



01674

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PED
(PREIMPLANTATION EMBRYO DEVELOPMENT) DE
LA PROTEÍNA Qa-2 EN EMBRIONES DE RATONES Y
DE SU EXPRESION EN ESTADIOS TEMPRANOS DEL
DESARROLLO EMBRIONARIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

ERNESTO ACOSTA JIMÉNEZ

**TUTOR:
DRA. GLADIS FRAGOSO GONZÁLEZ**

**COMITE TUTORAL:
DRA. EDDA SCIOTTO CONDE
DR. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR**

MÉXICO, D.F.

2003

A



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.

Autorizada por la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a sufragar el formato electrónico y copiar el
contenido de mi trabajo telecopia:

NOMBRE ERNESTO ACOSTA
JIMENEZ

FECHA 14 NOV 2003

FIRMA ERNESTO ACOSTA JIMENEZ

DEDICATORIAS

A

MIS PADRES
VICTORIA Y ANDRES

A

MIS HERMANOS

AGRADECIMIENTOS

Dra Adela Mújica Departamento de Biología Celular CINVESTAV IPN. Por sus comentarios sobre Fertilización in vitro.

MVZ DV. Gerardo Arrellin Jefe Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por las facilidades otorgadas y por su valiosa ayuda.

Dr José Juan Martínez. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Por su ayuda para el análisis estadístico.

Dra Laura Díaz-Cueto Clínica 4 de Gineco-obstetricia, Jorge Castelazo Ayala IMSS. Por sus valiosos comentarios y su apoyo para realizar la técnica de inmunofluorescencia en embriones preimplantados.

A la Dra Yolanda López Vidal. Facultad de Medicina, Lab de Microbiología. Por las facilidades Otorgadas para el Uso del microscopio de fluorescencia, por sus comentarios y su apoyo.

MVZ Susana González Jefa del Bioterio del Instituto Nacional de Perinatología. Por su apoyo para la realización del presente trabajo y por sus valiosos comentario, sobre el desarrollo in vitro de embriones.

Dra Gladis Fragoso González y Dra Edda Scitutto Conde, por todo su apoyo y ayuda para la realización del presente trabajo

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas

De la

Universidad Nacional Autónoma de México

Bajo la Dirección de la

Dra. Gladis Fragoso González y Dra Edda Sciutto Conde.

El sustentante fue becario de CONACYT con el número de registro 158517

COMITÉ TUTORAL

DR JORGE TORTORA PEREZ

DRA MARIA DE LOURDES JUAREZ MOSQUEDA

DRA EDDA SCIUTTO CONDE

DRA GLADIS FRAGOSO GONZALEZ

DRA CARLOS GUTIERREZ AGUILAR

ABREVIACIONES.

Kda	kilodaltons.
GPI	Glicosilfosfatidilinositol.
mM	milimolar.
NaCl	Cloruro de sodio.
KCl	Cloruro de potasio.
CaCl₂ 2H₂O	Cloruro de calcio dihidratado.
KH₂PO₄	Fosfato de potasio.
MgSO₄	Sulfato de magnesio.
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio.
BSA	Bovine serum albumin.
mKSOM	modified potassium simplex optimized medium.
EDTA	Etilen diamino tetra acetato de sodio.
µg.	microgramos.
ml.	mililitros.
µm.	micras.
UI.	Unidades internacionales.
FSH	Hormona folículo estimulante.
hCG	Gonadotropina coriónica humana.
IP.	Intraperitoneal.
dm.	Diámetro.
µl.	microlitro.
CO₂.	Bióxido de carbono.
PVP	Polivinilpirrolidona.
FIV	Fertilización in vitro.
mg	miligramos.
dpc	días post-coito

Resumen.

La proteína Qa-2, es una proteína clase Ib, codificada por cuatro genes Q6, Q7, Q8 y Q9, localizados en el extremo telomérico del complejo principal de histocompatibilidad del ratón (MHC), en embriones es codificada sólo por los genes Q7/Q9. Al gen Q9 se le ha denominado gen *Ped* (preimplantation embryo development), por los hallazgos de que influencia la velocidad de desarrollo de los embriones preimplantados, así mismo se le ha relacionado con aumentar el tamaño de la camada, el peso al nacer y el peso al destete de los ratones.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las funciones asociadas a la proteína Qa-2 sobre el desarrollo embrionario y la reproducción, para lo cual se evaluó el desarrollo preimplantatorio *in vitro* y los parámetros reproductivos: tamaño de la camada, número de partos por hembra y crías destetadas en cuatro cepas de ratones, C57BL/6J y BALB/cJ (Qa-2 positivas); B6.K1 y BALB/cAnN (Qa-2 negativas) pertenecientes al bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Los resultados muestran que las cepas Qa-2⁺ presentan una mayor velocidad de desarrollo *in vitro* y mayor viabilidad; sin embargo en el parámetro tamaño de la camada, que esta relacionado con la expresión de Qa-2 no se encontró diferencia entre las cepas Qa-2 positivas y negativas.

Por otra parte se presentan evidencias que sugieren la participación de otros factores diferentes a Qa-2 que influyen la velocidad de desarrollo, al no existir diferencias entre una cepa Qa-2⁺ BALB/cJ y una cepa Qa-2⁻ B6.K1. La identificación de estos factores podría ser de gran importancia para ahondar en los mecanismos que regulan los procesos reproductivos, que permitan en un futuro el mejoramiento de la reproducción animal.

Summary

The Qa-2 protein, is a class Ib protein encoded by four genes Q6, Q7, Q8 and Q9, located at the telomeric end of the major histocompatibility complex (MHC), in embryos is encoded by Q7 and Q9 genes. Q9 is called *Ped gen* (preimplantation embryo development) since it has influence over mouse embryo cleavage, also it has been related with increasing mouse litter size, birth weight and weaning weight.

The aim of this research was the evaluation of the functions associated to Qa-2 protein on the mouse embryo development and into mouse reproduction. Therefore the *in vitro* preimplantation embryo development and reproductive parameters such as litter size, parturition number by female, and pups weaned were evaluated in four mouse strains. C57BL/6J, BALB/cJ (Qa-2 positive), B6.K1 and BALB/cAnN (Qa-2 negative) which belonged to the facilities of Institute of Biomedical Research, UNAM.

The results show that Qa-2⁺ strains have a faster embryo development, *in vitro*, than Qa-2⁻ strains. However, the litter size parameter related to Qa-2 expression was not different among Qa-2⁺ and Qa-2⁻ strains.

On the other hand results show evidences that suggest the participation of the others factors that influence preimplantation embryo development, considering that not differences among BALB/cJ, Qa-2⁺ and B6.K1, Qa-2⁻ were found . The identification of these factors could be important in order to understand the mechanisms that regulate reproductive process, which will lead to improve the animal reproduction.

