



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE  
LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**VALORACIÓN DE LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE RATONAS  
TRANSGÉNICAS PPAR $\alpha$ -null CON DIFERENTE NUMERO DE  
PARTO**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE :

**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

**Paulo César Martínez Benítez**

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. RAFAEL HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**DRA. MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

MÉXICO, D.F.

Abril 2015



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.

## Resumen

Los animales de laboratorio utilizados como biomodelos en casi todos los aspectos de la investigación biomédica necesitan tener una estandarización en todos los parámetros; ya sean fisiológicos, bioquímicos, sanguíneos y reproductivos. Esto es con el fin de mantener una buena calidad en la investigación biomédica y para el caso de los distribuidores o reproductores de biomodelos mantener una producción constante. Uno de los objetivos de la Medicina y Zootecnia de animales de laboratorio es el de producir y mantener animales que presenten una respuesta estandarizada y previsible a la manipulación experimental, como cumplir con el principio de las 3 R's. Un modelo animal transgénico de reciente desarrollo es el ratón deficiente del activador del receptor Proliferador de Peroxisomas (PPAR $\alpha$ -null). Este modelo se caracteriza por carecer de la proteína PPAR $\alpha$  la cual se requiere para procesar lípidos a nivel intracelular en respuesta a la proliferación de peroxisomas. Los biomodelos transgénicos tienen problemas en la reproducción, y si existe otro factor agravante como la falta de un gen que afecta el metabolismo de lípidos la reproducción se ve más afectada. En este trabajo se observó que la cepa de ratones PPAR $\alpha$ -null tiene grandes deficiencias reproductivas en comparación con la cepa base C57BL/6.

## **INDICE**

### **CONTENIDO**

	<b>PÁGINA</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
2.1 Importancia del control de variables en la investigación con roedores de laboratorio	<b>8</b>
2.2 Cepas y Estirpes.	<b>10</b>
2.3 Características de la cepa base C57BL/6	<b>12</b>
2.4 Receptor Activado por Proliferador de Peroxisomas (PPAR)	<b>14</b>
2.5 Características de los ratones PPAR $\alpha$ -null	<b>15</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>16</b>
<b>4. HIPOTESIS</b>	<b>16</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>16</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>20</b>
<b>8. DISCUSIÓN Y CONCLUSION</b>	<b>36</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>37</b>
<b>10.REFERENCIAS</b>	<b>39</b>

## INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de la Medicina y Zootecnia de animales de laboratorio es el de producir y mantener animales que presenten una respuesta estandarizada y previsible a la manipulación experimental, como cumplir con el principio de las 3 R's.

Esto significa que la variabilidad debe mantenerse al nivel mínimo y de esta forma lograr que los experimentos que se realizan con estos animales sean provechosos con el menor número de animales posible y asegurar su bienestar durante los procesos de reproducción y experimentación. Los animales producidos bajo estos principios se denominan "animales estandarizados" o "de calidad definida"; estos animales se producen bajo condiciones animales controladas y estandarizadas, están libres de enfermedades y su definición incluye caracterización genética y condición microbiológica, cumpliendo además con sus necesidades de bienestar y enriquecimiento ambiental (Poole, 1987) (Weerd, 1996) (AALAS, 2010) (ICLAS, 2010).

La estandarización del ambiente de los animales de laboratorio (cajas, iluminación, temperatura, calidad del aire, ventilación, entre otros.) favorece la reproducibilidad de los resultados experimentales. El bagaje genético de algunas especies de animales de laboratorio como los roedores (ratones y ratas en su mayoría) se puede estandarizar por medio de sistemas de reproducción rígidos como los cruzamientos consanguíneos que producen cepas endogámicas con un mínimo de variación genética. La estandarización microbiológica se logra con la obtención de animales gnotobióticos y libres de patógenos específicos (SPF). De igual manera se puede alcanzar la estandarización de los procedimientos de operación siguiendo recomendaciones o regulaciones como las descritas por "Las buenas prácticas de laboratorio" (GLP) (Benn, 1995).

Para lograr este objetivo diferentes organismos han fomentado la utilización de parámetros, estándares y recomendaciones, las cuales, tienen tanto repercusión

internacional como nacional (Intitute For Laboratory Animal Resources. , 2010) (SAGARPA, 2002).

Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos tanto en México como en otras partes del mundo las características de los bioterios donde se alojan y producen animales de laboratorio presentan grandes diferencias, lo que abre la posibilidad de dispersión y falta de uniformidad en las características fenotípicas y genotípicas de los animales de laboratorio (Mata, 1979) (Castillo & Villalobos, 1987) (Cardenas, 1991).

Esta dispersión consecuentemente incrementa la variabilidad de los resultados de las investigaciones y su comparación entre diferentes laboratorios y bioterios.

En este sentido la contaminación genética por un deficiente programa de reproducción, detección de mutantes, deriva génica o inadecuado programa de control de calidad genética son factores que con frecuencia afectan los resultados de las investigaciones realizadas con animales de laboratorio (Lomeli & Carreño, 1991) (Torres, 2006) (Nitzki, Kruguer, Reinferberg, Wojnowsky, & Hahn, 2007) (The Jackson Laboratory).

Por otra parte, debido a las diferencias genéticas que existen en las diferentes estirpes y cepas de ratones, los parámetros reproductivos varían (Poole, 1987) (Pritchett & Taft, 2007).

De igual forma existen diferencias en los bioterios en la forma de alojar a los animales en cuanto a la densidad de población y espacio disponible por caja para la reproducción, diferencias de temperatura ambiental, variación en la calidad y tipo de alimento entre muchos otros factores identificables (Barnard, Lewis, Teter, & Thigpen, 2009) (O'Malley, Dambrosia, & Davis, 2008) (O'Malley, Dambrosia, & Davis, 2008) (Greenberg, 1972) (Cardenas, 1991).

En cuanto a las especies utilizadas como animales de laboratorio en México al igual que en otras partes del mundo la principal especie utilizada es el ratón

(*Mus musculus*), cerca del 90% de las investigaciones que se realizan utilizan esta especie (Comisión De Las Comunidades Europeas , 2007).

Si bien, a partir de 1980 ha habido una disminución en el número de animales y especies utilizadas en investigación, esto es cierto para otras especies y no para el ratón. Por el contrario, el ratón recientemente ha tenido un incremento en el número de animales utilizados debido a la aparición de los modelos transgénicos que son ratones modificados por ingeniería genética a través de la transferencia de secuencias específicas de ADN extraño, es decir de otro animal de su misma especie, de otra especie e incluso de otro reino (vegetal, fungí, mónera), que puede expresar o bloquear la síntesis de una proteína en particular. El uso de los modelos transgénicos se ha elevado considerablemente desde el uso del primer modelo en 1980 con un continuo crecimiento en miles de modelos disponibles de 1955 hasta el momento (Jaenisch, 1988).

Un modelo animal transgénico de reciente desarrollo es el ratón deficiente del activador del receptor Proliferador de Peroxisomas (PPAR $\alpha$ -null). Este modelo se caracteriza por carecer de la proteína PPAR $\alpha$  la cual se requiere para procesar lípidos a nivel intracelular en respuesta a la proliferación de peroxisomas. Por el contrario, los ratones que sí portan este gen se denominan: tipo silvestre ("wild type" por su nombre en inglés) generalmente de la cepa C57BL/6 (Taconic, 2008).

