

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

PRODUCCION Y MANTENIMIENTO DE RATONES TRANSGENICOS
B6D2F1/ J PARA UN PROYECTO DE INVESTIGACION
(REGULACION TRANSCRIPCIONAL DEL GEN SERCA 2 DEL RETICULO
SARCOPLASMICO DE CORAZON)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

NAYAR LOPEZ ESCARELA

ASESOR: M.V.Z. JOSÉ FERNANDO ALTAMIRANO ABARCA
COASESOR: M.C. M.V.Z. OCTAVIO VILLANUEVA SANCHEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2006



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres

Socorro Escarela Martínez y Francisco López García por ser el cimiento y fomento de mi educación.

A mis hermanas

Abril, Osiris y Luna por enriquecer mi universo con sus conocimientos.

A la UNAM

Por abrirme sus puertas y mostrarme los diversos universos en que nos desenvolvemos, que finalmente son uno y para todos.

A todos mis profesores

Que aportaron sus conocimientos para enriquecer los míos e influir directa o indirectamente en la apreciación de los diversos universos.

A mis amigas (os)

Por compartir conmigo sus universos y fortalecerme para seguir adelante.

Al M.C. MVZ. Octavio Villanueva Sánchez

Por el apoyo incondicional académico y personal.

Al MVZ. Fernando Altamirano Abarca

Por su apoyo, comprensión y paciencia en la elaboración de esta tesis.

A mis asesores

M.C. María del Carmen Barrón García

M.C. Crisóforo Mercado Márquez

QFB. Juana Alicia Alquicira Camacho

MVZ. Tiziano Santos Morín

Por aportar sus conocimientos e ideas a esta tesis para su enriquecimiento y culminación.

Al Dr. Angel Zaráin

Por las facilidades ofrecidas en la información para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVOS.....	7
ANTECEDENTES:	
I. El ratón como modelo animal en la transgénesis.....	8
- Variedades de ratones disponibles.....	9
- Sistemas reproductivos.....	10
II. Definición de transgénicos.....	12
- Técnicas de producción de animales transgénicos.....	12
- Mamíferos transgénicos: antecedentes y cronología.....	12
III. Técnica de microinyección de transgenes.....	15
- Clonación del fragmento de ADN.....	15
- Preparación de oocitos y embriones.....	17
- Microinyección del ADN en el pronúcleo.....	18
- Transferencia de embriones inyectados a animales hospedadores adecuados.....	19
- Detección del transgén en animales recién nacidos.....	20
- Métodos de reproducción en animales transgénicos.....	22
IV. Función del retículo sarcoplásmico de corazón.....	23
V. Pruebas para detectar los transgenes	
- PCR.....	24
- Southern blot.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1. Ganancia de peso X en 40 ratones de los laboratorios Jackson.....	34
Cuadro 2. Peso promedio de las hembras transgénicas criadas en el Bioterio de IICMN SZ (1) y el de las hembras de los laboratorios Jackson (2).....	35
Cuadro 3. Peso promedio de los machos transgénicos criadas en el Bioterio de IICMN SZ (1) y el de los machos de los laboratorios Jackson (2).....	36
Cuadro 4. Total de animales producidos del 21 de junio del 2001 al 1 de septiembre del 2003 con su respectivo porcentaje, además del promedio de crías que se obtuvo por camada (35 partos).....	39
Figura 1. Microinyección en el pronúcleo masculino de ratón.....	19
Figura 2. Embrión normal.....	20
Figura 3. Ciclos del PCR.....	25
Figura 4. PCR en gel.....	26
Figura 5. Transferencia Southern.....	29
Figura 6. Microaislador.....	31
Figura 7. Ganancia de peso entre machos y hembras del INCMN y los laboratorios Jackson.....	36
Figura 8. Expresión del tansgén SERCA 2 en ratones del INCMN SZ.....	38

RESUMEN

Los animales transgénicos son aquellos que portan nuevos genes dentro de su genoma, ya sea de la misma especie o de otras especies. Esto puede lograrse a través de diversas técnicas, siendo la más utilizada la de microinyección, que consiste en inyectar varias copias de un fragmento génico en un pronúcleo de macho o de hembra, o en un óvulo recién fecundado, transfiriéndolo posteriormente a una hembra en donde el embrión se desarrollará hasta su nacimiento.

El objetivo de este trabajo fue comparar la línea de crecimiento de los ratones transgénicos B6D2F1/J del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMN SZ) con los ratones B6D2F1/J sin transgén de los laboratorios Jackson para observar si existían diferencias significativas en la ganancia de peso, durante el crecimiento de los ratones.

La metodología que se realizó fue la clasificación de datos de los ratones transgénicos por su sexo (machos y hembras), los cuales fueron pesados semanalmente, 10 animales de cada sexo, desde la tercera hasta la novena semana de edad, obteniendo un peso promedio por semana, con estos datos se comparó a los ratones del INCMN SZ con los pesos de los ratones de laboratorios Jackson, a través de una prueba de hipótesis de medias. Los resultados fueron: diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de animales; atribuido principalmente a las variaciones en las condiciones ambientales en que se mantuvo a los ratones.

INTRODUCCIÓN

Durante cientos de años, la alteración genética efectuada por el humano, tras la domesticación de los animales salvajes, fue llevada inicialmente en forma empírica y después mediante la crianza dirigida y selectiva (27).

En los últimos años se ha visto el desarrollo de métodos, que a diferencia de las técnicas convencionales de crianza, permiten modificar directamente y de manera selectiva la composición genética de los organismos. Estas nuevas técnicas de manipulación genética pueden ser divididas en: la categoría que trata el genoma entero como una unidad compacta (manipulación genómica), y otra en la que son manipulados los genes individuales o manipulación génica (27).

Los genes son materia y mensaje, estructura e información, compuestos por la molécula de doble hebra de Ácido desoxirribonucleico (ADN), que consiste en los nucleótidos de adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G), el componente de información reside en el orden de esas letras, llamado código genético, que indica a las células la reunión de aminoácidos para poder fabricar proteínas particulares (37).

El término transgénico fue usado en primer lugar por Gordon y Ruddle (1982) para describir a aquellos animales que portan nuevos genes dentro de su genoma. Este término es actualmente aplicado de una forma general a la caracterización de ciertas variantes de especies cuyo genoma ha sido alterado por la transferencia de genes extraños (5, 27).

Los animales transgénicos tienen por lo menos un gen que ha sido transferido y cuyo sitio de integración y número de copias integradas no pueden ser controlados. Los genes integrados pueden interactuar con los genes del fondo y con los factores ambientales, parcialmente en el sitio de integración, de tal manera que cada animal transgénico original puede considerarse como un recurso único. Por tanto, se deben tomar las previsiones necesarias para preservar tales recursos, a través de los procedimientos tradicionales de manejo genético, incluyendo el mantenimiento de cuadros

genealógicos detallados y de la verificación genética para comprobar la presencia y cigosidad (se refiere a la expresión total –homocigota- o parcial –heterocigota- del gen) de los transgenes (23).

El primer paso en el proceso de la transgénesis, es combinar un gen clonado con un promotor apropiado, produciendo una construcción génica. El segundo paso es introducir la construcción génica en uno o más cromosomas del animal; esto se consigue habitualmente por la técnica de microinyección que consiste en inyectar varias copias del fragmento génico en un pronúcleo, de macho o de hembra o en un óvulo recién fecundado. Después de la microinyección, el óvulo fecundado se transfiere a una hembra receptora preparada convenientemente, que llevará el embrión hasta su nacimiento de la manera habitual (8, 24).

Las dos estrategias básicas para producir animales transgénicos son: para ganar una función o para perder una función (36). Cuando se inactiva el funcionamiento de un gen por la inserción de un transgén, se le conoce como animal “knock-out” (1).

El uso más extendido de la transgénesis se ha dado en la investigación básica (20). El interés por los animales transgénicos se ha concentrado en las siguientes áreas: la mejora de caracteres productivos, la resistencia animal a enfermedades, modelos animales de enfermedades humanas y la síntesis de productos biomédicos (5). La creación de animales transgénicos con mutaciones específicas en genes que provocan enfermedades en el hombre, permite estudiar su relación causal en el desarrollo de la patología, así como probar posibles terapias para el tratamiento (17). La transgénesis en la mejora de caracteres productivos se encuentra limitada por el desconocimiento sobre la identidad y regulación de los genes que determinan estos caracteres (1,5). Una de las aplicaciones más prometedoras a corto plazo es la síntesis de productos biomédicos en animales transgénicos (15).

Una aplicación de la transgénesis que se encuentra en intensa investigación es la posibilidad de usar órganos animales como fuente de transplantes en humanos (xenotransplantes) esto se está explorando principalmente en cerdos, donde se busca la eliminación de azúcares que desarrollen rechazo inmunológico en los pacientes. Otra opción es la

“humanización” de estos órganos, es decir, expresar antígenos humanos en ellos para usarlos como fuente de células en algunos procedimientos terapéuticos (1).

En el caso de los ratones B6D2F1/J que se utilizaron en el presente trabajo, el transgén que les fue microinyectado es el que se encarga de la regulación transcripcional del gen SERCA 2 del retículo sarcoplásmico de corazón que realiza el almacenamiento de Ca^{2+} durante la relajación muscular cardíaca, relacionándose la disminución de almacén de Ca^{2+} con miocardios hipertróficos e insuficientes, de ahí la importancia de dichos animales para los investigadores.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar la línea de crecimiento de los ratones transgénicos B6D2F1/J (gen SERCA 2 del retículo sarcoplásmico de corazón) del INCMN SZ, con los ratones B6D2F1/J sin transgén de los laboratorios Jackson, para observar si existen diferencias en la ganancia de peso, durante el crecimiento de los ratones.

Objetivo Particular

Determinar en generaciones consecutivas de ratones reproducidos en el INCMN SZ la expresión del transgén SERCA 2 (homocigoto o heterocigoto).

ANTECEDENTES

I. El ratón como modelo animal en la transgénesis

El uso más extendido de la transgénesis es la investigación básica utilizando animales de laboratorio, especialmente ratones (24).

Uno de los problemas que enfrenta la investigación biomédica es que muchos estudios no pueden realizarse directamente en humanos por razones éticas. Por ello, es importante desarrollar modelos animales que reproduzcan las enfermedades humanas, dichos modelos dan la oportunidad de realizar estudios morfológicos, inmunológicos y fisiológicos (33).

