



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DE DOS TIPOS DE DIETAS SOBRE LA EFICIENCIA
REPRODUCTIVA EN UNA COLONIA DE RATONES KNOCK OUT (Btd^{-/-})
DEFICIENTES DEL GEN DE LA BIOTINIDASA

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANAYÁNTZIN PAULINA HEREDIA ANTÚNEZ

TUTOR: DR. RAFAEL HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA-UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA-UNAM
DR. EMILIANO TESORO CRUZ
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

México, D. F. Mayo 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.

DEDICATORIA

A doña Angelina,

Agradezco el apoyo incondicional que siempre me has brindado, los valores y la motivación que siempre recibo de tu parte, lo que me ha permitido ser una buena persona, constante y comprometida con todas las actividades que he realizado a lo largo de mi vida.

A ti querido Sergio,

Por estar a mi lado y convertirme inesperadamente en mi mejor amigo y compañero, gracias por todas las aventuras que hemos vivido y alegrarme la vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al doctor Rafael Hernández González, por trasmitirme diversos conocimientos, especialmente en el campo de animales de laboratorio y otros temas que corresponden a mi profesión. Gracias por ofrecerme sabios consejos para lograr las metas que me he propuesto.

A todos los médicos veterinarios y técnicos del Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición- “Salvador Zubirán” que siempre estuvieron motivados y dispuestos para ayudar en este trabajo.

Al doctor Emiliano Tesoro Cruz y Oscar Gutiérrez Pérez, por su apoyo y consejos aportados en cada tutorial que mejoraron la calidad de este trabajo.

Al jurado, por sus aportaciones al escrito:

Dr. Mario Pérez Martínez

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

Dr. Antonio Díaz Cruz

Dra. Sandra Adela Orozco Suárez

A todos los que fueron mis compañeros de clase durante estos años, gracias por ese compañerismo y apoyo moral en momentos difíciles.

RESUMEN

La biotina, vitamina del complejo B actúa principalmente como coenzima en diversos procesos metabólicos. En mamíferos, la deficiencia de biotina puede causar alteraciones en las funciones neurológicas, metabólicas y reproductivas. El uso de animales genéticamente modificados ha sido de gran utilidad para el estudio de diversas patologías tanto en humanos como en animales. Es por ello que recientemente se desarrolló en el hospital Henry Ford (Detroit, USA), un ratón modificado por ingeniería genética (knockout) deficiente del gen de la biotinidasa. Estos ratones desarrollan signos neurocutáneos, alteraciones reproductivas así como problemas teratogénicos (microftalmia, micromelia, paladar hendido) cuando se les somete a una dieta pobre en biotina por lo que es importante la suplementación de esta vitamina para mantener la colonia. El objetivo de este estudio fue comparar dos tipos de dietas (Alimento Comercial Purificado con biotina libre o Dieta A y Alimento Suplementado a partir de una Dieta Natural Estándar o Dieta B) y medir la eficiencia reproductiva en machos y en las hembras. A partir de una colonia de ratones homocigotos Wild Type (WT) y homocigotos Knockout (KO) se realizaron apareamientos; de la progenie se seleccionaron 40 animales homocigotos y una vez obtenidos éstos se formaron 4 grupos: 1) apareamientos monogámicos con dieta A, 2) apareamientos en tríos con dieta A, 3) apareamientos monogámicos con dieta B, 4) apareamientos en tríos con dieta B. Se realizaron mediciones en varios parámetros reproductivos (Índice reproductivo, porcentaje de fertilidad, tamaño de la camada al nacimiento, peso de la camada al nacimiento, peso de la camada al destete, concentración, motilidad y morfología espermática) durante un periodo de 6 meses. Los resultados se analizaron mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA). Los resultados mostraron que el peso al destete es la única característica diferente cuando se aplican las 2 dietas en las hembras ($p < 0.05$). En cuanto a los sistemas de apareamientos, los colocados en tríos son los que producen más animales con mejores características fenotípicas. En el caso de los machos, existe evidencia suficiente para concluir que la concentración espermática, motilidad y morfología es diferente entre grupo WT y KO ($p < 0.05$), independientemente del tipo de dieta con el que se les suplemente.

Palabras clave: modelos animales, biotina, deficiencia de biotina, ratón knock out, eficiencia reproductiva.

ABSTRACT

Biotin, Vitamin B complex acts mainly as a coenzyme in several metabolic processes such as gluconeogenesis, fatty acid synthesis and the catabolism of several branch-chain amino acids and odd-carbon fatty acids. In mammals, biotin deficiency can cause alterations in neurological, metabolic and reproductive functions. The use of genetically modified animals has been useful for studying numerous diseases in both humans and animals. In order to understand many aspects of the pathophysiology of the disorder a group of scientists from the Henry Ford hospital (Detroit, USA) recently developed a transgenic biotinidase-deficient mouse. When fed a biotin-deficient diet these mice develop neurocutaneous symptoms, reproductive disorders and teratogenic problems (microphthalmia, micromelia, cleft palate). The clinical features are reversed with biotin supplementation. The aim of this study was to compare two types of diets (Defined Purified Diet with free biotin- Diet A and Natural Modified Diet from a Natural Diet- Diet B) and their effect of reproductive performance in males and females. From a colony of homozygous wild type mice (WT) and homozygous knock out (KO) micematings were carried out, 40 homozygous knock out animals were obtained in order to form 4 experimental groups; 1) monogamous matings with diet A, 2) mating in harem system with diet A, 3) monogamous matings with diet B, 4) matings in harem system with diet B. Five gestations were monitored and obtained measurements at several reproductive parameters (productivity efficiency index, average fertility rate, litter size at birth, litter weight at birth, litter weight at weaning, sperm concentration, sperm motility and sperm morphology) were evaluated over a period of 6 months. Analysis of Variance (ANOVA) analyzed data. The results showed that weaning weight is the only different characteristic when the 2 diets are applied in females ($p < 0.05$). Regarding mating systems, the triplets are placed at producing more animals with better phenotypic characteristics. For males, there is sufficient evidence to conclude that sperm concentration, motility and morphology is different between WT and KO group ($p < 0.05$), regardless of the type of diet they received.

Keywords: animal, models, biotin, biotin deficiency, knockout mice, reproductive performance.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN (ANTECEDENTES)	
1.1 Modelos Animales	1
1.2 Tipos de Modelos Animales	3
1.2.1 Modelos Animales para Investigación en Nutrición	3
1.3 Características de la Biotina	5
1.3.1 Estructura Química de la Biotina	6
1.3.2 Carboxilasas Dependientes de Biotina	7
1.3.3 Transporte de Biotina	9
1.3.4 Biotina y Reproducción	12
1.3.5 Efecto de la Biotina sobre la Expresión Genética	13
1.4 Aspectos Clínicos de la Deficiencia de Biotina en Humanos	13
1.5 Deficiencia de Biotina por alteraciones en la Biotinidasa (BTD)	14
1.5.1 Biotinidasa (BTD)	15
1.5.2 Gen de la Biotinidasa	15
1.6 Modelos Murinos para Estudio de Deficiencia de Biotina	17
1.7 Manejo de Colonias de Roedores Genéticamente Modificados	20
1.7.1 Esquemas de Apareamientos para Animales Transgénicos	21

2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6. RESULTADOS	34
7. DISCUSIÓN	52
8. CONCLUSIONES	58
9. REFERENCIAS	59

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS		Página
Cuadro 1.	Signos clínicos característicos del ratón deficiente de biotinidasa (Btd -/-) a los 10 días de una dieta pobre en biotina desarrollado por Pindolia y col.	19
Cuadro 2.	Datos reproductivos del ratón C57BL/6.	21
Cuadro 3.	Datos de grupos experimentales.	31
FIGURAS		
Figura 1.	Ratón de la cepa C57BL/6 creada por C.C. Little.	2
Figura 2.	Estructura química de la biotina.	6
Figura 3.	Ciclo biológico de la biotina.	11
Figura 4.	Localización del gen de la biotinidasa en el cromosoma, región p25.	16
Figura 5.	Características clínicas del ratón deficiente de biotina (Btd-/-) desarrollado por Pindolia y col.	18
Figura 6.	Esquema del diseño experimental.	26
Figura 7.	Esquema de las condiciones para realizar la PCR.	29
Figura 8.	Electroforesis de la PCR, mostrando los 3 diferentes genotipos obtenidos dentro de la colonia (Btd+/, Btd+/-, Btd-/-).	35
Figura 9.	Comparación de las dietas y efecto sobre el promedio de tamaño de la camada al nacimiento.	39
Figura 10.	Comparación de las dietas y efecto sobre el peso promedio de la camada al nacimiento.	40
Figura 11.	Comparación de las dos dietas y efecto sobre el peso promedio de la camada al destete.	41
Figura 12.	Comparación del peso testicular de animales	44

	homocigotos WT y animales homocigotos KO.	
Figura 13.	Comparación de la concentración espermática de animales homocigotos WT y animales homocigotos KO.	45
Figura 14.	Comparación de la motilidad espermática de animales homocigotos WT y animales homocigotos KO.	46
Figura 15.	Microfotografía de espermatozoide con morfología normal de ratón C57BL/6 de 16 semanas de edad.	47
Figura 16.	Microfotografía de espermatozoide de ratón KO de 16 semanas de edad con anormalidades en cabeza (cabeza triangular o forma de flor de loto).	48
Figura 17.	Microfotografía de espermatozoide de ratón KO de 16 semanas de edad con anormalidades en cabeza (cabeza ovalada).	49
Figura 18.	Microfotografía de espermatozoide de ratón KO de 16 semanas de edad con anormalidades en flagelo (flagelo ondulado).	50
Figura 19.	Comparación de la morfología espermática de animales homocigotos WT y animales homocigotos KO.	51

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MODELOS ANIMALES

Los modelos animales son piezas fundamentales en el desarrollo de las ciencias biomédicas debido a que los animales pueden asemejar algunas funciones o modelos de enfermedades con el ser humano. Los músculos de un perro o rata, por ejemplo, son similares en anatomía, fisiología y función si los comparamos con los músculos del humano y debido a esto, mediante el estudio de la función muscular en estos animales tenemos conocimiento de lo que podría estar ocurriendo con los seres humanos. A los animales utilizados en la investigación se les conoce como modelos animales (Matthews, 2008; Wolfer et al., 2002).

Los modelos animales son un medio importante de estudio de las funciones normales de un organismo así como de las diversas enfermedades que existen en las diferentes especies, principalmente en el humano (Matthews, 2008; Silver, 1995). Por lo que el modelo animal debe imitar de cerca la situación que se pretende estudiar en los seres humanos (Deyn et al., 2000).

De todas las especies que han sido manejadas como modelos de experimentación, el ratón es una de las especies que más relevancia tiene pues fue la primer especie en donde se establecieron colonias de animales endogámicos y exogámicos y además, en los últimos años se han establecido métodos de manipulación genética que permiten crear nuevos modelos de estudio y debido a esto, ha llegado a sustituir el uso de otras especies en una gran cantidad de experimentos (Silver, 1995).

El ratón se estableció como modelo de experimentación a principios del siglo XX por A. Laphrop, W. Castle y C. C. Little y se utilizó en investigación biomédica más que cualquier otra especie ya que se observó que ofrecía ventajas como especie tales como su tamaño, haciéndolos fáciles de mantener y

manejar (Fox, 2002) (Figura 1). Además de esto, evidenciaron atributos que los hacían particularmente deseables como modelos animales para los estudios de patologías, tratamiento y prevención de las enfermedades de origen genético (Fox et al., 2002; Beck et al., 2000). Se reproducen con periodicidad y producen camadas comparativamente grandes; se desarrollan rápidamente y por lo general terminan su ciclo de vida dentro de dos años aproximadamente (Pritchett-Corning et al., 2009). Asimismo, comparten el 95% de su genoma con los seres humanos y desarrollan muchos síndromes de enfermedades que son similares a enfermedades hereditarias de los seres humanos (Beck et al., 2000; Danneman et al., 2013).

Tal vez lo más importante que hay que destacar es su capacidad para sobrevivir de manera estable a la consanguinidad, pues la mayoría de las especies exhiben depresión endogámica dando como resultado una gran capacidad de tolerar, mantener y heredar manipulaciones genéticas complejas (Matthews, 2008).

Debido a todas estas características, estos valiosos animales son vistos como entidades importantes dentro del laboratorio, sin embargo, se debe hacer hincapié en asegurar que estos animales son cuidados y manejados de manera que optimice su valor en la investigación, salvaguardando su salud y bienestar (Liphann, 2003).



Figura 1. Ratón de la cepa C57BL/6 creado por C. C. Little (Fox et al, 2002)

1.2 TIPOS DE MODELOS ANIMALES

Los modelos animales pueden ser categorizados como naturales o inducidos. Los modelos animales naturales son aquellos en los que la condición se produce de forma espontánea, tal como la aterosclerosis en el mono ardilla. La aterosclerosis es una enfermedad humana prevalente en la cual los depósitos de grasa se producen a lo largo de las paredes internas de las arterias y mediante el estudio de la enfermedad en estos monos, es posible aprender sucesos sobre la enfermedad que también son ciertas en los seres humanos (Rivera & Tessarollo, 2008).

Los modelos animales inducidos son aquellos en los que una enfermedad o condición deben ser producidos artificialmente ya sea por modificaciones en su dieta, ambiente o por un procedimiento quirúrgico. Sin embargo, indudablemente la manipulación genética es probablemente en la actualidad el método más común para la inducción de patologías en animales de experimentación (Arencibia-Arrebola et al., 2010).

1.2.1 MODELOS ANIMALES PARA INVESTIGACIÓN EN NUTRICIÓN

Combs (1992) menciona 3 factores clave que fueron cruciales en el descubrimiento de los nutrientes esenciales: 1) reconocimiento de que ciertas enfermedades se asociaban con la dieta; 2) el desarrollo de modelos animales adecuados que tuvieran una característica fisiológica particular y/o susceptibilidad produciendo la enfermedad al modificar sus dietas pero que además, pudieran mejorar 1 o varios signos del cuadro clínico al proporcionar el nutriente nuevamente y; 3) el desarrollo de dietas purificadas que se elaboran de manera individual de acuerdo a las necesidades de la especie que se encuentra bajo investigación (Baker, 2008).

Con base en los elementos antes descritos se logró adquirir comprensión acerca de la interacción que existe entre los diferentes nutrientes, su biodisponibilidad, participación de éstos en las diferentes rutas metabólicas, precursores, niveles de tolerancia así como de toxicidad y los efectos sobre el organismo. La investigación con modelos animales ha contribuido en gran medida a lo que conocemos hoy en día acerca de la nutrición y el metabolismo (Gallaher, 1992; Semba, 2012).

En los últimos años, se han descubierto funciones mediadas por vitaminas a nivel de la expresión genética conjuntamente a la función que tienen como sustratos y cofactores (Combs, 1994). Las vitaminas liposolubles son las mejor estudiadas, los ejemplos más claros son con la vitamina A y D que actúan como ligandos de receptores de la superfamilia de receptores hormonales y de esta manera afectan diversas funciones tales como son la morfogénesis, regulación de algunas células del sistema inmune, crecimiento y diferenciación de células epiteliales (Carlberg, 1999; Barber & Blomhoff, 2002; Chistakos et al., 2003).

El incremento del conocimiento en los mecanismos moleculares de estas vitaminas y los efectos que tienen sobre el organismo ha abierto nuevas perspectivas de estudio, de tal manera que estos elementos se puedan utilizar como agentes terapéuticos en enfermedades crónicas (Hinds et al., 1997; Fernández-Mejía, 2005).

Existe menos información para las vitaminas hidrosolubles, principalmente las del complejo B y el efecto que tienen sobre la expresión de los genes, sin embargo, se sabe que éstas también lo modifican por lo que la investigación de estos micronutrientes se está basando al estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales tienen efecto sobre la transcripción de diversas células (Pacheco-Álvarez, 2002; Rodríguez-Meléndez & Zemleni, 2003).

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA BIOTINA

La biotina fue descubierta como factor protector contra la toxicidad de la clara de huevo en algunas dietas de rata, inicialmente fue denominada vitamina H (Vilches-Flores & Fernandez-Mejia, 2005). Esto se debió a un experimento que realizó Beatman (1916) que al alimentar a las ratas con clara de huevo cruda comenzaban con un síndrome caracterizado por descamación, dermatitis alopecia y trastornos neuromusculares (Gravel & Narang, 2005; Vilches-Flores & Fernandez-Mejia, 2005).