INDICE

	Página
I.- INTRODUCCIÓN	1
* I.1.- Antecedentes.	1
* I.2.- El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).	1
* I.3.- El Complejo Principal de Histocompatibilidad y su relación con reproducción.	2
* I.4.- Proteína Qa-2.	5
* I.5.- Qa-2 y Desarrollo embrionario.	8
* I.6.- Gen Ped (Preimplantation Embryo Development).	10
* I.7.- Qa-2 y Resistencia a la cisticercosis.	11
* I.8.- Expresión de Qa-2.	11
* I.9.- Justificación.	13
2.- HIPÓTESIS.	15
3.- OBJETIVOS.	15
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.	17
* 4.1.- Cepas de ratones.	17
* 4.2.- Registros de producción.	17
* 4.3.- Cultivo in vitro de embriones.	19
* 4.4.- Medios de cultivo.	19
* 4.5.- Pipetas.	20
* 4.6.- Fertilización in vitro.	20
* 4.7.- Evaluación del desarrollo preimplantatorio.	21
* 4.8.- Inmunofluorescencia para la detección de la proteína Qa-2.	22
* 4.9.- Análisis estadístico	22
5.- RESULTADOS	23
* 5.1.- Parámetros reproductivos.	23

* Gráfica 5.1.1. Índice de eficiencia reproductiva en dos cepas de ratones primer periodo.	23
* Gráfica 5.1.2. Promedio de partos por hembra en las cepas B6 y BALB/cAnN	24
* Gráfica 5.1.3. Promedio de crías por parto, en las cepas B6 y BALB/cAnN	24
* Gráfica 5.1.4. Promedio de crías destetadas por parto en las cepas de ratón B6 y BALB/cAnN.	25
* Gráfica 5.1.5. Promedio de estro post-parto fértil (EPPF),en las cepas de ratón B6 y BALB/cAnN.	25

Gráficas correspondientes a los parámetros reproductivos de 4 cepas de ratones, durante el período Enero del 2001 a Junio del 2003.

* Gráfica 5.1.6. Promedio de partos por hembra en 4 cepas de ratones.	26
* Gráfica 5.1.7. Promedio de crías por parto en 4 cepas de ratón.	27
* Gráfica 5.1.8. Promedio de crías destetadas por parto en cuatro cepas de ratón.	27
* Gráfica 5.1.9. Muestra el porcentaje de mortalidad de las crías durante la lactancia, en el segundo período para las cuatro cepas de ratón.	28

CUADROS. ANÁLISIS REPRODUCTIVOS

* 5.1.1 Análisis Reproductivo, 1 ^{er} período 1999-2000, de las cepas de ratón B6 y BALB/cAnN	28
* 5.1.2 Análisis Reproductivo, 2 ^{do} período 2001-2003, de las cepas de ratón B6, B6.K1 BALB/cJ y BALB/cAnN.	29

* 5.2.- Desarrollo embrionario.	30
* 5.2.1 Estadios del Desarrollo Embrionario Preimplantatorio Cepa BALB/cAnN	34
* 5.2.2 Estadios del Desarrollo Embrionario Preimplantatorio Cepa BALB/cJ	34
* 5.2.3 Estadios del Desarrollo Embrionario Preimplantatorio Cepa C57BL/6J	35
* 5.2.4 Estadios del Desarrollo Embrionario Preimplantatorio Cepa B6.k1	35
* 5.2.5 Número total de embriones en etapa de blastocisto y mórula compacta a las 96 hrs. de cultivo in vitro, en cuatro cepas de ratón.	36
* 5.2.6 Número de embriones en etapa de blastocisto y blastocisto eclosionado a las 96 hrs. de cultivo in vitro, en cuatro cepas de ratón.	36
* 5.2.7 Promedio de células en embriones en etapa de mórula compacta	37
* 5.2.8 Promedio de células en embriones en etapa de Blastocisto	37
* 5.2.9 Número promedio de células, en embriones pertenecientes a cuatro cepas de ratón, de las 48 a las 96 hrs. de cultivo in vitro.	37
* 5.2.10 Número promedio de células, en embriones de ratón pertenecientes a cuatro cepas, a las 96 hrs. de cultivo in vitro.	38

GRÁFICAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO.

* Gráfica 5.2.1. Desarrollo embrionario in vitro a las 48 hrs. en cuatro cepas de ratón	39
---	----

* Gráfica 5.2.2. Desarrollo embrionario in vitro a las 60 hrs. en cuatro cepas de ratón	39
* Gráfica 5.2.3. Desarrollo embrionario in vitro a las 72 hrs. en cuatro cepas de ratón	40
* Gráfica 5.2.4. Desarrollo embrionario in vitro a las 84 hrs. en cuatro cepas de ratón	40
* Gráfica 5.2.5. Desarrollo embrionario in vitro a las 96 hrs. en cuatro cepas de ratón	41
6.- DISCUSIÓN.	44
7.- CONCLUSIONES	53
8.- Anexo	
8.1 Anexo 1 Protocolo para inmunofluorescencia de embriones.	55
9.- REFERENCIAS.	56

Indice de Figuras.

• Fig.1 Modelo tridimensional de la estructura de Qa-2.	6
• Fig 2 Localización del Gene Ped	7
• Fig. 3 Organización de los genes de la región Q del MHC del ratón.	12
• Fig 4. Embriones de la cepa B6	42
• Fig 5. Embriones de la cepa B6.K1	42
• Fig 6. Embriones de la cepa BALB/cJ.	43
• Fig 7. Embriones de la cepa BALB/cAnN	43

1. INTRODUCCION

1.1. Antecedentes.

El desarrollo científico ha estado ligado a obtener un mejoramiento en las condiciones de vida de la población humana, una parte importante es la obtención de fuentes alimenticias a partir de la crianza, producción y mejoramiento de los animales domésticos. En un principio el obtener animales con las mejores características productivas fue un proceso lento, ya que se realizaba a través de la selección de los mejores ejemplares. Hoy en día el desarrollo de tecnología, como la micromanipulación de gametos, desde la maduración de ovocitos, fertilización, cultivo y selección de embriones *in vitro* para su posterior transferencia aunado a las técnicas de transgenesis y clonación ha llevado a un gran avance en relativamente poco tiempo.

Para el mejoramiento de las especies domésticas un interés especial se ha centrado sobre el complejo principal de histocompatibilidad, MHC (de las siglas en inglés: major histocompatibility complex); la importancia del MHC radica en su participación en fenómenos inmunes y no inmunes (Edidin, 1983). De entre los fenómenos no inmunes destaca su relación con la reproducción (Warner, 1986 ; Le Bouteiller, 1994; Jurisicova et al., 1996; Choudhury and Knapp 2001).

1.2. MHC

El MHC es un grupo de genes que codifican para proteínas, involucradas en la respuesta inmune (Yan, 2003). Estas proteínas se localizan en la superficie de las células de cada individuo y participan activamente en la respuesta inmune a antígenos proteicos; los linfocitos T reconocen segmentos de antígenos proteicos, como son péptidos, unidos a moléculas codificadas por los genes del MHC (Bouvier, 2003).

El modelo biológico en el cual el MHC ha sido mejor estudiado es el ratón, y se localiza en el cromosoma 17. Los genes del MHC se dividen en tres clases: clase I, clase II, y clase III, los productos de estos genes son proteínas, que se clasifican al igual que los genes en clase I, clase II y clase III, respectivamente.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Las proteínas clase I y II son glicoproteínas de membrana; mientras que las de clase III corresponden principalmente a componentes del complemento y a algunas moléculas solubles como el factor de necrosis tumoral (Fahrner et al., 1987; Cai et al., 1996).