El ratón pertenece al género *Mus*, subfamilia Murinae, familia Muridae, orden Rodentia. El ratón domestico de Norteamérica y Europa *Mus musculus* es la especie comúnmente utilizada para la investigación biomédica. Ha sido empleado en estudios de anatomía comparativa tempranamente desde los años setenta, pero la aceleración de la investigación biológica en la década de los noventa, el renovado interés en la genética mendeliana y el requerimiento de un pequeño y económico mamífero prolífico, fueron instrumentos para desarrollar el moderno ratón de laboratorio. Estos estudios han crecido espontáneamente durante esta década y han hecho del ratón de laboratorio en términos genéticos, el mamífero más completo como modelo de experimentación (9).

El ratón puede vivir entre 2 y 3 años, existen desde luego algunas diferencias en la longevidad que poseen las distintas estirpes y cepas, como consecuencia de su distinta susceptibilidad ante los procesos patológicos (14).

El uso de los ratones también está favorecido por la existencia de numerosas mutaciones que afectan el color del pelo (17). De los ratones más comúnmente utilizados de acuerdo a su pigmentación heredable, se incluyen las siguientes cepas:

- A (albino)
- BALB/c (albino)
- C57BL/6 (negro)
- CBA (agouti)
- C3H (agouti)
- C57BL/10 (negro)

- C57BR (castaño oscuro)
- DBA (café claro)
- NZB (negro)
- SJL (albino)
- 129 (usualmente albino o chinchilla) (25).
- C58 (negro)
- FVB (albino)
- NZW (blanco)
- SWR (albino)

Variedades de ratones disponibles

Los ratones más frecuentemente utilizados en la experimentación biomédica pueden clasificarse en dos grandes categorías: microbiológicas y genéticas.

Desde el punto de vista microbiológico son clasificados (refiriéndonos a los animales de laboratorio) en los siguientes grupos:

- 1) Ratones libres de gérmenes (axénicos), libres de cualquier microorganismo detectable.
- 2) Ratones con una flora conocida y controlada (gnotobióticos), es decir que soportan una población microbiana específica.
- 3) Ratones libres de gérmenes patógenos específicos (SPF), es decir libres de determinados agentes patógenos, y
- 4) Ratones convencionales, es decir todos los que no se encuentran en los grupos anteriores.

Genéticamente pueden clasificarse en:

- 1) Animales de reproducción no dirigida, mantenidos en grandes colonias, los apareamientos se realizan al azar entre machos y hembras procedentes de camadas distintas.
- 2) Animales endogámicos, es decir, lo que determina un aumento en la homocigocis –producto de por lo menos 20 apareamientos consecutivos entre hermanos- cada cruce de este tipo reduce la heterosis aproximadamente un 19%.
- 3) Los híbridos F1 que son el resultado del apareamiento de dos líneas parentales consanguíneas (14, 16).

Sistemas reproductivos

El programa reproductivo se establece teniendo en cuenta una serie de premisas, básicamente: espacio disponible, fecundidad de la estirpe o cepa a emplear, esquema de consanguinidad que eventualmente deba seguirse, problemas epizooticos y necesidades productivas programadas (14, 16).

Los sistemas reproductivos más empleados incluyen: el harem, las parejas monógamas o los tríos.

En el sistema de harem es suficiente 1 macho por cada 4-6 hembras, al detectar que se encuentran gestantes, las hembras son puestas en cajas individuales para que puedan criar. La desventaja de este sistema es que se pierde la posibilidad del apareamiento posparto (13).

El sistema de parejas monógamas supone el mantenimiento de parejas permanentes de un macho con una hembra y las crías que se obtienen se extraen unos días antes de que se produzca el nuevo parto.(14, 16)

En el sistema de tríos combina 1 macho por cada 2 hembras. Antes del siguiente parto se extraen las crías (13).

Receptividad sexual

Los ratones deben aparearse a la edad de 7-8 semanas de edad, cuando alcanzan un peso de 20-30 g para no obtener camadas reducidas.

El ciclo estral de las hembras es de 4-5 días, en tanto que el celo ocupa aproximadamente 12 horas y son poliéstricas continuas, (13, 26).

Un estro fértil ocurre 14-28 horas después del parto (13, 14, 16).

Las feromonas juegan un papel importante en el comportamiento reproductivo, son sustancias químicas secretadas por el cuerpo, y que a diferencia de las hormonas tienen efecto fuera del organismo que las produce, ya que provocan una reacción de comportamiento al ser activado el sistema olfatorio del que las percibe; esto se observa cuando se agrupan hembras de ratón en una caja, puede darse en todas ellas un período de anestro continuo que se interrumpe al percibir el olor de un macho o con la introducción de un macho en el lote estimulando la sincronización del celo en un intervalo de 72 horas, hecho que recibe la denominación de “Efecto Whitten” (13, 14, 16).

Diagnóstico de gestación

Los indicadores de que se ha producido la cópula en las 24 horas procedentes son la presencia de espermatozoides en los frotis vaginales o la existencia de un tapón vaginal. El tapón vaginal es formado por secreciones de la vesícula seminal y de las glándulas de copulación del macho. Este tapón usualmente persiste de 18-24 horas. A partir del día 13 de gestación se observa el desarrollo gradual de las mamas y el aumento en el peso corporal de la hembra, pudiéndose igualmente palpar los fetos (13, 14, 16).

Gestación

Las hembras no lactantes tienen un período de gestación que oscila de 19 a 21 días y en hembras lactantes aumenta en 3 a 10 días (14, 16).

Sexado

Los machos, al nacimiento pueden distinguirse de las hembras por la mayor distancia ano-genital (superior en 1.5-2 veces a la hembra), los testículos de color pálido, visibles a través de la pared abdominal y el mayor tamaño de la papila genital (13, 14, 16).

Tamaño de la camada

Las camadas varían en función de la edad de la madre y estirpe o cepa a que pertenece, siendo en todos los casos reducida la primer camada y del segundo al octavo parto las camadas son más numerosas 10-12 crías (6, 9). Nacen desnudos y a los 10 días de nacimiento los ratones están completamente cubiertos de pelo y para el día 12 abren los ojos. Usualmente se destetan a los 21 días pero puede presentarse el destete hasta los 28 días. Los ratones consumen sólidos y agua a partir de las 2 semanas de edad (14, 16).

II. Definición de transgénico

Es aquel cuyo genoma ha sido modificado por la introducción de un ADN exógeno o por la delección de un fragmento de ADN propio. El ADN exógeno puede ser un gen de otra especie o una secuencia nucleotídica propia alterada. El ADN introducido se denomina transgén y, normalmente, se mantiene integrado de forma estable en el genoma del animal transgénico (5).

Técnicas de producción de animales transgénicos

Las técnicas usadas hasta el momento para producir animales transgénicos son: a) Transferencia de ADN por retrovirus

b) Microinyección de ADN extraño en pronúcleos fertilizados.

c) Inyección de células madre embrionarias (ES) con ADN extraño.

d) Incubación de espermatozoides con ADN exógeno.

e) Transferencia génica dentro de células y embriones, mediado por liposomas.

f) Electroporación de espermatozoides.

g) Transferencia de genes a células somáticas (11, 36).

Las investigaciones llevadas a cabo a principio de los años ochenta no fueron más que el lanzamiento de una serie consecutiva de avances, tanto en la investigación básica como en la utilización práctica de los animales transgénicos. En el cuadro adjunto se incluyen los principales hitos relacionados con la obtención y desarrollo de los mamíferos transgénicos:

Mamíferos transgénicos: antecedentes y cronología

1938:	Spemann propone experimento de transferencia nuclear
1949:	Hammond mantiene embriones de ratón en cultivo <i>in vitro</i>
1961:	Tarkowski obtiene ratones quiméricos agregando embriones

1966:	Lin describe la técnica de microinyección de embriones de ratón
1980:	Gordon, Ruddle y col. obtienen los primeros ratones transgénicos por microinyección de ADN en el pronúcleo de cigotos de ratón
1981	Gordon y Ruddle obtienen ratones transgénicos por microinyección de ADN en el pronúcleo de cigotos de ratón
1981:	Evans y Kaufman obtienen células embrionarias totipotenciales de ratón.
1982:	Palmiter y col. obtienen ratones transgénicos gigantes mediante transgenes de la hormona del crecimiento de rata
1983	Palmiter y col. obtienen ratones transgénicos gigantes mediante transgenes de la hormona de crecimiento humana
1983:	McGrath y Solter desarrollan una nueva técnica para experimentos de transferencia nuclear en ratón
1985:	Hammer y col. obtienen animales de granja transgénicos (conejos, ovejas, cerdos) mediante el transgén de la hormona del crecimiento humano a partir de ADN clonado y microinyectado en pronúcleos de óvulos fertilizados
1987:	Thomas y Capecchi obtienen los primeros ratones <i>knockout</i> por recombinación homóloga
1989	Clark y col. obtienen ovejas transgénicas mediante el gen humano del factor IX de coagulación de la sangre mediante microinyección de ADN en el pronúcleo del cigoto
1991	Wright y col. obtienen ovejas transgénicas con el gen humano α -1-antitripsina, mediante microinyección de ADN

	en el pronúcleo de cigotos
1991	Ebert y col. obtienen cabras transgénicas con el gen AtPH humano (activador tisular de plasminógeno) mediante microinyección de ADN en pronúcleo de cigoto
1991	Krimpenfort y col. obtienen vacas transgénicas con el gen humano de la lactoferrina mediante microinyección de ADN en el pronúcleo de cigotos
1993:	Nagy y Rossant obtienen ratones quiméricos por co-cultivo de embriones
1993:	Schedl y col. obtienen ratones transgénicos con cromosomas artificiales de levaduras
1994:	Brinster y col. obtienen ratones transgénicos por trasplante de espermatogonias
1996:	Campbell y col. obtienen ovejas clónicas por transferencia nuclear de células embrionarias en cultivo
1997:	Wilmot y col. obtienen ovejas clónicas por transferencia nuclear de células diferenciadas fetales y adultas en cultivo
1997:	Schnieke y col. obtienen ovejas clónicas transgénicas por transferencia nuclear a partir de células fetales diferenciadas
1998:	Cibelli y col. obtienen vacas clónicas transgénicas por transferencia nuclear a partir de células fetales diferenciadas
1999	Baguisi y col. obtienen cabras transgénicas por transferencia nuclear
1999	Yanagimachi y col. obtienen ratones transgénicos mediante la co-inyección de cabezas de espermatozoides y ADN exógeno (38).