Los proliferadores de peroxisomas son compuestos que inducen el catabolismo de lípidos e incremento en el número y actividad enzimática de los peroxisomas intracelulares. Los ratones PPAR $\alpha$ -null presentan alteraciones en diferentes aspectos del almacenamiento de lípidos y su procesamiento así como la alteración de la respuesta inflamatoria (Taconic, 2008).

Las aplicaciones potenciales de este modelo son:

- Diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la hiperlipidemia
- Simular modelos humanos de alteración del procesamiento de los ácidos grasos
- Evaluar la influencia de PPAR $\alpha$  sobre el procesamiento de lípidos en diferentes compartimentos celulares.
- Mapeo de la especificidad tisular de las actividades celulares dependientes de actividad PPAR $\alpha$
- Refinamiento de modelos para el estudio de la inducción de mediadores que participan en la inflamación
- Exploración de la interrelación de las hormonas sexuales y la regulación del balance de lípidos.

Por lo anterior se puede observar que este modelo tiene amplia aplicabilidad al estudio de metabolismo de lípidos, obesidad y diabetes insulina resistente.

Actualmente el Instituto de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMN-SZ) tiene la necesidad de establecer una colonia de estos animales que satisfaga las necesidades de los investigadores en el INCMN-SZ. Resulta particular el observar que un problema que se presenta en la producción de ratones de laboratorio es el determinar con exactitud la eficiencia reproductiva y productiva de las hembras, la cual se ve afectada por un gran número de factores externos como los mencionados anteriormente (ambientales, tipo de alojamiento, densidad de población, condición microbiológica, alimentación sistema de reproducción e interacción entre congéneres) así como factores genéticos.



## **Importancia del control de variables en la investigación con roedores de laboratorio**

El animal de laboratorio debe de tener una respuesta predecible a una serie de factores diferentes que existen en los diferentes bioterios o centros de investigación. Este tipo factores que se espera sean homogéneos tienen diferente naturaleza y, debido a ella, afectan de manera positiva o negativa la investigación que se realice.

Es importante que los animales de laboratorio o reactivos biológicos mantengan estos estándares de homogeneidad siempre, pues hacen más fácil la obtención del resultado de la investigación cuando esta se reproduzca nuevamente, dado que esta es una característica del método científico.

Mientras menos variabilidad exista en el modelo animal estandarizado los resultados de las investigaciones científicas serán más confiables y reproducibles en todo el mundo (Giráldez Dávila & Martín Zúñiga).

Las variables que afectan a la investigación desde el punto de vista del modelo animal o reactivo biológico son:

Biológicos:

- Genotipo
- Microbiota
- Bacterias
- Aire
- Alimento
- Agua
- Personal del bioterio
- Insectos
- Parásitos
- Otros animales o roedores salvajes

No biológicos:

- Instalaciones
- Encierros primario y secundario
- Temperatura, humedad, recambios de aire, gases
- Luz (periodos, intensidad y color)
- Cama

En el modelo animal:

- Elección del modelo animal apropiado a la investigación
- Tamaño de la muestra
- Diseño estadístico
- Administración de sustancias
- Tratamientos médicos
- Operaciones quirúrgicas

En el caso de los roedores, como ejemplo, en su confinamiento en solitario, es decir un animal por caja provoca un aumento en la variabilidad a la respuesta a fármacos, así como también afecta la respuesta inmunológica, la química cerebral, el aprendizaje, el umbral de dolor, produce comportamiento atípico, provoca cambios en el peso corporal y de los órganos, produce cambios en el conteo celular, aumenta la función adrenal, se incrementa la frecuencia cardiaca y se afecta el ritmo circadiano normal de esta especie (Mackintosh, 1962) (Valzelli, 1973) (Baer, 1971) (Späni, Arras, König, & Rüllicke, 2003).

## **Cepas y Estirpes.**

En la investigación se utilizan animales con una identidad genética diversa, así como animales genéticamente definidos. Los diferentes tipos de ratones que se utilizan en la investigación biomédica son clasificados con diferentes denominaciones de acuerdo a sus características, esto es importante al momento de elegir un modelo animal para una investigación específica (The Mouse In Biomedical Research, 1981).

A los diferentes tipos genéticos se les conoce como cepas y estirpes. El término “cepa” se utiliza en animales genéticamente definidos, es decir, que son animales cuya homogeneidad genética es virtualmente la misma entre los individuos, dado que para su creación se realizan por lo menos 20 generaciones consecutivas de cruces entre hermano y hermana de estos ratones (Suckow, Danneman, & Brayton, 2001).

En cuanto a las estirpes, son ratones cuya homogeneidad genética no es importante y son colonias de ratones heterogámicas, donde la información genética es distinta entre los individuos. Usualmente se mantienen en colonias cerradas sin la introducción de otros animales de otra cepa o estirpe. El grado de variación genética de cada colonia depende de la historia de cada colonia, es decir, algunas colonias se forman con un número pequeño de parejas reproductoras y, con el tiempo, tienden a perder su variabilidad genética. A veces, estas colonias presentan cierto grado de endogamia, ya sea alta o moderada (Handbook Of Laboratory Animal Science , 2011).

Por otra parte, la clasificación de las cepas es más amplia y abarca diferentes conceptos y términos, entre ellos encontramos las siguientes:

- Ratones híbridos: Estos ratones son la primera generación (F1), resultado del apareamiento entre dos cepas distintas (Suckow, Danneman, & Brayton, 2001).
- Ratón endogámico recombinantes: Estos animales surgen de la cruce entre los F1, los cuales son la segunda generación o F2. Así, una cepa de ratones recombinantes surge después de 20 generaciones a partir de los F2 (Suckow, Danneman, & Brayton, 2001).
- Ratón endogámico que posee una mutación espontánea: Estos ratones endogámicos son perpetuados a partir de un solo ratón que nació con un cambio genético significativo. Por ejemplo, el ratón obeso C57BL/6J-*Lepob*, que se torna extremadamente obeso debido a una mutación que ocurre en un gen que codifica para la hormona leptina (Suckow, Danneman, & Brayton, 2001).
- Cepas coisogénicas: Son cepas de ratones que difieren entre ellos solo en un gen, la diferencia se origina en la mutación espontánea que ocurre en dicho gen. Una vez que aparece esta mutación el animal se separa como una cepa aparte de la cepa original (Suckow, Danneman, & Brayton, 2001).
- Ratones que portan mutaciones inducidas: las mutaciones pueden ser inducidas por químicos (por ejemplo, etilnitrosourea), irradiación o con retrovirus.

A su vez, esta categoría incluye a los siguientes:

Ratón transgénico: Estos ratones portan ADN de otros organismos que fue intencionalmente insertado en su ADN (Suckow, Danneman, & Brayton, 2001).

Ratones Knockout: En estos ratones, alguno de sus genes normales han sido inutilizados por medio de un proceso complejo conocido como recombinación homóloga (Suckow, Danneman, & Brayton, 2001). Un ejemplo de estos ratones es el PPAR $\alpha$ -null, del cual se hablará más a fondo en un capítulo posterior.