La biotina es una vitamina hidrosoluble con un peso molecular de 244.3 g/mol, que se puede disolver en agua y etanol (Hamid, 2012). Los mamíferos son incapaces de sintetizar la biotina en comparación con las plantas y los microorganismos, por lo que se obtiene principalmente de la dieta (Dakshinamurti, 2005). Los principales alimentos con altas concentraciones de biotina son el hígado, huevo y algunos vegetales (Vilches-Flores & Fernandez-Mejia, 2005).

Se han hecho diversos esfuerzos por estimar el consumo y la cantidad necesaria de biotina diaria; sin embargo debido a la diversidad en los métodos de cuantificación y la producción de biotina por la flora intestinal sólo se puede estimar que se encuentra entre 30 y 100 µg al día (Mamada et al., 2008).

La biotina tiene un agonista natural; la avidina, una glicoproteína que se une a ella con una gran afinidad. Esta proteína se encuentra presente en la clara de huevo crudo, si se consume en grandes cantidades la unión biotina-avidina impide que en el estómago e intestino se lleve a cabo la absorción correcta de la vitamina, presentándose así los síntomas y signos que se han catalogado como deficiencia de biotina (Hamid, 2012; Said, 2009).

La función más conocida de la biotina en los organismos eucariontes es la de participar como coenzima de las enzimas acetil- CoA carboxilasa (ACC), tanto de la isoforma citosólica (ACC1) como de la mitocondrial (ACC2); y de las enzimas mitocondriales piruvato carboxilasa (PC); propionil-CoA carboxilasa (PCC) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) (Hassan & Zempleni, 2006; Larrieta et al., 2012; Zempleni et al., 2009).

1.3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA BIOTINA

La biotina es un compuesto bicíclico, un anillo es un grupo ureido (-N-CO-N) que está fusionado a otro anillo que contiene un azufre al que se le denomina anillo tetrahidrotiofeno; este tiene unida una cadena lateral de 5 carbonos denominada ácido valérico, que termina en un grupo carboxilo (Hamid, 2012)(Figura 2).

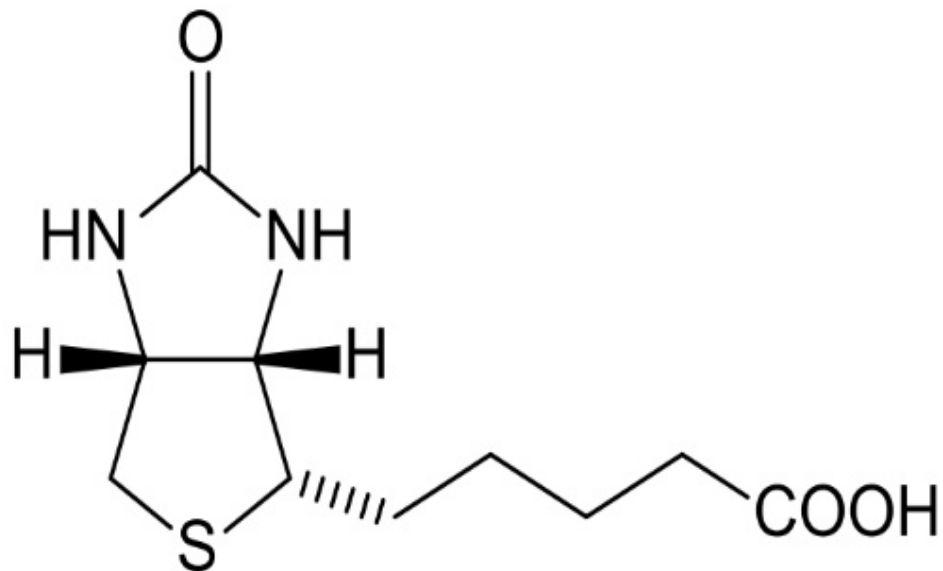


Figura 2. Estructura química de la biotina

1.3.2 CARBOXILASAS DEPENDIENTES DE BIOTINA

En las células de los mamíferos existen 5 enzimas que dependen de esta vitamina y que catalizan reacciones de fijación de CO₂ dependientes de ATP; tienen un papel clave en la síntesis de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos y gluconeogénesis (Vilches-Flores et al., 2010). La función de la biotina en todas las carboxilasas es actuar como un acarreador de un grupo carboxilo activado, que proviene del bicarbonato. Las carboxilasas son sintetizadas de manera inactiva y son activadas mediante la unión de una molécula de biotina. La reacción de biotinilación de carboxilasas en organismos eucariontes es catalizada por la enzima Holocarboxilasa Sintetasa (HCS) (McMahon, 2002; Tong, 2013; Vilches-Flores & Fernandez-Mejia, 2005).

a) Acetil CoA Carboxilasa (ACC)

La Acetil CoA es una carboxilasa involucrada en la conversión de acetil CoA en malonil CoA, una molécula reguladora de la lipogénesis que permite la síntesis y elongación de los ácidos grasos. Esta enzima tiene dos isoformas diferentes; ACC1 o ACC α , codificada por un gen localizado en el cromosoma 17, generando una proteína de 265 kDa aproximadamente; el gen de la ACC2 o ACC se encuentra en el cromosoma 12, y la proteína tiene un peso de 280kDa aproximadamente. Las isoformas tienen funciones diferentes en la célula; la ACC1 controla la síntesis de ácidos grasos en el citosol mediante el malonil CoA. Mientras que la ACC2 controla la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria mediante el malonil CoA, un inhibidor del transporte de ácidos grasos a la mitocondria (Rodríguez-Melendez & Zemleni, 2003; Tong, 2013).

Las isoformas de la ACC tienen una distribución diferente; la ACC1 está presente en tejidos lipogénicos (hígado, riñón), glándula mamaria lactante y su funcionamiento es regulado por glucosa e insulina; y la ACC2 se encuentra en músculo esquelético y el corazón (Pindolia, et al., 2010; Tong, 2013; Zemleni & Mock, 2001).

b) Piruvato Carboxilasa (PC)

Esta enzima es un polímero de 4 subunidades idénticas, tiene un peso de 125-130 kDa aproximadamente, se encuentra en diversos tejidos como hígado, riñón, adipocitos, glándula mamaria y adrenal (Wolf, 2011).

La piruvato carboxilasa es una enzima reguladora de la gluconeogénesis; cataliza la formación de oxaloacetato a partir de piruvato, bicarbonato y ATP; y se localiza en la mitocondria. Participa en la síntesis de los aminoácidos aspartato y glutamato. Al mantener los niveles de los intermediarios del ciclo de Krebs vía anaplerosis, esta enzima está involucrada en la biosíntesis de sustancias neurotransmisoras, provee de α -cetoglutarato y glutamina que sirven como precursores para el establecimiento de la reserva de neurotransmisores en las terminales presinápticas (Lietzan, et al., 2014; Rodríguez-Fuentes et al., 2007).

c) Propionil CoA Carboxilasa (PCC)

La propionil CoA carboxilasa se encuentra en la mitocondria; está conformada por 2 polipéptidos diferentes; PCCA o subunidad α de un peso de 70-72 kDa aproximadamente, codificado por un gen localizado en el cromosoma 3q13.3-q22. Esta carboxilasa presenta una conformación $\alpha_4\beta_4$ o $\alpha_6\beta_6$, y en la subunidad α es donde se localiza el dominio de unión a biotina (Hamid, 2012; Tong, 2013).

PCC cataliza la conversión de propionil CoA a metilcrotonil CoA que entra al ciclo de Krebs vía succinil CoA; el propionil CoA proviene del catabolismo de los aminoácidos esenciales isoleucina, treonina, metionina, valina; de ácidos grasos de cadena impar y de la cadena lateral de colesterol (Hassan & Zemleni, 2006; Zemleni & Mock, 2001) .

d) Metilcrotonil CoA Carboxilasa (MCC)

La metilcrotonil CoA carboxilasa es una enzima formada por 2 polipéptidos diferentes, con un peso de 76 kDa aproximadamente. La biotina se une al

polipéptido más grande, y tiene 4 moléculas de biotina por molécula. Esta enzima, localizada en la mitocondria, cataliza la conversión de metilcrotonil CoA a metilglutacotonil CoA una reacción clave en la degradación de leucina (McMahon, 2002; Tong, 2013).

1.3.3 TRANSPORTE DE BIOTINA

Las aves y mamíferos no pueden sintetizar la biotina, por lo que es necesario su consumo en la dieta diaria (Vilches-Flores & Fernandez-Mejia, 2005). La biotina se encuentra en los alimentos, en la mayoría de ellos unida al grupo ϵ -amino de una lisina formando el dímero conocido como biocitina, péptido biotinilado o bien, en forma libre. Para su absorción se requiere romper este enlace semipeptídico por acción de la biotinidasa (BTD) (Hamid, 2012). La biotina libre se absorbe por los enterocitos de la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno y posteriormente pasa a torrente sanguíneo. La entrada a las células se lleva a cabo mediante un transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT) que reconoce principalmente la porción del ácido valérico de la biotina. El SMVT es una proteína transmembranal que funciona como simportador introduciendo a la biotina y el ácido pantoténico junto con el sodio, a favor de un gradiente de concentración (Larrieta et al., 2012; Rodríguez-Fuentes et al., 2007; Said, 2009; Vilches-Flores & Fernandez-Mejia, 2005).

Las carboxilasas son sintetizadas como apocarboxilasas, sin actividad enzimática, en el citoplasma. Al unírseles la biotina covalentemente por acción de la holocarboxilasa sintetasa, se forma la proteína activa u holoenzima. La biotina, como coenzima de las carboxilasas, participa en el mecanismo de transferencia de un grupo carboxilo activado al sustrato correspondiente (Dakshinamurti, 2005; Hamid, 2012).

Posteriormente, la proteólisis de las holocarboxilasas libera residuos de lisina unidos covalentemente a la biotina (biocitina). Este enlace se rompe por acción

de la BTD y de este modo la biotina puede ser reciclada e integrarse como coenzima a nuevas carboxilasas sintetizadas, o bien pueden catalizarse formando otros productos derivados y excretarse. La síntesis de las holocarboxilasas sintetizadas y su catabolismo se denomina ciclo de la biotina (McMahon, 2002; Wolf, 2012; Zemleni et al., 2009) (Figura 3).

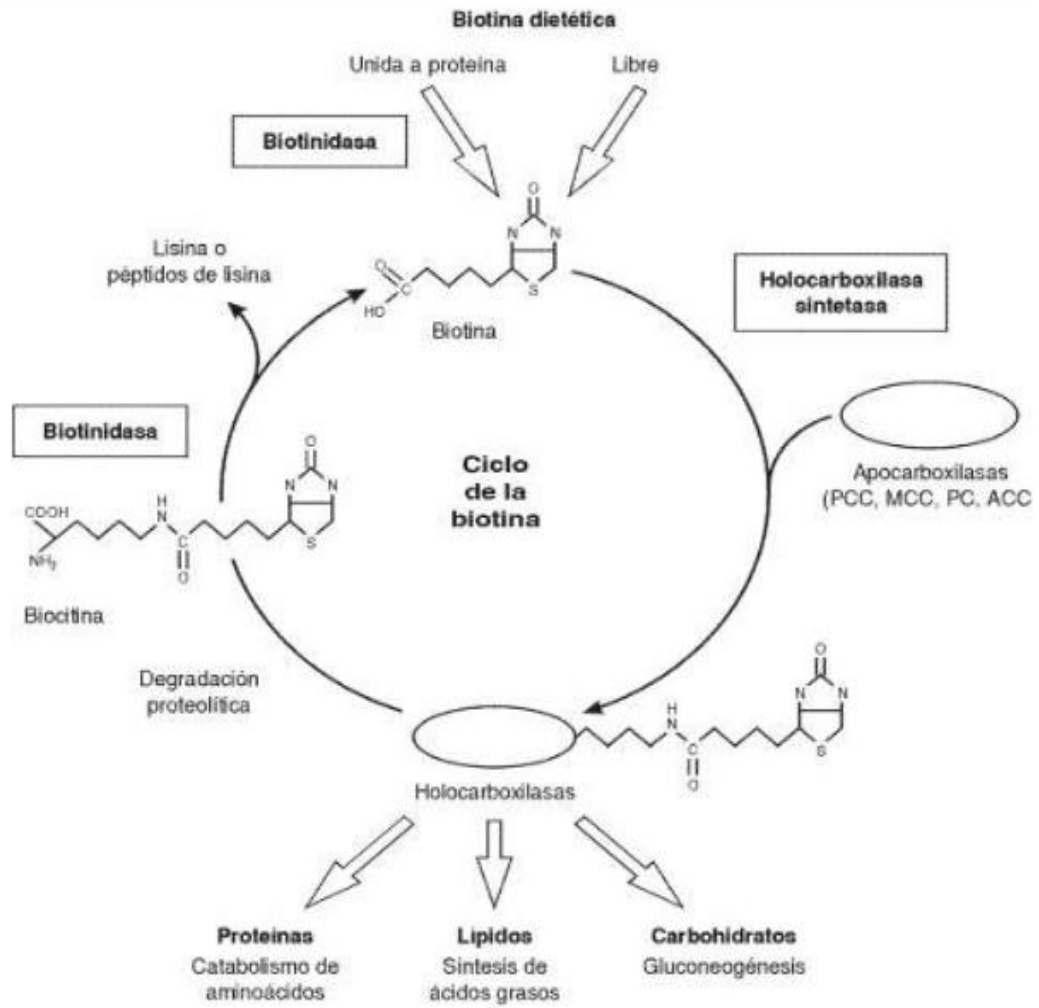


Figura 3. Ciclo biológico de la biotina (Vilches-Flores et al, 2005).

1.3.4 BIOTINA Y REPRODUCCIÓN

La biotina también es esencial para mantener la función reproductiva (Baez-Saldana et al., 2009). La importancia de la biotina durante la gestación, el desarrollo embrionario, nacimiento y reproducción ha sido demostrada en aves y mamíferos (Mock, 2005; Sawamura et al., 2014; Taniguchi & Watanabe, 2007; Watanabe, 1983). En mamíferos, la deficiencia de biotina durante la gestación induce severos efectos teratogénicos y mortalidad (Takechi, et al., 2008). Las malformaciones más comunes durante el desarrollo fetal en animales deficientes de biotina son: paladar hendido, microftalmia y micromelia (Watanabe, 1993; Watanabe, et al., 1995; Watanabe & Endo, 1989) .

Un reporte reciente ha indicado que el incremento en la excreción urinaria del ácido 3-hidroxiisovalérico (3-HIA), el cual está relacionado con la disminución de la actividad de una de las enzimas dependientes de biotina, la enzima metilcrotonil-CoA carboxilasa ocurre en la gestación de manera normal (Mock, 2005; Mock et al., 2002; Schulpis et al., 2003).

Se han observado diferencias en la susceptibilidad teratogénica entre una variedad de especies de roedores correspondiente a diferentes concentraciones de biotina en hígado de embriones (Watanabe & Endo, 1989). Esto le permitió a Watanabe y colaboradores proponer que las diferencias en susceptibilidad teratogénica entre roedores es causada por diferencias entre el transporte de biotina de la madre al feto (Taniguchi & Watanabe, 2008; Watanabe & Endo, 1991).

Taniguchi (2008) demostró que la biotina es esencial para el mantenimiento de una gestación normal y el desarrollo fetal en las últimas etapas de gestación debido a que es requerida durante la morfogénesis. Sin embargo, la relación de concentración de biotina y la actividad de biotinidasa todavía no es clara

(Sawamura et al., 2014; Takechi et al., 2008; Taniguchi & Watanabe, 2008; Watanabe, 1993; Watanabe & Endo, 1991).

1.3.5 EFECTO DE LA BIOTINA SOBRE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

Observaciones que se realizaron en la década de 1960 sugerían que la biotina intervenía en diversas funciones biológicas independientemente de su acción como coenzima. En la actualidad se ha establecido que la biotina modifica la expresión génica, tanto a nivel de la transcripción como de la traducción (Zempleni & Mock, 2001). Este efecto es análogo al de otras vitaminas que, aparte de sus funciones como sustratos y cofactores, regulan la expresión genética (Gravel & Narang, 2005).