III. Técnica de microinyección

Esta técnica es una de las más usadas en la transferencia de fragmentos de ADN los cuales se inyectan de manera directa en el pronúcleo de un óvulo fecundado (10) y consiste en los siguientes pasos:

1. Clonación del fragmento de ADN
2. Preparación de la solución de ADN que será usada en la microinyección
3. Preparación de oocitos y embriones
4. Microinyección del ADN en el pronúcleo
5. Transferencia de embriones inyectados a animales hospedadores adecuados
6. Detección del transgén en animales recién nacidos (27).

1. Clonación de fragmentos de ADN

El ADN clonado se caracteriza entre otras cosas, en que es una secuencia completa de nucleótidos bien determinados, identificables por pruebas especiales (15).

El objetivo de la clonación es la producción de un gran número de copias de una región de ADN, para ello el fragmento de ADN se une a otro ADN (vector de clonación), y la molécula de ADN recombinante formada se incorpora a la célula anfitriona donde tiene lugar la amplificación por replicación. Una vez detectada la presencia del ADN de interés y seleccionados los clones que lo han amplificado, se aísla el gen o fragmento de ADN.

El ADN desde bacteriano hasta el del hombre, tiene secuencias específicas de bases nitrogenadas que son reconocidas de manera universal por las enzimas endonucleasas (ligasa y de restricción) que unen y cortan (3).

La clonación puede describirse en siete etapas:

A. Preparación del ADN. El gen que se quiere clonar debe ser aislado de la muestra de ADN para producir una ruptura con endonucleasas de restricción y separar los fragmentos del ADN de interés.

B. Preparación del vector. Como vector se puede utilizar un plásmido, un cósmido o un virus.

C. Unión del ADN al vector. Habiendo cortado el ADN y el vector con una misma endonucleasa de restricción, ambos pueden unirse gracias a una ligasa. Al conjunto vector+inserto se le llama ADN recombinante (ADNr).

D. Incorporación del ADNr. El ADN recombinante se introduce en bacterias, empleando métodos diversos. El vector se replica al dividirse la bacteria y también de forma autónoma. Con ello, aumenta el número de copias. Cada bacteria, haya incorporado o no un vector y un ADN recombinante, se multiplica para dar lugar a un clon (población de bacterias con idéntico material genético –incluido el recombinante). También se le incluye el gen de resistencia a algún antibiótico o gen reportero.

E y F. Propagación celular y selección. Debido a que no todas las bacterias incorporaron el ADN de interés formando parte del vector recombinante, se seleccionan las que sí lo han hecho, normalmente cultivándolas en un medio con antibiótico, si en el vector se incluyó el gen de resistencia a este antibiótico.

G. Expresión del ADN clonado. Se cultiva en placas de agar para la formación de colonias, luego se pasan las colonias seleccionadas a un medio líquido de cultivo (20).

El diseño y la clonación de un fragmento génico es el paso fundamental en la generación de animales transgénicos, determinando esencialmente el éxito o el fracaso de todos los pasos subsiguientes (27).

2. Solución de microinyección del ADN

Cualquier fragmento de ADN, químicamente sintetizado, ADN clonado o fragmentos de cromosomas, pueden ser microinyectados y serán integrados en el genoma del hospedador con más o menos la misma frecuencia (21, 27).

Ha sido demostrado que los genes extraños son transcritos y degradados en una pequeña proporción únicamente durante las primeras 24 horas tras la microinyección. La transcripción de los plásmidos microinyectados se reduce considerablemente después de la primera división celular.

Con el objetivo de asegurar que los transgenes sean también transcritos, es aconsejable eliminar de los fragmentos de ADN cualquier secuencia procariótica del vector, ya que éstas pueden inhibir más adelante la actividad del gen. También se ha visto que es más ventajoso usar transgenes en su forma genómica original en lugar de usar copias de ADN clonado.

Los plásmidos recombinantes o los cósmidos que contienen el fragmento génico, usado para el establecimiento de los animales transgénicos, son aislados como moléculas de ADN super enrolladas por medio de procedimientos estándar a partir de cultivos bacterianos. Son subsecuentemente cortados por enzimas de restricción apropiadas para obtener el inserto (que puede ser purificado por electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida). El ADN es subsecuentemente extraído (NaDod-SO/fenol/cloroformo), precipitado (etanol), lavado (etanol) y resuspendido en el tampón de inyección (TE, pH 7.5) a una dilución apropiada (21, 27).

3. Preparación de los embriones

Los oocitos fertilizados de ratón para la microinyección pueden ser obtenidos de cepas fértiles endogámicas, exogámicas o híbridas. El número máximo de oocitos inyectables de un animal donador individual se obtiene tratando la hembra de ratón, de 6-8 semanas de edad, con hormonas. Tres días antes de la microinyección, se les administra PMSG (gonadotropina coriónica equina o también conocida como suero de yegua preñada) la cual actúa biológicamente como la hormona folículo estimulante (FSH) promoviendo el crecimiento folicular (12), administrándose por vía intraperitoneal a dosis de 5-10 UI; 48 horas después se administra gonadotropina coriónica humana (GCH) que actúa como la hormona luteinizante (LH) induciendo la ovulación (12). Aproximadamente, 12 horas después de la última administración de hormonas tiene lugar la ovulación inducida. Cada hembra superovulada es a continuación alojada junto con un macho en una celda separada. El

apareamiento normalmente tiene lugar en el período de oscuridad y puede ser detectado en las siguientes 12 horas por observación del tapón espermático en el orificio vaginal. Las hembras que se han apareado satisfactoriamente son usadas para obtener embriones. Entre 5 y 8 de cada 10 hembras superovuladas son normalmente apareadas satisfactoriamente y cada una producirá de 15 a 30 oocitos que pueden ser utilizados para experimentos de transferencia génica (17).

Las hembras positivas son sacrificadas mediante eutanasia 22 horas después del apareamiento, por dislocación de las vértebras cervicales. Los órganos reproductivos son extraídos para obtener los oocitos, el oviducto se lava con el medio M2 (solución Krebs-Ringer modificada con tampón HEPES). Los oocitos son a continuación lavados nuevamente con medio M2 recién preparado y son transferidos a un medio M16 a 37°C y 5% de CO² con el mantenimiento de un pH adecuado para estimular el desarrollo embrionario y manteniéndolos ahí hasta que son utilizados para la microinyección (12,19,21, 27).

4. Microinyección del ADN

El equipo consiste en un microscopio de inversión, dos micromanipuladores para manejar las pipetas de inyección y sujeción, y un aparato de inyección que permita regular la presión de inyección, además de una cámara de inyección que contiene los embriones en medio de cultivo cubiertos con una capa de aceite de parafina que se coloca bajo el microscopio. El embrión que va a ser inyectado es sujetado con la pipeta correspondiente bajo una presión reducida y posicionado de tal forma de que el pronúcleo sea visible. La pipeta de inyección tiene una punta con un diámetro de 1µm y está llena de solución de ADN en el extremo. Para la inyección de ADN, la punta es insertada cuidadosamente a través de la zona pelúcida y la membrana celular hasta que es colocada en el interior del pronúcleo (Figura 1). La inyección se realiza en el pronúcleo masculino que es ligeramente más grande que el femenino. El volumen del pronúcleo aumenta aproximadamente en un 50% si se inyectan 1 a 2 picolitros de solución de ADN (100 a 10 000 copias de ADN extraño es óptimo para que haya integración en la línea germinal). Todos los embriones

inyectados son transferidos a medio de cultivo y son mantenidos a 37°C o 39°C hasta que son transferidos a un animal receptor (9, 21, 22, 27).

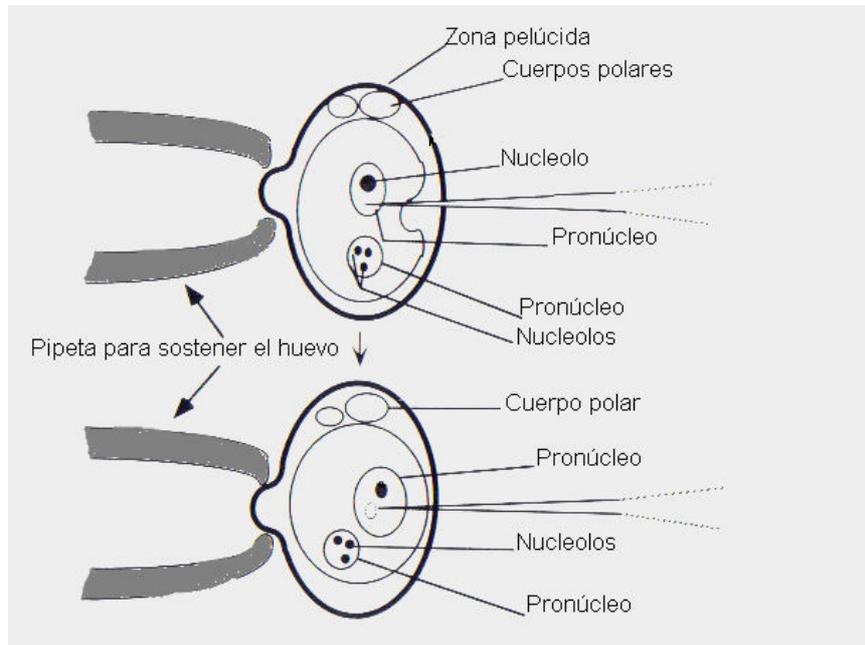


Figura 1. Microinyección en el pronúcleo masculino de ratón (17).

5. Transferencia de embriones

Normalmente, los embriones serán transferidos a animales receptores sincronizados después de un corto período de cultivo *in vitro*, de hasta varias horas, (Figura 2). Los embriones morfológicamente defectuosos son descartados y no son utilizados para la transferencia embrionaria. Una alternativa a la transferencia es el cultivo intermediario de embriones durante 3 días, a partir del mismo día que la microinyección. Este cultivo ofrece la ventaja que los embriones que han sido dañados en el proceso de inyección son identificados.

El ciclo estral de los animales receptores debe ser sincronizado con el de los animales donadores de embriones, de tal forma que los ovarios, los oviductos y el útero se encuentren en condiciones que garanticen el desarrollo fisiológico de los embriones transferidos. La sincronización se lleva a cabo apareando las hembras con machos vasectomizados. Si los embriones han de ser cultivados *in vitro* durante períodos más largos, es recomendable utilizar donadores y receptores cuyo ciclo sea asincrónico por un día (21, 27).

La transferencia directa de oocitos microinyectados a oviductos de receptores definitivos requiere siempre cirugía, por lo que los animales receptores son anestesiados, se prepara adecuadamente el campo de operaciones para acceder a cavidad abdominal. Los embriones son recogidos del medio de cultivo con un catéter apropiado para la transferencia, liberándolos en el oviducto de la hembra receptora.

