tinción de huesos y cartilagos con rojo de alizarina y azul alciano (McLeod, 1980), de la siguiente manera: a los ratones recién sacrificados se les reseco la piel, grasa subcutánea y vísceras y se fijaron con etanol al 95% por cinco días. Después se colocaron 2 días en acetona para eliminar la

grasa y rigidizar el cuerpo y se incubaron 3 días a 37°C en la solución de tinción (rojo de alizarina al 0.1% en etanol al 95% y azul alciano al 0.3% en etanol al 70%) (Apéndice 9) y luego se lavaron con agua destilada. Se aclararon las preparaciones primero con KOH al 1% por 12-48 horas y después en las siguientes soluciones sucesivas de glicerol/KOH al 1%: (vol/vol): 1:4, 1:1 y 4:1; el tiempo total de inmersión en estas soluciones fue de 2 semanas. Los cuerpos teñidos y aclarados fueron almacenados a temperatura ambiente en glicerol.

3. *Necropsias*

Se observaron, se describieron los hallazgos y se tomaron muestras de los órganos afectados en una forma especial (Apéndice 7).

Se disecaron y se pesaron cuidadosamente cinco de los músculos principales (gastrocnemio lateral, gastrocnemio medial, sóleo, sartorio y recto anterior) de las extremidades posteriores de ratones distróficos y Balb/c.

E. Caracterización microscópica

Técnicas histológicas

Se fijaron las muestras en formaldehído al 10% amortiguado con fosfatos; las muestras se incluyeron en parafina para obtener cortes de 7-8 μm que fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

F. Obtención del DNA

1. De la cola

Se cortaron con tijeras 1 cm de la cola a 63 ratones de la cuarta generación que se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml; se le adicionó a cada tubo 550 μl de regulador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH8) y 40 μl de RNasa (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y se incubaron 1 h a 37°C. Posteriormente se le agregaron 40 μl de proteinasa K (10 mg/ml), se agitó con el vórtex y se incubaron los tubos a 56°C toda la noche en agitación.

Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y se agregó un volumen de fenol equilibrado, se mezclaron los tubos por inversión suave durante 10 min, se

centrifugaron 5 min a 15,000 rpm, se colocaron las fases acuosas en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se repitió la extracción fenólica 2 veces; se precipitó la fase acuosa con 0.2 volumen de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío.

Las muestras se centrifugaron por 5 min a 15,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se invirtieron los tubos Eppendorf sobre papel para eliminar el alcohol; se agregó 1 ml de etanol al 70% frío, se mezclaron suavemente por inversión y se centrifugaron por 5 min a 15,600×g, se repitió el lavado con etanol. Finalmente se eliminó el etanol invirtiendo los tubos Eppendorf sobre papel durante 30 min, se disolvió cada pastilla de DNA con 50 μ l TE, y se guardaron las muestras de DNA a -20°C.

Para cuantificar el DNA se hicieron diluciones 1:40 de las muestras. Se agregaron 4 μ l de DNA de cada ratón a tubos Eppendorf de 0.5 ml con 156 μ l TE. Se tomaron lecturas del DNA a 260 y 280 nm (la lectura fué aproximadamente 1.75). Se calculó la concentración del DNA en unidades de A_{260} (50 μ g/ml).

2. De la oreja

Se hizo la identificación de ratones transgénicos de la quinta y sexta generación con fragmentos de orejas, que se digirieron con regulador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH8), adicionándole proteinasa K. Estas mezclas se incubaron por 15 min a 55°C, se mezclaron con el vórtex, se reincubaron a 55°C por 15 min, se llevaron a un volumen de 200 μ l y se hirvieron. Se usó 1 μ l de cada muestra para las mezclas de PCR.

Amplificación del DNA por PCR

1. "Primers"

Los dos oligonucleótidos (21-mers) empleados para la identificación del transgen por PCR fueron diseñados originalmente por Bernstein *et al.* (1994) y sintetizados en el Departamento de Genética del CINVESTAV-IPN. Tienen un producto de 728 pares de bases, el cual incluye una parte del exón 1, todo el intrón 1 y una parte del exón 2 del antígeno T de SV40 (Fiers *et al.*, 1978), se prepararon a una concentración final de 50 ng/ μ l con agua estéril y se almacenaron a -20°C.

SECUENCIA DEL ANTÍGENO T AMPLIFICADA POR PCR (728 pb: 4361-5089)

EXÓN 2 (2691-4571)-INTRÓN 1 (4572-4897)-EXÓN 1 (4898-5163)

Oligómeros: "sense", 21-mero (4361-4381); "antisense", 21-mero (5069-5089)

```

4321 tcctttgtgg tgtaaatagc aaagcaagca agagttctat TACTAAACAC AGCATGACTC
4381 AAAAAACTTA GCAATCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT CTACCTTCTT CTTCTTTTTT
4441 GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTCTTCTT
4501 GAGCAAAACA GGTTTTCTC ATTAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCACTT ATCAGTTCCA
4561 TAGGTTGAA TCTAAAATAC AACAACAATT AGAATCAGTA GTTAAACACA TTATACACTT
4621 AAAAATTTTA TATTEACCTT AGAGCTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTG CAATTATGTC
4681 ACACCACAGA AGTAAGGTTT CTTACAAAG ATCAAGTCCA AACCACATTC TAAAGCAATC
4741 GAAGCAGTAG CAATCAACCC ACACAAGTGG ATCTTCTCTG TATAATTTTC TATTTTCATG
4801 CTTCATCTCT AGTAAGCACA GCAAGCATAT GCAGTAGCA GACATTTTCT TTGCACACTC
4861 AGGCCATGT TTGCAGTACA TTGCATCAAC ACCAGGATT AAGGAAGAAG CAAATACCTC
4921 AGTTGCATCC CAGAAGCCTC CAAAGTCAGG TTGATGAGCA TATTEACTC CATCTTCCAT
4981 TTTCTTGTAC AGAGTATTCA TTTTCTTCAT TTTTCTTCA TCTCCTCTT TATCAGGATG
5041 AAACTCCTTG CATTTTTTTA AATATGCCCT TCTCATCAGA GGATATTCC cccaggcaact

