



118  
23  
**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FRACCIONES PROTEICAS SERICAS  
EN LOS RATONES CB 1, ALOPECICOS  $ot/ot$  Y PORTADORES  $ot/+$ ,  
MEDIANTE ELECTROFORESIS.**

**T E S I S**

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

**P R E S E N T A:**

**MARIA DE LOURDES RUIZ CORTES**



MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FRACCIONES PROTEICAS SÉRICAS  
EN LOS  
RATONES CD 1, ALOPÉCICOS  $et/et$  Y PORTADORES  $et/+$ ,  
MEDIANTE ELECTROFORESIS.**

**TESIS PRESENTADA ANTE  
LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
POR  
MARÍA DE LOURDES RUIZ CORTÉS**

**Asesores: MVZ Francisco Javier Basurto Alcántara  
MVZ Daniel Atilano López.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido formar parte de ella y procurando llevar su nombre siempre en alto.

Al departamento de microbiología e inmunología por el apoyo incondicional en la utilización de sus instalaciones.

A los integrantes de los laboratorios de Serología y Biología Molecular por su colaboración amistad y asesoría en la realización de este trabajo.

A todos los integrantes del Jurado por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

## **RECONOCIMIENTOS:**

Al MVZ Francisco Javier Basurto A. por haber sido además de un buen asesor, un entusiasta amigo.

Al MVZ Daniel Atilano L. por el tiempo dedicado a la asesoría de este trabajo.

## **DEDICATORIAS**

**A mi padre por dedicar todo su esfuerzo para brindarme una educación.**

**A mi madre por todo el amor con que siempre apoyó mi formación profesional.**

**A mi esposo por todo el apoyo y estímulo brindado para terminar este trabajo.**

## CONTENIDO

página

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>12</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>13</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>14</b>

RESUMEN

**RUIZ CORTES MARÍA DE LOURDES: ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FRACCIONES PROTEICAS SÉRICAS EN LOS RATONES CD 1, ALOPÉCICOS  $e\eta/e\eta$  Y PORTADORES  $e\eta/+$ , MEDIANTE ELECTROFORESIS. (bajo la dirección de: Francisco Javier Basurto Alcántara y Daniel Atilano López).**

El ratón desnudo  $e\eta/e\eta$  ha sido considerado como hipotímico; presenta alteraciones en los mecanismos de defensa ya que en él se manifiesta una gran predisposición a procesos infecciosos, por lo que se sospecha que tiene una inmunodeficiencia. En el presente trabajo se evaluaron las fracciones de proteínas séricas de ratones desnudos  $e\eta/e\eta$  machos y hembras, comparándolos con los heterocigóticos  $e\eta/+$  y la cepa CD 1, mediante electroforesis. Sólo se encontraron diferencias significativas en los porcentajes referentes a la fracción alfa globulina de los machos  $e\eta/e\eta$ , lo cual puede deberse a los elevados niveles de corticosteroides que informa Rosas en esta variedad de ratones y que consecuentemente va ligado a un nivel elevado de transcortina, que es la enzima encargada de metabolizar a esta hormona en el hígado. La transcortina está clasificada como una alfa globulina. Con este trabajo no se pudo concluir si los ratones  $e\eta/e\eta$  son inmunodeficientes.

## ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FRACCIONES PROTEICAS SÉRICAS EN LOS RATONES CD 1, ALOPÉCICOS $e\eta/e\eta$ Y PORTADORES $e\eta/+$ , MEDIANTE ELECTROFORESIS.

### INTRODUCCIÓN:

Se considera inmunodeficiencia cuando existen alteraciones en alguno de los mecanismos de respuesta inmune (13).

La inmunodeficiencia puede ser de origen genético o adquirido, siendo el agente causal de este último sustancias químicas como fármacos, agentes físicos como radiaciones y biológicos como los agentes infecciosos (13).

La inmunodeficiencia genética puede ser inducida o espontánea, ambas se producen generalmente por mutaciones en los genes que codifican para los órganos linfoides o para las células de la respuesta inmune(13).

Algunas de estas mutaciones han ocurrido en animales de experimentación y han generado líneas de investigación (6).

A partir de su descubrimiento, la utilización de ratones con mutaciones productoras de inmunodeficiencias, ha sido fundamental para el progreso de diferentes áreas como la inmunología, infectología, parasitología, microbiología, oncología, genética, gnotobiología e histopatología, entre otras (6).