### **Características de la cepa base C57BL/6**

Este tipo de ratones endogámicos, surgen de una mutación espontánea, son de color negro; son la cepa más popular y utilizada para la investigación biomédica. También fue la primer cepa de ratones en tener secuenciado su genoma, entre otras características, esta cepa es refractaria para diferentes tipos de tumores, es resistente a convulsiones provocadas por el ruido, tiene una densidad ósea relativamente baja, y desarrolla pérdida de cabello provocado por la edad. Así como también son susceptibles a la obesidad inducida por la dieta, diabetes tipo 2 y aterosclerosis. Los macrófagos de esta cepa son resistentes a la toxina letal del ántrax (The Jackson Laboratory, 2012).

Dentro de la descripción más detallada que podemos encontrar está la de *The Jackson Laboratory*, que nos da una idea más detallada sobre esta cepa.

Información de la cepa:

- Tipo: mutación espontánea, cepa endogámica, se le considera una buena cepa reproductora.
- Apariencia: negros
- Nota importante: esta cepa es homocigota para la mutación que desarrolla la pérdida de cabello relacionada a la edad *Cdh23<sup>ahl</sup>*, que produce la pérdida de cabello en estos animales a partir de los 10 meses de edad.

- Descripción: La cepa C57BL/6 es la cepa endogámica más ampliamente usada. Es una cepa usada con propósitos generales así como también como cepa de trasfondo genético para la generación de mutaciones inducidas o espontaneas. Así también esta cepa es refractaria a varios tipos de tumores, su trasfondo genético permite la máxima expresión de muchas mutaciones.

Esta cepa es usada ampliamente en gran variedad de áreas de investigación, que incluyen biología cardiovascular, biología del desarrollo, diabetes y obesidad, inmunología, neurobiología e investigación neuronal. Estos ratones también son comúnmente usados en la producción de modelos transgénicos. Por sobre todo, los C57BL/6 se reproduce muy bien, tienen vida larga y tienen una baja susceptibilidad a tumores.

Otras características de la cepa C57BL/6 son:

- 1) Una gran susceptibilidad a la obesidad inducida por la dieta;
- 2) Gran incidencia de microftalmia y otras anormalidades asociadas a los ojos;
- 3) Resistencia a convulsiones por ruido;
- 4) baja densidad ósea;
- 5) Hidrocefalia hereditaria (del 1 al 4%);
- 6) Pérdida de pelo asociado a un sobre acicalamiento;
- 7) Tienen preferencia por el alcohol y la morfina;
- 8) Aparición tardía de pérdida de pelo;
- 9) Alta incidencia de hidrocefalia y maloclusión.

La cepa C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa desarrollan obesidad, hiperglucemia de media a moderada e hiperinsulinemia (The Jackson Laboratory, 2012).

### **Receptor Activado por Proliferador de Peroxisomas (PPAR):**

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares.

Existen tres isoformas ( $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ) hasta ahora descritas. Estos actúan como elementos del ADN como heterodímeros, con el ácido retinoico nuclear como receptor. Sus ligandos activadores naturales son los ácidos grasos y sustratos derivados de lípidos. El PPAR- $\alpha$  está presente en hígado, corazón y en menor proporción en el músculo esquelético. Es decir, son receptores que participan de manera activa en el metabolismo lipídico.

Cuando es activado, se promueve la oxidación del ácido graso, la síntesis de cuerpos cetónicos y la regulación de la glucosa. Los fibratos, que son usados como medicamentos hipolipidémicos, son ligandos del PPAR- $\alpha$  (Ferré, 2004).

## **Características de los ratones PPAR $\alpha$ -null**

Los ratones que carecen del gen funcional que codifica para el receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR), exhibe muchas alteraciones en el metabolismo de los lípidos. El modelo animal que carece de este gen es el ratón PPAR $\alpha$  null. Este modelo se origina en Estados Unidos de Norte América, en el Instituto Nacional de Cáncer, en el Laboratorio de Metabolismo por Frank González y colegas (Taconic, 2008).

Algunas de las características relevantes de este modelo animal son:

- Expresión anormal del ARNm para el PPAR- $\alpha$
- Ausencia de la proteína PPAR- $\alpha$
- Perfiles de lípidos séricos alterados.
- Falta de producción de ARNm para enzimas que oxidan a los ácidos grasos seguido de una exposición a proliferadores de peroxisomas
- Crecimiento normal, así también el peso, fertilidad y viabilidad. No se observan defectos anatómicos observables (Taconic, 2008).

## **Por lo tanto el uso potencial de este modelo:**

- Diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la hiperlipidemia
- Simular modelos humanos de alteración del procesamiento de los ácidos grasos
- Evaluar la influencia de PPAR $\alpha$  sobre el procesamiento de lípidos en diferentes compartimentos celulares.
- Mapeo de la especificidad tisular de las actividades celulares dependientes de actividad PPAR $\alpha$
- Refinamiento de modelos para el estudio de la inducción de mediadores que participan en la inflamación
- Exploración de la interrelación de las hormonas sexuales y la regulación del balance de lípidos.



## **Justificación:**

El INCMN-SZ tiene una larga tradición en proyectos de investigación del metabolismo de lípidos y su relación con las enfermedades de los seres humanos.

Como hemos dicho los ratones C57BL/6 y PPAR $\alpha$ -null tienen las características deseables para la investigación que se hace en el INCMN-SZ, por lo cual se convierten en una herramienta potencial para los investigadores involucrados en las alteraciones del metabolismo lipídico, de ahí que el establecer una colonia de estas características dentro del instituto permitirá el desarrollo de productos específicos. Por otro lado, el conocer las características reproductivas de la cepa PPAR $\alpha$ -null favorece la planeación de programas reproductivos para mantener siempre animales a disposición.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo buscará determinar cuáles son los parámetros reproductivos de la cepa PPAR $\alpha$ -null.

Cabe señalar que la cepa PPAR $\alpha$ -null es un modelo animal de reciente creación y se desconoce si la modificación genética en su genoma (PPAR $\alpha$  null) afectará el desempeño reproductivo de la cepa C57BL/6 base genética para este modelo transgénico. Lo anterior justifica la observación y reporte de las características promedio de su comportamiento reproductivo. Los parámetros obtenidos en el animal transgénico se compararán contra los observados en la cepa de origen (C57BL/6)

### **Objetivo General:**

Estudiar los parámetros reproductivos de las ratonas transgénicas PPAR $\alpha$ -null comparándose con los de la cepa base C57BL/6.

### **Hipótesis:**

Los parámetros reproductivos de las ratonas PPAR $\alpha$ -null serán menos eficientes que el de las ratonas C57BL/6.

Por lo que su identificación permitirá proponer mejoras de manejo y estimados de producción que mejoren el manejo reproductivo de la colonia.

### **Material y Métodos:**

Para esta investigación se utilizaron **83 unidades reproductivas** de ratones **PPAR $\alpha$ -nul**, como grupo comparativo se utilizaron **20 unidades reproductivas** de ratones **C57BL/6**; donde cada unidad reproductiva consta de un apareamiento monógamo de ratones, tomando registros durante 5 partos.