La proliferación celular, la función inmunológica, el desarrollo embrionario, y el metabolismo de carbohidratos y de lípidos se ven afectados por la biotina. Sin embargo, el mecanismo es que la biotina participa a nivel molecular en cada una de estas funciones a nivel genético aún se encuentra en estudio (Baez-Saldana et al., 2009; Dakshinamurti, 2005; Pindolia et al., 2014; Vilches-Flores et al., 2010).

1.4 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA EN EL HUMANO

Los signos de deficiencia de biotina puede ser observados en: 1) individuos que consumen grandes cantidades de clara de huevo cruda provocando una disminución sustancial en su biodisponibilidad, 2) deficiencias nutricionales por una dieta pobre, 3) defectos con el transportador y 4) alteraciones con la HCS y la BTM siendo la deficiencia de BTM el defecto primario debido a que se han reportado más de 150 mutaciones en el gen que codifica para esta enzima disminuyendo o anulando su actividad, induciendo lo que se conoce como la deficiencia múltiple de carboxilasas (Wolf, 2012; Zempleni et al., 2009).

Clínicamente, los individuos con deficiencia de biotina presentan uno o más de los siguientes síntomas: hipotonía, ataxia, convulsiones, problemas locomotores, erupciones en la piel, alopecia, problemas respiratorios tales como la hiperventilación, estridor laríngeo y apnea, conjuntivitis, retraso en el desarrollo, pérdida de la audición y problemas de visión tal como atrofia ocular (Pindolia et al., 2010; Seymons et al., 2004; Wolf, 2012).

Metabólicamente, la mayoría de individuos pueden tener uno o más de las siguientes alteraciones: acidosis cetoláctica, aciduria orgánica e hiperamonemia severa. Sin embargo, la ausencia de aciduria orgánica o cetoacidosis metabólica no excluye el diagnóstico de deficiencia de biotina en un individuo asintomático (Hamid, 2012; Pindolia et al., 2010).

Los pacientes usualmente responden a dosis de 5-20mg de biotina al día, revirtiendo los síntomas clínicos y bioquímicos presentados; a excepción de los síntomas neurológicos como atrofia óptica y pérdida del oído, que no pueden ser revertidos una vez que se presentan (Hernandez-Vazquez et al., 2013; Seymons et al., 2004; Zempleni & Kuroishi, 2012).

1.5 DEFICIENCIA DE BIOTINA POR ALTERACIONES EN LA BIOTINIDASA (BTD)

La deficiencia múltiple de carboxilasas ocasionado por mutaciones en el gen de la BTD, es un padecimiento que sucede principalmente en humanos a temprana edad; los síntomas usualmente aparecen entre 1 semana a 10 años de edad, con un promedio de 3.5 meses. Algunos niños con deficiencia de biotinidasa muestran únicamente un síntoma de los anteriormente mencionados mientras otros presentan múltiples alteraciones principalmente neurológicas y cutáneas (Gravel & Narang, 2005; Said, 2009).

Debido a la incidencia de esta enfermedad, la deficiencia de biotinidasa ha sido aceptada en los programas de tamizaje para recién nacidos desde 1984, porque sus síntomas no son reconocidos fácilmente a menos que se presenten y porque involucra un tratamiento de por vida. (Pindolia et al., 2010; Wolf, 2011).

1.5.1 BIOTINIDASA (BTD)

En la década de los 50's, Thoma y Peterson determinaron la presencia de una enzima en el hígado del cerdo que era capaz de liberar la biotina que formaba parte de los péptidos digestivos (Moreno-Arango & Texidor-Llopiz, 2005) (Hassan & Zemleni, 2006). Casi simultáneamente, Wright y colaboradores (1954), describieron una enzima en el plasma del humano que hidrolizaba la biocitina (producto de la degradación proteolítica de las carboxilasas). A pesar de que la BTD se conocía desde mediados del siglo XX, es hasta la década de los 80's que Wolf y colaboradores muestran que su deficiencia es el defecto bioquímico en pacientes como la forma de presentación múltiple de carboxilasas en etapa juvenil (Pindolia et al., 2012; Wolf, 2011, 2012).

La BTD es una enzima que hidroliza específicamente d-biotinilamidas y ésteres, por lo que no libera la biotina que está unida a carboxilasas intactas; primero las carboxilasas tienen que ser degradadas por proteasas y peptidasas en biocitina o péptidos pequeños para que la hidrólisis se lleve a cabo y la biotina pueda ser reciclada. Esta función también la realiza sobre la biotina unida a proteínas provenientes de los alimentos (Vilches-Flores & Fernandez-Mejia, 2005).

1.5.2 GEN DE LA BIOTINIDASA

El gen de la biotinidasa del humano ha sido clonado, secuenciado y caracterizado. El gen se localiza en el cromosoma 3p25 (Cole et al., 1994) (Figura 4), además la estructura ha sido determinada. Se sabe que contiene 4 exones que tienen un tamaño de 44 kb y codifica a una proteína de 543

aminoácidos con un peso molecular de 56-77 kDa. Los 4 exones han sido designados A₁₂₅₋₄₄, B₄₅₋₃₀₉, C₃₁₀₋₄₅₉, D₄₆₀₋₁₉₆₁. El tamaño de cada exón es 79 pb, 265 pb, 150 pb y 1502 pb, respectivamente. (Cole et al., 1994; Pindolia et al., 2010).

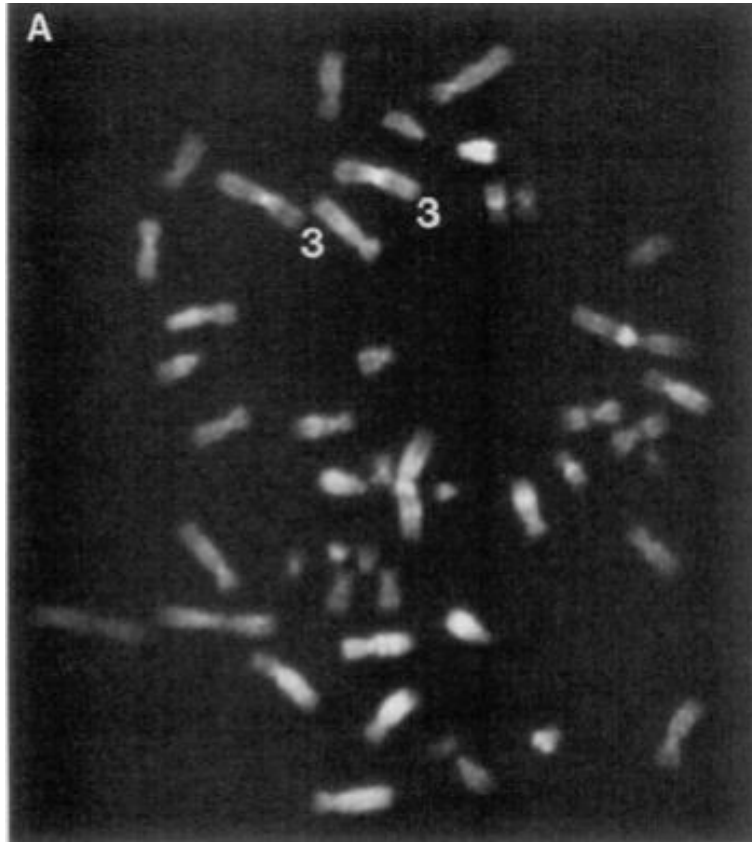


Figura 4. Localización del gen de la biotinidasa en el cromosoma 3 región p25 (Cole, 1994).

1.6 MODELOS MURINOS PARA ESTUDIO DE DEFICIENCIA DE BIOTINA

El modelo tradicional para el estudio de la deficiencia de biotina consiste en inducir a los animales a que la presenten sometiéndolos a una dieta rica en avidina, comprometiendo la biodisponibilidad de la vitamina e impidiendo que el intestino la absorba (Watanabe,1993).

Estos modelos y el avance en las técnicas en biología celular y molecular han permitido conocer las bases moleculares de los efectos de la biotina sobre el metabolismo, la reproducción y la función inmunológica, sin embargo, a nivel molecular hasta el momento se desconoce el papel de la biotina sobre todos estos sistemas en la regulación genética (Pindolia et al. 2012, Dakshinamurti et al., 2005; Larrieta et al., 2012). Por lo que diversos grupos de investigación, se han estado ocupando en diseñar nuevos modelos que proporcionen datos más cercanos a lo que sucede en humanos.

Pindolia y colaboradores (2011), desarrollaron un modelo knock-out (KO) por medio de ingeniería genética que no presenta actividad detectable de la BTB. Los ratones con deficiencia de esta enzima muestran muchos de los aspectos clínicos y bioquímicos de los niños no tratados con deficiencia de BTB (Figura 5, Cuadro 1), y cuando presenta un cuadro sintomático, responden de manera similar al tratamiento con biotina (Pindolia et al., 2011; Pindolia et al., 2014).

Tras una caracterización adicional, este animal deficiente de biotinidasa es, probablemente el modelo más prometedor para responder a preguntas que aún quedan por responder acerca del efecto de la restricción de biotina sobre las alteraciones metabólicas y las consecuencias a nivel cutáneo, neurológico (específicamente auditivo y oftalmológico) y sobre el sistema inmunológico (Hernandez-Vazquez et al., 2013), además de la relación que existe entre la biotina y la expresión de genes (Dakshinamurti et al., 2005).

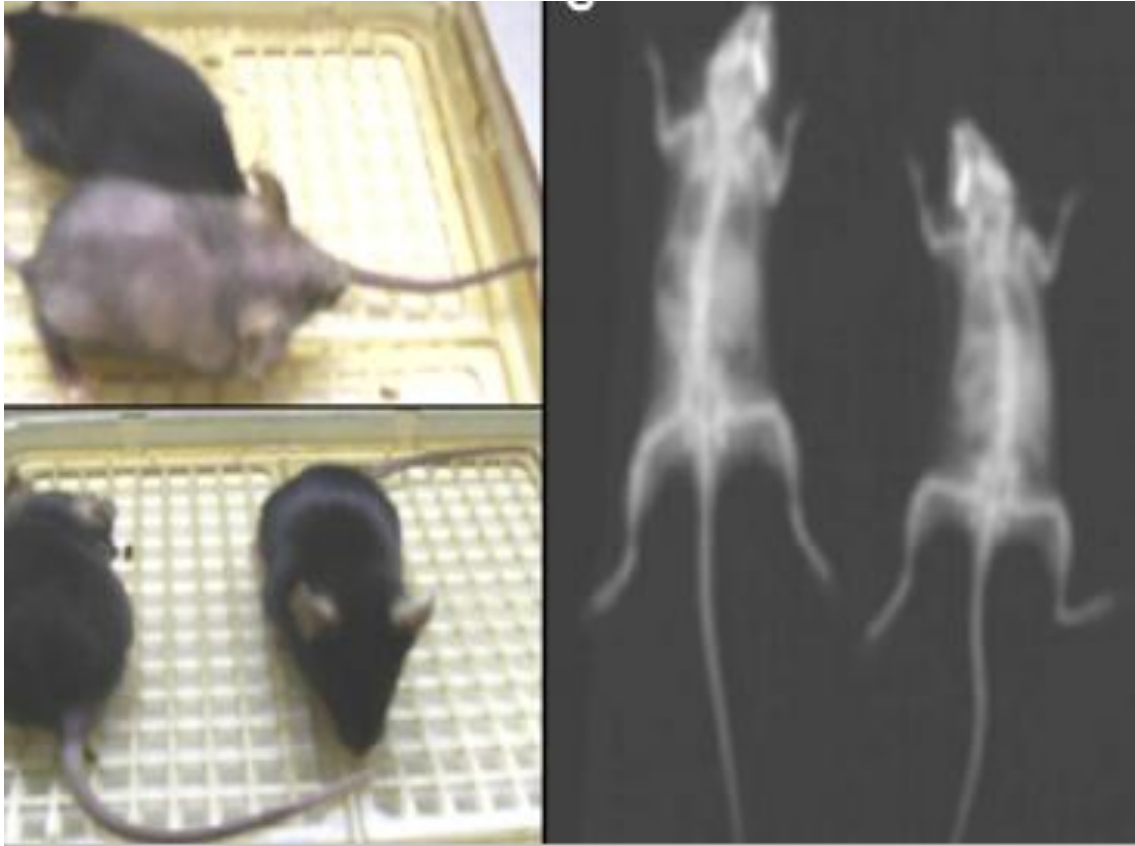


Figura 5. Características clínicas del ratón deficiente de Biotinidasa Btd (-/-) desarrollado en el Hospital Henry Ford, Detroit, USA (Pindolia et al., 2011).

Cuadro 1. Signos característicos del ratón Btd (-/-) a los 10 días de una dieta pobre en biotina (Pindolia et al., 2011)

Sistemas afectados	Signos
Neurológico	Tremores Debilidad Postura encorvada Parálisis de miembros torácicos y pelvianos Letargia
Tegumento	Hiperpigmentación Alopecia
Metabolismo	Biotina en orina Hiperamonemia
Peso del ratón	Pérdida de peso
Músculo	Hipotonía
Visión	Dificultad para mantener los párpados abiertos

1.7 MANEJO DE COLONIAS DE ROEDORES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Manejar una colonia de ratones creados por ingeniería genética no es complicado pero requiere planeación estratégica. Antes de empezar, se debe considerar el análisis del fondo genético del ratón para suponer el mejor manejo reproductivo y una vez que se tiene determinado el mejor método de apareamiento es importante dar un seguimiento genético de tal manera que se mantenga controlado el número de animales homocigotos o heterocigotos dentro de la colonia (Conner, 2005; Kincer et al., 2011).

Cuando se trabaja con animales genéticamente modificados, se debe de tomar en cuenta que no se puede manejar como una colonia tradicional ya que pueden observarse cambios como disminución de la fertilidad, letalidad embrionaria, modificaciones de la glándula mamaria (lactación) y alteraciones en el comportamiento materno (Conner, 2002).

Tener un adecuado registro del comportamiento de una colonia se verá reflejado en una rápida expansión de ésta dando como resultado una mejor optimización en el desarrollo de los procesos experimentales (Davis et al., 2009).

Los datos de producción son útiles para examinar del rendimiento de los ratones y las colonias de manera individual y evaluar el desempeño de los ratones de las líneas de producción dentro de las colonias de roedores de tal manera que se pueda determinar cuando los ratones tienen la necesidad de ser reemplazados como pie de cría. Los registros científicos detallados también deben mantenerse para registrar la información genética y fenotípica de ratones a nivel individual (Conour, 2000; Kincer et al., 2011; Liphann, 2003; Peters et al., 2002).

Cuadro 2. Datos reproductivos del ratón C57BL/6 (Davis, 2009).

Dato reproductivo	Rango
Madurez sexual	5- 7 semanas
Gestación	18.5- 21 días
Ciclo estral	4 días
Peso al nacimiento	1-1.5g
Destete	21-28 días
Vida reproductiva	8 meses
Estro postparto	12-20 horas
Tamaño de la camada	6-8

1.7.1 ESQUEMAS DE APAREAMIENTO PARA ANIMALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Existen tres diferentes esquemas de apareamiento de acuerdo al tipo genético que se pretende obtener dentro de una colonia de roedores. Al conseguir crías de éstos apareamientos es importante realizar la determinación del genotipo del animal, el cual se determina fácilmente mediante el corte de la punta de la cola y a partir de éste tejido se realiza la extracción de ADN y posteriormente se somete a PCR para observar las bandas amplificadas. Con estas técnicas los progenitores de las siguiente generación se determinan fácilmente en base a las necesidades de los investigadores (Kincer et al., 2011; Liphann, 2003).

ESQUEMAS DE APAREAMIENTO

- HOMOCIGOTO (-/-) X HOMOCIGOTO (-/-) = En el cual el 100% de la progenie es afectada. Para mantener este esquema de apareamiento es necesario evaluar si tanto el macho como la hembra son viables y fértiles como individuos homocigotos.

	-	-
-	-/-	-/-
-	-/-	-/-

- HETEROCIGOTO (+/-) X HOMOCIGOTO (-/-) = En el cual se obtendrán el 50% de la progenie homocigota.