Las hembras receptoras usualmente reciben de 10 a 20 embriones, los cuales son distribuidos equitativamente entre los dos oviductos, solo la mitad o una tercera parte de los embriones llevan a término la gestación (17) Una gravidez satisfactoria puede ser diagnosticada varios días o semanas después y debe ser vigilada hasta el nacimiento. La gravidez precoz también proporciona datos inmediatos de los índices de supervivencia de los embriones (21, 27).



Figura 2. Embrión normal

6. Detección de la integración

Habitualmente en ratones, el ADN es analizado a las 3 y 6 semanas de edad, respectivamente, para detectar secuencias integradas. Cuando son tomadas muestras de tejidos o de sangre, los animales deben ser marcados permanentemente y de tal forma que no se confundan. En casos raros, los animales que portan un fragmento transferido integrado, pueden mostrar alteraciones fenotípicas al nacer. Por otra parte, la expresión de fenotipos que distinguen a los animales transgénicos de los no transgénicos normalmente no son expresados en todos los individuos, pruebas inequívocas de la presencia de un fragmento génico integrado pueden ser obtenidas por análisis del ADN genómico (8, 19, 21, 27).

En relación a lo que conocemos por transgénesis, se sabe que el genoma del animal resultante tendrá una o más copias del fragmento génico. Tales animales, se dice que son transgénicos y el fragmento génico insertado se

llama transgén. Aproximadamente la mitad de los animales transgénicos expresan realmente el transgén (o sea, que producen el polipéptido), pero casi todos ellos transmiten el gen a su descendencia con normalidad (24).

El animal que se obtiene a partir de un embrión inyectado con ADN se llama “fundador” (Fo). Todos los animales transgénicos que desciendan de un mismo fundador compartirán el mismo transgén (o locus transgénico), lo que se denomina una línea de ratones transgénicos (8).

Un signo obvio que indica que hubo múltiples sitios de integración en la generación de animales F1, es la heredabilidad del transgén, ya que en el caso de un fundador que tenga 2 sitios de integración, el 75% de los animales F1 serán transgénicos (26).

Con relación a la secuencia codificante, la transgénesis puede ser utilizada para introducir un alelo nuevo de un gen que ya existe en la especie, o también ofrecer la posibilidad de introducir genes que sean completamente nuevos para las especies (23).

Los transgenes contienen normalmente secuencias reguladoras y estructurales, las secuencias reguladoras son las que determinarán el tipo de tejido y momento de expresión del transgén. El elemento estructural es la secuencia de ADN que codifica para la proteína que se quiere expresar.

La mayoría de los animales transgénicos fundadores (>62%) son mosaicos, es decir que solo una porción de sus células son portadoras del transgén. Se cree que este fenómeno se produce por la integración del transgén en el genoma después de la primera replicación del ADN cromosómico. No siempre se produce la expresión del transgén y, a veces, se observa en tejidos o en momentos del desarrollo no específicos (expresión ectópica). En general, la expresión del transgén depende del lugar de integración en el genoma, por lo que diferentes líneas transgénicas pueden tener patrones de transcripción muy diferentes (5). Algunas veces se necesitan 20 o más descendientes F1 de los fundadores mosaico para transmitir con éxito el transgén. En algunos casos el transgén no entra en ninguna célula germinal, por lo que los fundadores nunca transmiten el transgén a su descendencia (8).

Diversas técnicas están disponibles para investigar la integración del transgén en el ADN de los animales, como es el caso de la prueba de Southern blot y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), entre las más importantes (26, 27).

Métodos de reproducción en animales transgénicos

En ciertos casos, el animal heterocigoto (Tg/+) posee un fenotipo fácil de identificar, pero en otros casos, el animal transgénico (Tg/+) no tiene un fenotipo perceptible y es necesario recurrir a técnicas moleculares, especialmente PCR y Southern blot.

Siempre que sea posible, es recomendable colocar el transgén en estado de homocigosis (Tg/Tg), es decir, realizar apareamientos homocigotos ya que de esta manera se economiza espacio y se evita el corte de cola (para obtener ADN) y el genotipado por pruebas para detección del transgén. La probabilidad de obtener un macho y una hembra homocigotos (Tg/Tg) a partir de una cruce heterocigota (Tg/+ x Tg/+) es, a priori de 1/16 (1/4 para que el macho sea Tg/Tg). Esto no siempre es posible debido a dos razones: Primero, alrededor del 10% de los transgenes son letales en estado homocigota (mutación recesiva letal). Segundo, durante el genotipado del ADN por pruebas de detección del transgén es muy difícil distinguir los animales transgénicos heterocigotos de los individuos transgénicos homocigotos. Si el transgén es viable al estado homocigota, lo mejor será localizar lo más rápido posible estos machos Tg/Tg, lo que permitiría suprimir los genotipados por PCR de su descendencia, ya que 100% de las crías resultantes de un cruce con hembras salvajes (+/+) serán heterocigotas para el transgén (Tg/+) (4).

Reproducción asistida.

Estas técnicas son esenciales para evitar la pérdida de líneas transgénicas. Las más importantes son: transplante de ovarios de ratones transgénicos en ratones no transgénicos ovariectomizados para obtener descendencia transgénica, esto es de valor incalculable en el caso de que no se pueda obtener descendencia de los ratones transgénicos; y fertilización *in vitro* (27).

IV. Función del retículo sarcoplásmico de corazón

El retículo sarcoplásmico constituye el mayor organelo intracelular que almacena Ca^{2+} libre dentro del miocito y que regula la relajación y el desarrollo de tensión en el músculo cardíaco y esquelético; esta conformado por una porción tubular longitudinal y otra formada por cisternas terminales (10).

En las cisternas terminales se encuentra la proteína calsequestrina que tiene 4 sitios de unión para calcio con una moderada afinidad por el Ca^{2+} , y las cuales son las responsables de la liberación de Ca^{2+} durante la activación muscular.

La porción tubular longitudinal está compuesta casi por completo de ATPasas de Ca^{2+} (SERCA), que secuestran el Ca^{2+} durante la relajación muscular (por lo que inicialmente se le conoció como factor relajante), distribuidos más ampliamente en las fibras rápidas. Se han identificado siete isoformas de SERCA que son codificadas por tres genes con la posibilidad de edición alternativa, expresándose de manera tejido específica, y son:

- a) SERCA 1a de músculo esquelético rápido adulto.
- b) SERCA 1b de músculo esquelético rápido neonatal.
- c) **SERCA 2a de músculo esquelético lento y cardíaco.**
- d) SERCA 2b de músculo liso y tejido no muscular.
- e) SERCA 3a, b, c de endotelio vascular, epitelio, linfocitos y plaquetas.

Gracias al transporte de Ca^{2+} de la SERCA en contra del gradiente de concentración, se alcanza en el interior del retículo sarcoplásmico una concentración similar a la del medio extracelular (2).

Hasta la fecha, los mecanismos transcripcionales involucrados en la expresión tejido específica del gen SERCA 2 durante la diferenciación celular y también durante el proceso de hipertrofia del miocito cardíaco son prácticamente desconocidos. Un número creciente de reportes derivados de modelos experimentales en animales y en humanos indica que la función de transporte de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico está disminuida en el miocardio hipertrófico e insuficiente.

V. Pruebas para detectar los transgenes

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("Polymerase Chain Reaction"), es una metodología con la que se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (28).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa se desarrolla en tres pasos (Figura 3). El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas (94°C) durante 5 minutos. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria. A continuación se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa. Cada nueva cadena sintetizada rebasa la posición en la que otro cebador se unió en la cadena complementaria, generándose dos productos de extensión de longitud indeterminada. A continuación se vuelve a calentar la misma mezcla de reacción a 94°C pero por tiempo corto de manera que los híbridos de pequeña longitud se separen y sirvan ahora de modelos de nuevas parejas de oligonucleótidos cebadores. Cada una de las moléculas de ADN hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Así tras 20 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN (28).

Entre las principales aplicaciones de la PCR tenemos: clonación de ADN amplificado, creación de genotecas de expresión, preparación de reacciones de secuenciación, pruebas de paternidad, criminalística y forense, detección

clínica de procesos malignos o infecciones y detección de mutaciones. Recientemente la realización de PCR *in situ* ha permitido la localización de ácidos nucleicos específicos de virus presentes en muestras, por lo que a futuro puede ayudar enormemente a la localización específica de secuencias extrañas de ARN o ADN (6).

Para comprobar los resultados de PCR se hace la prueba de electroforesis en gel, que es la forma rutinaria para analizar el ADN. El gel es una red compleja de moléculas poliméricas, la distancia que el ADN migra a través del gel refleja su tamaño, el cual se puede estimar usando fragmentos de ADN marcador como referencia (Figura 4).

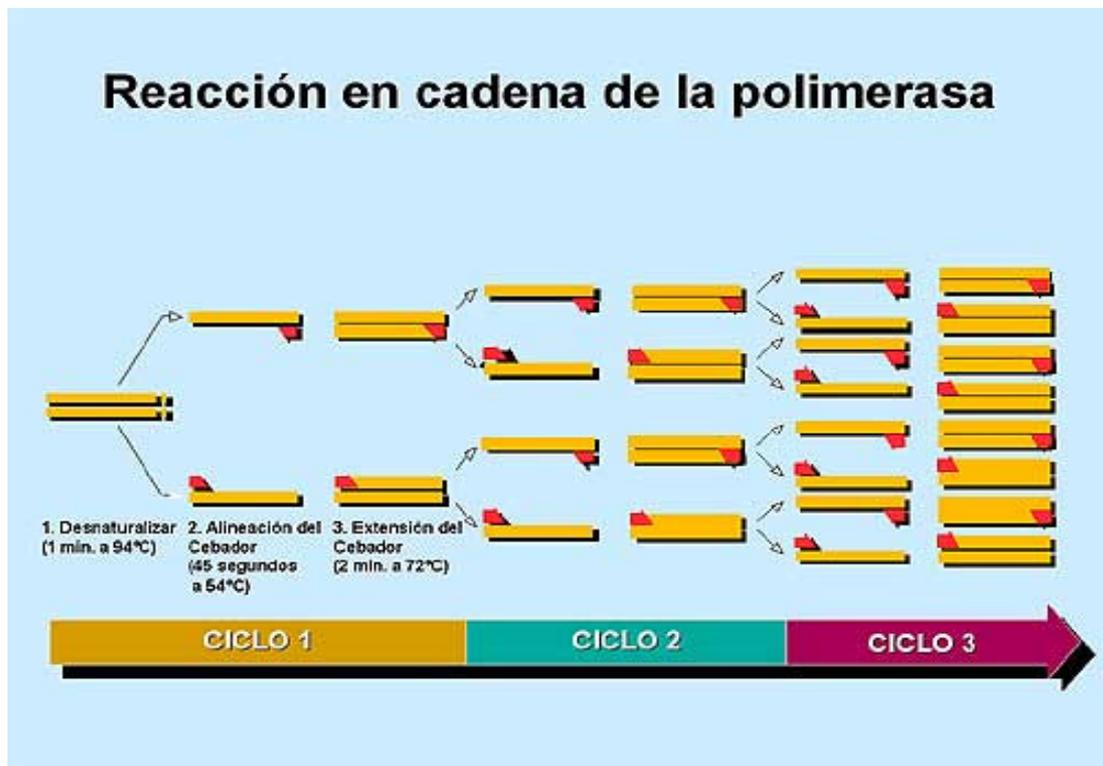


Figura 3. Ciclos del PCR. Ciclo 1. Separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a 94°C durante 5 minutos. Ciclo 2. Se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. Ciclo 3 Consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa (41).