```

Figura 1 Secuencia del antígeno T amplificada por PCR.

Segmento que abarca las secuencias exón 2-intrón 1-exón 1 del gen del antígeno T de SV40, en mayúsculas se señala el segmento amplificado por PCR (728 pb: 4361-5089).

2. Precauciones

Como la reacción de polimerización en cadena permite identificar desde la presencia de una sola molécula de DNA, deben tomarse precauciones para prevenir la contaminación de las mezclas de reacción con trazas de DNA que podrían servir de molde. Estas precauciones que se siguen son esenciales cuando se amplifican secuencias blanco presentes en concentraciones bajas (Sambrook et al., 1989):

1. Se montan las reacciones en una campana de flujo laminar
2. Se mantienen exclusivamente para PCR campana, microcentrifuga y se usan guantes, material y pipetas desechables
3. Se preparan los reactivos con puntas de pipetas desechables

4. Se autoclavean los amortiguadores y las puntas de pipetas antes de usarlos
5. Se usan guantes nuevos al empezar a trabajar en el área de PCR
6. Se cambian los guantes con frecuencia
7. Se prepara un juego de reactivos propios almacenados en alícuotas pequeñas, en una sección especial de un congelador. No se usan estos reactivos para otros propósitos. Se preparan con cristalería y material de plástico nuevos y pipetas no expuestas a otros DNA usados en el laboratorio. Después de usar los reactivos, se descartan los sobrantes y no se vuelven a almacenar
8. Para reducir la posibilidad de contaminación de guantes y pipetas, antes de abrir los tubos con reactivos de PCR, se centrifugan brevemente (10 seg) en la microcentrifuga de la campana
9. Es mejor añadir todos los componentes de la reacción al tubo antes del DNA molde. Una vez añadido el DNA molde, se tapa el tubo y se mezcla el contenido golpeando suavemente un lado con un dedo enguantado
10. Al añadir el DNA molde a una mezcla de reacción, se evita la formación de aerosoles que puedan contaminar otras reacciones. Se mantienen bien cerradas las tapas de todos los tubos que no estén en uso inmediato. Se cambian los guantes después de manejar tubos con DNA molde

Se incluye siempre un control positivo (reacción con pequeña cantidad de secuencia blanco apropiada). Esta se prepara en una área diferente del laboratorio, para prevenir la entrada de soluciones concentradas de DNA blanco al área exclusiva de PCR. Se incluye también un control negativo que contiene todos los componentes de la reacción excepto el DNA molde. Este control se prepara después de todas las reacciones (Sambrook et al., 1989).

3. Mezcla de reacción

A continuación se especifican los componentes para una mezcla de reacción.

a. Oligonucleótidos (21 meros)

1) Sentido: AATATTCCTCTGATGAGAAAG

2) Antisentido: TACTAAACACAGCATGACTCA. Se ajustan las soluciones madre a 50 ng/ μ l con agua estéril y se almacenan a -20°C . De cada oligonucleótido tomamos 1 μ l por mezcla de reacción.

b. Desoxirribonucleósidos trifosfato

4dNTPs 2mM c/u (USB Cat. No. US77170).

c. MgCl_2

MgCl_2 30 mM.

d. Amortiguador.

Amortiguador 10x para PCR que contiene Tris-HCl 100 mM pH 8.4, KCl 500 mM.

e. Taq DNA polimerasa

Taq polimerasa 5 U/ μ l

f. DNA problema: 1 μ l

Tabla 1. Componentes para una mezcla de PCR (50 μ l)

Componente	μ l
Amortiguador PCR 10 \times	5
MgCl 30 mM	5
Mezcla dNTPs (2 mM)	1.25
Oligo 1 (50 ng/ μ l)	1
Oligo 2 (50 ng/ μ l)	1
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/ μ l)	0.25
H ₂ O bidestilada estéril	35.5
Mezclar (pipeteo suave, no vórtex)	
DNA problema	1

g. Ciclos de incubación

La incubación en el termociclador Perkin-Elmer (Gene Amp PCR system 2400) fue programada para 32 ciclos de amplificación (como se describe en la tabla 2).

Tabla 2. Ciclos de incubación de la PCR

No. ciclos	Tiempo	Temperatura
1	3 min	94° C (desnaturalización inicial)
30	30 seg	94° C (desnaturalización)
	30 seg	53° C (apareamiento)
	1 min	72° C (polimerización)
1	10 min	72° C (alargamiento final)

4. Análisis de los productos de amplificación

Se analizaron los productos de amplificación por electroforesis en geles de agarosa al 2%-TAE (Tris-acetato/EDTA) (Tris base, Acido acético glacial y EDTA pH 8.0).