	-	-
+	+/-	+/-
-	-/-	-/-

- HETEROCIGOTO (+/-) X HETEROCIGOTO (+/-) = En el cual se obtendrán el 25% de la progenie homocigotas.

	+	-
+	+/+	+/-
-	+/-	-/-

Estos dos últimos son muy útiles cuando el macho y/o hembra o ambos no son viables como animales homocigotos (Conour, 2000).

2. JUSTIFICACIÓN

El papel de la biotina en la regulación genética se ha confirmado en diversos estudios, sin embargo, aún existen incógnitas acerca de la función que tiene a nivel molecular por lo que se requiere un buen modelo de estudio. Hasta el momento, el modelo más prometedor y aceptado es el que propusieron Pindolia y colaboradores (2011), sin embargo, existen inconvenientes para producir y mantener la colonia.

De acuerdo con lo descrito por Pindolia (2011), las colonias de reproducción se deben mantener con animales de genotipo heterocigoto teniendo que realizar la determinación del tipo genético a toda la progenie para utilizar en investigación. Además, requieren una suplementación de biotina diaria a una concentración de 20µg/20g de peso, principalmente en etapas críticas como son la gestación y lactación en el caso de la hembras, animales recién destetados y machos en reproducción. La administración de biotina se recomienda mediante inoculación vía intraperitoneal (IP) durante toda la vida del animal, sin embargo, esto puede producir estrés debido al manejo y puede provocar daño al tejido ocasionado por la inoculación diaria.

Ante esta problemática se justifica la búsqueda de métodos alternativos para suplementar la biotina. Por lo que se propone que proporcionar biotina través de la dieta puede mejorar la calidad de vida de estos animales.

3. HIPÓTESIS

La dieta purificada y la dieta natural suplementada serán capaces de mantener a una colonia de ratones reproductores deficientes al gen de la biotinidasa (Btd^{-/-}).

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar dos tipos de dietas sobre la eficiencia reproductiva en ratones reproductores deficientes al gen de la biotinidasa (Btd^{-/-}).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar Animales Homocigotos Knock out realizando retrocruzas a partir de hembras Wild Type (WT) y machos Knock out (KO).
2. Determinar Tamaño de la Camada al Nacimiento, Peso de la Camada al Nacimiento, Peso al Destete, índice de Producción y Proporción entre Sexos como Indicadores de Eficiencia Reproductiva en Hembras al Proporcionar la Dieta Purificada y la Dieta Natural Suplementada.
3. Determinar la Concentración, Motilidad y Morfología Espermática como Indicadores de Eficiencia Reproductiva en Hembras al Proporcionar la Dieta Purificada y la Dieta Natural Suplementada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue financiado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMN-SZ). Los animales se mantuvieron en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del INCMN-SZ. La determinación de Genotipos se efectuó en el laboratorio de la Unidad de Genética de Nutrición perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental, prospectivo y longitudinal (Figura 6).

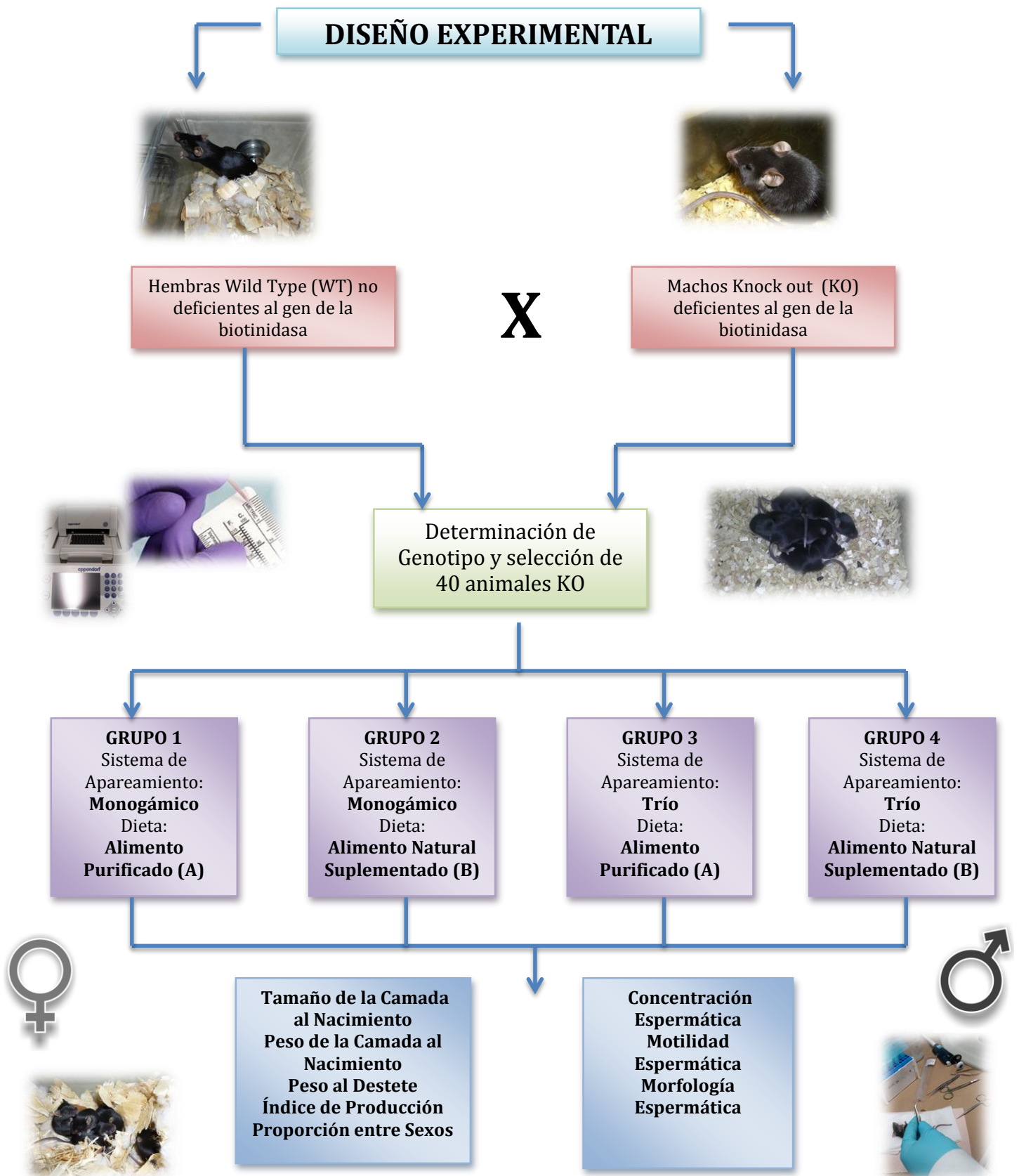
ANIMALES

La aprobación de este proyecto fue otorgado por el Comité de Investigación Animal (CINVA) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Todos los animales se alojaron de acuerdo a las condiciones establecidas por la NOM-062-ZOO-1999, la cual menciona que los roedores deben mantenerse en cuartos con los parámetros ambientales controlados con las siguientes características: temperatura de 18-22°C, humedad de 40-70%, fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y ruido menor a 85 decibeles. Durante todo el proyecto los animales se mantuvieron en microaisladores estáticos con alimento y agua *ad libitum*.

Para obtener ratones homocigotos knock out (BTD^{-/-}) se realizaron cruzamientos entre ratones hembras C57BL/6 homocigotos no mutantes para el gen de la biotinidasa o también llamados Wild Type (WT) y ratones machos C57BL/6 homocigotos o mutantes Knock out (KO) donados por el Dr. Barry Wolf, Profesor del Hospital Henry Ford en Detroit, Michigan, E.U.A.

Figura 6. Esquema del Diseño Experimental



DETERMINACIÓN DE GENOTIPO

Los genotipos de los animales se determinaron a las 3 semanas de edad realizando corte de cola a partir del cual se obtuvo ADN de acuerdo a lo establecido por Pindolia (Conner, 2005; Pindolia et al., 2011).

Extracción de ADN

Para obtener ADN a partir de tejido se adaptó el protocolo descrito por Stratman y Simon (2003) de la siguiente manera: se cortó al ratón un fragmento de cola (0.2-0.5cm), ésta se maceró y se resuspendió en 100µl de buffer de lisis con 3µl de proteinasa K (SIGMA) a una concentración de 20mg/ml. Las muestras se incubaron en baño María a 60 °C durante toda la noche, posteriormente a 100°C durante 10 minutos. Se agregaron 100µl de fenol-cloroformo a cada muestra, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos. Se agregaron 3 volúmenes de etanol al 100% y medio volumen de NaCl₂ 5M, se centrifugaron a 13000 rpm y se lavaron con etanol al 75%.

Estas muestras se trataron nuevamente agregando 200µl de H₂O grado HPLC y 200µl de fenol-cloroformo siguiendo por segunda ocasión los pasos anteriormente descritos. Al finalizar, a la pastilla se le agregó 100µl de agua libre de DNAsas para hidratarla (Puregen DNA Hydration Solution, Qiagen) y se resuspendió. El DNA hidratado fue transferido a microtubos de 1.5 ml y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Cuantificación y pureza del ADN

La concentración y pureza del ADN se determinó mediante espectrofotometría convencional (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260, 280 y 230 nm.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se realizó la técnica de PCR a partir del ADN obtenido, seleccionándose 3 iniciadores: una secuencia de la biotinidasa común a los animales wild type y animales knock out (WT 5' - AACACAGCCAGCCGTTTGAA- 3'), una secuencia específica antisentido específica para el alelo wild type (WT 5' - GTCGAGGTTCTGCTTCATGA- 3') y por último, una secuencia específica para el alelo homocigoto knock out (KO 5' - GCTGGACGTAAACTCCTCTT- 3') (Pindolia, et al., 2011).

La preparación para realizar la PCR se consideró con un volumen final de 25µl y consistió en la mezcla de:

- 2.5µl de Buffer de fusión
- 1µl de dNTP's (desoxirribonucleótidos)
- 1µl de MgCl₂ (Cloruro de Magnesio)
- 3µl de Primers 3µl
- 1µl deTaq polimerasa 1µl
- 15.5µl de H₂O
- 1µl de Muestra de ADN

Una vez que se mezclaron todos los reactivos en un microtubo, se agitaron vigorosamente y se colocaron en el termociclador (eppendorf, Mastercycler). Los ajustes del programa se siguieron de acuerdo a Pindolia (2011) (Figura 7):

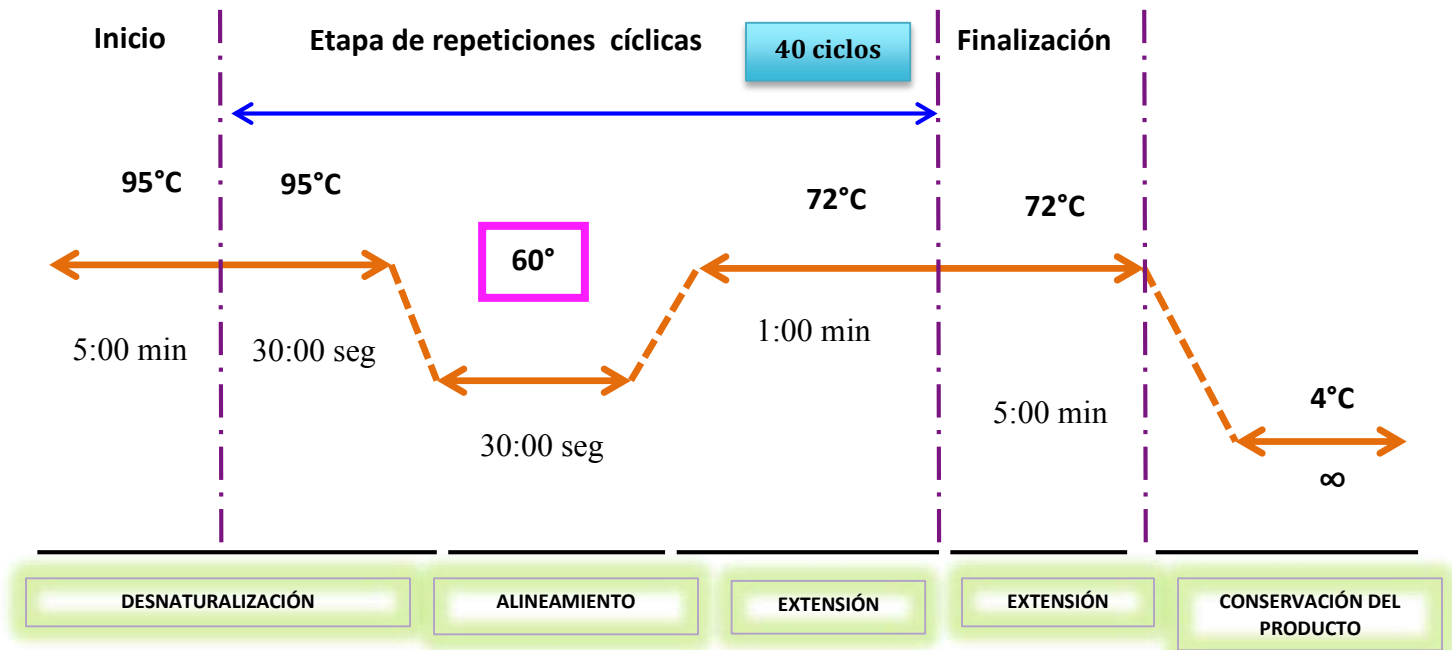


Figura 7. Esquema de las condiciones para realizar la PCR.

Electroforesis

Para observar los resultados de la PCR, se realizaron geles de agarosa al 1.5% a partir de agarosa en polvo (BIORAD). Para ello se disolvieron 0.45g de agarosa en 30ml de buffer TAE 1X, esta mezcla se calentó en una placa calefactora durante 10 minutos y se vació en el soporte dejándolo a temperatura ambiente hasta polimerizar. Se colocaron 5µl de marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) y 10µl de la muestra de ADN. La electroforesis se realizó a 100V durante 60 minutos. Al finalizar, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (UltraPure™, Invitrogen) a una concentración de 0.5µg/ml durante 5 minutos. Los geles se visualizaron en un espectrofotómetro (BIORAD), para verificación de las bandas y determinación del genotipo de los animales.

SELECCIÓN DE DIETAS Y FORMACIÓN DE GRUPOS

Preparación de Dietas

Alimento purificado (Dieta A)

Se eligió una dieta con los requerimientos necesarios para animales en reproducción que contiene 20% de proteína cruda, 9% de grasa cruda, 4% de fibra cruda y 6.5% de cenizas. Adicional a esto, la dieta considera la cantidad concentrada de biotina requerida para las necesidades de estos animales, es decir, de 1g/Kg (2018S, Harlan Teklad, Madison, WI).

Alimento Natural Suplementado (Dieta B)

Se optó por una dieta comercial para animales en reproducción (PicoLab Mouse Diet 20 5058), que provee 20% de proteína cruda, 9% de grasa cruda, 4% de fibra cruda y 6.5% de cenizas para colonias de ratones que requieren niveles extra de energía necesaria para una máxima producción. Debido a que esta contiene únicamente 0.1g/Kg se tuvo que adicionar la biotina en polvo (SIGMA) para ajustarla a la concentración exacta de la dieta A.

Para ello, se molió el alimento debido a la presentación en pellet de éste (Thomas Scientific, 174931.00 USA), se adicionó la biotina en polvo y se ajustó a 1g/Kg de alimento. Una vez que se tuvo esta mezcla se homogenizó bien en una mezcladora (Siemen) y se peletizó nuevamente, por lo que el alimento se humedeció con agua destilada a una concentración de 30%. El alimento humedecido se introdujo en la peletizadora (California Pellet Mill NH394199) hasta obtener el alimento peletizado.

Los pellets se dejaron secar durante 48 horas en un horno ahumador (Poliingenieros S. A. de C. V.) a una temperatura de 20°C. Una vez que los pellets se secaron en su totalidad el alimento se esterilizó por medio de radiaciones gamma a una dosis de 5 Kilograys¹ en la planta de esterilización del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

¹ Kilogray: Unidad de medida de la dosis de radiación absorbida de radiación ionizante.

Las condiciones de almacenamiento para las dos dietas fueron a una temperatura de 4°C de acuerdo a las recomendaciones del proveedor para el mantenimiento sin pérdida de los nutrientes.