**Características del ambiente, del alojamiento, superficie de las cajas, material de cama, alimento y alimentación, frecuencia de cambios de cama, agua.**

Los animales se mantuvieron en el bioterio del INCMN-SZ. Con las siguientes características en su alojamiento:

Encierro secundario, estuvieron en un cuarto con 15 a 18 recambios de aire, con una iluminación automatizada de 12 horas luz por 12 horas de oscuridad, en cuanto a la humedad relativa se mantuvo entre los 40 – 70 %, la temperatura se mantuvo dentro de los 20 °C, en cuanto al confinamiento primario, se mantuvieron a los animales en cajas cerradas con extracción de aire individual, prueba de escape, con tapa removible; los bebederos que se utilizaron son removibles con agua esterilizada y se les proporciono *ad libitum*. En cuanto al comedero también se uso uno removible y el alimento se les proporciono *ad libitum*.

Las dimensiones de la caja en el encierro primario son: base de 29 cm; altura de 28 cm con una profundidad de 13.5 cm. Considerando que un ratón adulto de esta cepa pesa 25 g en promedio, por cada caja podemos tener hasta 6 animales adultos.

El material de cama que se usa es de la marca Aspen Shavings, que es esterilizable, sin toxinas, resinas, de madera virgen, buen material absorbente, cómodo, natural y no palatable. Los cambios de cama se hacen de dos a tres veces por semana.

En cuanto a la alimentación: se utilizó alimento PicoLab Roden Diet 20. 5053, que contiene: Proteína 20%; grasa cruda 4.4%; Fibra cruda 6%; cenizas 7%.

**Método reproductivo:**

El método reproductivo que se usó en el manejo de esta colonia fue el de parejas monógamas, con el macho siempre presente, introduciéndolas a la crusa al cumplir 8 semanas de vida. Dejando que obtuvieran por lo menos 6 partos.

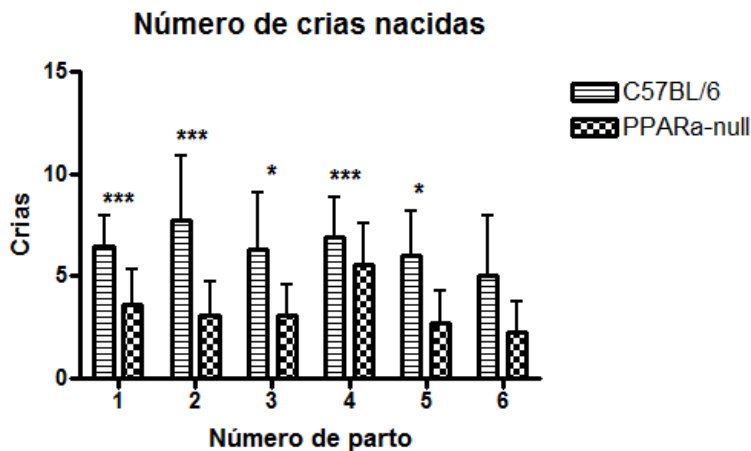
Las camadas tuvieron un periodo de lactación de por lo menos 3 semanas antes de ser destetadas.

## Resultados.

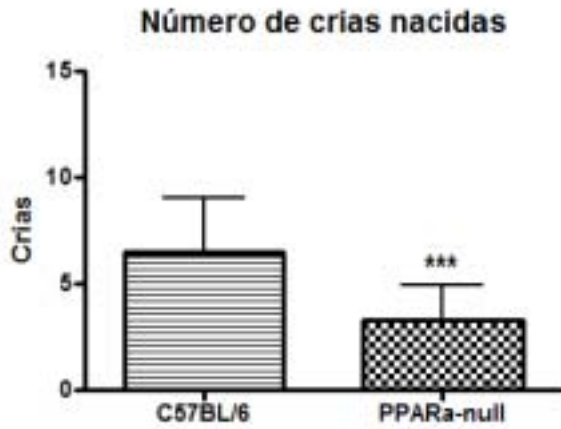
### Número de Crías Nacidas

Se analizaron los datos estadísticamente con una T de Student comparando cada parto entre ambos grupos (C57BL/6 y la cepa Transgénica *PPAR $\alpha$ -null*) y se encontró diferencia estadística significativa para el número de crías nacidas por parto comparando las cepas C57BL/6 y la cepa Transgénica *PPAR $\alpha$ -null* resultando que para el caso de los partos 1, 2 y 4 existe una diferencia altamente significativa y significativa para el caso de los partos 3 y 5, sin encontrarse una diferencia estadística en el parto 6 (Fig 1).

El número de crías nacidas son mayores en el caso de la cepa C57BL/6; dónde al parecer no afecta a esta cepa la edad comparándola con la cepa transgénica hasta el 6 parto. En el caso de la cepa *PPAR $\alpha$ -null* se mantiene con un bajo número de crías promedio por parto.

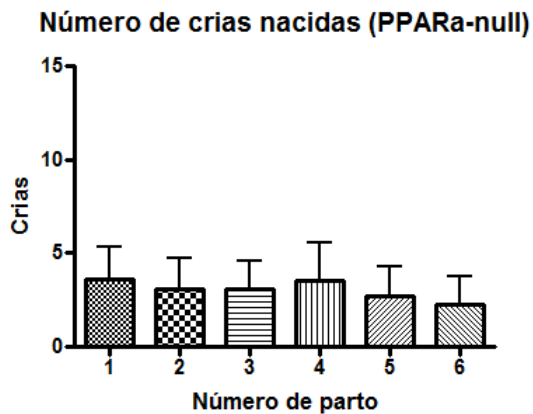
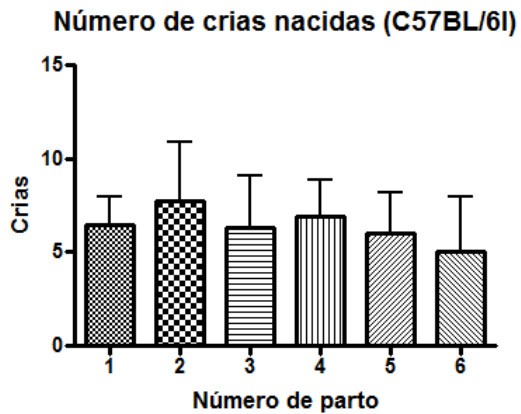


En la siguiente gráfica se muestra el total de crías nacidas en todos los partos de ambos grupos. En ella se muestra una diferencia estadísticamente significativa para el caso de la cepa *PPARα*-null en la que se muestra que tiene un número reducido de crías nacidas en comparación con la cepa C57BL/6.