Los genes del MHC clase I están constituidos por ocho exones y siete intrones. El exón 1 codifica para el péptido señal, el exón 2 para el dominio alfa 1, el exón 3 para el dominio alfa 2, el exón 4 para el dominio alfa 3, el exón 5 para el dominio transmembranal y los exones 6, 7 y 8 para el dominio citoplasmático (Flaherty et al., 1990; Stroynowski, 1990).

Las moléculas de clase I del ratón, a su vez, se subdividen en moléculas clásicas o clase 1a y no clásicas o clase 1b. Las moléculas clásicas son codificadas en las subregiones K y D del MHC, se caracterizan por ser altamente polimórficas; se expresan en la mayoría de los tejidos, su función es la de presentar péptidos, de 8 a 10 aminoácidos, a los linfocitos T CD8+, los cuales son capaces de destruir a células infectadas (Bouvier, 2003).

Las moléculas no clásicas o clase 1b son codificadas por genes localizados en las regiones Q y TL (Flaherty et al., 1990), aunque la función de éstas moléculas se desconoce se les ha relacionado con procesos inmunológicos y reproductivos (Warner et al., 1991; Braud et al., 1999).

1.3. Complejo Principal de Histocompatibilidad y su relación con la reproducción.

Estudios serológicos han demostrado que existen al menos 5 productos distintos, de genes no clásicos o genes 1b en el ratón, designados como Qa-1, Qa-2, Q10, T1a y H-2 M (Flaherty, 1990).

En células somáticas, la expresión de algunas proteínas del MHC requieren la coexpresión de varias moléculas, como la calreticulina, tapasina, Beta₂ – microglobulina (β_2 -m) y las moléculas transportadoras TAP1 y TAP2 (Ke et al., 2000).

La importancia en el área reproductiva de algunas de estas moléculas, ha sido comprobada en diferentes estudios. Así, los ratones knockout β_2 -m, presentan problemas severos de fertilidad, aunque se reproducen. Ratones con niveles bajos de β_2 -m, obtenidos al cruzar un ratón knockout β_2 -m con una cepa silvestre, presentan fertilidad baja, comparados con la cepa silvestre, por lo se propone que β_2 -m es necesaria para un desempeño óptimo de la reproducción y el desarrollo de los embriones en etapas preimplantatorias (Fernández et al 1996).

Por otro lado, además de β_2 -m, se han encontrado proteínas del MHC clase 1a presentes en ovocitos y en embriones en 2 células y estadios posteriores. Se ha observado que los mRNAs que codifican para proteínas clase Ia, clase Ib y β_2 -m son sintetizados después de la etapa de cigoto. Esto sugiere que las proteínas de origen materno son degradadas pero nuevas proteínas del MHC clase 1a son sintetizadas por parte del embrión en 2 células (Fernández et al., 1999).

La presencia de genes asociados con la velocidad de desarrollo en embriones de ratón fue descrita por Goldbard et al., (1982) y posteriormente Warner et al., (1986, 1987) los relacionaron al MHC.

La proteína Qa-2 codificada por los genes Q6, Q7, Q8 y Q9 del MHC ha sido relacionada directamente con la reproducción y en especial con el desarrollo de embriones preimplantados. (Warner et al., 1991). En estudios posteriores la proteína Qa-2 fue descrita como el producto del gene Ped, Q9 (Preimplantation embryo development) que influencia la velocidad de desarrollo de los embriones de ratón en etapa preimplantacional, y es además una proteína clase 1b o no clásica (Warner et al., 1999).

Los mRNAs para el par Q7/Q9 han sido detectados en ovocitos y en embriones preimplantatorios y su producto Qa-2 parece estar involucrado en la regulación de la diferenciación celular y en la velocidad de segmentación (Cai et al., 1996; Fernández et al., 1999). Se ha propuesto que el MHC y el gen Ped contribuyen o están asociados con la longevidad de los ratones, por un acelerado

desarrollo de los embriones, así los ratones Qa-2 positivos tendrán un promedio de vida menor que aquellos con un desarrollo lento (Tarin, 1997).

En otras especies también existen genes ligados al MHC, que controlan el crecimiento, la reproducción y la susceptibilidad al cáncer y a infecciones. En la rata existe la región **grc**, región que ha sido localizada entre los genes clase I RT1.E (un locus homólogo al H-2K y H2-D en el ratón y al HLA-A y HLA-B en el humano) y RT1.G el que es considerado homólogo a la región TL del ratón. Dentro de esta región se han identificado 3 loci; **ft** (fertility) asociado con la capacidad reproductiva; **dw-3** (dwarf-3) asociado con el tamaño corporal y **rcc** (resistance to chemical carcinogens). También se ha reportado que ratas homocigotas para una delección de 70 kb en la región grc (grc-) tienen un tamaño pequeño, presentan una elevada mortalidad perinatal e infertilidad parcial en hembras o completa en machos; junto con una elevada susceptibilidad a carcinógenos (Gill et al., 1999). En humanos también se ha propuesto que el HLA (human leukocyte antigens, MHC en otras especies), influencia el desarrollo de los gametos, la segmentación de los embriones, la formación de blastocistos y del trofoblasto, la implantación, el desarrollo fetal y la sobrevivencia del producto (Jurisicova et al., 1996; Choudhury et al., 2001).

Todo lo anterior sustenta evidencias importantes que soportan la relación entre el MHC y la reproducción en mamíferos, aunque los mecanismos de acción no están bien comprendidos es claro que el papel del MHC involucra más que la regulación de la respuesta inmune a través de la presentación de antígenos y que la expresión de genes del MHC en embriones durante la etapa preimplantacional, es parte esencial de un buen funcionamiento reproductivo.

Una de las proteínas del MHC del ratón no clásicas más estudiadas ha sido la proteína Qa-2 por su asociación con el sistema inmunológico (Das et al., 2000), su capacidad de mediar resistencia a la cisticercosis murina (Frago et al., 1998) y por sus funciones en la reproducción (Warner et al., 1999).

1.4. Proteína Qa-2

El locus Qa-2 fue descubierto por Flaherty en 1976 como una región localizada entre el H-2D y el loci Tla. Este loci difiere entre las cepas congénicas de ratones B6.K1 y B6.K2, siendo el antígeno Qa-2 expresado en células hematopoyéticas de B6.K2 pero no en B6.K1 (Stroynowski, 1990).

Qa-2 es codificada por cuatro genes Q6, Q7, Q8 y Q9, pertenecientes a la región Q del MHC del ratón (Flaherty, 1990). Q6 es similar a Q8; y Q7 es similar a Q9.

Aunque cada uno de los genes pueden codificar la proteína Qa-2, en la gran mayoría de las células que expresan la proteína, los genes que la codifican es el par Q7/Q9 (Mellor et al., 1985; Stroynowski et al., 1990; Stroynowski, 1995), y en embriones sólo se han detectado mRNAs para el par Q7/Q9 (Cai et al., 1996).

La proteína Qa-2 está unida a la membrana celular por glicofosfatidilinositol, tiene un peso de 40 KDa y como todos los antígenos del MHC clase I está unida a β_2 microglobulina. Existe además una forma soluble de la proteína Qa-2 con un peso de 39 KDa. Ambas formas presentan tres dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$, éste último unido por interacciones no covalentes a la proteína $\beta 2$ -microglobulina la cual le da estabilidad (Figura 1).