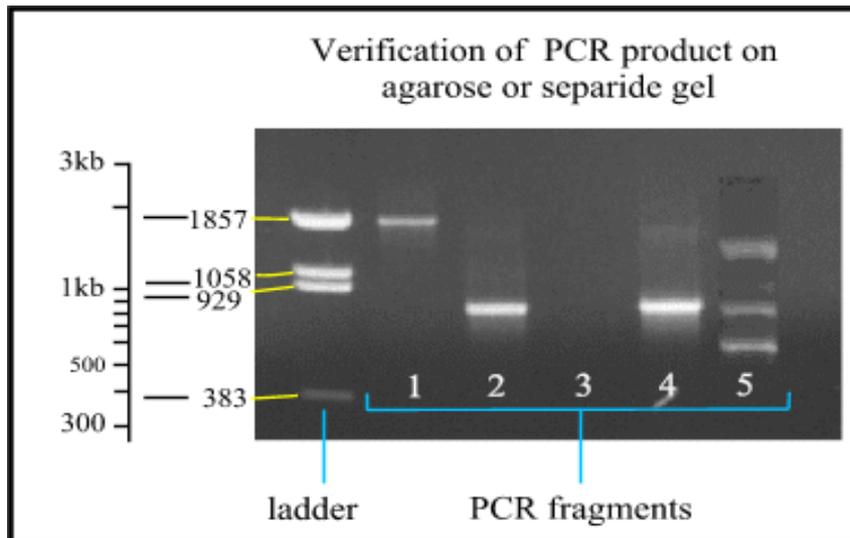


Figura 4. Verificación de los resultados de PCR en gel.

La escala es una mezcla de fragmentos con tamaño conocido que se compara con los fragmentos de la PCR. Obsérvese que la distancia entre los diferentes fragmentos de la escala es logarítmica. Escala 1: el fragmento de PCR tiene aproximadamente una longitud de 1850 bases. Escala 2 y 4 los fragmentos tienen una longitud aproximada de 800 bases. Escala 3: no se formaron productos, no funcionando la PCR. Escala 5: múltiples bandas son formadas porque uno de los cebadores encajó en diferentes sitios (41).

La prueba de PCR presenta los siguientes inconvenientes para la detección del transgén:

a) La taq polimerasa (*Thermus aquaticus* bacteria termofílica que posee la enzima Taq polimerasa), resiste incubaciones repetidas, incrementa la especificidad de la PCR al disminuir el alineamiento erróneo) (35) o algunas variantes hechas por ingeniería genética carecen de actividad correctora 3'—5' exo, con lo cual presentan una tasa de incorporaciones erróneas bastante alta. El problema puede ser especialmente grave cuando aparece alguna mutación en los primeros ciclos de la PCR, ya que quedará fija la mutación en los ciclos posteriores y aparecerá en la mayoría de las moléculas amplificadas.

b) Uno de los principales factores limitantes es la longitud de ADN molde entre los cebadores, generalmente cuanto más larga es la secuencia, menor es la eficiencia de la PCR.

c) La secuencia del ADN por amplificar puede afectar también a la eficiencia del proceso. Las hebras desnaturalizadas que presentan zonas de secuencias ricas en guanina citosina, pueden impedir a la enzima la lectura del ADN molde, ya que tienden a formar estructuras secundarias (35).

d) Las concentraciones de reactivos llegan a ser limitantes, ya que la enzima se va agotando después de los repetidos ciclos de calentamiento.

e) Si el cebador no está totalmente extendido antes de la desnaturalización (lo cual puede ocurrir si la polimerasa tiene una baja procesividad o encuentra una base dañada) entonces las cadenas parcialmente sintetizadas pueden competir con los cebadores en los siguientes ciclos.

f) La amplificación exponencial de moldes de ADN, que puede conseguirse incluso a partir de una sola célula, cualquier *detritus* celular o reactivos contaminados pueden presentar un serio riesgo de resultados falsos (35).

Southern blot

La técnica de hibridación o Southern blot denominada así en honor a quien la desarrolló en 1975, se emplea para identificar fragmentos específicos de ADN en una mezcla compleja. Inicialmente se digiere el ADN que se quiere estudiar con una o más enzimas de restricción, las cuales cortan en puntos específicos de la secuencia, generando fragmentos de varios tamaños. Seguidamente, estos fragmentos se separan en un gel de agarosa y luego se transfieren a una membrana. Se cubre la superficie superior del gel con un filtro de nitrato de celulosa y se tapa con un papel de filtro seco. El ADN pasa a través del gel, absorbido por el papel de filtro seco, cuando el ADN entra en contacto con el nitrato de celulosa, se queda fijo en él. El ADN debe ser desnaturado para que quede permanentemente fijo al nitrato de celulosa calentando a 80°C, después se coloca el filtro en una solución de ARN radioactivo o ADN radioactivo desnaturado, cuya secuencia sea complementaria a la del ADN transferido por absorción para que el ADN radioactivo o sonda pueda hibridar con el ADN complementario sobre el nitrato de celulosa. Al exponer la membrana a una película de fotografía, podemos identificar el fragmento y establecer así si está o no contenido en el ADN que estamos estudiando (Figura 5), (25).

El método es sumamente sensible e incluso se puede emplear para mapear sitios de restricción a lo largo de un gen presente en una sola copia, en un genoma complejo (25). Muchos análisis de Southern blot se usan para detectar mutaciones de genes, siempre y cuando las mutaciones produzcan un nuevo sitio de acción de las enzimas de restricción, dando como resultado cambios detectables en los fragmentos cortados por estas (6).

Los inconvenientes de la prueba de Southern blot son los siguientes:

a) No hace la determinación del cociente entre heterocigotas y homocigotas, con base en la presencia de la(s) secuencia(s) de ADN introducido.

b) El resultado de un experimento de hibridación depende de la estabilidad de los híbridos que se produzcan, cuanto mayor sea el grado de similitud entre ambas cadenas, mayor será la estabilidad. Un aumento moderado de la

temperatura es suficiente para deshacer los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas, lo que hace a los híbridos más inestables a temperaturas altas (28).

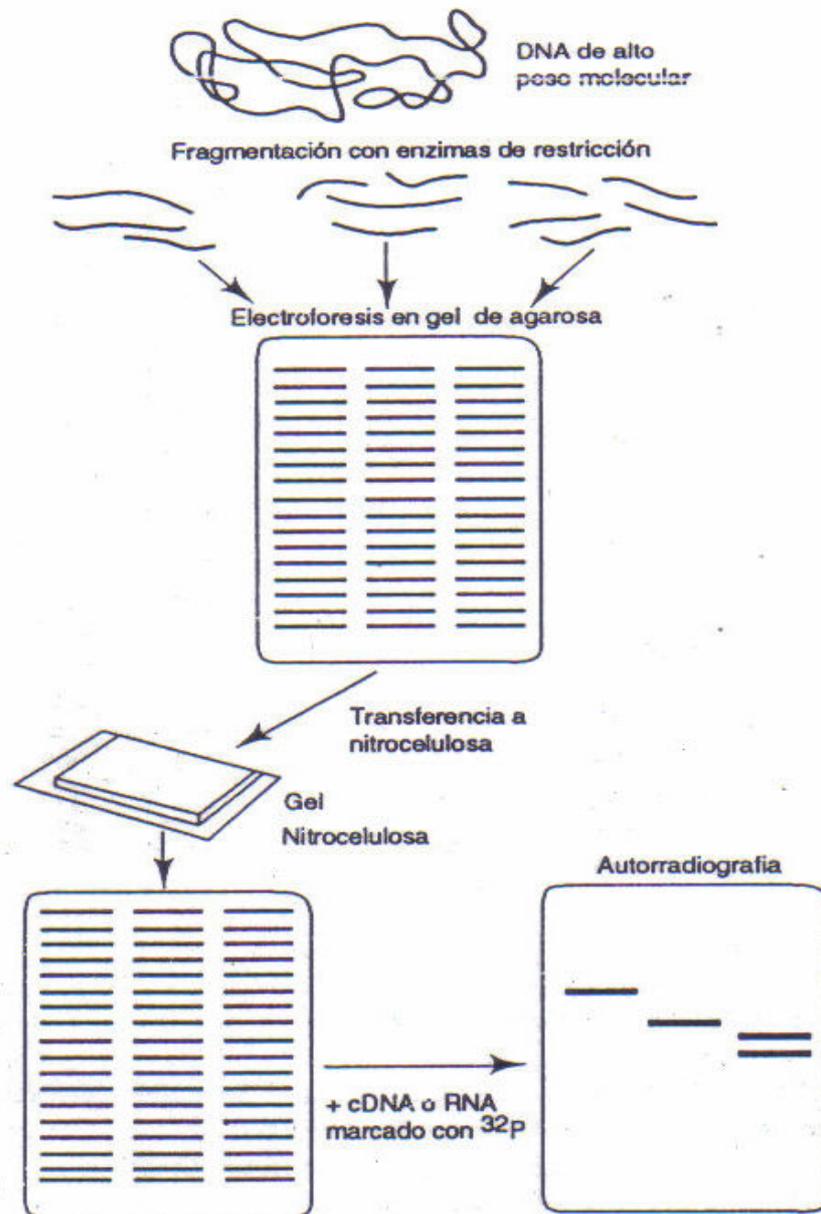


Figura 5. Transferencia Southern. El ADN se fragmenta con una o varias enzimas de restricción. Los fragmentos se separan por tamaño usando electroforesis en gel agarosa. El gel se coloca entonces sobre una pieza de nitrocelulosa y se hace pasar solución amortiguadora a través del gel que esta sobre la nitrocelulosa, esto hace que los fragmentos de ADN salgan del gel y se unan al filtro, de modo que en él se obtiene una réplica de los fragmentos de ADN separados del gel. El filtro puede hibridarse con una sonda marcada adecuadamente y los fragmentos de ADN que hibriden la sonda se podrán observar en una autorradiografía.