Las mutaciones más evidentes que se han presentado, son las correspondientes a los ratones desnudos o atímicos ( $nu/nu$ ) y a los ratones inmunodeficientes comprometidos severamente, denominado en inglés SCID (Inmunodeficiente severamente comprometido), el primero es deficiente en linfocitos T, y el segundo en linfocitos T y B. (6,14).

Se han descrito animales desnudos en los cuales su función inmunológica no se ha visto comprometida como en algunos cuyes y ratones como el sha/sha ("SHAVE" rasurado) los cuales poseen sus funciones inmunológicas normales (6).



## ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL RATÓN DESNUDO:

En 1962 J.H. Isaacson y B.M. Cattanach publicaron por primera vez la aparición de ratones sin pelaje en una colonia cerrada, no consanguínea, de ratones albinos en el laboratorio de virología del hospital Ruchill en Glasgow, Escocia (6).

Esta mutación fue detectada primero por el Dr. N.A. Grist, quien envió ratones desnudos y normales de la misma camada al Instituto de genética animal de Edimburgo, Escocia (6).

En este instituto el Dr. S.P. Flanagan, demostró que los ratones heterocigóticos para el gen recesivo responsable de la mutación ausencia de pelaje son fenotípicamente normales; asimismo, demostró por los datos de segregación que el fenómeno se debe a un gen recesivo que lo denominó nude (desnudo) y cuyo símbolo genético es "nu" (6).

Otro de los hallazgos descritos por Flanagan, fue que estos animales presentaron talla reducida y períodos de vida más cortos, un 100% de mortalidad a la edad de 25 semanas, y una marcada mortalidad infantil de hasta el 45% en las primeras dos semanas de vida (6).

En 1968, M.N. Pantelouris describió que los ratones homocigóticos recesivos para el gen nu ( $nu/nu$ ) carecen de timo, mientras que los hermanos de camada homocigóticos dominante ( $+/+$ ) y heterocigóticos ( $nu/+$ ) presentan timo normal (6).

Los primeros usos experimentales se realizaron por J. Rygaard en 1969, quien realizó xenoinjertos de tumores malignos humanos; desde entonces, se ha aumentado el uso del ratón desnudo en diferentes disciplinas (6).

## EL RATÓN ALOPÉCICO $et/et$ :

Actualmente existe otro mutante alopécico, originado en 1985, que proviene de la cepa del ratón albino CD 1 y que es denominado  $et/et$ . En algunos lugares como el bioterio de la FES-Zaragoza, UNAM y ahora en el bioterio de el departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, estos ratones viven y se reproducen bajo condiciones convencionales de crianza a pesar de que

poseen las alteraciones siguientes: los machos poseen un órgano con las características histológicas de un timo, pero con un peso que es aproximadamente la mitad a la de un timo normal, por lo que se les define como hipotímicos; las hembras presentan en lugar de timo un órgano linfoide similar a un ganglio linfático, por lo que se les ha considerado atímicas(1, 10, 12).

La **Dra. Rosas** y colaboradores, en su estudio de las características reproductoras del ratón **et/et** mencionan los siguientes aspectos:

Los ratones **et/et** rechazan los xenoinjertos de piel (12).

La fertilidad de machos y hembras **et/et** es normal, pero en estas últimas decrece con la edad (12).

La supervivencia de los ratones **et/et** al destete es de 80% comparada con los **CD 1** (12).

Los ratones **et/et** presentan un período de vida de dos años (12).

Las concentraciones séricas de corticosterona en los ratones **et/et** son más elevadas que en los **CD 1** (11,12)

Las concentraciones de colesterol en las adrenales de los ratones **et/et** son menores que en las de los **CD 1** (11,12).

La presencia del gen puede ser identificada mediante biometría hemática en el conteo leucocitario, ya que los ratones **et/et** presentan una población de leucocitos y linfocitos mayor que las de los **CD 1**, mientras que los **et/+** presentan una cantidad intermedia entre las otras dos cepas ( 1 ).

#### **ELECTROFORESIS :**

La electroforesis se define como el movimiento de partículas cargadas eléctricamente en solución, bajo la influencia de un campo eléctrico ( 14 ).

Si se somete un suero normal a electroforesis se separan diferentes fracciones: albúmina, alfa globulina 1, alfa globulina 2, beta globulina y gamma globulina (4, 14 ).