Se sellaron las orillas de la placa de corrida con masking-tape, se colocó el peine y se prepararon 350 ml de TAE 1 \times . Para formar el gel, pesamos 0.8 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, le añadimos 40 ml de TAE y 1 μ l de EtBr (10 mg/ml). Se fundió la mezcla a intensidad máxima por 1 min en el horno de microondas y se dejó enfriar hasta unos 60°C. Se vació en la placa de corrida, se esperó a que gelificara para quitar el peine y se colocó el gel en el aparato de electroforesis submarina (BRL, modelo H5). A las muestras de DNA se le añadieron 0.1 volumen de regulador de muestras (RM) 10 \times (Tris-HCl 0.49M pH 6.8, SDS 10%, Glicerol 50%, β -mercaptoetanol, azul de

bromofenol 0.2% y H₂O) y se colocaron 15 µl en los pozos del lado del cátodo (-, negro). Se fijó la placa al soporte con masking tape, se le añadió TAE 1× a los reservorios de los lados hasta cubrir la superficie del gel, se colocó la tapa para conectar los electrodos e inició la electroforesis a 80 V por 2 h.

El marcador de pesos moleculares fue el la escalera de DNA de 100 pb (GibcoBRL, 15628-019), que contiene 15 fragmentos de 100-1500 pares de bases (pb) con incrementos en el tamaño de 100 pb, un fragmento adicional de 2072 pb y concentraciones mayores de los fragmentos de 600, 1500 y 2072 pb.

Se usó como control positivo de la PCR una mezcla con pSVΔ202 (1.36 ng/µl, no restringido), este plasmido porta el gen del antígeno T de SV40 acoplado al enhancer de metalotioneína I murina y como control negativo una mezcla sin DNA.

5. Registro digital de imágenes

Después de la corrida, las bandas fluorescentes de DNA que aparecieron en los geles de agarosa fueron registradas digitalmente en un equipo Eagle Eye (Stratagene) que consta de una cámara de video adaptada a una computadora con software apropiado.

RESULTADOS

A. Producción e identificación de ratones transgénicos

1. Producción

De las 27 cruzas T×N se obtuvieron 228 animales con un promedio de 8.5 animales por camada que nos han permitido mantener la línea de ratones transgénicos. De las ocho cruzas T×T se obtuvieron 55 animales con un promedio de 6.1 animales por camada. Algunos de ellos podrían ser homocigotos para el transgén (Tabla 3).

Tabla 3. Tamaño de las camadas en cruzas T×N y T×T

Generación	Cruzas		Tamaño camadas	Cruzas		Tamaño camadas
	T×N	Progenie		T×T	Progenie	
1	5	45	9.0	--	--	--
2	6	49	8.2	--	--	--
3	2	18	9.0	3	19	6.3
4	7	58	8.3	1	5	5.0
5	4	35	8.8	3	27	9.0
6	3	23	7.7	1	4	4
Total/Media	27	228	8.5	8	55	6.1

2. Identificación

a. Optimización de la PCR

Concentración de magnesio

Para optimizar la PCR, se hicieron mezclas de 100 μ l con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (1.5 a 6.9 mM) y con una concentración del plásmido de 10 ng/ μ l, se encontró que la amplificación fue máxima con $MgCl_2$ 3 mM.

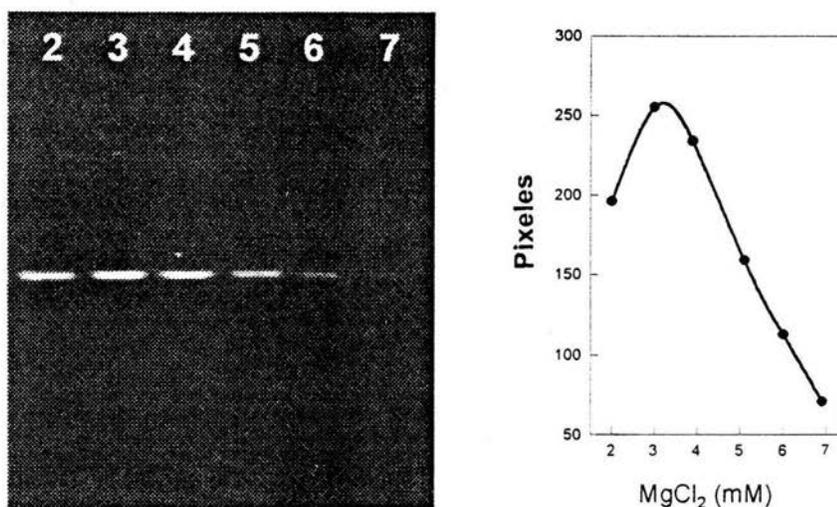


Figura 2. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ sobre la amplificación por PCR.

En los carriles 2 a 7 observamos diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (2.1, 3, 3.9, 5.1, 6, y 6.9 mM respectivamente). en la gráfica vemos que el producto de amplificación (medido en pixeles en un equipo Eagle Eye) es máximo con $MgCl_2$ 3 mM.

Concentración de DNA

Para optimizar la concentración de DNA en la PCR, se hicieron diluciones de 100 μ l con diferentes concentraciones del transgén (de 0.0136 a 30 pg) y se obtuvo una señal clara y nítida en la concentración de 10 pg (Fig.3, carril 2)

Una mezcla de reacción de 50 μ l fue suficiente para obtener buenas señales del producto de amplificación en ambos casos.