La forma soluble de 39 KDa es detectable en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos y se ha comprobado que es producida a través de un "splicing" alternativo del exón 5 (SQa-2) (Ulker et al., 1990; Tabaczewski 1994). Existe otra forma soluble que es derivada de la proteína unida a membrana (MDQa-2) la cual es liberada de la membrana por la enzima fosfolipasa C (Tian et al., 1992). Las dos formas solubles han sido detectadas después de la estimulación de los linfocitos T con sustancias mitogénicas como concavalina A y se ha sugerido que las formas solubles pudiera tener un papel inmunoregulatorio (Tabaczewski et al., 1994).

La expresión de Qa-2 es detectada en diferentes tejidos, está presente en linfocitos T(Cai et al., 1996), en la cámara anterior del ojo (Niederkorn et al.,

1999) en folículos pilosos, en placenta (Fahrner et al., 1987), en blastocistos (Xu et al., 1994) en espermatozoides y testículo (Ungchusri et al., 2001), en otros tejidos como pulmón, hígado y riñón se han detectado mRNAs de Q7/Q9 (Fahrner et al., 1987). Mientras que en corazón, hígado, intestino, pulmón, riñón y piel se han detectado mRNAs para Q6/Q8 (Wang et al., 1996).

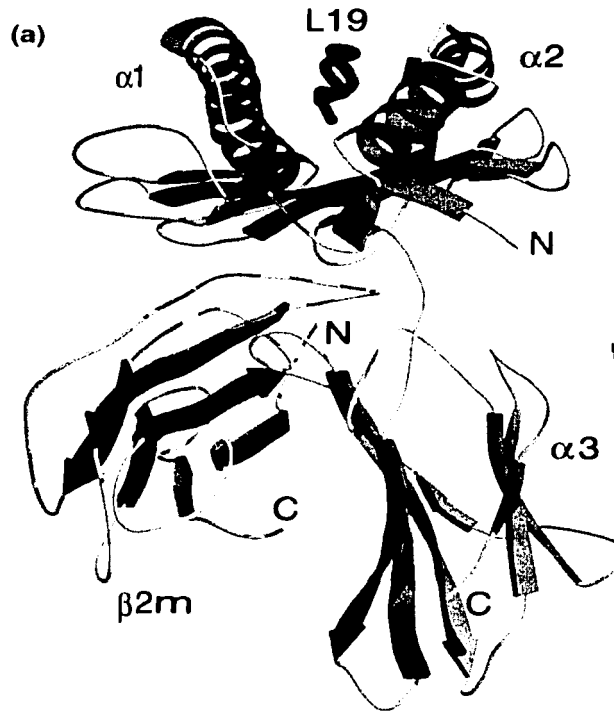


Fig.1 Modelo tridimensional de la estructura de Qa-2, formando complejo con el péptido L19 (He X. et al 2001). Se observan los dominios $\alpha 1$, 2 y 3, unidos a $\beta 2$ microglobulina.

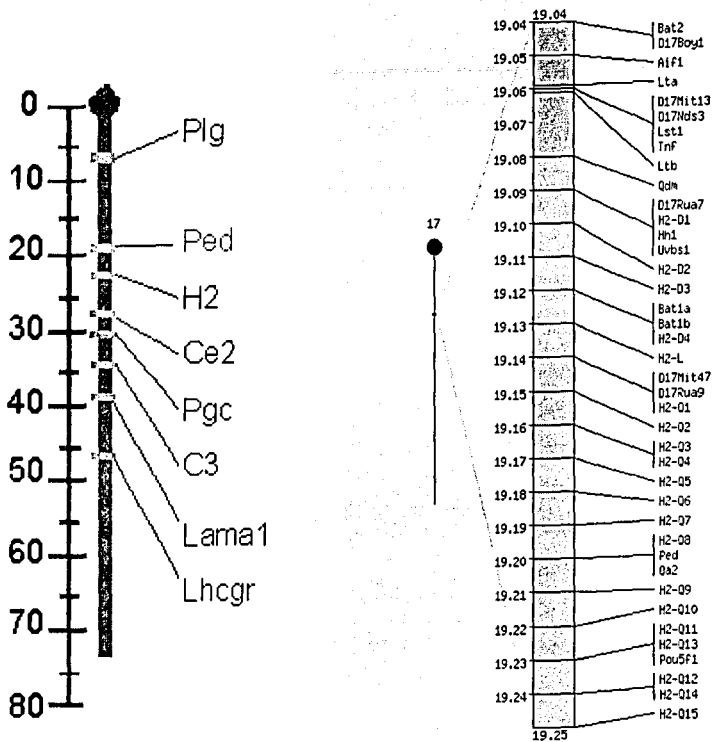


Fig. 2 Localización del Gen Ped (preimplantation embryo development) en el cromosoma 17 del ratón. www.informatics.jax.org

1.5. Qa.2 y desarrollo embrionario.

Qa-2 es expresada en la superficie de los embriones preimplantados (0-3 días post-coito) se ha demostrado que el fenotipo Ped fast (división rápida) se correlaciona en forma directa con la presencia o ausencia de Qa-2 en la membrana celular de los embriones (Warner et al., 1987a).

Al gen Q9 se le ha denominado gen **Ped**, y la proteína Qa-2, producto de éste gen, ha sido relacionada con influenciar el desarrollo embrionario. La Figura 2 muestra la ubicación que se le ha asignado al gene Ped en el MHC del ratón. Las cepas de ratones que expresan a la proteína Qa-2 se desarrollan más rápido que aquellas cepas que no la expresan; así cuando se adiciona el transgene Q9, a cepas de ratones Ped slow (división lenta), se convierte el fenotipo en Ped fast (división rápida) (Xu Y et al., 1994).

Utilizando a las cepas congénicas B6.K1 y B6.K2, que sólo se diferencian en la región Q del MHC, se observó que durante la etapa preimplantatoria los embriones de la cepa B6.K2, Qa-2 positivo (división rápida), presentan una división celular más rápida, con respecto a los embriones Qa-2 negativos (división lenta), de la cepa B6.K1 (Warner et al., 1991).

La importancia biológica del gen **Ped**, toma especial interés en la transferencia de embriones; en diversos estudios, con embriones de ratón, aquellos que manifiestan el gen división rápida sobreviven mejor a la transferencia embrionaria y en mayor número; mientras que los embriones con el gen división lenta, el porcentaje de sobrevivencia es menor (Warner et al., 1993).

En otras especies y en el caso específico de los cerdos, los embriones que tienen una menor velocidad de división, son menos capaces de sobrevivir comparados con los embriones de mayor división celular. Esta incapacidad está determinada por el lento desarrollo embrionario y las condiciones uterinas de la madre. El efecto de asincronía entre las condiciones uterinas y el desarrollo embrionario afecta de manera directa a los embriones de menor desarrollo. Tal efecto se ha observado en cultivos *in vitro* de embriones de cerdo, algunos embriones se presentan en estado de blastocisto y otros en mórula o bien exhiben

un menor desarrollo, después de la transferencia de embriones; los embriones más desarrollados sobreviven mejor (Wilson et al., 2001).