## **ALBÚMINA.**

La albúmina es la mas pequeña y mas abundante de las proteínas del plasma, se sintetiza en el hígado, juega un papel importante en la regulación osmótica y actúa como molécula de transporte. ( 4, 13 )

Los casos con disminución de albúmina sérica, en la mayoría de las especies, se deben a un balance nitrogenado negativo, por ejemplo en infecciones graves, traumas quirúrgicos y accidentales, uremia, enfermedades gastrointestinales y en el infarto de miocardio (4, 13).

La analbuminemia refleja una insuficiencia en la producción más que un aumento en su catabolismo (4, 13).

## **ALFAGLOBULINAS:**

La fracción alfa globulina consta de un número de proteínas diferentes de movilidad electroforética similar. La fracción alfa 1 incluye un número de glucoproteínas y otros diversos componentes. Las lipoproteínas alfa 1, son de significado clínico, importantes en el transporte de lípidos. La antitripsina alfa 1 es una enzima que se ha encontrado disminuida en ciertas formas hereditarias de enfermedad pulmonar crónica. La transcortina, globulina fijadora del cortisol y la globulina fijadora de tiroides, migran también con la fracción alfa 1 ( 3, 4, 13 ).

Los componentes clínicamente importantes en las globulinas alfa 2 son la macroglobulina, la haptoglobulina que fija la hemoglobina libre en el plasma, y la ceruloplasmina de importancia en el transporte del cobre. Además de la eritropoyetina, las enzimas colinesterasa, lactatodeshidrogenasa y fosfatasa alcalina, también migran con esta fracción (4).

Las globulinas alfa se encuentran aumentadas en procesos de carcinoma metastásico avanzado y en necrosis celular aguda. Las causas de niveles bajos de alfa globulinas son la anemia hemolítica intravascular, enfermedades hepáticas agudas y en enfisema pulmonar obstructiva crónica (relacionada con disminución en la antitripsina alfa 1). (3,4).

**BETAGLOBULINAS:**

Estas incluyen las lipoproteínas beta que son de menor densidad que las lipoproteínas alfa. La hemopexina que fija el hem (pero no la hemoglobina) y el plasminógeno, forma inactiva de la plasmina (que lisa los coágulos de fibrina), la transferrina (siderofibrina) que fija y transporta el hierro en el plasma, migra también en la región beta 1, como lo hacen también la fracción del complemento C'3 que es la más abundante, algunos de los otros componentes (C'2, C'6 y C'7) viajan en la fracción electroforética beta 2 (4,13,14).

También podemos encontrar en esta fracción a los polímeros de inmunoglobulinas como la Ig M y la Ig A. (4,13,14)

**GAMMAGLOBULINAS:**

Mientras que las demás fracciones globulínicas consisten en proteínas no relacionadas que sólo comparten una movilidad electroforética común; las gammaglobulinas tienen una propiedad vital en común: la actividad de anticuerpo. En esta fracción se encuentran todos los tipos de anticuerpos existentes (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). (4, 14).

Los valores normales de las fracciones séricas en el ratón son: albúmina 53%, alfa globulina 14%, beta globulina 19%, gammaglobulina 14% (9).

**JUSTIFICACIÓN:**

Se ha observado que el ratón alopecico *et/et* presenta anormalidades en la resistencia contra procesos infecciosos, asimismo se ha demostrado que tienen alteraciones en las células fagocíticas (aumento de monocitos y presencia de neutrófilos hipersegmentados) (1), por esto mismo se considera importante estudiar sus mecanismos inmunológicos, para lo cual se propone evaluar por electroforesis, las concentraciones de las fracciones protéicas séricas de animales clínicamente sanos, poniendo especial atención a la fracción gammaglobulina.

**HIPÓTESIS:**

Si el ratón alopecico  $e/e$  es inmunodeficiente entonces presentará disminuidas las concentraciones de las fracciones betaglobulina y gammaglobulina en comparación con el ratón CD 1 que es la cepa de donde se segregó y no deberán existir cambios en las concentraciones de albúmina y alfa globulina, asimismo se deberán observar diferencias entre machos y hembras de cada grupo de ratones, debido a los estados hormonales.

**OBJETIVO:**

Determinar si existen diferencias en las concentraciones de las fracciones séricas (albúmina, alfa globulinas, beta globulina y gammaglobulina) entre el ratón de la cepa CD 1 , portadores (e<sup>t</sup>/+), alopecicos (e<sup>t</sup>/e<sup>t</sup>) y entre machos y hembras.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## MATERIAL Y MÉTODOS:

Se utilizaron 60 muestras individuales de suero de animales clínicamente sanos, dividiendo éstas en los siguientes grupos:

- a) 10 machos CD 1,
- b) 8 hembras CD 1,
- c) 9 machos *et/+*,
- d) 13 hembras *et/+*,
- e) 10 machos *et/et*,
- f) 10 hembras *et/et*,

todos ellos mantenidos bajo un sistema de alojamiento convencional de bioterio.