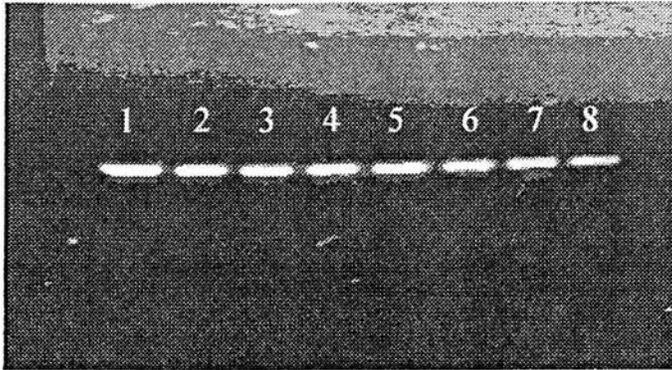


Figura 3. Efecto de la concentración del transgén sobre la amplificación por PCR.

En los carriles 1 a 8 observamos diferentes concentraciones del transgén (30, 10, 3.3, 1.1, 0.37, 0.123, 0.0411 y 0.0136 pg), la concentración máxima fue de 10 pg (carril 2).

b. Identificación de los ratones transgénicos con la PCR optimizada

Se identificaron ratones de nuestra línea transgénica con la técnica de PCR, en donde el transgén rinde un producto de 728 pb.

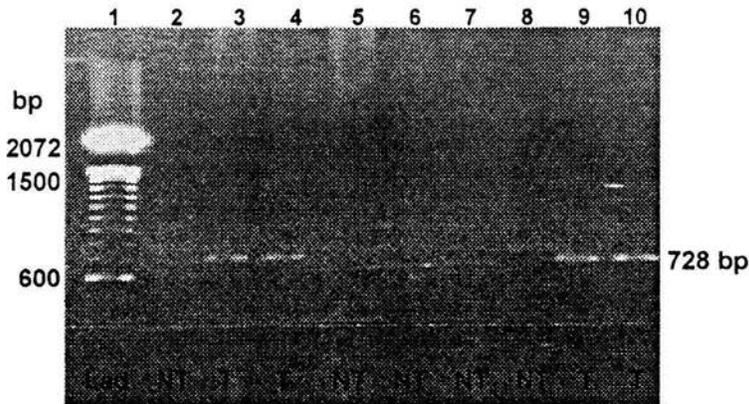


Figura 4. Identificación de los ratones transgénicos por PCR.

Gel de identificación de los animales transgénicos, el transgén rinde un producto de 728 pb, en el carril 1 observamos los marcadores de peso molecular con múltiplos de 100 pb. las bandas indicadoras están mas concentradas en 600, 1500 y 2072 pb, en los carriles 3,4, 9 y 10 observamos DNA de ratones transgénicos y en los carriles 2, 5, 6, 7 y 8 DNA de ratones no transgénicos.

B. Caracterización de los ratones transgénicos

1. Síndrome distrófico

Tres ratones transgénicos de la tercera generación desarrollaron parálisis y atrofia de las extremidades posteriores. Este fenotipo distrófico, que podría constituir un nuevo modelo de enfermedad neurológica debida a la expresión del transgén, ha aparecido con penetrancia incompleta en las cuatro generaciones subsecuentes.

La parálisis y atrofia muscular se iniciaron y fueron más notables en las extremidades posteriores. Fueron progresivas y aparecieron entre el primero y el segundo mes de vida. En los casos más graves hubo hiperflexión de la rodilla trasera y llegaron a afectarse las extremidades anteriores.

La cola de los ratones distróficos era hipertónica y sinuosa, con continuos movimientos ondulatorios lentos y tremores. En los machos distróficos se observó prolapsos del pene, que se encontraba flácido.

Tabla 4. Síndrome distrófico

Atrofia y parálisis progresivas
Hiperflexión de la rodilla posterior
Pérdida de peso
Movimiento rápido de la cola
Pene flácido y prolapsado

2. Frecuencias y pedigrees

Animales transgénicos y distróficos

En las 50 cruces realizadas en seis generaciones se obtuvieron 35 camadas con un total de 283 animales: 151 machos (53.3%), 132 hembras (46.6%), 102 transgénicos (36%) y once distróficos (3.9%) (Tabla 5 y Fig 5).

Tabla 5. Machos y hembras, transgénicos y distróficos, en las 35 camadas de las primeras seis generaciones

Generación	Camadas	Animales	M	H	Transgénicos	Distróficos
1	5	45	15	30	12	0
2	6	49	35	14	11	0
3	5	37	22	15	9	3
4	8	63	29	34	25	2
5	7	62	36	26	32	4
6	4	27	14	13	14	3
Totales	35	283	151	132	103	12
		(100%)	(53.3%)	(46.6%)	(36.3%)	(4.2%)