En el cultivo *in vitro* de embriones preimplantados se han observado diferencias en la velocidad de desarrollo, éstas diferencias se han relacionado con varios factores, los cuales pueden ser clasificados en dos grupos: genéticos y ambientales; dentro de los genéticos esta la especie, raza y sexo del embrión y en los ambientales está el medio o medios de cultivo utilizados (Ho et al.,1995; Biggers et al., 2000), volumen del medio, número de embriones cultivados por grupo (Lane et al.,1992) y condiciones de cultivo como el CO₂ y la temperatura.

En varias especies de mamíferos se han observado diferencias en la velocidad de desarrollo embrionario y en algunas de ellas una mayor velocidad de desarrollo se ha ligado con el sexo, así en ovejas, humanos y ratones, se han observado diferencias en el desarrollo embrionario entre machos y hembras en estudios *in vitro*, estas diferencias se han ligado al cromosoma Y (Mittwoch 1993; Kochhar et al., 2001) Sin embargo se demostrado que la deleción del gen SRY no afecta la velocidad de desarrollo de los embriones murinos. (Pergament et al., 1994).

En contraste se ha mencionado que morfológicamente no se presentan diferencias en los embriones, pero al realizar el conteo de núcleos se ha observado que los machos tienen más células que las hembras, aunque estas se compactan antes, esto ha sido asociado con el medio de cultivo. (Peipo et al.,1995).

Solamente en el ratón se ha identificado al gen Ped y a su producto la proteína Qa-2, que influyen la velocidad de desarrollo embrionario, y aunque en otras especies se han observado diferencias en la velocidad del desarrollo embrionario no se ha identificado el gen o los genes que controlen estos procesos, ni tampoco si están relacionados con el MHC.

1.6. Gen Ped (Preimplantation Embryo Development).

Dentro de las propiedades que han sido asignadas al gen Ped figuran:

La Presencia de dos alelos para el control de la velocidad de segmentación: uno de velocidad rápida (fast) y el otro de velocidad lenta (slow). El alelo fast es dominante (Warner et al., 1988) no afecta el tiempo de ovulación (Goldbard et al., 1982); el fenotipo se manifiesta durante la primera división del embrión (Warner et al., 1988), el cual es independiente del ambiente uterino (Brownell et al 1988). El gen Ped está ligado a la región Q del MHC del ratón (Warner et al., 1987), es codificado por dos genes, Q7 y Q9, el alelo slow es una delección de ambos (Wu et al., 1999). Las cepas de ratones con el fenotipo fast tienen los dos genes, Q7 y Q9, sin embargo, algunas cepas sólo transcriben Q7 y otras Q9 y algunas más transcriben ambos (Cai et al.,1996; Wu et al.,1998). El uso de oligonucleótidos antisentido para el par Q7/Q9 inhiben la expresión del gen Ped y dan el fenotipo división lenta. (Xu et al., 1993) y la introducción del transgen Q9 en una cepa con el alelo slow la convierte del fenotipo slow al fenotipo fast (Xu et al., 1994); el producto del gene Ped es la proteína Qa-2 (Warner et al., 1987).

La proteína Qa-2 se une a la superficie de los embriones por un enlace de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y su remoción altera en forma negativa la velocidad de desarrollo (Tian et al., 1992) y su expresión aumenta la velocidad de desarrollo (McElhinny et al., 2000). Se han reportado otros efectos del gen Ped y de la proteína Qa-2 sobre la reproducción del ratón, entre ellos se encuentra el aumentar el tamaño de camada, el peso al nacer y el peso al destete. (Warner et al., 1991 y 1993).

Los efectos de Qa-2 sobre la reproducción en el ratón son importantes por que uno de los principales parámetros reproductivos es el tamaño de la camada, la obtención de hembras con un mayor tamaño de camada tiene importancia directa sobre la producción.

Así en las especies múltiparas, como los cerdos y conejos, la productividad de la hembra es medida por el número de crías destetadas por parto y está directamente relacionada con el tamaño de camada. En éste parámetro se ha

trabajado con el fin de mejorar la productividad; la selección para aumentar el tamaño de camada y para aumentar el peso de las crías al destete, se traducen en la obtención de más crías con mejor peso que representarán una mayor producción de carne para la venta, producida por una hembra.

1.7. Qa-2 y resistencia a la cisticercosis.

La proteína Qa-2 ha sido estudiada ampliamente, sin embargo aún se desconoce mucho acerca de ésta proteína, así como también de su mecanismo de acción. Entre las funciones no inmunes destaca su relación con el desarrollo embrionario y en las funciones inmunológicas su relación con la resistencia a la cisticercosis.

En un estudio sobre la cisticercosis murina, producida por el metacéstodo de Taenia crassiceps (céstodo semejante a Taenia solium) se observó que existen diferencias importantes en cuanto a la susceptibilidad del hospedero a la infección, en diferentes cepas de ratones. Utilizando dos sublíneas BALB/cJ y BALB/cAnN se comprobó que la primera es resistente, y es Qa-2 positiva, mientras que la segunda carece de la proteína Qa-2 y es susceptible (Frago et al., 1996). Estudios de ligamiento genético entre la expresión de Qa-2 y la resistencia a la cisticercosis murina han permitido asociar a la proteína Qa-2 con funciones implicadas en la resistencia a la cisticercosis. Esta relación entre la expresión de la proteína Qa-2 y la resistencia a la cisticercosis fue comprobada utilizando ratones transgénicos que sobreexpresaban la proteína Qa-2, en un fondo genético Qa-2 negativo y susceptible a la cisticercosis. Los resultados mostraron una asociación entre la alta expresión de ésta proteína, en estos ratones, y una disminución de la susceptibilidad a la cisticercosis murina (Frago et al., 1998).

1.8. Expresión de Qa-2.

Las diferentes cepas de ratones existentes, y aún las silvestres expresan o carecen de la proteína Qa-2 (O'Neill et al., 1986). El nivel de expresión de Qa-2 varía entre cepa y cepa, sin embargo aún cuando las cepas positivas a Qa-2

pueden expresarla en nivel alto o bajo no se presenta ninguna variación serológica detectable. Los fenotipos alto o bajo han sido definidos en base a la diferencia en el número de genes que codifican a Qa-2 (figura 3) (Flaherty et al., 1990; Water et al., 1991). Diferentes estudios han sugerido que la mayor parte de la proteína Qa-2 unida a la membrana celular es codificada por los genes Q7 y Q9, sin embargo el producto de los genes Q6 y Q8 también ha sido detectado en la membrana celular (Stroynowski et al., 1995).