Formación de grupos

Se seleccionaron 40 animales homocigotos KO y se mantuvieron hasta llegar a madurez sexual (8 semanas) administrando biotina (SIGMA) vía intraperitoneal a una concentración de 20µg/20g al día.

Antes de formar las unidades reproductoras, todos los animales KO se pesaron y se compararon con animales WT para verificar la homogeneidad de su desarrollo. Los animales que presentaron cualquier signo de deficiencia de biotina principalmente anomalías locomotoras o retardo en el crecimiento no se incluyeron en el estudio y se les aplicó eutanasia de manera humanitaria mediante cámara de CO₂. Una vez que los ratones llegaron a las 8 semanas, se formaron 4 grupos para dar inicio a la suplementación a través del alimento (Tabla 3).

Cuadro 3. Datos de los grupos experimentales.

Grupo	Sistema de Apareamiento	Tipo de Dieta
Grupo 1	Monogámico	Alimento Purificado (A)
Grupo 2	Monogámico	Alimento Natural Suplementado (B)
Grupo 3	Trío	Alimento Purificado (A)
Grupo 4	Trío	Alimento Natural Suplementado (B)

Además, se utilizaron 20 animales WT divididos en dos grupos (sistema monogámico y trío) que fueron utilizados como grupos control para descartar

que cualquier problema reproductivo pudiera deberse a cambios en el ambiente o por agentes infecciosos.

MANEJO DE DIETAS

Las dos dietas se proporcionaron *ad libitum* durante un periodo de 6 meses obteniendo los datos reproductivos.

OBTENCIÓN DE DATOS

Los animales obtenidos de toda la colonia se observaron y se pesaron diariamente para obtener los siguientes datos reproductivos:

DATOS DE PRODUCCIÓN EN HEMBRAS

1. Tamaño de la camada
2. Peso de la camada
3. Peso al destete
4. Índice de producción
5. La proporción de sexos

DATOS DE PRODUCCIÓN EN MACHOS

Se tomaron al azar 16 machos maduros (8 WT y 8 KO) y se les realizó análisis de semen comparando la concentración, motilidad y morfología espermática.

Obtención y análisis de espermatozoides epididimales

La eutanasia se efectuó de manera humanitaria realizando dislocación cervical. Posterior a la eutanasia, ambos testículos junto con el epidídimo y conductos deferentes fueron recuperados realizando una incisión en la zona inguinal sobre cada testículo. La cola del epidídimo y conductos deferentes fueron retirados del testículo y de la grasa adyacente por disección y colocados en solución salina a temperatura de 37°C para ser lavados. Estas porciones fueron seccionadas para

liberar a todos los espermatozoides. Una vez que se tuvo la suspensión de manera homogénea se tomaron 100µl de ésta para determinar el conteo y motilidad espermática. La concentración espermática y motilidad se determinó mediante el cuantificador de semen SQA-V™(Sperm Quality Analyzer). Una gota de aproximadamente 40µl se colocó sobre un portaobjetos para realizar el análisis de la morfología efectuando una tinción con eosina-negrosina. Estos se realizaron por duplicado y para el caso de la morfología espermática se evaluaron 200 espermátocitos por muestra para determinar el número final de anomalías (Bernardi & Brogliatti, 2010; Yu, 1998).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para comparar los distintos grupos utilizando el Programa SPSS 16.0 y para realizar las gráficas se utilizó el Programa GraphPad Prism 6.

6. RESULTADOS

Determinación de Genotipo a partir de corte de cola de ratón empleando la técnica de PCR

Durante un periodo de doce meses, el número total de animales obtenidos de los apareamientos entre ratones hembras WT y ratones machos KO fue de 150. Todos los animales obtenidos presentaron fenotipo de ratón de la cepa C57BL/6, y por la técnica de PCR se identificaron 3 diferentes genotipos dentro de la colonia: animales homocigotos KO, animales homocigotos WT y animales heterocigotos de acuerdo a la amplificación que se observó en la electroforesis.

En el caso de animales homocigotos KO se evidenció una banda de 297 bp, en el caso de animales homocigotos WT se observó una amplificación correspondiente a 424 bp y finalmente en el caso de los animales heterocigotos la amplificación de ambas bandas evidenció la presencia de los dos alelos (Figura 8).

La proporción de animales de cada genotipo fue la siguiente: 44 animales homocigotos KO, 50 animales homocigotos WT y 56 animales de genotipo heterocigoto.

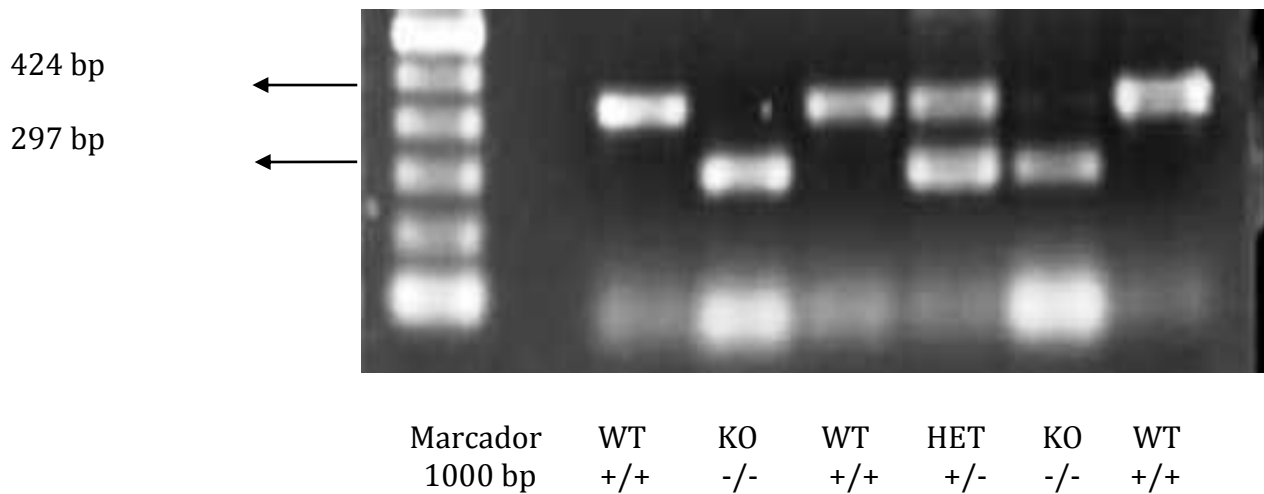


Figura 8. Fotografía de la electroforesis de productos de la PCR en agarosa al 1.5%. El patrón de bandeo se utilizó para discriminar a los 3 genotipos dentro de la colonia. La banda de 297 bp (carril 2 y 5) corresponde a los animales homocigotos KO, la banda de 425 bp (carril 1, 3 y 6) corresponde a los animales homocigotos WT y la presencia de ambas bandas (carril 4) corresponde a un animal heterocigoto.

Evaluación de la hembra

La edad de todos los animales al crear la unidad reproductiva fue de 8 semanas y durante los primeros 3 días se logró visualizar el tapón vaginal tomando la presencia de éste como el diagnóstico de gestación. El peso promedio al nacimiento de animales KO fue de 19.86 ± 1.93 g en hembras y de 23.97 ± 2.99 g en machos. En el caso de animales WT, el peso promedio para hembras fue de 19.81 ± 0.98 g y en el caso de machos fue de 23.15 ± 2.19 g. El porcentaje de fertilidad para animales KO fue de 85% y en animales WT fue de 90%.

El tamaño promedio de la camada al nacimiento en animales WT fue de 7.15 ± 0.34 para los que se encontraban en apareamiento monogámico y de 12.2 ± 0.63 en el grupo de animales bajo un sistema de apareamiento en trío. En el caso de los animales KO, el promedio de tamaño de camada al nacimiento fue el siguiente: Grupo 1 de 5.25 ± 0.10 , Grupo 2 de 5.05 ± 0.84 , Grupo 3 de 6.95 ± 0.55 y Grupo 4 el promedio fue de 6.65 ± 0.52 .

Al evaluar las dos dietas y el efecto sobre el tamaño de la camada al nacimiento de los cuatro grupos de animales KO, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) al examinar los dos grupos que se encontraban en sistema monogámico (1 y 2) con los que se encontraban bajo sistema en trío (3 y 4). En donde se evidenció diferencia significativa ($p < 0.05$) fue al realizar la comparación entre los sistemas de apareamiento demostrando que en el caso de apareamientos en tríos, el promedio de tamaño de la camada fue mayor contrastándolos con los apareamientos monogámicos. Además de esto, fue evidente la disminución del tamaño de la camada de los cuatro grupos de animales KO al compararlos con los animales control (WT) (Figura 9).

El peso promedio de la camada al nacimiento en animales WT fue de 8.18 ± 0.12 g en sistema de apareo monogámico y de 14.02 ± 0.74 g para los ratones agrupados en tríos. El promedio en los animales KO fue el siguiente:

Grupo 1 de 6.06 ± 0.85 g, Grupo 2 de 5.29 ± 0.94 g, Grupo 3 de 8.44 ± 0.84 g y finalmente, para el Grupo 4 fue de 8.51 ± 0.52 g.

Al comparar las dos dietas sobre el peso promedio de la camada al nacimiento, sólo se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) al contrastar los apareamientos monogámico con los apareamientos en trío y con estos datos se puede observar una tendencia a ser mayor el peso al nacimiento en el caso de apareamientos en trío. El peso promedio de animales WT también es mayor con respecto a los 4 grupos de animales KO (Figura 10).

Durante la etapa de lactancia hubo mortalidad tanto en los animales WT como en los 4 grupos de animales KO. La mortalidad en animales control fue del 5% y en el caso de ratones KO el promedio de animales destetados de las unidades reproductivas en sistemas monogámicos fue de 80% y en las unidades reproductivas en trío fue de 90%. El peso promedio de camadas WT destetadas fue de 60.60 ± 2.14 g en sistema de apareamiento monogámico y de 119.31 ± 17.80 g en sistema de tríos. Para el caso de animales KO los pesos promedios de la camada al destete fueron los siguientes: Grupo 1 de 43.89 ± 1.50 g, Grupo 2 de 34.80 ± 7.61 g, Grupo 3 de 59.46 ± 4.15 g y Grupo 4 de 56.83 ± 3.51 g.

Al examinar si hay un efecto importante de las dietas sobre el peso promedio de las camadas al momento del destete, es evidente que no existe diferencia significativa al compararlas pero si existe diferencia de peso ($p < 0.05$) de acuerdo al sistema de apareamiento que se maneja (Figura 11).

El total de animales destetados durante los 6 meses fue de 446 ratones distribuidos de la siguiente manera: Grupo 1 con 96 animales, Grupo 2 con 78 animales, Grupo 3 con 139 animales y Grupo 4 con 133 animales. La proporción de machos y hembras fue de 55.1% y 44.9% respectivamente.

El índice de eficiencia reproductiva para el Grupo 1 fue de 0.30, para el Grupo 2 fue 0.30, para el Grupo 3 de 0.36 y para el Grupo 4 de 0.36, no existiendo diferencias significativas ($p > 0.05$) en estas últimas comparaciones entre dietas y sistemas de apareamiento.

Tamaño de la Camada al Nacimiento

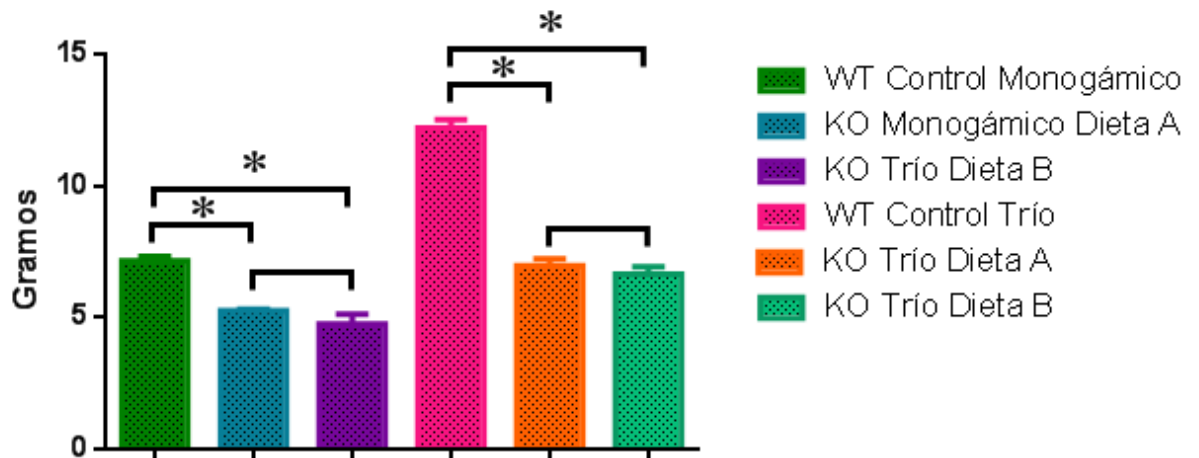


Figura 9. Comparación de la Dieta Purificada y Dieta Natural sobre el Tamaño Promedio de la Camada al Nacimiento. Cada control (columna 1 y 4) se comparó con la dieta correspondiente y con el sistema de apareamiento. Con base en esto, se encontró que no hubo diferencia significativa al examinar las dietas sobre los grupos, las columnas 2,3, 5 y 6 muestran que las camadas fueron homogéneas independientemente de la dieta que se les proporcionó.

En el caso de apareamiento en trío, el tamaño promedio de la camada fue mayor comparándolos con los apareamientos monogámicos, por lo que en este caso si existe diferencia significativa ($p < 0.05$).

La disminución del tamaño de la camada en los 4 grupos de animales KO es indiscutible al observar el comportamiento de los animales WT.

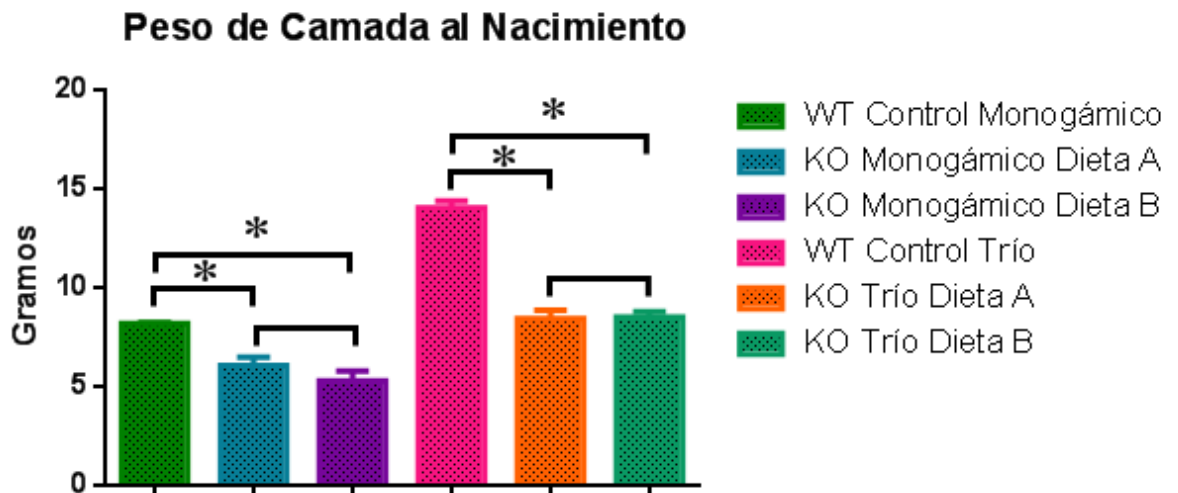


Figura 10. Comparación de la Dieta Purificada y Dieta Natural sobre el Peso Promedio de la Camada al Nacimiento. Cada control (columna 1 y 4) se comparó con la dieta correspondiente y con el sistema de apareamiento. En esta gráfica se muestra que no existe diferencia significativa al examinar las dietas sobre los diferentes grupos, el peso de las camadas no se notó influenciada por efecto de alguna dieta en particular.

Sólo se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) al contrastar los apareamientos monogámicos (columna 2 y 3) con los apareamientos en trío (columna 5 y 6) y con estos datos se puede observar una tendencia a ser mayor el peso al nacimiento en el caso de apareamientos en trío.

El peso promedio de animales KO también es mayor con respecto a los cuatro grupos de animales KO.