MATERIAL Y METODOS

La investigación se realizó en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Se emplearon tres ratones cepa B6D2F1/J (dos hembras y un macho) con el transgén SERCA 2 del retículo sarcoplásmico de corazón y ocho animales B6D2F1/J (cinco hembras y tres machos) sin el transgén.

Los animales provinieron del Anderson Center de la Universidad de Houston, certificados libres de patógenos específicos y son el resultado de la cruce de ratones cepa DBA color agouti con ratones cepa C57BL/6 color negro, el ADN fue microinyectado en el pronúcleo masculino y el cromosoma homólogo materno (pronúcleo) no fue inyectado, denominado también “wild type”.

a) Manejo general de los ratones transgénicos

1. Los animales fueron alojados en microaisladores, que son cajas de policarbonato con una medida de 27 x 15 x 21 cm, con un filtro especial en la tapa de la caja para prevenir la contaminación aérea entre una caja y otra (Figura 6). Cuentan con un contenedor metálico en el interior de la caja en el cual se coloca el alimento y el bebedero. Pueden estar alojados de 4 a 5 ratones adultos o una hembra con sus crías. A cada microaislador se le colocó una etiqueta y se clasificó con los siguientes datos: progenitores, fecha de nacimiento de la hembra, fecha de nacimiento del macho, fecha de apareamiento, fecha de nacimiento de la camada, número de crías machos y hembras. Todas las cajas se colocaron sobre un anaquel especial que permitió que las cajas se mantuvieran ventiladas, dicho anaquel mide 1.77 m de largo, 1.91 m de alto y 62 cm. de ancho, en cada anaquel se pueden colocar 12 cajas. El cuarto en el que se alojaron los ratones mide 4.83 m de largo, 3.35 m de ancho y 2.5 m de alto.



Figura 6. Foto de un microaislador donde se puede observar el filtro de la tapa y el contenedor metálico para colocar el agua y el alimento.

2. El alimento para los ratones fue ofrecido *ad libitum*. El consumo aproximado por ratón es de 3-5 g de alimento diario, se utilizó alimento irradiado marca PICOLAB de Purina que contiene 20% de proteína cruda, 4.5% de grasa cruda, 6% de fibra cruda, cenizas 7% y minerales adicionales 2.5%. El agua también se proporcionó *ad libitum* y se esterilizó en autoclave, la cual se colocó en bebederos de chupón y donde el consumo aproximado es de 1.5 mililitros de agua por 10 gramos de peso.

3. El cambio de microaisladores, bebedero y cama se realizó de 2 a 3 veces por semana, la cama utilizada fue de la marca Aspen Shaving (Northwestern).
El manejo y cambio de cama se realizó en una campana de flujo laminar marca Heto-Holten.

4. Manejo de condiciones ambientales. T° 18-26 °C, humedad relativa 40-70%, fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas oscuridad. El cuarto en el que se instaló a los animales cuenta con un reloj para el control del fotoperíodo, también cuenta con un aparato que mide la temperatura y la humedad (termohigrómetro), para poder mantener a los animales dentro de los parámetros establecidos en la norma 062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para el cuidado, uso y mantenimiento de animales de laboratorio).

La temperatura y la humedad se regularon por medio de la inyección de aire a los cuartos.

5. Los microaisladores y bebederos sucios fueron lavados y colocados en bolsas para esterilizar, para posteriormente ser reutilizados.
6. Desechos. La cama sucia se colocó en bolsas transparentes para su disposición en contenedores especiales para este fin.

b) Manejo reproductivo.

1. Tipo de apareamiento: El sistema de apareamiento utilizado inicialmente fue en harem para el caso del macho transgénico con hembras no transgénicas y en monogamia en relación a las hembras transgénicas. Los animales F1 y su descendencia fueron apareados entre hermanos cuando fue posible y en caso contrario se aparearon con animales sin transgén; estos apareamientos se hicieron en parejas monógamas.
2. Sexado y censo de animales por parto: Se contó el número de crías postparto y entre los 21-25 días se realizó destete; los animales se pesaron semanalmente con una balanza OHAUS hasta que alcanzaron los 100 días de edad para realizar posteriormente una línea de crecimiento. Los pesos obtenidos semanalmente de hembras y machos se compararon con los pesos de los ratones transgénicos de los laboratorios Jackson por medio de una prueba t de student, para observar si existían diferencias significativas entre los pesos de los animales (ver en resultados).
3. Identificación: Los animales fueron marcados con orificios o muescas en las orejas para asignarles un número y realizar con ellos el manejo reproductivo necesario para seguir obteniendo ratones con el transgén.

4. Alojamiento: Por la limitada cantidad de microaisladores (15 ocupadas y 15 para cambio) los ratones al ser destetados fueron alojados en cajas de policarbonato con medidas de 56 x 28 x 23 cm, separados por sexo, machos y hembras hermanos; cada caja se etiquetó con los datos de procedencia de los animales (progenitores), sexo y número total de animales en cada caja, fecha de nacimiento de la camada y fecha en que se destetaron los animales. Se cambió el tipo de alimento a 5001 de PMI se les empezó a dar agua acidificada (50 ml de ácido clorhídrico en 50 litros de agua) en lugar de esterilizada y la cama que se utilizó fue de otra marca y no se esterilizó, el cambio de caja dejó de realizarse en la campana de flujo laminar.
5. Reconocimiento de los animales con el gen (destino experimentación o reemplazo). Para conocer cuáles de los animales nacidos heredaron el transgén se utilizó la técnica de PCR y Southern blot, a partir de ADN que se obtuvo al cortar la punta de la cola (3mm fue suficiente). Cabe mencionar que estas pruebas las llevó a cabo el investigador a cargo del proyecto con su equipo de trabajo.
6. Todos los datos de los animales fueron vaciados en una libreta de registros, en donde se maneja la siguiente información: fecha de apareamientos de los ratones, número de caja en que se colocaron, fecha de nacimiento de la camada, número de crías machos y hembras, censos mensuales de los ratones, fecha de eutanasia o fallecimiento.

c) Información obtenida de los laboratorios Jackson

Los laboratorios Jackson son uno de los mejores laboratorios de EUA con 75 años de experiencia en la creación de ratones como modelos experimentales para ser utilizados en la investigación, representando así un modelo de calidad genética. Por tal motivo se utilizó como referencia a dicho laboratorio.

La siguiente información fue obtenida de los laboratorios Jackson, para realizar la comparación con los ratones del INCM N SZ.

1. Ratones B6D2F1/J
2. Tipo: Híbridos F1
3. Padres: C57BL/6JF x DBA/2JM
4. Apariencia: Negros
5. Alimentación: Lab Diet 5K52 (Purina) que contienen 18% de proteína cruda, 6% de grasa cruda, 5% de fibra cruda, 8% de cenizas y minerales adicionales 3%.

SEXO	3 sem. edad	4 sem. edad	5 sem. edad	6 sem. edad	7 sem. edad	8 sem. edad	9 sem. edad
HEMBRAS	11.17 g	17.53 g	18.58 g	20.15 g	21.18 g	23.31 g	24.41 g
D.E.	± 1.89	±1.29	±.082	± 1.09	± 1.46	± 3.41	± 2.82
MACHOS	13.01 g	19.62 g	22.60 g	25.94 g	28.78 g	31.80 g	34.49 g
D.E.	± 1.66	±2.01	± 1.64	± 2.09	± 2.83	± 1.78	± 2.53

Cuadro 1. Ganancia de peso X en 40 ratones de los laboratorios Jackson. Edad en semanas, peso promedio (en gramos), desviación estándar.

RESULTADOS

En los cuadros 2 y 3 se presentan los pesos por semana de hembras y machos comparados con los pesos de los ratones de los laboratorios Jackson ($p < 0.05$).

EDAD EN SEMANAS	(1) PESO PROMEDIO EN GRAMOS DE LA MUESTRA (n=10)	(2) PESO PROMEDIO EN GRAMOS DE LA POBLACIÓN	CONCLUSIÓN DIFERENCIA:
3	10.23	11.17	NO SIGNIFICATIVA
4	15.65	17.53*	SIGNIFICATIVA
5	17.09	18.58*	SIGNIFICATIVA
6	17.69	20.15*	SIGNIFICATIVA
7	19.27	21.18*	SIGNIFICATIVA
8	18.85	23.31*	SIGNIFICATIVA
9	20.12	24.41*	SIGNIFICATIVA

Cuadro 2. Peso promedio de las hembras transgénicas criadas en el bioterio del INCMN SZ (1) y el de las hembras de los laboratorios Jackson (2). * ($p < 0.05$)

EDAD EN SEMANAS	(1) PESO PROMEDIO EN GRAMOS DE LA MUESTRA (n=10)	(2) PESO PROMEDIO EN GRAMOS DE LA POBLACIÓN	CONCLUSIÓN DIFERENCIA:
3	11.03	13.01*	SIGNIFICATIVA
4	16.03	19.62*	SIGNIFICATIVA
5	19.76	22.60*	SIGNIFICATIVA
6	22.97	25.94*	SIGNIFICATIVA
7	23.51	28.78*	SIGNIFICATIVA
8	23.84	31.80*	SIGNIFICATIVA
9	24.89	34.49*	SIGNIFICATIVA

Cuadro 3. Peso promedio de los machos transgénicos criados en el bioterio del INCMN SZ (1) y el de los machos de los laboratorios Jackson (2). * ($p < 0.05$)

En la siguiente figura podemos observar más claramente la diferencia en la ganancia de peso de los ratones con transgén del INCMN y los de los laboratorios Jackson sin transgén.