Comparación de las crías nacidas entre los diferentes partos de la cepa C57BL/6 y *PPAR $\alpha$* -null

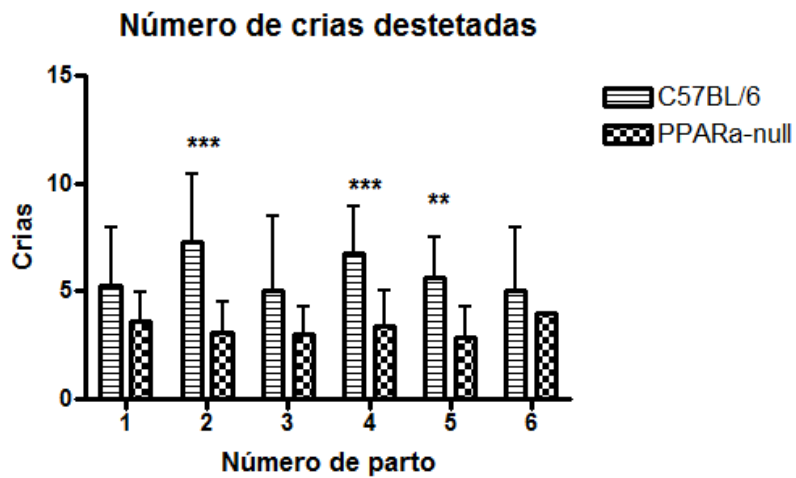
Para este análisis estadístico se realizó una ANOVA de una vía. Obteniendo como resultado que no existe una diferencia estadística significativa entre el número de crías con relación al número de parto ni a la edad de la hembra en ninguno de los dos grupos.



## Número de Crías Destetadas.

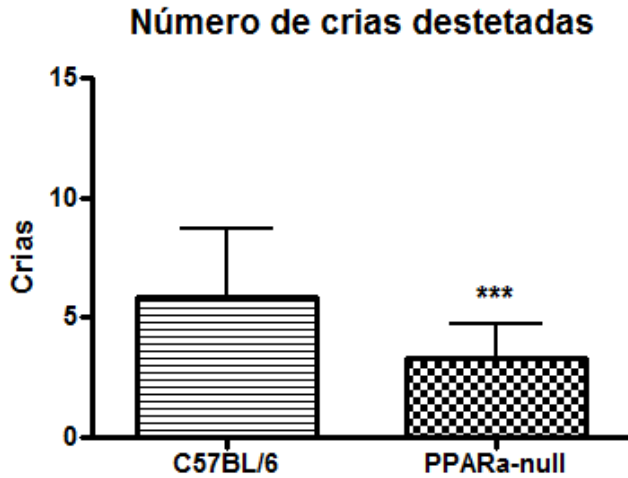
Para el número de crías destetadas por parto se compararon los partos entre ambos grupos encontrando una diferencia estadísticamente significativa para la cepa C57BL/6 en los partos 2, 4 y 5; mientras que los partos 1, 3 y 6 son estadísticamente iguales comparándolos con la cepa *PPARα*-null.

Esto significa que en los partos 2, 4 y 5 la cepa C57BL/6 desteta un mayor número de crías por parto.

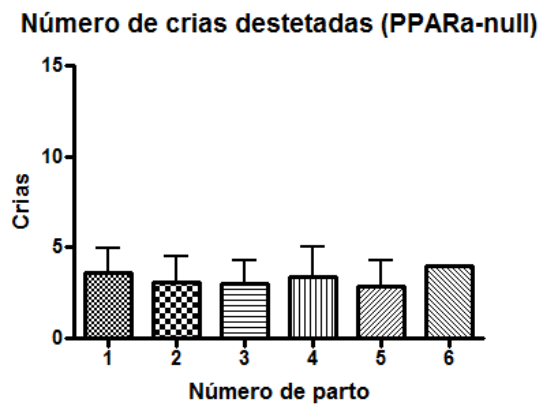
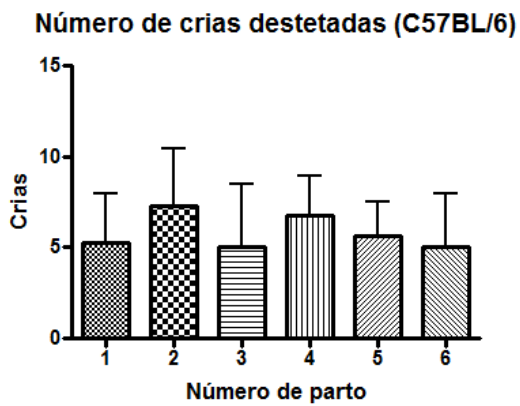




En la siguiente gráfica se muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa en el número de crías entre los dos grupos comparados; observando que el grupo *PPARα*-null presenta un menor número de crías destetadas en comparación con la cepa C57BL/6.

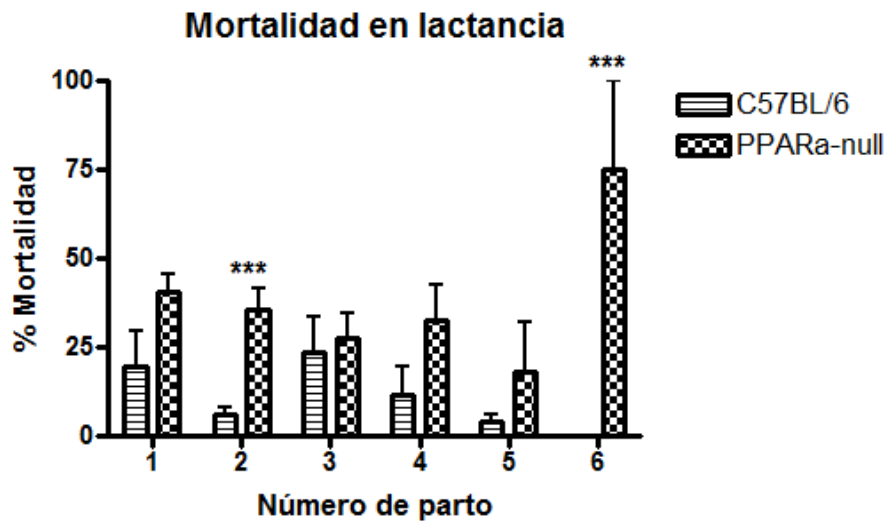


En cuanto a la comparación entre cada parto de cada uno de los grupos no se encontró una diferencia estadísticamente significativa para ningún caso; manteniendo un promedio constante en cada una de las cepas.

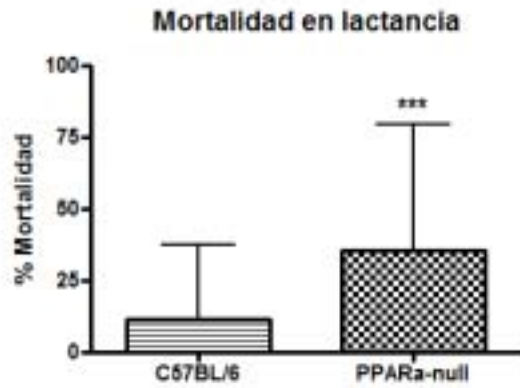


Mortalidad en la lactancia.