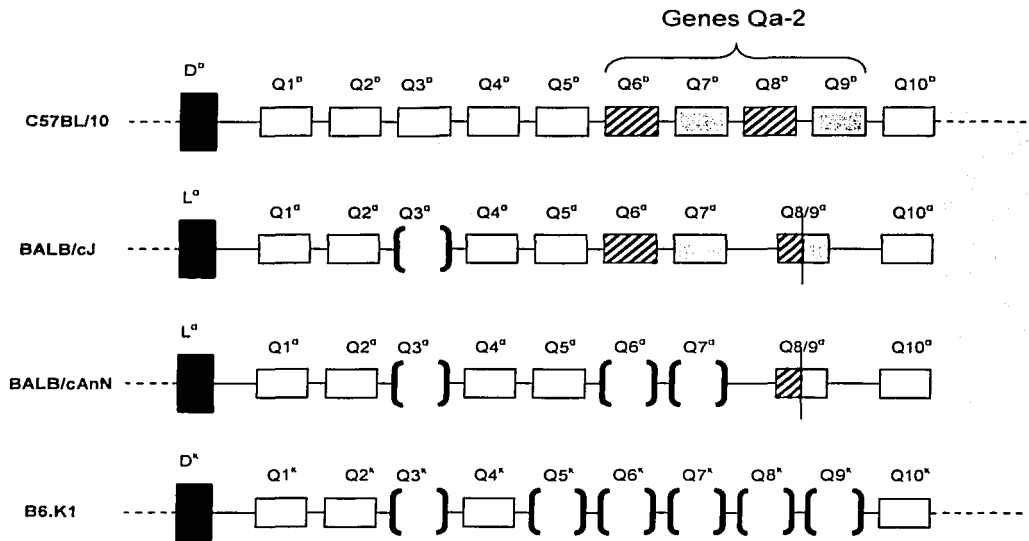


Fig. 3 Organización de los genes clase Ia y Ib del MHC, en el cromosoma 17; de 4 cepas diferentes de ratones; C57BL/10 presenta 4 genes que codifican para la proteína Qa-2; mientras que BALB/c presenta una deleción de 7 pares de bases en el gen Q8 y Q9 y una deleción del gen Q3 (Stroynowski et al., 1995) y B6.K1 presenta deleciones en los 4 genes que codifican a Qa-2, además deleciones en Q3 y Q5 (Ginger et al., 1999).

Dentro de las cepas positivas a Qa-2 se encuentran C57BL/6 (abreviado B6) ; C57BL/10 y C57BL/6Boy, entre otras que presentan una expresión alta por la presencia de los 4 genes Q6, Q7, Q8 y Q9 (figura 3). La cepa BALB/c presenta

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

una variación fenotípica importante en el cromosoma 17, en el locus del MHC; lo que ha dado por resultado la presencia de cepas positivas y negativas a Qa-2. Los ratones BALB/cJ y las sublíneas derivadas de ellos son Qa-2^a, esto es, que expresan la proteína Qa-2, por otra parte la cepa BALB/cAnN y las sublíneas derivadas de ella son Qa-2^b y no expresan la proteína Qa-2 (Potter et al., 1985).

En BALB/cJ el gen Q8/Q9 presenta una delección de 7 bases en el exón 3 y por resultado hay un codón de terminación temprano, así Q8/Q9 no codifica la proteína Qa-2 y expresa el fenotipo Qa-2 bajo, el cual está dado por la expresión del gen Q7 (Nakayama et al., 1991), ya que no se han detectado mRNAs para Q6 en embriones (Cai et al., 1996). En otras sublíneas de BALB/c (por ejemplo BALB/cAnN y BALB/cBy) se presenta una delección adicional en los genes Q6 y Q7, dando el fenotipo nulo para Qa-2 (Mellor et al., 1985).

Otras cepas con fenotipo nulo presentan extensas delecciones en la región Q, como por ejemplo C3H y B6.K1 (Fig. 3) (O'Neill et al., 1986).

Diferencias fenotípicas adicionales, además de la presencia de Qa-2, entre las cepas BALB/cJ con respecto a BALB/cAnN, son niveles más altos de testosterona en los machos, un mayor nivel de enzimas adrenales involucradas en la síntesis de catecolaminas que se relacionan con el temperamento más agresivo y niveles altos de alfafetoproteína (Roderick et al., 1985).

1.9. Justificación

La proteína Qa-2 es un antígeno del MHC, no clásico de clase I, que se ha implicado tanto en la respuesta inmune innata y adaptativa así como también en el desarrollo embrionario.

Además, se le ha encontrado asociada con la resistencia a la cisticercosis experimental murina por T. crassiceps. La heterogeneidad de sus funciones sugiere que podría ser una proteína pleiotrópica. Al respecto, de su posible función en el desarrollo embrionario, se le ha relacionado como producto del gen *Ped* con base en observaciones que muestran que los ratones Qa-2⁺ presentan, en estudios *in vitro*, una velocidad de desarrollo embrionario mayor, lo cual tiene

como consecuencia un mayor número de crías al nacimiento y con un mayor peso (Warner et al., 1991). Sin embargo, un análisis realizado con los datos del índice reproductivo de las cepas BALB/cAnN (Qa-2⁻) y C57BL/6J (Qa-2⁺) del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se reportan datos que no parecen confirmar las propiedades Ped (preimplantation embryo development) de la proteína Qa-2. Considerando la relevancia que pudiera implicar a nivel agronómico el identificar una proteína que mejore los índices reproductivos de las especies animales productivas, es que se justifica reevaluar las propiedades de Qa-2 en el desarrollo embrionario.

2.- HIPOTESIS

“ Si Qa-2 es la proteína Ped (preimplantation embryo development) entonces los ratones Qa-2 positivos deberán tener las funciones asignadas a la proteína Ped, presentando una velocidad de desarrollo embrionario *in vitro* y un tamaño de camada mayor que las cepas Qa-2 negativas ”.

3.- OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar las funciones de Qa-2 asociadas con la velocidad de desarrollo embrionario *in vitro* y con el tamaño de camada, en cepas de ratón Qa-2 positivas y negativas.

Objetivos Particulares

1.- Realizar un estudio sobre los parámetros reproductivos: Número de partos por hembra, Tamaño de la camada y crías destetadas por parto en ratones pertenecientes a las cepas Qa-2 positivo; C57BL/6J, BABL/cJ y en cepas Qa-2 negativo; BALB/cAnN y B6.K1; pertenecientes al bioterio del instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

2.- Evaluar *in vitro* la velocidad de segmentación en los embriones de ratón pertenecientes a las cepas C57BL/6J, BALB/cJ; Qa-2 positivo y en las cepas BALB/cAnN y B6.K1; Qa-2 negativo, durante el período de preimplantación.

3.- Evaluar la expresión de la proteína Qa-2 durante el período de preimplantación en los embriones de ratón desarrollados *in vitro*, de las cepas C57BL/6J, BALB/cJ, BALB/cAnN y B6.K1

4. Material y Métodos

4.1. Cepas de ratones

Las cepas de ratones utilizadas fueron C57BL/6J, (abreviada como B6); B6.K1 y dos sublíneas de BALB/c; BALB/cJ y BALB/cAnN.

Los stocks originales de las cepas C57BL/6J, BALB/cJ y BALB/cAnN provinieron de los laboratorios Jackson; y los de la cepa B6.K1 fueron donados por el Dr Mark Soloski (Johns Hopkins University School of Medicine USA). Todos los ratones utilizados fueron mantenidos y reproducidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Los ratones para el estudio del desarrollo in vitro fueron alojados en grupos de 5 ratones por jaula, con un fotoperíodo de luz: oscuridad de 12 hrs., alimento y agua ad libitum. El manejo de los ratones fue de acuerdo a la guía del National Research Council, establecido ya en el bioterio.