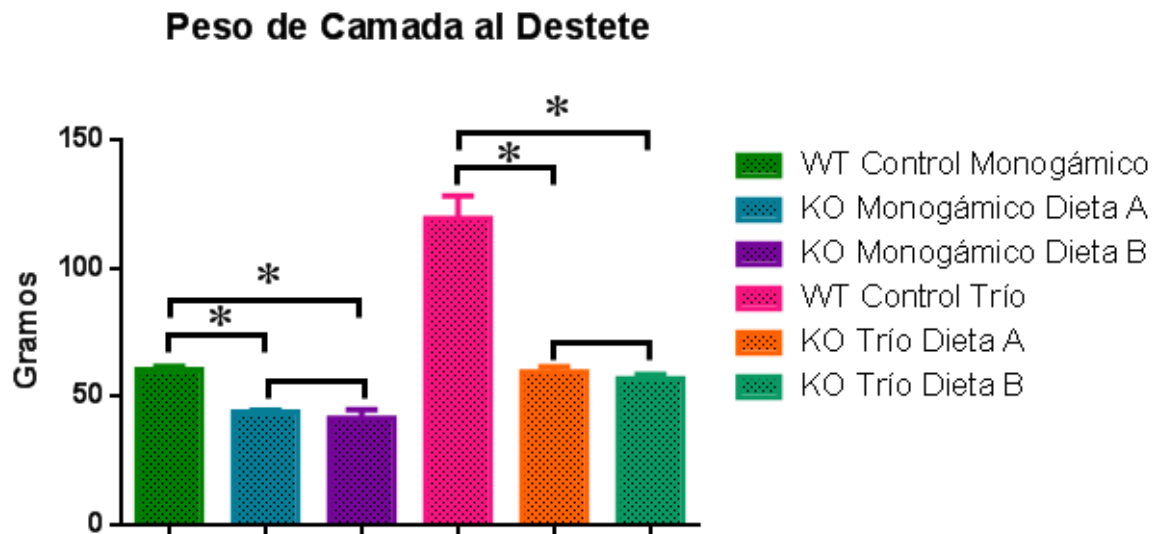


Figura 11. Comparación de la Dieta Purificada y Dieta Natural sobre el Peso Promedio de la Camada al Destete. Cada grupo control (columna 1 y 4) se comparó con la dieta y con el sistema de apareamiento correspondiente. No existe diferencia significativa al comparar las dietas pero si existe diferencia de peso ($p < 0.05$) de los animales destetados de acuerdo al sistema de apareamiento que se maneja. En las columnas 1-3 se puede observar que las camadas que se encuentran bajo un sistema monogámico tienen menor peso al destete al compararlos con los animales que se encuentran bajo un sistema de tríos (columna 5 y 6). Además de esto, se notó que la mortalidad fue mayor en el caso de sistemas monogámicos.

Los animales WT bajo un sistema de monogamia producen camadas al destete del mismo peso que los animales KO que se encuentran en trío.

EVALUACIÓN DEL MACHO

Al no encontrar diferencias significativas durante el desarrollo al proporcionar la Dieta Purificada y la Dieta Natural Suplementada en los diferentes grupos, para este estudio se utilizaron cuatro machos con dieta A y cuatro machos con dieta B y se compararon con ocho machos C57BL/6 WT.

El peso promedio de estos animales, en el caso de animales WT fue de 23.77 ± 1.24 g y en animales KO fue de 27.6 ± 2.45 g. Se obtuvo el peso de los testículos y en el caso del testículo izquierdo, el promedio fue de 0.1025 ± 0.015 g para animales WT y de 0.1143 ± 0.010 g para animales KO. El peso promedio del testículo derecho fue de 0.099 ± 0.018 g para animales WT y de 0.1091 ± 0.011 g. De acuerdo al análisis estadístico ($p > 0.05$), no existe evidencia suficiente para decir que el peso testicular es variable entre el grupo WT y KO (Figura 12).

En el análisis de la concentración espermática entre los dos grupos, los resultados demostraron que la concentración espermática en animales WT fue de 34.68 ± 5.49 millones/ml y en los animales KO, la concentración espermática fue de 20.96 ± 3.38 millones/ml. Estos resultados indican una diferencia significativa al comparar estos datos ($p < 0.05$), pues los animales WT tienen una concentración espermática superior a los animales KO (Figura 13).

Al evaluar la motilidad espermática, se encontró que los espermatozoides de los animales WT presentaron una motilidad de $64.58 \pm 4.37\%$ y en los animales KO se observó una motilidad de $54.58 \pm 9.56\%$. Con base en estos datos se encontró una diferencia estadística ($p < 0.05$) evidenciando que del volumen obtenido, el eyaculado de animales KO presenta mayor cantidad de espermatozoides con alteraciones en la motilidad o con mayor susceptibilidad a morir más rápidamente (Figura 14).

Tanto los ratones WT como los ratones KO evaluados presentaron alteraciones en la morfología de los espermatozoides. Las anomalías que más se encontraron y evaluaron fueron: cabezas triangulares, cabezas ovaladas y

flagelos ondulados (Figuras 15-18).

En los animales WT, se encontró un promedio de cabezas triangulares de $19.7 \pm 2.9\%$, $11.6 \pm 1.9\%$ de cabezas ovaladas y $11.6 \pm 2.7\%$ de flagelos ondulados. En los animales KO, el porcentaje promedio de cabezas triangulares fue de $35.5 \pm 0.03\%$, cabezas ovaladas de $20.1 \pm 0.02\%$ y de flagelos ondulados de $39 \pm 0.034\%$. Con base en estos resultados es posible decir hay diferencia estadística ($p < 0.05$) en la comparación de la morfología entre animales KO y animales WT. Los animales KO presentan mayor cantidad de espermatozoides con alteraciones en su morfología (Figura 19).

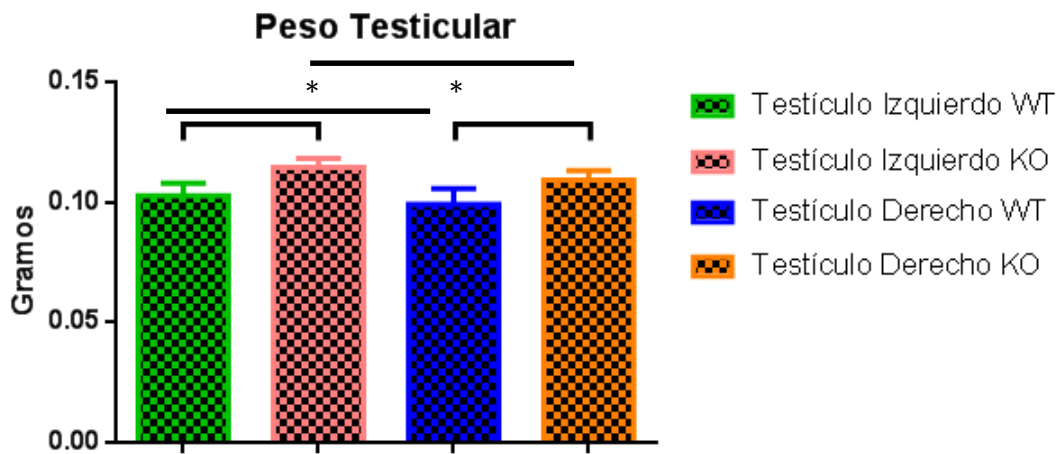


Figura 12. Comparación del Tamaño Testicular en ratones WT y KO de 16 semanas de edad. Con base en los datos obtenidos al pesar los testículos, en esta gráfica se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) al comparar el tamaño testicular izquierdo (columna 1 y 2) y derecho (columna 3 y 4) de ambos grupos.

Es evidente que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar el tamaño testicular de cada genotipo, es decir el tamaño y peso del testículo izquierdo es mayor tanto en animales WT como animales KO.

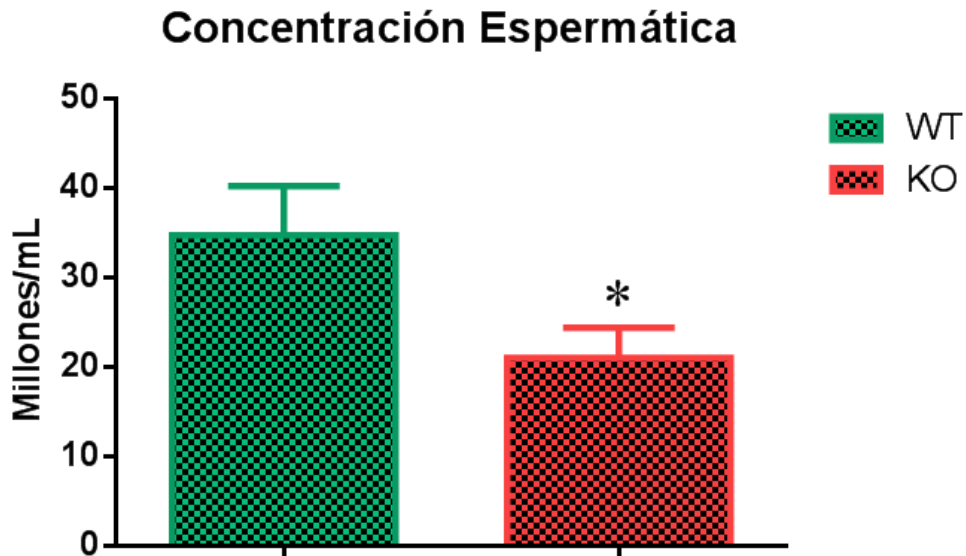


Figura 13. Concentración espermática de ratones WT (columna 1) y KO (columna 2) de 16 semanas de edad. Los ratones WT produjeron, en promedio, 35 millones de espermatozoides/mL mientras que los animales KO produjeron 20 millones/mL. Estos resultados indican una diferencia significativa al comparar estos datos ($p < 0.05$), demostrando que los animales WT tienen una concentración espermática superior a los animales KO.

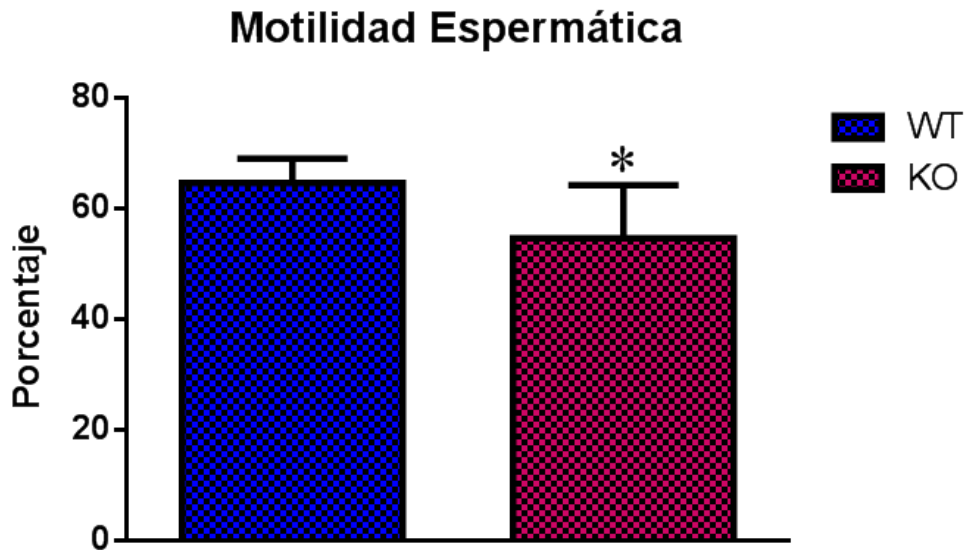


Figura 14. Motilidad espermática de ratones WT (columna 1) y KO (columna 2) de 16 semanas de edad. De la concentración total de espermatozoides, se encontró un porcentaje promedio de motilidad de 64.58% en los ratones WT y de 54.58% en animales KO, notando una diferencia estadística ($p < 0.05$) y evidenciando que los espermatozoides de animales KO presentan menor motilidad.

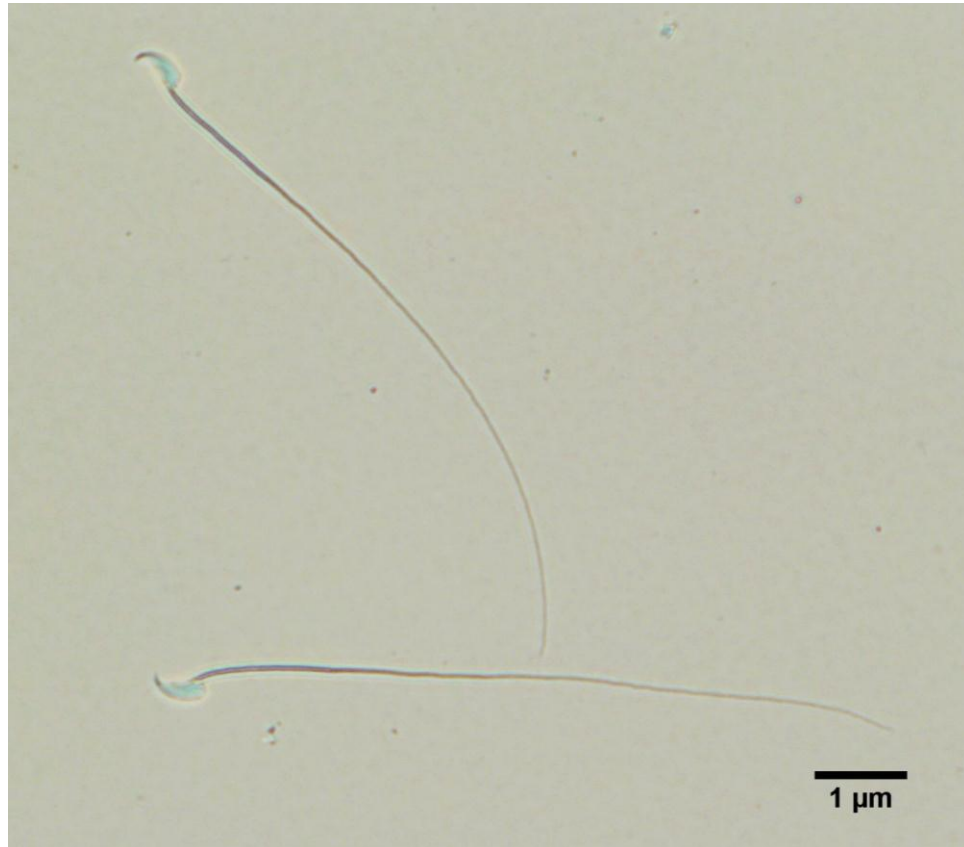


Figura 15. Fotografía de espermatozoide de ratón C57BL/6 WT de 16 semanas de edad sin alteraciones en su morfología. Tinción eosina-negrosina. Aumento 40X.



Figura 16. Fotografía de espermatozoide de ratón KO deficiente de biotinidasa de 16 semanas de edad mostrando diferentes espermatozoides y evidenciando uno con alteraciones en la morfología de cabeza (cabeza triangular o forma de flor de loto). Tinción eosina-negrosina. Aumento 40X.



Figura 17. Fotografía de espermatozoide de ratón KO deficiente de biotinidasa de 16 semanas de edad mostrando diferentes espermatozoides y evidenciando algunos con alteraciones en la morfología de cabeza (cabeza triangular). Tinción eosina-negrosina. Aumento 40X.