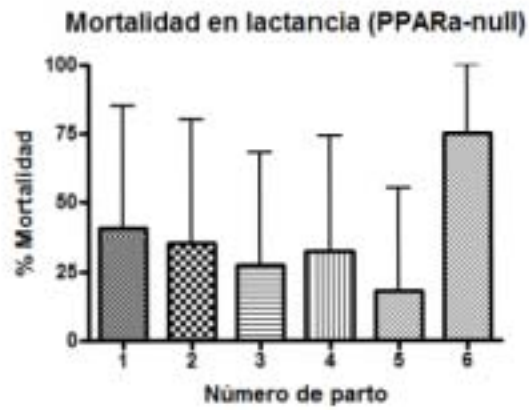
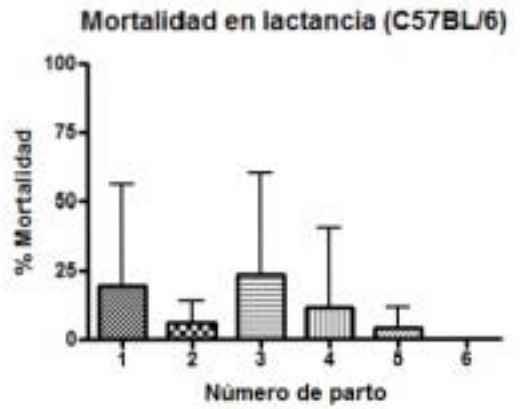
Comparando ambos grupos encontramos que existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la mortalidad en la lactancia para la cepa *PPARα*-null; esto quiere decir que la mortalidad es más alta comparándola con la cepa C57BL/6. Esto es visible en la siguiente gráfica dónde se muestra diferencia estadísticamente significativa en los partos 2 y 6; mientras que los otros partos se encuentran estadísticamente iguales.



Cuando se compara la mortalidad total entre ambos grupos se puede observar una diferencia estadística para el caso de la cepa *PPAR $\alpha$ -null* que presenta una mayor mortalidad en esta etapa a comparación con la cepa C57BL/6. La siguiente gráfica muestra esta diferencia estadística.



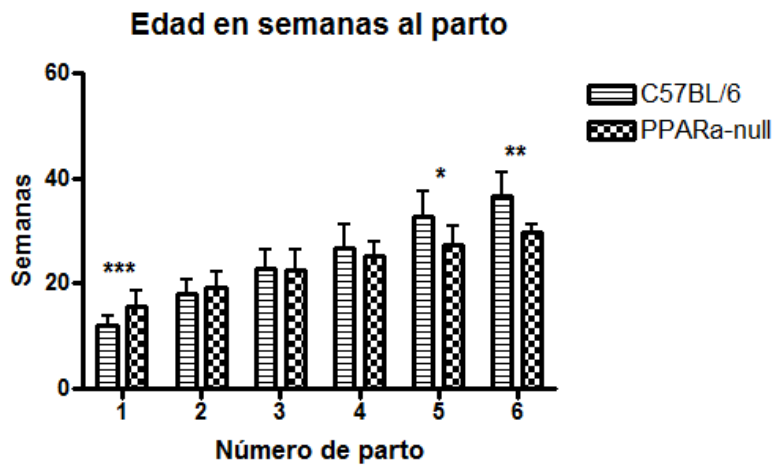
En cuanto a la comparación entre los partos del mismo grupo, tanto para la cepa C57BL/6 y la *PPARα*-null se encuentra que son estadísticamente iguales.



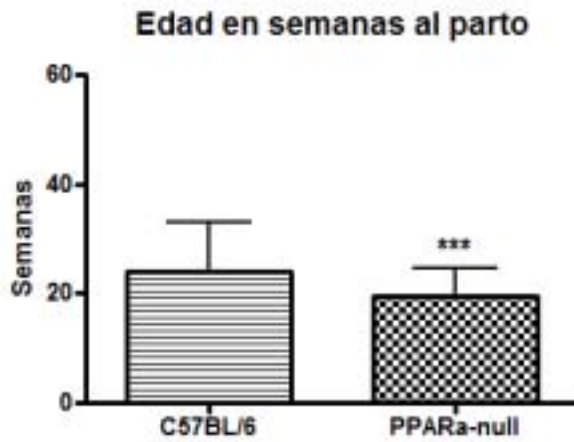
## Edad a semanas al parto

La edad que tenían los animales a cada uno de los partos que tuvo también se tomó en consideración; para determinar la cantidad de tiempo en semanas que requiere una cepa en comparación de otra para obtener uno o hasta 6 partos.

En la siguiente gráfica podemos observar que existe una diferencia estadísticamente significativa para el caso de la cepa C57BL/6, la cual requirió de más semanas de vida para obtener el parto 1, 5 y 6. Mientras que para los partos 2, 3 y 4 permanecen estadísticamente iguales.



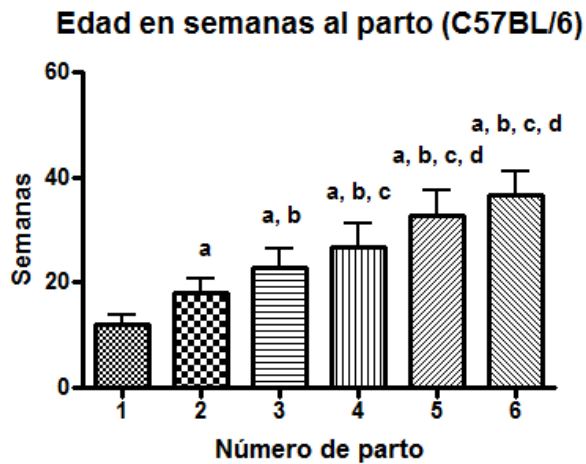
En la siguiente gráfica se puede apreciar que existe una diferencia estadística significativa, esto significa que para el caso de *PPARα*-null se requirieron menos semanas de vida para obtener un parto seguido del otro.



Para el caso del análisis de la vida de la hembra en semanas a cada parto de cada una de las cepas, encontramos, para el caso de la cepa C57BL/6 que existe diferencia estadísticamente significativa entre los siguientes partos.

- a diferencia significativa con respecto al parto 1
- b diferencia significativa con respecto al parto 2
- c diferencia significativa con respecto al parto 3
- d diferencia significativa con respecto al parto 4

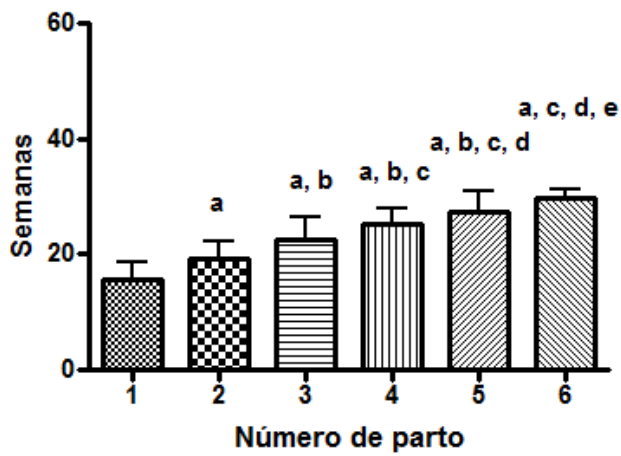
Esto quiere decir, que para estos partos, la hembra requirió más tiempo de vida para obtener el siguiente parto.



Lo mismo sucede para el caso de la cepa *PPARα*-null, donde se encuentra una diferencia estadísticamente significativa en los siguientes partos.