Cada ratón se sangró en blanco por vía intracardiaca, anestesiado previamente con éter; se obtuvo 0.3 ml de suero.

El suero obtenido se congeló durante 1 semana hasta su uso.

Posteriormente los sueros se sometieron a electroforesis en acetato de celulosa (Cellogel) utilizando una modificación de la técnica de Morilla (9), la cual consistió en cambiar algunas de las constantes de la metodología tales como: solución amortiguadora tris glicina (14.1 g de tris y 22.6 g de glicina, en 1000 ml de agua bidestilada con un pH de 9.4), tiempo de corrimiento (20 minutos), voltaje (200 v), tiempo de tinción (10 minutos), concentración de colorante (Ponceau al 1%), para así ajustar la lectura del patrón electroforético de suero de ratón.

Los fracciones fueron medidas mediante un espectrodensitómetro y se obtuvo con este los porcentajes de las fracciones.

Posteriormente se cuantificó la concentración de proteína total en el suero para hacer la conversión de porcentaje a miligramos por ml en cada una de las fracciones, utilizando una modificación de la técnica de Bradford



(2). Esta técnica consiste en disolver albúmina en diferentes concentraciones (1, 3, 5, 7, 9 y 10 mg/ml), preparados según la técnica de **Biuret** (9, 5), y colocar 5µl de cada dilución incluyendo la muestra de suero, en papel filtro whatman No. 1, previamente dividido en cuadros de 2 cm. Se dejan secar las muestras a temperatura ambiente y se agrega por 15 minutos, 8 ml de solución teñidora (50% de metanol absoluto, 10% de ácido acético glacial, 40% con agua destilada y 0.1% de azul de **Coomasie**).

Posteriormente se lava por 30 minutos o hasta que el resto del colorante no fijado, sea eliminado del papel, esto se realiza con la solución lavadora ( 50% de metanol absoluto, 10% de ácido acético glacial y 40% de agua bidestilada).

La lectura se realiza comparando la coloración de la muestra problema con la de los estándares (M.V.Z. Daniel Atilano L. Comunicación personal).

A los datos obtenidos se les aplicó la prueba de Bartlett para determinar la igualdad de varianzas con lo que se determinó aplicar las pruebas de análisis de varianza de **Kruskal-Wallis** y la prueba de **U de Mann-Whitney** (7, 8).

**RESULTADOS:**

Los valores de las medias de las porcentajes de proteína de las fracciones electroforéticas de los ratones **CD 1**, **et/+** y **et/et** se muestran en el cuadro No.1, donde se puede observar que no hubo diferencias significativas entre los tres grupos de animales.

En el cuadro No. 2, se encuentran los valores medios de los porcentajes de las fracciones electroforéticas según el sexo de cada uno de los ratones, mostrando que solo hubo diferencias significativas en los machos **et/et** vs las hembras del mismo grupo.

cuadro 1			
Valores medios de los porcentajes de la concentración de las diferentes fracciones de proteínas séricas de los ratones CD 1, et/+ y et/et			
Fracción proteica	variedad de ratón		
	CD 1	et/+	et/et
Albumina	63.239	64.827	62.445
Alfaglobulinas	5.733	4.141	6.215
Betaglobulinas	22.428	22.027	21.825
Gammaglobulinas	9.222	9.05	9.43

cuadro 2						
Tabla comparativa de las medias de los porcentajes de concentración de proteínas séricas de machos y hembras de los ratones CD 1, et/+ y et/et						
ratón	CD 1		et/+		et/et	
	machos	hembras	machos	hembras	machos	hembras
Fracción proteica						
Albumina	64.11	62.15	63.267	65.908	60.43	64.46
Alfaglobulinas	6.48	4.8	5.467	3.223	(+) 8.94	3.49
Betaglobulinas	20.59	24.725	22.8	21.492	22.4	21.25
Gammaglobulinas	8.82	9.725	8.578	9.377	8.27	10.59
(+)p= 0.026 machos contra hembras de los ratones et/et						

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

En las electroforesis de proteínas séricas, se puede observar que no existen alteraciones en la inmunidad humoral, ya que todos los valores de la fracción gamma son semejantes en las tres líneas de ratones, y los cambios en el porcentaje de albúminas descarta la posibilidad de problemas en la síntesis de proteínas como sería en los mielomas (9,13).