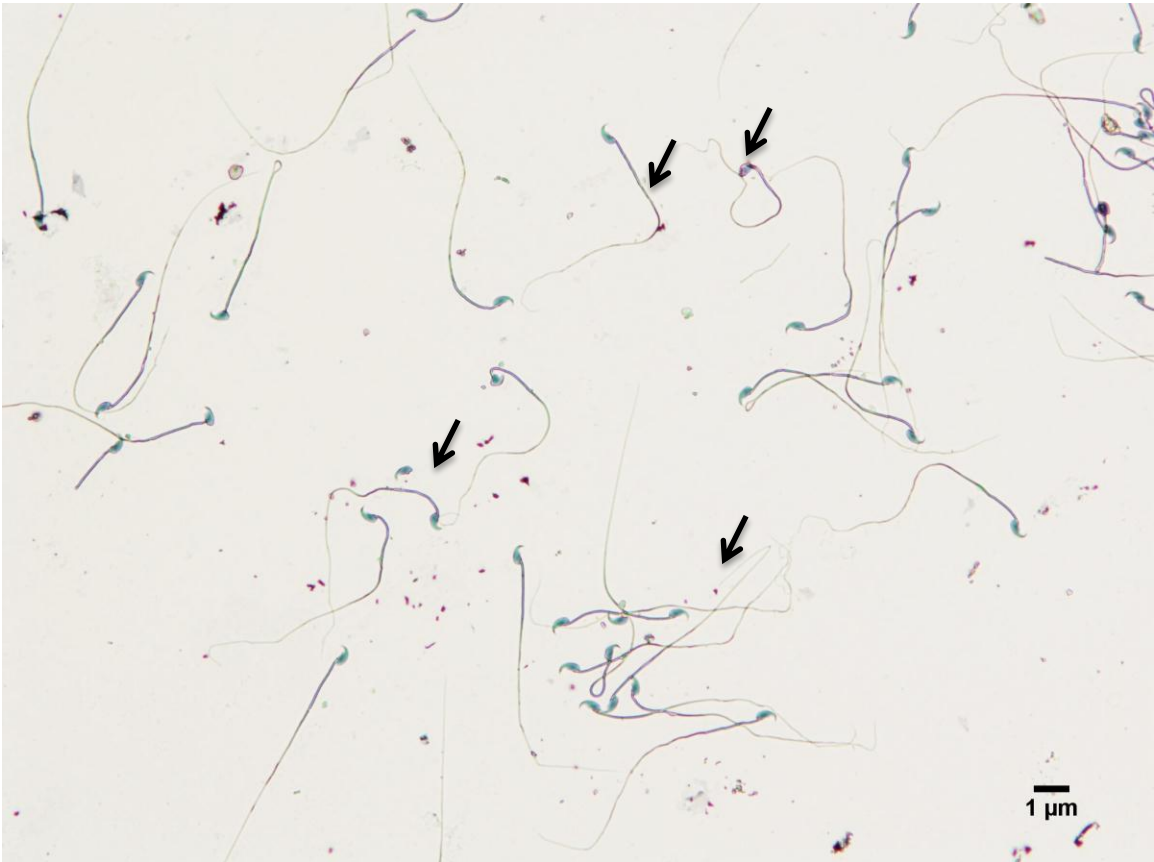


Figura 18. Fotografía de espermatozoide de ratón KO deficiente de biotinidasa de 16 semanas de edad mostrando diferentes espermatozoides y evidenciando algunos con alteraciones en el flagelo (flagelo ondulado). Tinción eosina-negrosina. Aumento 40X.

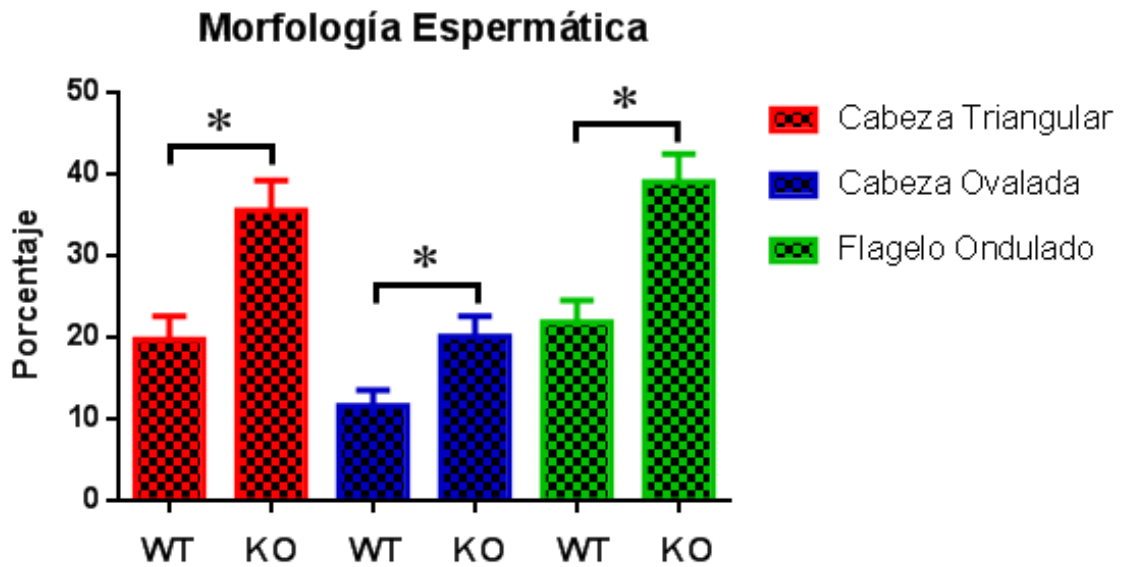


Figura 19. Morfología espermática de ratones WT y ratones KO. Ambos grupos presentaron anomalías en morfología de cabeza y flagelo. En esta gráfica se puede observar el porcentaje de las anomalías evaluadas (cabeza triangular en la columna 1 y 2, cabeza ovalada en la columna 3 y 4 y flagelo ondulado en la columna 5 y 6), con una diferencia significativa ($p < 0.05$) se observó que los animales KO presentaron el doble de espermatozoides con alteraciones en su morfología del total del eyaculado obtenido.

7. DISCUSIÓN

El impacto que los animales transgénicos o knock-out han tenido en las biociencias es innegable, en particular para el estudio de la función y la regulación de los genes y para la simulación de enfermedades humanas , con la siguiente búsqueda de nuevas terapéuticas (Cavagnari, 2010).

La biotina es una vitamina hidrosoluble clasificada dentro de las vitaminas del complejo B. En los mamíferos, la biotina sirve como un cofactor esencial de 4 carboxilasas involucradas en la síntesis de ácidos grasos, metabolismo de aminoácidos y gluconeogénesis. Por lo tanto, la deficiencia de biotina provoca una disfunción de éstas vías metabólicas resultando principalmente en anomalías en sistema tegumentario observándose lesiones como dermatitis, alopecia y convulsiones además de problemas neurológicos (Pindolia et al., 2010; Vilches-Flores & Fernandez-Mejia, 2005). En la actualidad, cada vez es más importante conocer el papel que juega la biotina como regulador de la expresión de los genes (Fernandez-Mejia, 2005).

Además de lo descrito, se sabe que la biotina es esencial para la reproducción en mamíferos. Los primeros estudios que se realizaron buscando los efectos de la deficiencia de biotina informaron que se observaron malformaciones congénitas como micromelia en embriones de pollo. Conjuntamente a esto, Watanabe y colaboradores (1991) observaron lesiones histológicas de diversos órganos de la descendencia de ratas que fueron alimentadas con una dieta deficiente de biotina antes y durante la gestación (Watanabe & Endo, 1991; Watanabe et al., 2009).

Este trabajo tuvo como objetivo principal evaluar un método alternativo para suplementar biotina a ratones knock-out en etapa reproductiva con el propósito de mejorar la calidad de vida de éstos, minimizando su manejo y causándoles dolor y molestia innecesaria (Rodríguez-Yunta, 2007).

El presente estudio permitió una comparación simultánea de los efectos de dos

dietas (dieta purificada y dieta natural suplementada), dos sistemas de apareamiento (monogámico y trío) y sobre una colonia de ratones reproductores KO deficientes al gen de la biotinidasa. Nuestros resultados demuestran que no se encontraron diferencias significativas en indicadores reproductivos obtenidos tales como: porcentaje de fertilidad, índice de eficiencia reproductiva, tamaño de la camada al nacimiento y peso de la camada al nacimiento y destete, demostrando que ambas dietas fueron capaces de mantener a los animales en etapa reproductiva y de crecimiento. Estos datos obtenidos son muy beneficiosos debido a que por las características de formulación de una dieta purificada el costo es muy elevado si se compara con una dieta natural. Un aspecto importante a considerar dentro de los bioterios es que más del 50% de los costos son destinados al alimento debido a las características genéticas y los elementos que requieren en la etapa de mantenimiento y reproducción (Festing & Ford, 1981; Peters et al., 2002).

Al realizar la comparación de las dos dietas y el efecto sobre los diferentes grupos se demostró que ambas se encontraban con la cantidad suficiente de biotina para que las características genéticas de los ratones, es decir, la deficiencia de biotinidasa no afectara negativamente la fertilización, implantación o desarrollo embrionario pues el ciclo estral, duración de la gestación y características de la progenie fueron similares a los ratones silvestres (Watanabe et al., 2009; Watanabe T., 1996). El porcentaje de animales con signos de deficiencia de biotina durante la lactación fue de <10% del total de la colonia, observándose mayormente microftalmia. Sin embargo, es importante mencionar que el fondo genético de este modelo es el ratón C57BL/6 que tiene esta susceptibilidad de manera natural (Ayadi, et al., 2011; Fox et al., 2002). También se consideró la posibilidad de causar consecuencias debido al exceso de la vitamina en la dieta, pues los efectos del exceso de biotina también han sido reportados con algunos estudios utilizando ratas, y comprobando que excesivas cantidades de biotina (205 μ mol/kg) provocan reabsorción, aumento de la concentración de estradiol y disminución de la cantidad de folículos primarios en el ovario (Paul & Duttagupta, 1973). Báez- Saldaña (2009),

menciona que la rata es más susceptible a los efectos del exceso de biotina y demostrándolo en ratonas BALB/c a las cuales les administró una dosis farmacológica de biotina (400µmol/kg) sin evidenciarse estos efectos (Baez-Saldana et al., 2009).

Se encontraron diferencias significativas en el sistema de apareamiento utilizado, los apareamientos en trío independientemente de la dieta que se les proporcionó fueron los que produjeron mayor cantidad de animales y de mejor calidad fenotípica desarrollándose más rápidamente que la progenie de los apareamientos en trío. De acuerdo a las recomendaciones de Pindolia (2011), el sistema de apareamiento bajo el cual se deben mantener los animales para un mejor control de la reproducción es el sistema de monogamia y realizándolo con animales que presenten genotipo heterocigoto (BTD+/-) debido a que la expresión de un transgen en animales con genotipo homocigoto (BTD-/-) puede afectar la viabilidad y fertilidad de una cepa. Festing (1981), menciona que para producir ratones suficientes para los experimentos lo indicado es tener múltiples parejas reproductoras hermana-hermano o establecer tríos conformados por dos hembras y un macho (Festing & Ford, 1981). La mayoría de las cepas producen más descendencia por jaula si se aparean en tríos o en harem debido a que las hembras se ayudan con el cuidado de las crías por lo que mayor número de animales al momento de destete (Nagy et al, 2002).

En relación al genotipo, se planteó la posibilidad de reproducir animales con genotipo homocigoto (BTD-/-) y no heterocigoto (BTD+/-) como se recomendaba debido a la limitación de espacio dentro del bioterio y el exceso de animales que se requieren tomando en cuenta que no se observaron animales con fenotipos indeseables, tales como la letalidad embrionaria o infertilidad con su debida suplementación (Conner, 2005; Conour, 2000), por lo que el sistema de cruzamiento de animales recomendado por Pindolia (2011) únicamente se aplicó para expandir la colonia a partir de la colonia núcleo, observándose una relación de genotipos BTD+/, BTD+/- y BTD-/- para animales recién destetados de 1:2:1 criados a partir de estos animales heterocigotos. En este estudio se pudo

demostrar que en el caso de esta colonia de ratones se pueden aparear y mantener animales homocigotos KO (BTD^{-/-}) sin verse afectada la colonia de una manera importante y satisfaciendo la demanda de animales para los diferentes experimentos para los cuales se requirieron durante el periodo en el que éste trabajo se desarrolló.

El análisis de la calidad seminal se realizó comparando los diferentes grupos para evaluar la existencia de diferencias por efecto de las dietas, al no encontrarlas todos los animales KO se compararon con animales silvestres y las alteraciones encontradas se asociaron más a sus características genéticas que debido a la dietas (Sun, 2006; Toshimori & Ito, 2003). La evaluación de la calidad del espermatozoide se requiere para llevar a cabo una fertilización exitosa; por lo tanto cambios en la motilidad, concentración o morfología indican irregularidades en los procesos de formación o maduración, este último siendo proceso que se adquiere durante su paso por el epidídimo (Hafez, 2002; Galina & Valencia, 2008).

En este trabajo se evidenciaron cambios significativos en el análisis de la calidad seminal de los animales KO al ser comparados con los animales WT. Uno de los cambios más evidentes fue la concentración espermática, pues los animales KO presentaron una concentración espermática muy baja (20 millones/mL) con respecto a los animales WT (35 millones/mL). Existe poca información en relación a la biotina y los efectos sobre la espermatogénesis. En los mamíferos, la espermatogénesis depende principalmente de la testosterona que producen los endocrinocitos intersticiales (células de Leydig) y actúa sobre los túbulos seminíferos para impulsar la espermatogénesis (Sawamura et al., 2014). Dakshinamurti y colaboradores (2005) han demostrado que los niveles séricos de testosterona se encuentran disminuidos en ratas deficientes de biotina y que además la deficiencia de biotina estaba acompañada por un grado significativo de desprendimiento del epitelio de los túbulos seminíferos en estas ratas. El tratamiento de estas ratas con gonadotropinas o biotina aumenta los niveles séricos de testosterona, sin embargo, incluso cuando los niveles de testosterona

se mantienen en niveles altos en las ratas que se les implanta gonadotropinas, el aumento de testosterona en suero no resulta en la espermatogénesis normal (Dakshinamurti, 2005; Sawamura et al., 2014).

Existen informes de que la administración de biotina sola o en combinación con testosterona a ratas deficientes de biotina permite una espermatogénesis normal sugiriendo que la biotina podría estar involucrada en la formación de factores a nivel testicular que son requeridos adicionales a la testosterona y permitan la interacción entre los endocrinocitos intersticiales, epitelocitos de sostén (células de Sertoli) y células peritubulares. (Dakshinamurti, 2005; Paulose et al., 1989).

Hasta el momento no se ha encontrado una asociación entre la deficiencia de biotina y el efecto sobre la motilidad espermática, pero existen datos que mencionan que la oligospermia en muchos mamíferos es acompañada de alteraciones importantes en la motilidad y morfología (Cooper & Barfield, 2006; Oehninger, 2014; Teers & Huhtaniemi, 2015). Adicional a esto, se pueden explicar cambios en la motilidad debido a la disminución de actividad enzimática en las mitocondrias, sin embargo, para poder afirmar esto se tienen que realizar estudios más específicos.

Se demostró que los animales KO presentaron un mayor índice de espermatozoides con anomalías estructurales. Kishikawa (1999) menciona que en muchas especies de mamíferos, incluyendo seres humanos y los grandes simios, los machos producen un considerable número de espermatozoides morfológicamente anormales. Entre mayor tengan este índice hay problemas de fertilidad debido a que son menos capaces de pasar a través del cuello uterino, la unión útero-tubárica y tener las interacciones con la zona pelúcida para fertilizar al ovocito (Sinowitz et al., 2001). Algunas cepas de ratones (por ejemplo C57BL/6/Kw, PL/J2-azh y BALB/c) se sabe que producen una alta proporción de espermatozoides anormales (Kishikawa, Tateno, & Yanagimachi, 1999). El aumento de anomalías en la morfología de los animales KO no puede ser asociado a la dieta, pues los datos reproductivos

obtenidos en este trabajo son similares a los de Pindolia y colaboradores (2011). Indudablemente, la alteración de la morfología en los ratones KO provocó una disminución en el porcentaje de fertilidad al compararse con los animales WT. Sin embargo, esto no represento un problema grave para expandir y mantener la colonia durante el ciclo productivo.

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas al comparar el peso testicular de animales KO y WT; sin embargo, se notó una variación entre el peso testicular derecho e izquierdo independiente del tipo genético, siendo más pesado el testículo izquierdo y confirmando diferentes estudios donde se demuestra la asimetría del peso testicular en diferentes especies animales, sin embargo, hasta el momento no existe explicación de la importancia de este fenómeno (Yu, 1998; Teers & Huhtaniemi, 2015).