- a diferencia significativa con respecto al parto 1
- b diferencia significativa con respecto al parto 2
- c diferencia significativa con respecto al parto 3
- d diferencia significativa con respecto al parto 4
- e diferencia significativa con respecto al parto 5

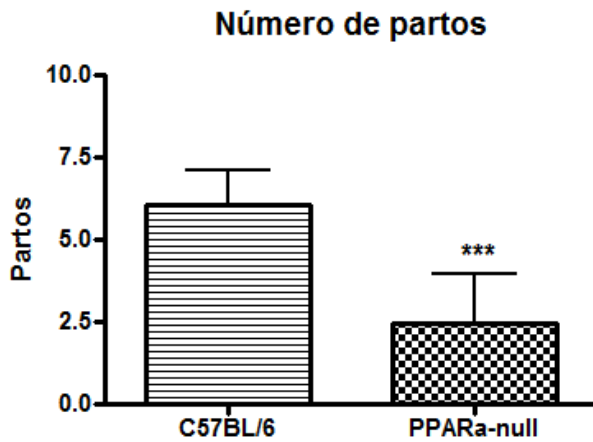
### Edad en semanas al parto (*PPARα*-null)



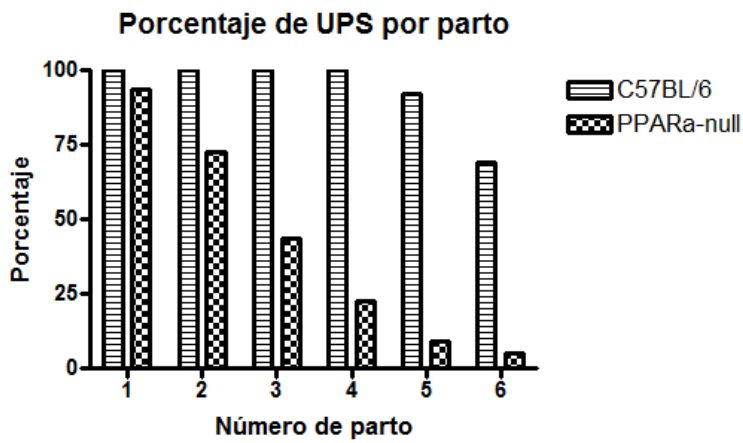


## Número de Partos.

En el conjunto de todos los partos obtenidos por cepa se demuestra una diferencia estadísticamente significativa para el caso de la cepa *PPAR $\alpha$ -null*, en la cual encontramos un menor número de partos totales entre todas las Unidades Productivas (UPS) de esta cepa en comparación con la cepa C57BL/6; como se muestra en la siguiente gráfica.

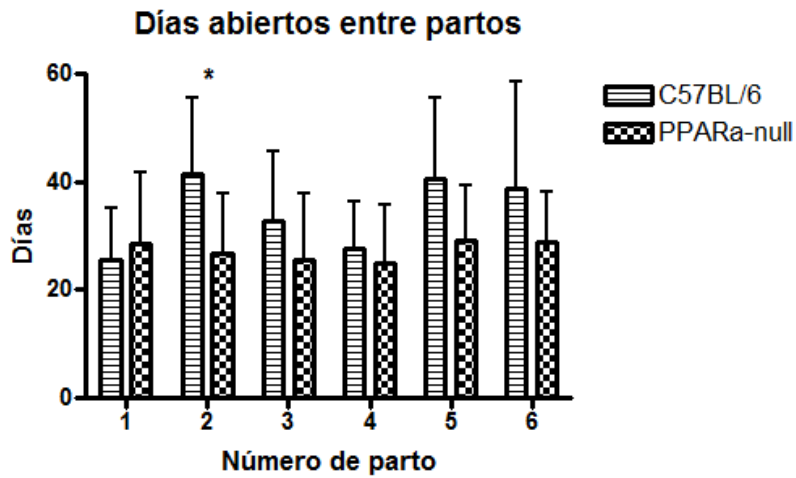


En la siguiente gráfica podemos observar el porcentaje UPS que obtuvieron de uno hasta el 6 parto. Por ejemplo, en el caso de la cepa C57BL/6 el 100% de las UPS obtuvo el 1er parto, mientras que la cepa *PPARα*-null solo el 85% obtuvo un primer parto, esto se debe a que algunas de las UPS de esta cepa a pesar de ser acopladas en parejas monógamas perpetuas nunca quedaron gestantes y jamás se obtuvo ningún parto para estas UPS. Para el caso del parto 6, casi un 75% de la cepa C57BL/6 lo obtuvo en contraste con el 5% de las UPS de la cepa *PPARα*-null que pudieron llegar a obtener un sexto parto.

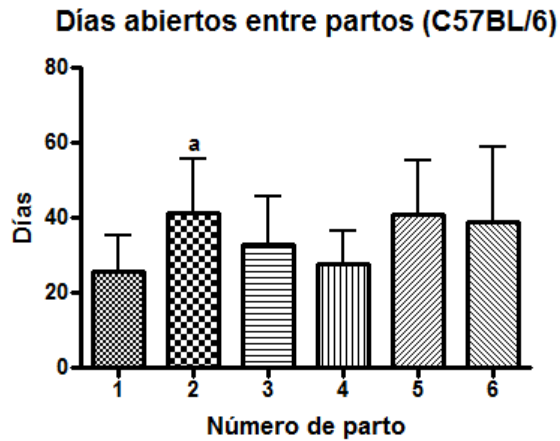


Días abiertos entre partos.

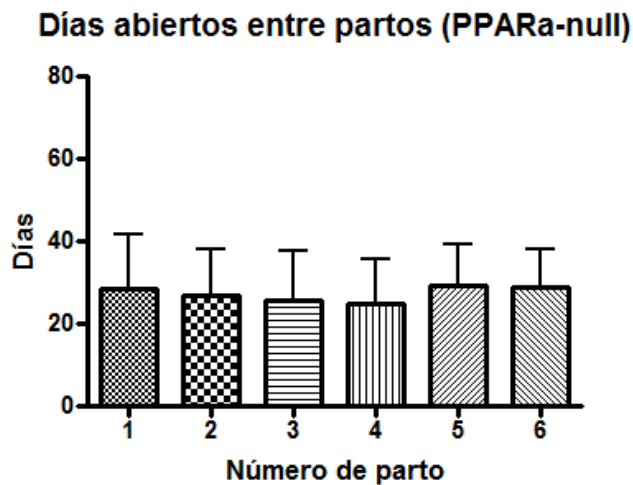
Esto se refiere a los días que existen de parto a parto en las unidades productivas. En este caso podemos encontrar una diferencia estadísticamente significativa para el caso de la cepa C57BL/6 para el parto número 2, donde esta cepa requirió más días para obtener el segundo parto. Mientras que en los demás partos se encuentran estadísticamente iguales.



En el análisis de los días abiertos entre cada uno de los partos de la misma cepa, para ambos grupos solo se encontró diferencia estadística significativa en el caso de la cepa C57BL/6; esto fue para los días abiertos entre el segundo y primer parto, indicando más días entre el primer y el segundo parto.



En el caso de la cepa *PPAR $\alpha$ -null* no se encontró diferencia estableciendo que los días abiertos fueron estadísticamente iguales para esta cepa.



## **Discusión y conclusiones**

Se observa una clara tendencia de la cepa PPAR $\alpha$ -null a tener problemas en la reproducción. Se sabe que los modelos transgénicos tienen siempre problemas de reproducción en mayor o menor medida y en este caso se puede atribuir a que el gen que tiene deletado afecta directamente al metabolismo de los lípidos y puede estar afectando alguna ruta metabólica importante. Es necesario continuar con investigación molecular para dilucidar por completo el porqué de estas fallas reproductivas en esta cepa.