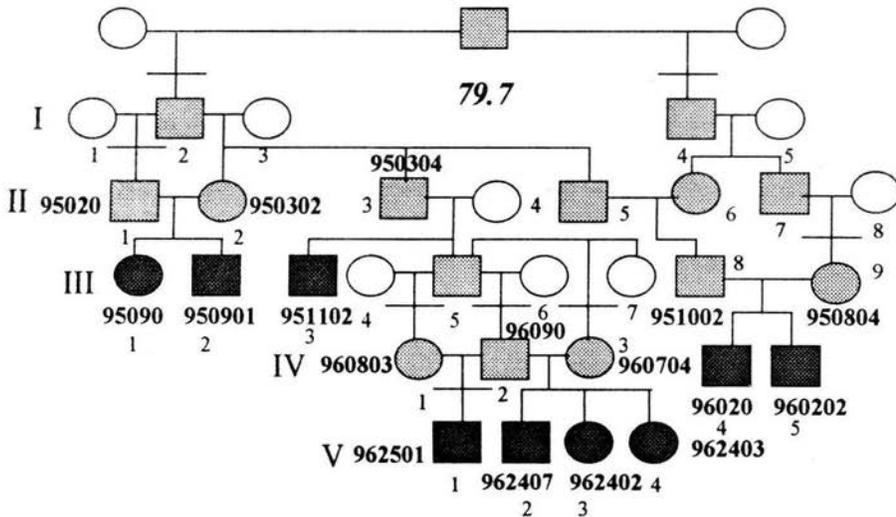


Figura 5. Genealogía de ratones transgénicos y distróficos.

Pedigree de las primeras cinco generaciones de ratones de la línea Δ202. Círculos vacíos hembras Balb/c; círculos llenos grises, hembras transgénicas; círculos llenos rojos, hembras transgénicas distróficas; cuadros llenos grises, machos transgénicos; cuadros llenos rojos, machos transgénicos distróficos.

3. Alteraciones macroscópicas

Esqueleto. Como los animales distróficos más afectados tenían hiperflexión rígida de las rodillas posteriores, se investigó si una malformación ósea era la causa del problema.

Las radiografías y las preparaciones de los esqueletos completos teñidos con azul alciano y rojo de alizarina de los ratones afectados mostraron huesos bien desarrollados en todas las extremidades. Por estas observaciones se concluyó que no hubo malformación ósea que provocara secundariamente la atrofia o la hiperflexión de la rodilla posterior.

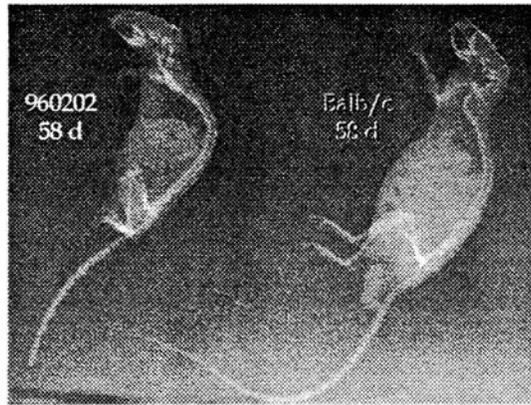


Figura 6. Radiografías del esqueleto de los ratones distróficos.

Radiografías de un ratón normal y de un ratón distrófico. (A) Ratón Balb/c, adulto normal de 60 días de edad. (B) Ratón transgénico distrófico 960326, sacrificado a los 58 días de edad.

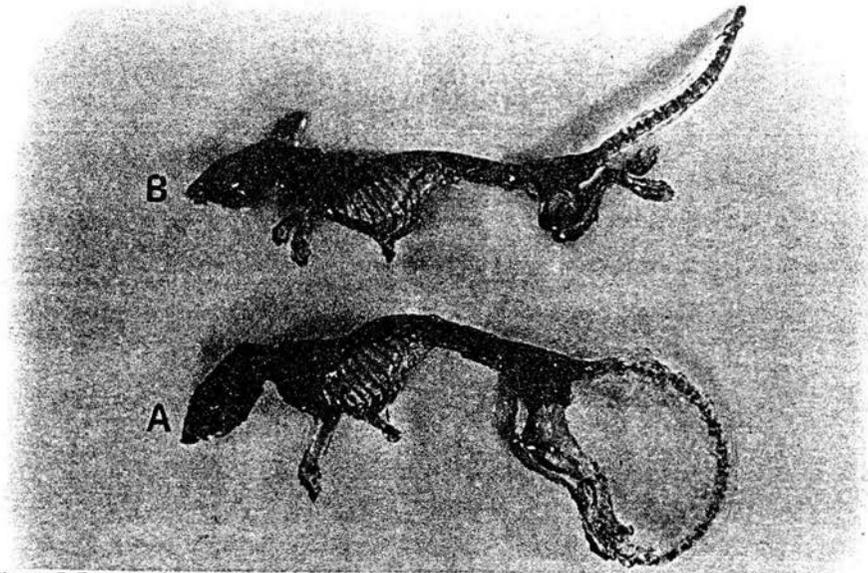


Figura 7. Preparaciones teñidas del esqueleto de un ratón normal y un distrófico.

Los esqueletos de los animales presentados en las radiografías de la Fig. 6 fueron disecados y teñidos con azul alciano y rojo de alizarina. (A) Ratón Balb/c, adulto normal de 60 días de edad. (B) Ratón transgénico distrófico 960326, sacrificado a los 58 días de edad.

Músculos. Los músculos gastrocnemio lateral, gastrocnemio medial, sóleo, sartorio y recto anterior de los ratones distróficos adultos (85-93 días de edad) pesaron unas 7 veces menos que los de un ratón no distrófico de edad comparable. El sóleo pareció ser el músculo relativamente más atrofiado.