4.2. Registros de producción

Para el análisis reproductivo de las cepas Qa-2 positivas y negativas, se utilizaron los registros de producción de C57BL/6J, BALB/cJ, cepas Qa-2 positivas; B6.K1 y BALB/cAnN cepas Qa-2 negativas; pertenecientes al bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.

Los registros de producción comprendieron 2 períodos, el primer período de febrero de 1999 a diciembre del 2000 y el segundo período de enero del 2001 a junio del 2003.

En el primer período se evaluaron en forma retrospectiva a las cepas B6 y BALB/cAnN y los datos obtenidos se compararon entre estas dos cepas. El manejo reproductivo de estas cepas, durante el primer período fue por medio de un sistema monogámico intensivo, es decir un macho y una hembra juntos durante toda su vida reproductiva, la cual inició entre las 9 y 10 semanas de edad y terminó 25 semanas después, cuando fueron reemplazadas; las crías se destetaron a los 21 días de edad.

Los datos obtenidos en este período correspondieron al índice de eficiencia reproductiva.

El índice de eficiencia reproductiva evalúa el comportamiento reproductivo de una colonia y se define como: El número de crías destetadas por semana por hembra apareada; y se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{IER} = \frac{\text{número de animales destetados}}{\text{Vida productiva (días)}} \times 7$$

La vida productiva es el período que dura una hembra con un macho, con fines reproductivos y se obtiene de restar la fecha del primer apareo de la fecha del último destete (Poole 1999). Si bien éste índice nos permite conocer de manera objetiva y general datos importantes de reproducción; puede verse afectado de manera importante por la mortalidad de las crías durante la lactancia, por el número de hembras que quedan gestantes y por los días entre parto y parto.

También se evaluó el tamaño de la camada (promedio de crías por parto), parámetro que ha sido reportado estar influenciado por la proteína Qa-2. Este parámetro es un dato que el índice de eficiencia reproductiva no permite distinguir, así mismo se evaluaron los siguientes parámetros reproductivos: promedio de partos por hembra, promedio de crías destetadas por parto así como el promedio de estro post-parto fértil; éstos tres parámetros influyen en forma directa el índice de eficiencia reproductiva.

En el segundo período el manejo reproductivo fue a través de un sistema poligámico intensivo, en trío, un macho y dos hembras, al igual que en el período anterior su vida productiva inició entre las 9 y 10 semanas de edad y duró 25 semanas; el destete se realizó a los 21 días. En éste período se obtuvo el número de partos por hembra, el tamaño de la camada, el número de crías destetadas por parto y el porcentaje de mortalidad durante la lactancia.

Los resultados obtenidos se compararon entre las cepas positivas y negativas con el mismo fondo genético, con lo cual se compararon los resultados de C57BL/6J con B6.K1 y entre las sublíneas BALB/cJ y BALB/cAnN.

4.3. Cultivo *in vitro* de los embriones

Para la evaluación del desarrollo embrionario, se utilizó un modelo de fertilización y cultivo *in vitro* de embriones durante la etapa preimplantatoria. El paso inicial fue la preparación de los medios para la fertilización y para el cultivo *in vitro*, así como un medio para el manejo de los embriones.

4.4.- Medios de cultivo

Medio M2, se utilizó para la colección y el manejo de los embriones fuera de la incubadora: NaCl 94.66 mM, KCl 4.78 mM, CaCl₂ 2H₂O 1.71 mM, KH₂PO₄ 1.19 mM, MgSO₄ 7H₂O 1.19 mM, NaHCO₃ 4.15 mM, HEPES 20.85 mM, piruvato de sodio 0.33 mM, glucosa 5.56 mM; BSA 4mg/ml, penicilina G.0.060 mg, sulfato de estreptomicina 0.050 mg.

Medio mKSOM, utilizado para la fertilización y el cultivo *in vitro* de los embriones: NaCl 95.0 mM, KCl 2.50 mM, KH₂PO₄ 0.35 mM, MgSO₄ 7H₂O 0.20 mM, lactato 10.0 mM, glucosa 5.56 mM, piruvato de sodio 0.20 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, CaCl₂ 2H₂O 1.71 mM, glutamina 1.0 mM; EDTA 0.01 mM, BSA 4 mg/ml, penicilina G 100 UI/ml, sulfato de estreptomicina 50 µg/ml .

Medio Tyrode modificado, fue utilizado para inducir la capacitación de los espermatozoides: NaCl 99.23 mM, KCl 2.68 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 2H₂O 0.36 mM, MgCl₂ 6H₂O 0.49mM, CaCl₂ 2H₂O 1.80mM, Glucosa 5.56 mM, penicilina 100 UI/ml, rojo fenol 0.5% 154 mM, NaHCO₃ 0.1 ml/100 ml, BSA 4 mg/ml (Fraser, 1994).

Los medios fueron preparados, un día antes de cada experimento, a partir de soluciones stock, y para su preparación se utilizó agua miliQ. El pH del medio M2 se ajustó entre 7.2 – 7.4; el medio tyrode se ajustó a un pH 7.5 y para equilibrar el pH del medio mKSOM, se colocó una noche antes de realizar la fertilización *in vitro*. Todos los medios una vez preparados fueron filtrados a través de filtros millipore 0.02 µm. Todos los reactivos utilizados para preparar los medios fueron de Sigma, con calidad probada para cultivo de embriones.

4.5.-Pipetas

Las pipetas para el manejo de los embriones fueron hechas con tubos capilares de pared gruesa de 1 mm de diámetro interno (Clark Electromedical Instruments). Los tubos fueron colocados el tubo en la flama de un mechero y estirados hasta obtener un diámetro interno de la pipeta de 200 μm para las pipetas de manejo y de 100 μm para las pipetas utilizadas en la remoción de la zona pelúcida.

4.6.- Fertilización *in vitro*.

Ratones hembras de 9 semanas de edad, pertenecientes a las cepas BALB/cAnN, BALB/cJ, B6.K1 y C57BL/6J se inyectaron intraperitonealmente con 5 UI de Folligon^R (intervet FSH) y 48 hrs. más tarde con 5 UI de hCG (Sigma hCG) las hembras se sacrificaron por dislocación cervical 15:30 hrs. post hCG, y por medio de una incisión abdominal amplia se obtuvieron los oviductos y se depositaron en cajas de petri 35 mm de dm., con 3 ml de M2; los complejos cúmulos-ovocitos fueron obtenidos por el rompimiento del ámpula en 1 ml de medio mKSOM contenido en cajas de petri 35 mm de dm y cubierto bajo aceite mineral donde se realizó la fertilización *in vitro*.

Los machos utilizados fueron de 13 a 16 semanas de edad, se sacrificaron por dislocación cervical y por una incisión abdominal amplia se obtuvieron las caudas de los epidídimos y se colocaron en 500 μl de medio Tyrode cubierto con aceite mineral. Con tijeras para microcirugía se hicieron cortes en los epidídimos para permitir la salida de los espermatozoides, después de 10 minutos se retiraron los epidídimos del medio y los espermatozoides dejaron capacitar por 90 minutos. La inseminación se realizó a las 16 hrs. post-hCG, ajustando la concentración espermática a 2×10^6 , y 10 complejos cumulus-ovocitos y se incubaron por un tiempo de 4 hrs.