## Anexos

### Anexo 1.- Registros

#### Sistema de registros

Para el manejo de la colonia se utilizaron dos tipos de tarjetas de campo. La de los animales en apareamiento y la de los animales en stock o destetados.

Tarjeta de animales en apareamiento:

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN						
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL Y BIOTERIO						
MVZ PAULO MTZ.			FNC	AP	P	Fecha de ap.
Cepa:	PPAR $\alpha$ null	Macho				
AP #:		Hembra				F:
P:	FNC	#	FDC	Machos	Hembras	Total
1						
2						
3						
4						
5						

Donde:

- AP #: Significa Apareamiento y se refiere al número de unidad reproductiva que corresponde.
- FNC: Fecha de nacimiento de la camada
- AP: Apareamiento del que procede
- P: Parto del que procede
- Fecha de apareamiento, es la fecha en la que se realiza la cruce
- FDC: Fecha de destete de la camada
- F: Generación a la que corresponde, ya sea F1, F2, F3 y así sucesivamente

Tarjeta de animales en stock o destetados:

DEPTO. INVES. EXPERIMENTAL Y BIOTERIO				MVZ Paulo Martínez.	
DESTETADOS				PROCEDENCIA	
CEPA	PPAR- $\alpha$ null			AP.	P.
FNC		SEXO			
FDC		CANTIDAD			
OBSERVACIONES.					
F:					

Donde:

- Procedencia: Nos dice de que craza provienen estos animales, de que Apareamiento y de que numero de parto
- Sexo: Nos indica el género de los animales, pues al momento de destetarlos se separan de acuerdo al sexo.
- FNC: Fecha de nacimiento de la camada que se desteta
- FDC: Fecha de destete de la camada
- F: Generación a la que pertenecen.
- Cantidad: Número de animales que hay en la caja

## Bibliografía

- (1981). *The Mouse In Biomedical Research*. En H. Foster, D. Small, & J. Fox (Edits.). Academic Press.
- (2011). *Handbook Of Laboratory Animal Science* . En S. Schapiro, & J. Hau (Edits.), *Volume I Essential Principles And Practices* (Third Edition ed., Vol. I). CRC Press.
- AALAS. (2010). [www.aalas.org](http://www.aalas.org). Recuperado el Junio de 2010
- Baer, H. (1971). Long-term isolation stress and its effects on drug response in rodents. *Laboratory Animal Science*.
- Barnard, D. E., Lewis, M. S., Teter, B., & Thigpen, J. (2009). Opened and Closed Formula For Laboratory Animals Diets and their Importance to Research. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.*, 48(6), 1-5.
- Benn, D. M. (1995). Innovations in Research Animal Care. *Journal of the American Veterinary Medical Association*(206), 465 - 468.
- Cardenas. (1991). *Análisis de la temperatura macroambiental en instalaciones convencionales para animales de laboratorio durante dos años (de Enero de 1988 a Diciembre de 1989)*. México D. F.: Tesis de Licenciatura.
- Castillo, M. R., & Villalobos, G. (1987). Tesis de Licenciatura. *Estudio Comparativo de la Situación Actual de los Bioterios en México*. México.
- Comisión De Las Comunidades Europeas . (2007). *Quinto informe sobre las estadísticas relativas al número de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea*. Bruselas.



- Ferré, P. (2004). The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. Relationship With Metabolism and Insulin Sensitivity. *Diabetes*, 53(Supplement 1).
- Giráldez Dávila, A., & Martín Zúñiga, J. (s.f.). La ciencia del animal de laboratorio y el procedimiento experimental. En *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*.
- Greenberg, G. (1972). The effects of ambient temperature and population density on aggression in two inbred strains of mice, *Mus Musculus*. *Behaviour*, 119-130.
- ICLAS. (2010). *ICLAS*. Recuperado el 30 de Junio de 2010, de ICLAS: <http://www.iclas.org>
- Institute For Laboratory Animal Resources. . (2010). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* . Washington, D.C., United States Of America: National Research Council .
- Jaenisch, R. (1988). Transgenic animals. *Science* , 1468-1474.
- Krackow, S. (1989). Effect to food restriction on reproduction and lactation in house mice mated post partum. *Journal Of Reproduction and Fertility* , 341-347.
- Lomelí, C., & Carreño, J. (1991). *Verificación Genética de la cepa singénica C57B1/10J y la línea congénita resistente B10.BR H-2 de ratón de laboratorio por métodos inmunogénicos*. México D.F: UNAM.
- Mackintosh, J. (1962). Effect of strain and group size on the response of mice to „sconal“ anaesthesia. *Nature*(194), 1304.
- Mata, M. M. (1979). Tesis de Licenciatura. *Influencia de la Temperatura e Iluminación Sobre la Reproducción de Ratones*. Distrito Federal, Ciudad Universitaria, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

- Nitzki, F., Kruguer, A., Reinferberg, K., Wojnowsky, L., & Hahn, H. (2007). Identification of genetic contamination in a comercial mouse strain using two panels of polymorphic markers. *Laboratory Animal*, 218-228.
- O'Malley, J., Dambrosia, J., & Davis, J. (2008). Effect of housing density on reproductive parameters and corticosterone levels in nursing mice. *Journal Of American Association Laboratory Animal Science*(47), 9-15.
- Poole. (1987). *The UFAW Handbook on the care and management of Laboratory Animals*. England.
- Pritchett, K., & Taft, R. (2007). Reproductive biology of laboratory mouse. En J. Fox (Ed.), *The Mouse In Biomedical Research 2nd Edition* (Vol. III). Academic Press.
- SAGARPA. (2002). NOM-062-ZOO-1999. *Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*. Distrito Federal, México.
- Späni, D., Arras, M., König, B., & Rüllicke, T. (2003). Higher heart rate of laboratory mice housed individually vs in pairs. *Laboratory Animals* (37), 54-62.
- Suckow, M. A., Danneman, P., & Brayton, C. (2001). *The Laboratory Mouse*. Estados Unidos: CRC Press.
- Taconic. (2008). *Taconic*. Recuperado el Junio de 2010, de Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR $\alpha$ ) Targeted Mutation Mouse Model : [www.taconic.com](http://www.taconic.com)
- Taconic. (s.f.). *Taconic*. Recuperado el 31 de 10 de 2012, de [www.taconic.com](http://www.taconic.com)
- The Jackson Laboratory*. (s.f.). Recuperado el 20 de Agosto de 2012, de <http://www.jax.org/index.html>:  
<http://jaxmice.jax.org/genetichealth/GQCprogram.html>

The Jackson Laboratory. (2012). *The Jackson Laboratory*. Recuperado el 18 de Octubre de 2012, de <http://jaxmice.jax.org>

Torres, J. (2006). Evaluación de factores de reproducción para detectar posible contaminación genética en cepas consanguineas de ratones. *Boletín de Maraliogía y Salud Ambiental*.

Valzelli, L. (1973). The „isolation syndrome“ in mice. *Psychopharmacologia*(31).

Weerd, V. d. (1996). *Environmental enrichment for Laboratory Mice: preferences and consequences*. Nederland.