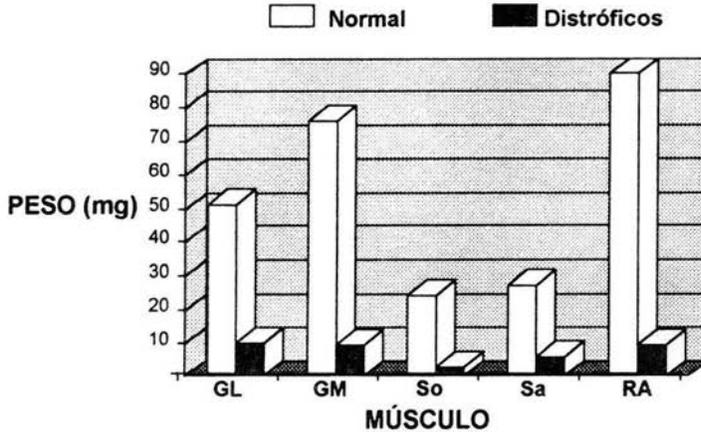


Figura 8. Peso de cinco músculos principales de los miembros posteriores de un ratón Balb/c y tres ratones distróficos.

Las barras vacías representan los pesos de los músculos del ratón Balb/c; las llenas el promedio de los ratones distróficos 962402, 962407 y 96250. Clave de los músculos: (GL) gastrocnemio lateral, (GM) gastrocnemio medial, (So) sóleo, (Sa) sartorio, (RA) recto anterior.

4. Curvas de crecimiento

Se pesaron a los ratones distróficos para seguir el curso de su crecimiento y se compararon con ratones de la cepa Balb/c y ratones transgénicos no distróficos.

En animales de la cepa Balb/c (no transgénicos) se observó que los machos tienen un promedio de 42.4 g y las hembras 37.2 g (Fig. 9 A), en animales transgénicos no distróficos, los machos tienen un promedio de 40 g y las hembras de 28 g (Fig. 9 B) y en animales transgénicos distróficos, los machos tienen un promedio de 13 g y las hembras de 12.2 g (Fig. 9 C), todos a los 90 días de edad.

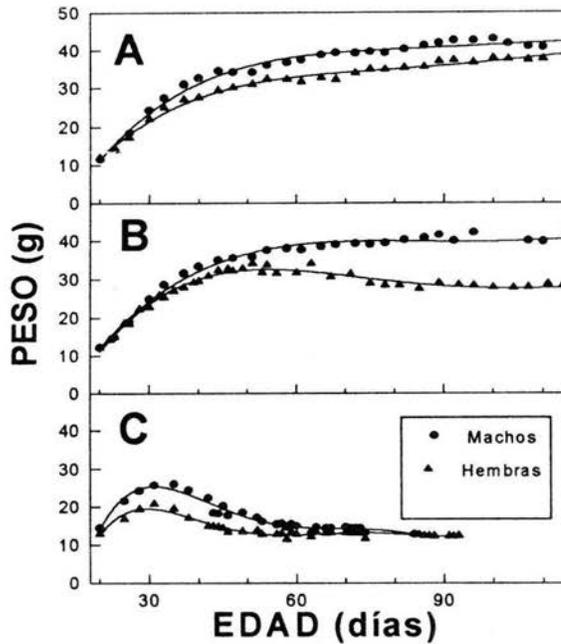


Figura 9. Crecimiento de ratones transgénicos y distróficos.

Pesamos a los ratones distróficos para seguir el curso de su crecimiento y los comparamos con ratones de la cepa Balb/c y ratones transgénicos no distróficos. (A) animales no transgénicos, (B) animales transgénicos no distróficos y (C) animales transgénicos distróficos.

5. Alteraciones microscópicas

Sistema nervioso

En la médula y encéfalo hubo proliferación anormal de células de la sustancia blanca con aspecto glial, predominantemente astrocítico que reemplazaba la arquitectura normal. Dichas células eran grandes de núcleos lobulados, hipercromáticos, con pleomorfismo acentuado y mitosis anormales. Infiltraban la sustancia gris y parecían comprimir las neuronas, algunas de las cuales presentaban degeneración eosinófila.