En la evaluación de las alfa globulinas tanto por grupo como por sexo observamos que los ratones *et/et* y en especial los machos presentaron una mayor concentración de este grupo de proteínas, entre las cuales se encuentran algunas enzimas como la transcortina que es una proteína ligadora de los corticoides, y que se podría asociar a la hipersecreción glucocorticoide de los machos *et/et* (3, 4).

Dentro del grupo de las alfa globulinas también se encuentra una enzima ligadora de la eritropoyetina, la cual es el principal promotor de la eritropoyesis. Basurto et.al. observaron que los ratones desnudos presentan una policitemia, lo que posiblemente se deba al efecto glucocorticoide, pero no se descarta la posibilidad de una hipersecreción de eritropoyetina (3).

Ya sea por la alteración de los glucocorticoides o de la eritropoyetina en esta variedad de ratones, el incremento de alfa globulinas está justificado.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir

- 1.- No se identifican alteraciones inmunológicas ni fisiológicas en cuanto a la síntesis de proteínas en las diferentes grupos de ratones
- 2.- La síntesis de las proteínas evaluadas en los ratones desnudos *et/et* y *et/+* son iguales a los ratones CD 1.
- 3.- No se puede descartar la posibilidad de una inmunodeficiencia con los resultados obtenidos en este trabajo.
- 4.- No hay posibilidad de identificar la homocigosis de los genes de cada una de las variedades de ratones mediante las concentraciones de proteínas por electroforesis.

## LITERATURA CITADA:

- 1.- **Basurto, F.J., Mondragón, R.L., Marroquín-Segura R. y Marques M.J.:** Estudio de las poblaciones de leucocitos en el ratón desnudo hipotímico et/et. (En prensa) 1995.
- 2.- **Bradford M.M.:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding.  
Analytical Biochemistry 72, 248-254 (1976).
- 3.- **Ettinger, S.J.:** TRATADO DE MEDICINA INTERNA VETERINARIA. 3ª edición. Inter-médica Buenos Aires. Argentina. 1992.
- 4.- **Davidsohn, I., Bernard Henry, J.:** DIAGNOSTICO CLÍNICO POR EL LABORATORIO. 6ª edición. Salvat editores, S.A. México, D.F.1978.
- 5.- **Garvey J. S., Cremer N.E. and Sussdorf D.H.:** METHODS IN IMMUNOLOGY. 3rd edition. W.A. Benjamin Inc. London-Amsterdam, 1977.
- 6.- **Hernández González, R.:** Antecedentes históricos y características genéticas del ratón desnudo. Memorias del curso de actualización, El ratón desnudo en la investigación científica. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1992. 1-5pp. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1992).
- 7.- **Marques D. M.J.:** ESTADÍSTICA PARA LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS. 1ª edición Editorial McGraw-Hill México, 1991.
- 8.- **Mendenhall W., Scheaffer R.L., Wackerly D.D.:** ESTADÍSTICA MATEMÁTICA CON APLICACIONES. 3ª edición, Grupo Editorial Iberoamérica, Mexico D.F., 1986.
- 9.- **Morilla, G.A., Bautista, G.C.:** MANUAL DE INMUNOLOGIA. 1ª edición. Editorial Diana México D.F., 1986.
- 10.- **Rosas, P., Castellanos, P. and. Domínguez, R.:** The existence of spontaneous hairless ("nude") hypothimic mutant mice from the CD 1 strain,

reared under conventional animal house conditions. Med.Sci.Res. 15: 553-554 (1987).

11.- **Rosas, P., Chávez, R., Cruz, Ma.E. and Domínguez, R.:** Sex differences in serum corticosterone levels and circadian rhythms between hairless *et/et* mutant and CD 1 adult mice. Med.Sci.Res 17 : 283-284 (1989).

12.- **Rosas Saucedo, P.:** Estudio de las características reproductoras de ratones desnudos hipotímicos y la vinculación del timo con la regulación neuroendócrina de la reproducción. Tesis de doctorado en ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.,1990.

13.- **Stites, D.P., Terr A.I.:** INMUNOLOGIA BÁSICA Y CLÍNICA. 7ª edición. Editorial "El manual moderno S.A. de C.V." México, D.F., 1993.

14.- **Tizard,I.R.:** INMUNOLOGIA VETERINARIA. 4ª edición. Nueva editorial Interamericana. México, D.F., 1992.