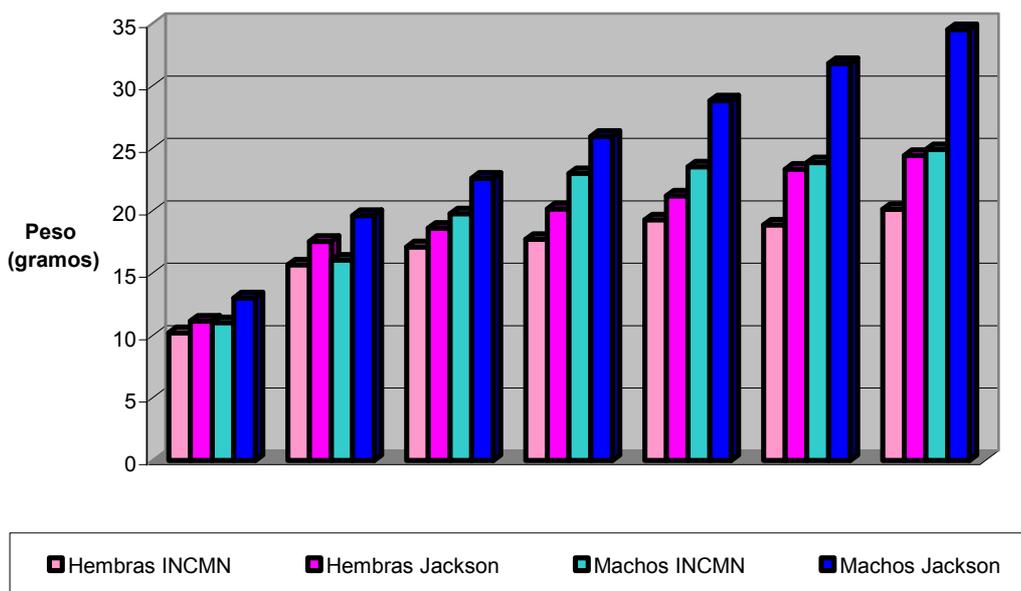


Figura 7. Ganancia de peso entre machos y hembras del INCMN y los laboratorios Jackson.

La ganancia de peso en los ratones B6D2F1/J sin transgén de los laboratorios Jackson es mayor a la de los ratones transgénicos del INCMN, en la tercera semana de edad la diferencia de los pesos no es muy marcada entre las hembras de ambos grupos y estadísticamente no es significativa, pero a partir de la cuarta semana de edad la diferencia en la ganancia de peso se vuelve aparente y estadísticamente significativa. En los machos la diferencia es marcada desde la tercera hasta la novena semana, siendo más relevante a partir de la séptima hasta la novena semana.

En la siguiente figura (figura 8) podemos observar como se expresó el transgén SERCA 2 en la colonia de ratones del INCMN SZ, en base a los resultados obtenidos en la prueba de southern blot.

Es importante aclarar que el número de ratones que se presentan, no representan el total de animales producidos, ya que solo se muestran los apareamientos de interés (en los que se detectó la presencia del transgén), por lo que en el cuadro 4 se presenta el total de animales producidos durante un tiempo determinado.

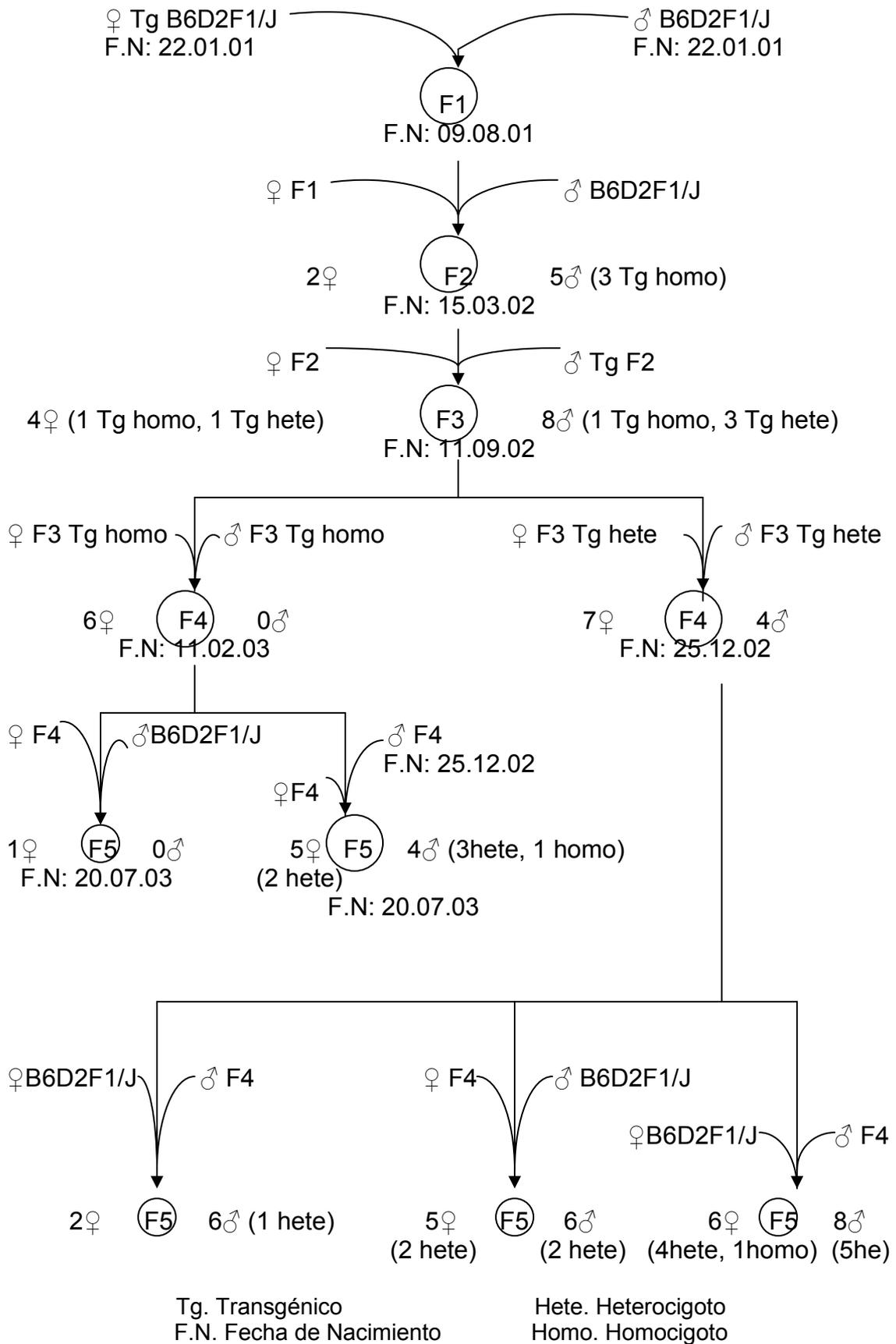


Figura 8. Expresión del transgén SERCA 2 en ratones del INCMN SZ

No. DE CRIAS		PORCENTAJE	X DE CRIAS POR CAMADA
HEMBRAS	127	49.23 %	3.62
MACHOS	131	50.77 %	3.74
TOTAL	258	100 %	

Cuadro 4. Total de animales producidos del 21 de junio del 2001 al 1 de septiembre del 2003 con su respectivo porcentaje, además del promedio de crías que se obtuvo por camada (35 partos).

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, se deduce que el cambio de ambiente fue determinante en la diferencia significativa entre los pesos de los ratones del INCMN SZ con los ratones de los laboratorios Jackson; ya que la mayoría de los animales del INCMN SZ se cambió de un microaislador a una caja, el contar con mayor espacio, de hasta el doble de lo necesario para los ratones (norma 062-ZOO-1999) implica un mayor gasto de energía, en comparación con animales que habitan un espacio mínimo de alojamiento (microaisladores). Como lo indica Zorzano 2004, el peso corporal depende del balance entre ingesta energética y el gasto energético. La energía se consume en los procesos del metabolismo basal, en la termogénesis inducida por el ejercicio y en la termogénesis adaptativa, la cual es una respuesta a los cambios ambientales como el frío, el consumo de alimentos y las infecciones virales o microbianas (42).

Así mismo, las condiciones ambientales son factores que influyen directamente en la salud y el consumo de alimento de los animales. Estas condiciones ambientales se dividen en dos: microambiente, que se refiere a los factores ambientales dentro de la caja en que habitan los animales; y macroambiente que son los factores ambientales fuera de la caja, como son: temperatura, humedad, ventilación, luz, ruido y condiciones higiénicas. Estos factores influyen directamente sobre el microambiente, ya que hay comunicación entre uno y otro (31). La importancia de las condiciones ambientales radica en el control de enfermedades en cada caja, evitando el acumulo de gases amoniacales, humedad y temperatura así como la contaminación entre una caja y otra.

Por otro lado, se conoce que los mamíferos que comparten un mismo espacio físico establecen relaciones interespecíficas e intraespecíficas que les permiten regular sus patrones de alimentación y predación (7), por lo que al

cambiar de ambiente a los ratones deben establecer nuevamente estas relaciones para adaptarse al nuevo espacio.

Sumado a lo anterior, se sabe que la hormona del crecimiento es esencial para lograr un crecimiento normal en sujetos jóvenes, y se ha confirmado que en ratas y ratones con estrés hay un decremento de dicha hormona (7), que podemos decir que al cambiar de ambiente a los ratones se les provoca un estrés adaptativo. En relación a lo anterior, es importante mencionar que el cambio de ambiente se realizó a partir de la tercera o cuarta semana de edad y como podemos observar en la figura 7, es a partir de la cuarta a la novena semana de edad en donde se observa que hay evidente diferencia en la ganancia de peso entre los ratones del INCMN SZ y los de los laboratorios Jackson.

La variación genética y los factores ambientales en los ratones indican que los requerimientos de nutrientes son diversos de acuerdo a los estándares nutricionales; además, el estado microbiológico de los animales, indica las poblaciones de flora intestinal de los ratones, que influyen las necesidades de nutrimentos (Nutrient Requirements of Laboratory Animals).

Una dieta promedio para ratones de laboratorio debe contener de 17 a 24% de proteína cruda, 4 a 11% de grasa cruda, 3 a 6% de fibra cruda y de 5 a 7% de cenizas (norma 062-ZOO-1999). Los alimentos que se les proporcionó a los dos grupos de ratones (del INCMN SZ y los laboratorios Jackson) se encuentran dentro de los estándares establecidos, para saber específicamente como influyó este en la ganancia de peso de los ratones se tendrían que realizar otros estudios más específicos.

Con relación al cambio de alimentación y agua de bebida de los ratones destetados, podemos decir que la literatura reporta que para que el ratón de laboratorio alcance el peso requerido en un período corto, los cambios en la dieta han de efectuarse en forma gradual, incrementando parcialmente la proporción de alimento nuevo, hasta reemplazar completamente el antiguo

alimento, esto se ha demostrado después de muchas pruebas con distintos alimentos (32).