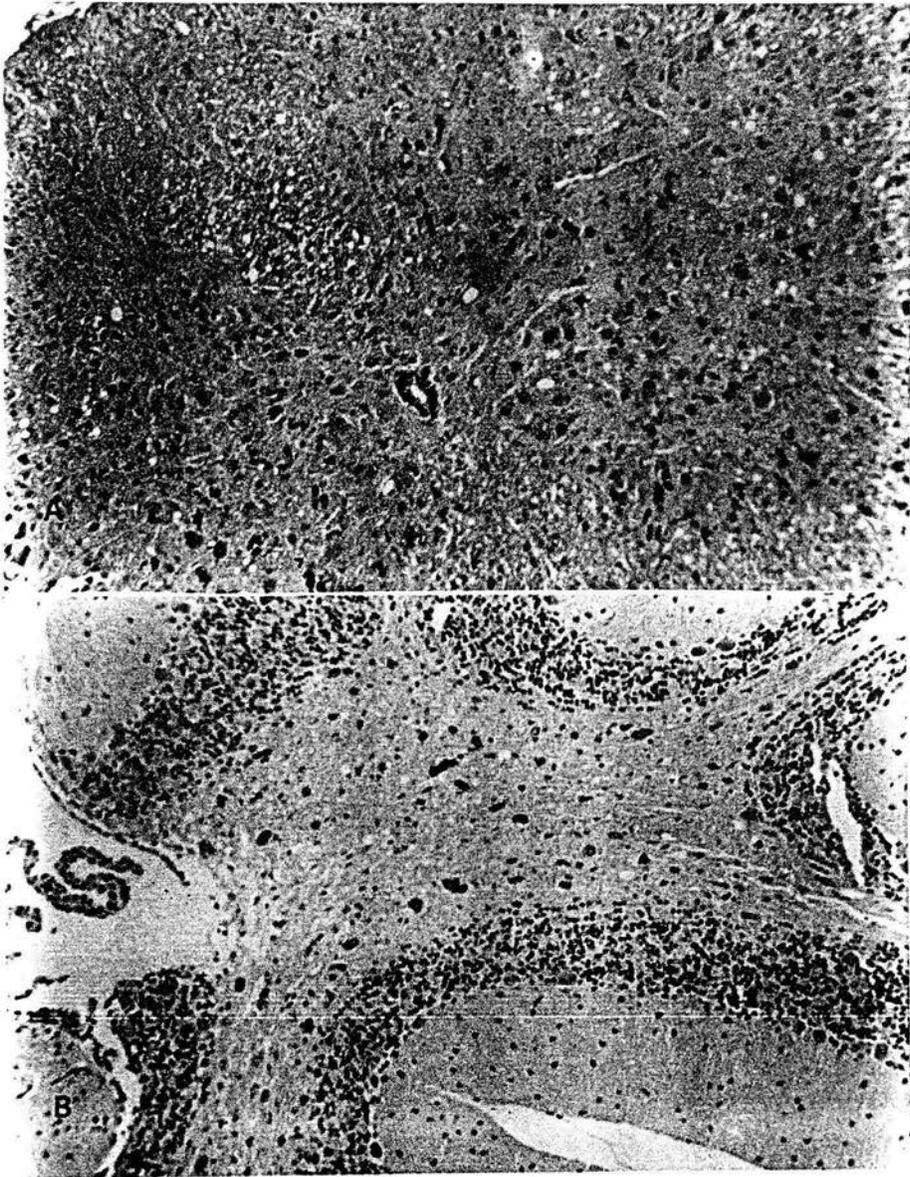


Figura 10. . Fotomicrografías del sistema nervioso central de un ratón “distrófico”.

(A) médula espinal, (B) encéfalo. En las dos se observa proliferación anormal de células de aspecto glial predominantemente astrocítico. Esta proliferación comprime las neuronas, algunas de las cuales presentan degeneración eosinófila ($\times 40$).

Otros órganos

En el hígado se observó transformación anaplásica difusa de los hepatocitos, con células aumentadas de tamaño, de núcleos irregulares, pleomórficos, cromatina granular con inclusiones citoplásmicas y numerosas mitosis tripolares. El citoplasma era eosinófilo o con degeneración vacuolar y algunas células tenían francos cambios de muerte. Las células sinusoidales y de los conductos no mostraron alteraciones.

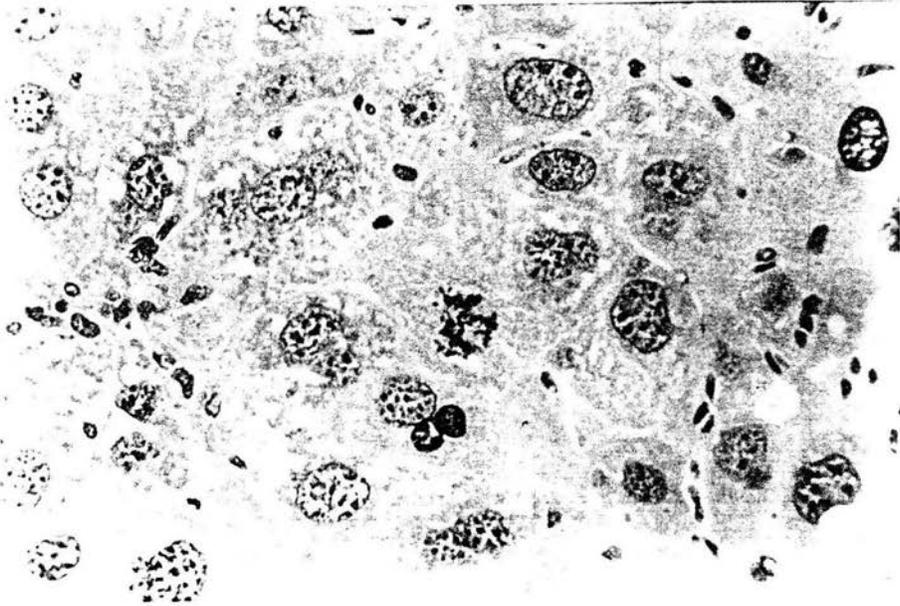


Figura 11. Fotomicrografía del hígado de un ratón "distrófico"

Numerosos hepatocitos aumentados de tamaño con núcleos pleomórficos, cromatina granular y numerosas mitosis tripolares. El citoplasma era eosinófilo o con degeneración vacuolar ($\times 40$).

DISCUSION

El trabajo descrito aquí indica que los ratones transgénicos que portan el plásmido $\Delta 202$ presentan en adultos una distrofia progresiva de sus extremidades que culmina con la muerte del animal en el lapso de unos meses. Aparentemente, los efectos del antígeno T de SV40 requeridos para inmortalizar y así obtener líneas celulares de hepatocitos, provocan además, una severa afectación neurológica en la progenie de ratones establecida aquí en México a partir del macho fundador alemán.