8. CONCLUSIONES

- 1.- La Dieta Purificada al igual que la Dieta Natural Suplementada mantienen ratones KO en etapa reproductiva deficientes al gen de la biotinidasa (Btd^{-/-}).
- 2.- El mejor sistema de apareamiento es colocando dos hembras y un macho (tríos) permitiendo una mayor producción de animales con mejor desarrollo en la etapa de lactancia.
- 3.- Se demostró que no es necesario aparear animales heterocigotos, ya que los animales homocigotos KO son capaces de mantener a los animales durante la etapa crítica de desarrollo.
- 4.- La concentración espermática, motilidad y morfología espermática es diferente en los animales KO y WT, sin embargo, esto no afectó el índice de fertilidad permitiendo obtener progenie viable.

9. REFERENCIAS

- Arencibia-Arrebola, D., Rosario-Fernández, L., Hernández-Rodríguez, Y., & Curveco-Sánchez, D. (2010). Evaluación de la línea de ratón C57BL/6/cenp como biomodelos experimental de tres ensayos de genotoxicidad potencial. *Revista de Tecnología en Línea*, 1(1), 23.
- Ayadi, A., Ferrand, G., Goncalves da Cruz, I., Warot, X. (2011). Mouse Breeding and Colony Management *Current Protocols in Mouse Biology* (Vol. 1, pp. 26). Wiley Online Library: John Wiley & Sons, Inc.
- Baez-Saldana, A., Camacho-Arroyo, I., Espinosa-Aguirre, J. J., Neri-Gomez, T., Rojas-Ochoa, A., Fernandez-Mejia, C. (2009). Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids*, 74(10-11), 863-869. doi: 10.1016/j.steroids.2009.06.004.
- Baker, D. (2008). Animal models in nutrition research. *J Nutr. Symposium: animal models in nutrition research*, 391-396.
- Balmer, J. Blomhoff, R. (2002) Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*, 43:1773-1808.
- Beck, J. A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J. (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet*, 24(1), 23-25. doi: 10.1038/71641.
- Bernardi, S., Brogliatti, G. (2010). Estructura Testicular y Calidad Seminal en Ratones Seleccionados por Peso. *Int. J. Morphol.*, 28(3), 8.
- Carlberg, C. (1991) Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors*,10:91-97.
- Chistakos, S. Dhawan, P., Liu, Y., Peng, X., Porta, A. (2003). New insights into the mechanism of vitamin D action. *J Cell Biochem*, 88:695-705.

- Cole, H., Weremowicz, S., Morton, C., Wolf, B. (1994). Localization of serum biotinidase (BTD) to human chromosome 3 in band p25. *Genomics*, 22(3), 662-663. doi: 10.1006/geno.1994.1449
- Combs, J. (1994) Biotin. In: The Vitamins. *Fundamental aspects in Nutrition and Health*. 2nd ed. San Diego, Academic Press Inc;p. 329-345.
- Conner, D. (2002). Mouse Colony Management *Manipulating the Mouse Embryo* (pp. 10). Harvard Medical School: John Wiley & Sons, Inc.
- Conner, D. (2005). Transgenic Mouse Colony Management *Manipulating the Mouse Genome* (pp. 8). Harvard Medical School, Cambridge Massachusetts: Jhn Wiley & Sons, Inc.
- Conour, L. (2000). *A User's Guide to Transgenic Mice, Advanced Breeding: Trouble Shooting Transgenic Colony Performance*.
- Cooper, T., Barfield, J. (2006).Utility of infertile male models for contraception and conservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 25:206-211.
- Crisp, S., Griffin, J., White, B., Toombs, C., Zempleni, J. (2004). Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxilases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependet multivitaamin transporter in JAr choriocarcinoma cells. *Eur J Nutr* ; 43(1):23-31.
- Crouthamel, M., Kelly, E., Ho, R. (2012). Development and characterization of transgenic mouse in the blood-brain and blood-CSF barriers. *Transgenic Res*; 21(1): 113-130. doi: 10.1007/s11248-011-9512-z
- Danneman, P., Suckow, M., Brayton, C. (2002). The laboratory mouse (pp.20-23). 2nd edition.CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Dakshinamurti, K. (2005). Biotin--a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem*, 16(7), 419-423. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.03.015
- Davis, K., Davisson, M., Fanher, K., Greene, K., Linnell, S., Lutz, C. (2009). *Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice: The Jackson Laboratory*.
- Fernandez-Mejia, C. (2005). Pharmacological effects of biotin. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16:424-427. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.03.018

- Festing, M., Ford, D. (1981). Genotype X diet interaction for litter size in mice. *Lab Anim*, 15(1), 79-81.
- Fox, J., Anderson, L., Quimby, F., Loew, F. (2002). Laboratory animal medicine (pp.35-20), 2nd edition. Academic Press. American Colleague of Laboratory Animal Medicine.
- Gallaher, D. (1992). Animal models in human nutrition research. *Nutr Clin Prac*, 7(1):37-39.
- Galina, C., Valencia, J. (2008). Reproducción de animales doméstico (pp 43-59). Tercera edición, Limusa.
- Gravel, R., & Narang, M. (2005). Molecular genetics of biotin metabolism: old vitamin, new science. *J Nutr Biochem*, 16(7), 428-431. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.03.020
- Hafez, E., Hafez, B. (2000). Reproducción e inseminación artificial en animales (pp.98-112) . Septima edición, Mc Graw-Hill Interamericana.
- Hamid, M. (2012). Biotin: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects In O. Stanger (Ed.), *Water Soluble Vitamins, Clinical Research and Future Application* (Vol. 1, pp. 19). VA Medical Center, Long Beach: Springer Science+Business.
- Hassan, Y., Zempleni, J. (2006). Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *J Nutr*, 136(7), 1763-1765.
- Hernandez-Vazquez, A., Wolf, B., Pindolia, K., Ortega-Cuellar, D., Hernandez-Gonzalez, R., Heredia-Antunez, A., Velazquez-Arellano, A. (2013). Biotinidase knockout mice show cellular energy deficit and altered carbon metabolism gene expression similar to that of nutritional biotin deprivation: clues for the pathogenesis in the human inherited disorder. *Mol Genet Metab*, 110(3), 248-254. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.08.018
- Kincer, J., Smiley, J., Hankes-Peña, P., Florence, G., Davis, A., Croxford, J. (2011). *Mouse Breeding Colony Management*. Kentucky, USA.
- Kishikawa, H., Tateno, H., Yanagimachi, R. (1999). Chromosome analysis of BALB/c mouse spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Biol Reprod*, 61(3), 809-812.

- Larrieta, E., Vega-Monroy, M., Vital, P., Aguilera, A., German, M., Hafidi, M., Fernandez-Mejia, C. (2012). Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Nutr Biochem*, 23(4), 392-399. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.01.003
- Lietzan, A., Lin, Y., St Maurice, M. (2014). The role of biotin and oxamate in the carboxyltransferase reaction of pyruvate carboxylase. *Arch Biochem Biophys*, 562C, 70-79. doi: 10.1016/j.abb.2014.08.008
- Liphann, W. (2003). *Guidelines for Breeding Genetically Engineered Mice at Memorial-Sloan Kettering Cancer Center* (Vol. 1). Cornell University: Weill Medical College.
- Mamada, Y., Murata, T., Taniguchi, A., Hasegawa, Y., Suzuki, T., Kohda, K., Ishiguro, A. (2008). Biotin deficiency in amino acid formula nutrition for an infant with milk protein allergy. *Arerugi*, 57(5), 552-557.
- Matthews, R.(2008). Medical progress depends on animal models - doesn't it? *J R Soc Med*, 101(2), 95-98. doi: 10.1258/jrsm.2007.070164
- McMahon, R. (2002). Biotin in metabolism and molecular biology. *Annu Rev Nutr*, 22, 221-239. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.121101.112819
- Mock, D. (2005). Marginal biotin deficiency is teratogenic in mice and perhaps humans: a review of biotin deficiency during human pregnancy and effects of biotin deficiency on gene expression and enzyme activities in mouse dam and fetus. *J Nutr Biochem*, 16(7), 435-437. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.03.022
- Mock, D., Quirk, J., Mock, N. (2002). Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am J Clin Nutr*, 75(2), 295-299.
- Moreno-Arango, J., Texidor, L. (2005).Deficiencia de biotinidasa. *Rev Biomed*; 16:185-191.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vinterstes, K., Behringer, R. (2002). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Oehninger, S., Franken, D., Ombelet, W. (2014). Sperm functional tests. *Fertility and Sterility*; 102 (6), 1528-1533. doi: 0015-0282

- Pacheco-Alvarez, D., Solorzano, S., León del Río, A.(2002). Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch Med Res*; 33: 439-447.
- Paul, P., Duttagupta, P. (1976). The effect of an acute dose of biotin at a postimplantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*; 22:181-186.
- Paul, P., Duttagupta, P., Agarwal, H. (1973) Effects of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat. *Curr Sci*, 42:206-208.
- Paulose, C., Thliveris, J., Viswanathan, M., & Dakshinamurti, K. (1989). Testicular function in biotin-deficient adult rats. *Horm Metab Res*, 21(12), 661-665. doi: 10.1055/s-2007-1009314
- Peters, A., Bywater, P., & Festing, M. (2002). The effect of daily disturbance on the breeding performance of mice. *Lab Anim*, 36(2), 188-192.
- Pindolia, K., Chen, J., Cardwell, C., Cui, X., Chopp, M., Wolf, B. (2012). Neurological deficits in mice with profound biotinidase deficiency are associated with demyelination and axonal degeneration. *Neurobiol Dis*, 47(3), 428-435. doi: 10.1016/j.nbd.2012.04.016
- Pindolia, K., Jordan, M., Guo, C., Matthews, N., Mock, D., Strovel, E., Wolf, B. (2011). Development and characterization of a mouse with profound biotinidase deficiency: a biotin-responsive neurocutaneous disorder. *Mol Genet Metab*, 102(2), 161-169. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.10.005
- Pindolia, K., Jordan, M., Wolf, B. (2010). Analysis of mutations causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat*, 31(9), 983-991. doi: 10.1002/humu.21303
- Pindolia, K., Li, H., Cardwell, C., Wolf, B. (2014). Characterization and functional analysis of cellular immunity in mice with biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab*, 112(1), 49-56. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.02.008
- Pritchett-Corning, K., Chang, F., Festing, M. F. (2009). Breeding and housing laboratory rats and mice in the same room does not affect the growth or reproduction of either species. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 48(5), 492-498.

- Rivera, J., Tessarollo, L. (2008). Genetic background and the dilemma of translating mouse studies to humans. *Immunity*, 28(1), 1-4. doi: 10.1016/j.immuni.2007.12.008
- Rodriguez-Fuentes, N., Lopez-Rosas, I., Roman-Cisneros, G., Velazquez-Arellano, A. (2007). Biotin deficiency affects both synthesis and degradation of pyruvate carboxylase in rat primary hepatocyte cultures. *Mol Genet Metab*, 92(3), 222-228. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.06.021
- Rodriguez-Melendez, R., Zemleni, J. (2003). Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem*, 14(12), 680-690.
- Rodriguez-Yunta, E. (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioethica*; 13 (1), 25-40.
- Said, H. (2009). Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption. *J Nutr*, 139(1), 158-162. doi: 10.3945/jn.108.092023
- Sawamura, H., Ikeda, C., Shimada, R., Yoshii, Y., Watanabe, T. (2014). Dietary intake of high-dose biotin inhibits spermatogenesis in young rats. *Congenit Anom (Kyoto)*, Article in Press.
- Schulpis, K., Gavriili, S., Tjamouranis, J., Karikas, G., Kapiki, A., Costalos, C. (2003). The effect of neonatal jaundice on biotinidase activity. *Early Hum Dev*, 72(1), 15-24.
- Semba, R. (2012). The discovery of the vitamins. *Int J Vitam Nutr Resp*, 82(5):310-315. doi: 10.1024/0300-9831/a000124
- Seymons, K., De Moor, A., De Raeve, H., Lambert, J. (2004). Dermatologic signs of biotin deficiency leading to the diagnosis of multiple carboxylase deficiency. *Pediatr Dermatol*, 21(3), 231-235. doi: 10.1111/j.0736-8046.2004.21308.x
- Stanley, J. Griffin, J., Zemleni, J. (2001) Biotinylation of histones in human cells: effects of cell proliferation. *Eur J Biochem*; 268:5424-5429.
- Silver, L. (1995). *Mouse Genetics: Concepts and Applications* Oxford University Press.
- Sinowatz, F., Petersen, E., Palma, G. (2001). Functional morphology of the Zona Pellucida. *Anat. Histol. Embryol*; 30, 257-263.

- Stratman, s. (2003). Universal Mouse Genotyping Protocol. *Transgenic Res*; 12, 521-522.
- Sun, F., Ko, E., Martin, R. (2006). Is there a relationship sperm chromosome abnormalities and sperm morphology?. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4:1doi: 10.1186/1477-7827-4-1
- Takechi, R., Taniguchi, A., Ebara, S., Fukui, T., Watanabe, T. (2008). Biotin deficiency affects the proliferation of human embryonic palatal mesenchymal cells in culture. *J Nutr*, 138(4), 680-684.
- Taniguchi, A., Watanabe, T. (2007). Roles of biotin in growing ovarian follicles and embryonic development in domestic fowl. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 53(6), 457-463.
- Taniguchi, A., Watanabe, T. (2008). Transplacental transport and tissue distribution of biotin in mice at midgestation. *Congenit Anom (Kyoto)*, 48(2), 57-62. doi: 10.1111/j.1741-4520.2008.00179.x
- Teerds, K., Huhtaniemi, I. (2015). Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. *Human Reproduction Update*; 0: 1-19.
- Thoma, R., Peterson, W. (1954). The enzymatic degradation of soluble bound biotin. *J Biol Chem*; 210-410.
- Toshimori, K., Ito, C (2003). Formation and organization of the mammalian sperm head . *Arch Hist Cytol*; 66(5):583-396
- Tong, L. (2013). Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci*, 70(5), 863-891. doi: 10.1007/s00018-012-1096-0
- Vilches-Flores, A., Fernandez-Mejia, C. (2005). [Effect of biotin upon gene expression and metabolism]. *Rev Invest Clin*, 57(5), 716-724.
- Vilches-Flores, A., Tovar, A. R., Marin-Hernandez, A., Rojas-Ochoa, A., Fernandez-Mejia, C. (2010). Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem*, 21(7), 606-612. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.03.009

- Watanabe, T. (1983). Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J Nutr*, 113(3), 574-581.
- Watanabe, T. (1993). Dietary biotin deficiency affects reproductive function and prenatal development in hamsters. *J Nutr*, 123(12), 2101-2108.
- Watanabe, T., Dakshinamurti, K., Persaud, T. V. (1995). Biotin influences palatal development of mouse embryos in organ culture. *J Nutr*, 125(8), 2114-2121.
- Watanabe, T., Endo, A. (1989). Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents. *J Nutr*, 119(2), 255-261.
- Watanabe, T., Endo, A. (1991). Biotin deficiency per se is teratogenic in mice. *J Nutr*, 121(1), 101-104.
- Watanabe, T., Nagai, Y., Taniguchi, A., Ebara, S., Kimura, S., Fukui, T. (2009). Effects of biotin deficiency on embryonic development in mice. *Nutrition*, 25(1), 78-84. doi: 10.1016/j.nut.2008.06.031
- Wolf, B. (2011). The neurology of biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab*, 104(1-2), 27-34. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.06.001
- Wolf, B. (2012). Biotinidase deficiency: "if you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have". *Genet Med*, 14(6), 565-575. doi: 10.1038/gim.2011.6
- Wolfer, D., Crusio, W., Lipp, H. (2002). Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci*, 25(7), 336-340.
- Yu, Z. (1998). Asymmetrical testicular weights in mammals, birds, reptiles and amphibia. *Int J Androl*, 21(1), 53-55.
- Zempleni, J., Kuroishi, T. (2012). Biotin. *Adv Nutr*, 3(2), 213-214. doi: 10.3945/an.111.001305
- Zempleni, J., Mock, D. (2001). Biotin homeostasis during the cell cycle. *Nutr Res Rev*, 14(1), 45-64. doi: 10.1079/NRR200117
- Zempleni, J., Wijeratne, S., Hassan, Y. (2009). Biotin. *Biofactors*, 35(1), 36-46. doi: 10.1002/biof.8

zempleni, J., Helm R., Mock, D. (2001). In vivo biotin supplementatio at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release. *J Nutr*, 131(5):1479-1484.