Con respecto al agua de bebida, esta es una de las fuentes más importantes en la transmisión de enfermedades debido a que los animales contaminan a través de su boca, saliva, manos, pelos, orina y materia fecal el agua de los bebederos. En el caso del agua esterilizada, se elimina toda forma de vida, pero una vez que el agua es contaminada por el animal pierde sus características deseables. La acidificación elimina las principales bacterias patógenas de los animales de laboratorio además de que confiere estabilidad a la calidad higiénica del agua tratada y tiene la ventaja de que no pierde su poder bactericida al entrar en contacto con materia orgánica (29).

Por otra parte, en relación a la proporción entre machos y hembras (tabla 4) se observa que es casi del 50%, lo que nos lleva a la teoría genética que indica que los cromosomas X, Y determinantes del sexo se encuentran en la misma proporción al unirse con los cromosomas X del óvulo (21).

En el cuadro 4 podemos observar que el promedio de crías por camada es de 7.36 y la literatura nos indica que el promedio de ratones por camada es de 10 a 12, por lo que consideramos a los ratones transgénicos B6D2F1/J (transgén SERCA 2) como poco prolíficos; sin embargo se ha reportado que el promedio de animales por camada está influido por el tipo de cepa o estirpe a la que pertenecen los ratones (6, 9).

Con respecto a la expresión del transgén se sabe que en algunos casos el transgén no entra en ninguna célula germinal, por lo que los fundadores nunca transmiten el transgén a su descendencia (8). Se conoce que los animales fundadores son heterocigotos por lo que transmiten el transgén al 50% de su descendencia. No obstante, algunos de los animales transgénicos no transmiten el transgén o lo hacen con frecuencias inferiores al 50%. La explicación más probable de este fenómeno es el mosaicismo en las células de

la línea germinal (5). Algunas veces se necesitan 20 o más descendientes F1 de los fundadores mosaico para transmitir con éxito el transgén.

También debe de tomarse en cuenta que las predicciones de segregación mendeliana en animales transgénicos pueden estar alteradas ya que no se sabe *a priori* si se ha incorporado más de una copia del transgén, ni los lugares cromosómicos donde la inserción ha tenido lugar (17).

El transgén lleva la información necesaria, la cual no se confunde en ninguna forma, ya que el control regional debe permitir la transcripción únicamente en los tejidos en los cuales este gen es normalmente activo. Sin embargo, la integración casual puede resultar en inactivación insercional (mutación) de un gen en el sitio de integración, resultando en una pérdida de función que puede ser atribuido equivocadamente a una sobre expresión del transgén. En suma, la mutagénesis de un gen puede no ser aparente inmediatamente si un gen recesivo ha sido inactivado, mientras que un fenotipo anormal puede no evidenciar líneas transgénicas homocigotas que han sido establecidas. Además, el sitio en el que se integró el transgén puede resultar en alteraciones de tejidos específicos por medio del uso de diferentes promotores en cromosomas de localización normal (27). Por lo que podemos decir que la frecuencia esperada en la descendencia de los ratones transgénicos es diferente para cada caso, dependiendo de las características de cada animal fundador.

CONCLUSIONES

Si se cuenta con los recursos necesarios para mantener a los animales en condiciones ambientales estandarizadas se traduce en que el crecimiento de los ratones se mantiene de acuerdo a los parámetros establecidos para cada cepa o estirpe. Por lo que las diferencias existentes encontradas en los pesos de los ratones en este trabajo se deben más a los cambios en el manejo (esterilidad, alimentación, alojamiento) que a la manipulación genética.

Con respecto a la expresión del transgén se observó que las predicciones mendelianas no fueron en todos los casos las esperadas ya que al no saber cuantos transgenes se insertan en el ADN y su ubicación, hace que cada animal fundador sea único y por tanto las predicciones mendelianas también varíen.

Por último, es muy importante hacer notar que durante el desarrollo de cualquier proyecto de investigación, la utilización de animales de laboratorio en buen estado de salud y calidad microbiológica, así como el conocimiento de su origen genético y parámetros reproductivos, sumado a la estandarización de las condiciones de macro y microambiente, eliminan variables indeseables que pueden influir directamente en los resultados del proyecto y por tanto hacen que dicho trabajo sea reproducible.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso R. Transferencia de genes en animales domésticos. *Imagen Veterinaria*. Vol. 1 No. 5. 2001 pp.39-41.
2. Becker SVM. Caracterización de la actividad de transporte por las bombas de Ca^{2+} en túmulos transversos y retículo sarcoplásmico de fibras musculares esqueléticas de conejos adaptados al ejercicio y durante la fatiga. Tesis doctorado. Facultad de Medicina. U.N.A.M. 2004.
3. Barahona A, Piñero D. *Genética: La continuidad de la vida*. F.C.E. (2000).
4. Benavides F, Guénet J. *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio*. Universidad de Alcalá y SECAL. España. (2003).
5. Casado M, González R. *Los Retos de la Genética en el siglo XXI: Genética y Bioética*. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. (1999). pp 193-199.
6. Cox T., Sinclair J. *Molecular Biology in Medicine*. Blackwell Science . U.S.A. (1997) pp. 40-59.
7. Díaz PR. Efectos de la privación de alimento sobre el estado metabólico, el aprendizaje y la memoria en ratones machos adultos y su relación con la hormona del crecimiento. Tesis maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 1997.

8. Ferrick A, Di Mofetto-Landon L, Ohashi P S. Transgenic Mice as an *in Vivo* Model for self Reactivity. R.G. Landes Company Austin. Texas, U.S.A. (1993) pp. 1-5.
9. Fox JG, Anderson LC, Loew FM. Laboratory Animal Medicine. (2 ed.) Academic Press Inc. U.S.A. (2002) pp. 35-41.
10. Garza de la GP. Inhibición del retículo sarcoplásmico cardiaco por cadmio. Tesis Especialidad (Cardiología). Facultad de Medicina, U.N.A.M. 1992.
11. Grosveld F, Kollias G. Transgenic Animals. 2d. ed. Academic Press. San Diego, U.S.A. (1993) pp. 248-265.
12. Hafez ES, Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales (7ª ed) Mc Graw Hill. México, D.F. (2000) pp. 45, 416.
13. Hafez. Reproduction and Breeding techniques for laboratory animals. Lea and Febiger. Philadelphia, U.S.A. (1970) pp 299-314
14. Harkness J, Wagner J. Biología y Clínica de Conejos y Roedores. Acribia. Zaragoza, España (1997) pp.35-43.
15. Hill W, Mackay T. Evolution and Animal Breeding. C.A.B. International. 1989. pp 243-260.
16. Hrapkiewicz K, Medina L, Holmes D. Clinical Laboratory Animal Medicine. (2d). Iowa State University Press/Ames U.S.A. (1998)
17. Izquierdo RM. Ingeniería Genética y Transferencia Génica. Pirámide. Madrid, España. (1999) pp 247-261.

18. Lewin B. Genes. Reverté, S.A. Barcelona, España. (1991). pp. 685-689.
19. Lorne A, Babiuk J, Phillips, Murria Moo-Young. Animal Biotechnology. Pergamon Press. New York, U.S.A. (1989) pp. 233-248.
20. Luque J, Herráez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Harcourt. Madrid, España. (2001) pp. 203-206.
21. Monastersky G, Robl J. Strategies in transgenic animal science. A.S.M. Press. Washington, U.S.A. (1995) pp. 3-23, 25-31.
22. Murray JD, Anderson GB, Oberbauer AM y Mc Gloughlin MM. Transgenic Animals in Agriculture. Cabi Publishing. New York, U.S.A. (1999) pp. 269-282.
23. National Research Council. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Academia Nacional de Medicina. México, D.F. (2002). pp. 14-15, 54-55, 66-67.
24. Nicholas FW. Introducción a la Genética Veterinaria. Acribia. Zaragoza, España. (1998). pp. 80-82.
25. Old R, Primrose S. Principios de Manipulación Genética. Introducción a la Ingeniería Genética. Acribia. Zaragoza, España. (1987) p 8
26. Pinkert C. Transgenical Animal Technology. A laboratory handbook. Academic press. New York, U.S.A. (1994) p.p. 24-31, 69-80, 229-233.

27. Pühler A. Ingeniería Genética de Animales. Acribia. Zaragoza, España. (1993) p.p. 107-142.
28. Ramos RR. Técnicas de Investigación en Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España. (2001) pp. 85-92.
29. Sánchez FSG. Efecto del grado de acidificación del agua de bebida sobre el índice de conversión alimenticia de ratones de la cepa N.I.H. Tesis licenciatura. Facultad de Veterinaria. UNAM. 1993.
30. Scragg A. Biotecnología para ingenieros. Limusa. México, D.F. (2002) pp. 91-92, 238.
31. Serrano AG. Efecto de las variaciones del microambiente en la cría del ratón. Tesis licenciatura. Facultad de Veterinaria, U.N.A.M. 1973 pp. 23-31.
32. Sierra PJA. Evaluación de cinco alimentos diferentes utilizados en la alimentación de ratones de laboratorio. Tesis licenciatura. Facultad de Veterinaria. UNAM. 1985.
33. Silva BMP. Mantenimiento de una colonia de ratones gnotobióticos SPF heterocigotos con doble translocación Robertsoniana para obtener embriones trisómicos. Tesis licenciatura. F.E.S.C. U.N.A.M. 1992. p 6
34. Tymms MJ, Kola I. Method in Molecular Biology Gene Knockout Protocols. Aumana Press vol. 158. Totowa, New Jersey (U.S.A). (2001) pp.325-330.

35. Walker JM, Gingold EB. Biología Molecular y Biotecnología. (2ª. Ed) Acibia. Zaragoza, España. (1997) pp 43-58.
36. Wheeler MB. Production of transgenic livestock: Promise fulfilled. Journal of Animal Science. Vol. 81 No. 3, 2003 pp. 32-37
37. Wheelwright J. Interpretar el lenguaje de nuestros antepasados. Una actualización de la genética moderna a través de la visión de Victor Mckick. Discover en español. Vol. 6 No. 3 2002 pp 58-64.

OTRAS FUENTES CONSULTADAS

38. La cadena J. Animales transgénicos. 1999
<http://www.cnice.mecd.es/tematicas/genetica/index.html>.
39. Norma 062-ZOO-1999. <http://cinvestav.mx/upeal/norm.html>
40. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. 1995
<http://www.nap.edu/openbook/0309051266/html/>
41. Vanfleteren J. Principle of the PCR. 2004
<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr/html>
42. Zorzano A. Papel de nuevas proteínas mitocondriales en el balance energético. 2004. http://www.unav.es/revistamedicina/48_2/zorzano.pdf