La producción de neoplasias gliales y del síndrome neurológico en los ratones de nuestra colonia $\Delta 202$ podría deberse a que el fondo genético de los animales Balb/c que empleamos en México para mantener la línea transgénica es diferente del de los animales que se siguen usando en la colonia original. Otra posibilidad es que aquí haya ocurrido una mutación en el macho fundador o en uno de sus primeros descendientes antes de que apareciera la distrofia.

Los nueve animales distróficos fueron transgénicos.

Solamente uno de los animales distróficos (951102), producto de una cruce $T \times N$, ha sido con seguridad heterocigoto para el transgén. Los ocho distróficos restantes provinieron de cruces $T \times T$, uno, varios, o todos estos animales distróficos pueden haber sido homocigotos para el transgén (Fig. 5).

La característica más importante en estos ratones distróficos es el desarrollo de una parálisis de las extremidades posteriores, efecto que no ha sido reportado en ningún otro trabajo con ratones transgénicos que portan el antígeno T de SV40.

Por la presencia de ciertos signos (cola turgente y con tremores, prolapso del pene, etc.) siempre consideramos que esta atrofia tenía un origen nervioso; inicialmente investigamos si se trataba de un proceso desmielinizante, los estudios histopatológicos mostraron que la atrofia no era causada por esto, sino por una extensa proliferación de células gliales, principalmente astrocitos. Esta proliferación puede explicar la atrofia progresiva por compresión de las neuronas motoras de la médula espinal.

Estos animales son un modelo adecuado para estudiar el control de la expresión genética, ya que en la misma camada encontramos animales no transgénicos, transgénicos

que posteriormente desarrollan carcinogenesis hepática y animales transgénicos distróficos, nuestro siguiente estudio se enfocará en los mecanismos moleculares implicados en la expresión de cada uno de estos fenotipos.

CONCLUSIONES

1. Se estandarizaron los procedimientos para el manejo de la colonia (apareamientos, cruzas T N, cruzas T T, destete, separación, marcaje, y registros), lo cual nos permitió seguir manteniendo la línea transgénica murina $\Delta 202$.
2. La técnica de polimerización en cadena optimizada fue útil para la identificación de transgénicos.
3. La parálisis y la atrofia muscular características del síndrome neurológico fueron más notables en las extremidades posteriores y se presentan sólo en algunos animales transgénicos.

REFERENCIAS

- Boyd A, Samid D. (1993). Review: Molecular biology of transgenic animals. *J. Anim. Sci.* 71 (Suppl. 3): 1-9
- Capecchi, M. (1994). Sustitución dirigida de genes. *Investigación y Ciencia*. Mayo: 22-29
- Estrada E, Peralta L, Rivas P. (1982). *Manual de técnicas histológicas*. México: AGT Editor.
- Merlino G. Transgenic mice: Designing genes for molecular models. En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA (1994) *The liver: biology and pathobiology*, 3ª ed. Nueva York Raven Press, 1579-1587
- Mullis K, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 155:335-350
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300:611-615
- Paul D, Höhne M, Pinkert C, Piasecki, A, Ummelmann E, Brinster R (1988) Immortalized differentiated hepatocyte lines derived from transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes. *Exp Cell Res* 175:354-362
- Sambrook J, Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning*. 2ª ed., USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shizhong C, Glen AE (1990) A simple screening method for transgenic mice using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8:32-3
- Watson JD, Gilman M, Witkowski, Zoller M (1992) *Recombinant DNA*, 2ª ed., Nueva York: Scientific American Books

APENDICES

7. REPORTE DE NECROPSIA

Clave del animal:	Fecha:	Línea/Cepa: Sexo: M H	Camada:
No. de necropsia:	Edad:	Causa de muerte:	No. Histología:
Persona que hizo la necropsia:	Peso:	Diagnóstico presuntivo:	No. Foto:

Observaciones iniciales:

ORGANO	Normal	Anormal	Destino	Observaciones
PIEL/PELO				
TEJ. SUBC./MAMA				
NODULOS LINF.				
MUSC. ESQUEL.				
VIAS NASALES				
CAVIDAD ORAL				
TIROIDES				
PULMONES				
CORAZON				
TIMO				
ESTOMAGO				
INTESTINO DELG.				
CIEGO/COLON				
PANCREAS				
HIGADO				
BAZO				
RIÑON/ADRENAL				
OVARIOS/TESTIC				
UTERO				
VEJIGA URINARIA				
PROSTATA				
GLS. SEMINALES				
CRANEO				
COLUMNA VERT.				
CEREBRO				
HIPOFISIS				
MEDULA ESPINAL				
OTROS TEJIDOS				

Otros detalles, incluyendo diagramas, en el reverso de esta hoja.

8. MARCAS DE SACABOCADO EN LAS OREJAS



1



2



3



4



5



6



7



8



9

9. TINCIÓN DE LOS ESQUELETOS

La solución de trabajo debe prepararse al momento:

- a. Azul alciano 8GS (Sigma) al 0.3% en etanol al 70%, 1 vol.
- b. Rojo alizarín S (Sigma) al 0.1% en etanol al 95%, 1 vol.
- c. Ácido acético, 1 vol.
- d. Etanol al 70%, 17 vol.

Se pueden preparar soluciones madre filtradas de los colorantes (McLeod, Teratology 22:299-301, 1980).