Posteriormente para retirar los restos de células del cumulus y espermatozoides adheridos a la zona pelúcida los ovocitos se lavaron en 3 ml de medio M2 adicionado con 40 μl de hialuronidasa (10 mg/ml) durante 2 minutos, seguido de otros dos lavados en M2 sin hialuronidasa y finalmente en mKSOM; los

ovocitos se colocaron en microgotas de mKSOM bajo aceite mineral; de acuerdo a lo descrito por (Summers 1995). A las 8 hrs. post-inseminación la fertilización fue evaluada por la presencia de uno o dos cuerpos polares y dos pronúcleos. Una vez que se determinó el número de ovocitos fertilizados, se formaron grupos de 20 cigotos para su cultivo en microgotas de 20 μ l de medio mKSOM. La incubación fue a 37° C con 5% CO₂.

4.7. Evaluación del desarrollo embrionario preimplantatorio

El registro del desarrollo *in vitro* de los embriones pertenecientes a las cuatro cepas de ratones en estudio, se realizó cada 12 horas, tomando como hora cero el momento de la fertilización *in vitro*, hasta cumplir las 96 horas de desarrollo. Para el registro del desarrollo se contó el número de blastómeros bajo el microscopio invertido.

Para la etapa de mórula y blastocisto el conteo de los blastómeros bajo el microscopio invertido no fue posible, por la cual se registro la morfología de los embriones y el conteo del número de células de manera indirecta a través del uso de un fluorocromo polinucleótido específico, (bisbenzimidida, Hoechst 33258 Sigma).

A los embriones en etapa de mórula o blastocisto se les retiró la zona pelúcida con 5% de pronasa (Sigma) en M2, se incubaron durante 4 minutos y posteriormente por pipeteo constante se retiró la zona pelúcida, después se realizó un lavado en M2 y se colocaron durante 5 minutos en PVP/PBS (PVP polivinilpirrolidona), finalmente se fijaron en etanol absoluto conteniendo 100 μ g/ml de bisbenzimidida durante 24 hrs.

Finalmente los embriones teñidos fueron montados en portaobjetos y presionados con un cubreobjetos para permitir la disgregación de los blastómeros y facilitar el conteo de núcleos bajo el microscopio de luz ultravioleta.

4.8. Inmunofluorescencia para la detección de la proteína Qa-2

Para la detección de la proteína Qa-2 en embriones preimplantados se utilizó el siguiente protocolo. Como controles negativos se utilizaron embriones Qa-2-incubados con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal anti-Qa2 purificado, clona 1-1-2 Pharmigen) y con el anticuerpo secundario (IgG antimouse (H + L) conjugado con el fluorocromo rojo Texas. Jackson Immunoresearch Laboratories). El protocolo para inmunofluorescencia se describe en el anexo 1.

Análisis Estadístico

Para la estadística descriptiva de los parámetros reproductivos evaluados: Tamaño de Camada (promedio de crías por parto), promedio de crías destetadas por parto, promedio de partos por hembra y estro post-parto fértil se utilizó medidas de Tendencia central y de dispersión, fueron analizados con la prueba U de Mann – Whitney.

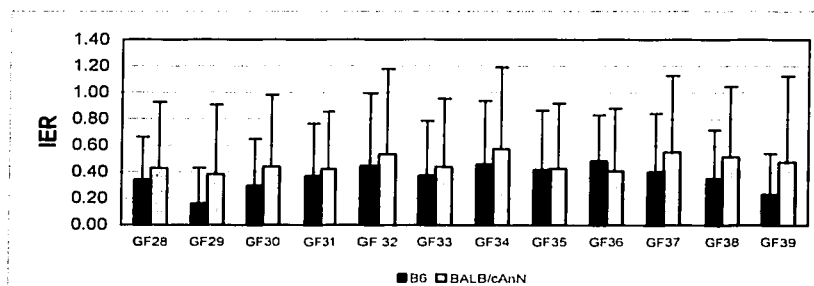
En el análisis estadístico del desarrollo *in vitro* se utilizó: Para el promedio de células en la etapa de mórula compacta y blastocisto la prueba t de student; para el análisis del número de blastocistos y blastocistos eclosionados se utilizó la prueba χ^2 y para el número promedio de células en embriones de las cuatro cepas se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) (Steel 1990).

Resultados

5.1. Parámetros reproductivos

Los datos recopilados sobre el comportamiento reproductivo de las cepas de ratones comprenden dos períodos, el primero realizado en forma retrospectiva, de febrero de 1999 a diciembre del 2000. En éste periodo se obtuvo el índice de eficiencia reproductiva para dos cepas: B6, Qa-2⁺ y BALB/cAnN, Qa-2⁻ y se compararon los datos.

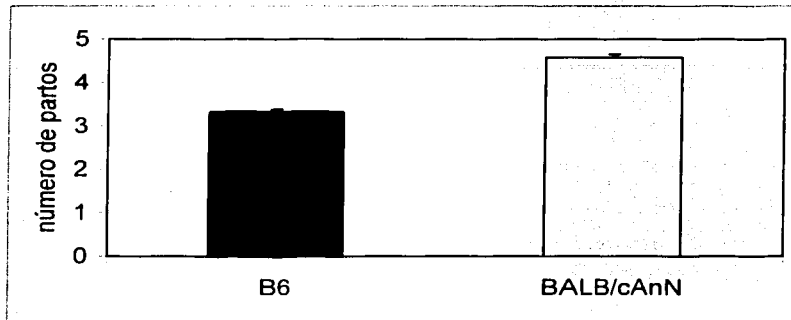
La cepa BALB/cAnN presentó un mejor índice de eficiencia reproductiva que la cepa B6 en 11 de las 12 generaciones filiales que comprendió el periodo de estudio (gráfica 5.1.1), solamente en la generación filial 36 la cepa B6 tuvo un mejor índice de eficiencia reproductiva y en la generación filial 35 el índice fue semejante para las dos cepas.



Gráfica 5.1.1. Índice de eficiencia reproductiva en dos cepas de ratones, primer período, de febrero de 1999 a diciembre del 2000. GF generación filial. Se muestra el promedio y la desviación estándar.

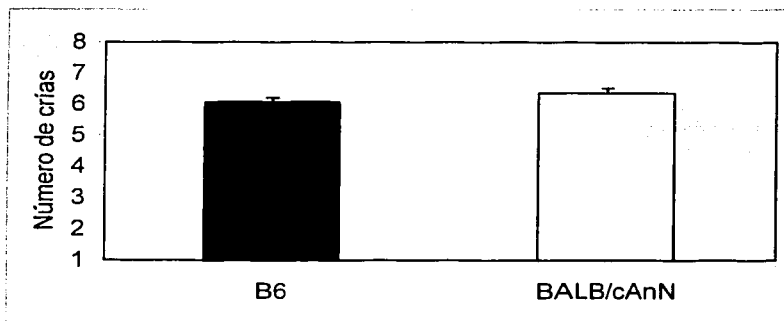
Para la cepa B6, el número total de hembras fue de 112, las cuales tuvieron 372 partos en total, presentaron un promedio de partos por hembra de 3.321. En la cepa BALB/cAnN fueron 97 hembras con un total de 444 partos y un promedio de

partos por hembra de 4.577 (cuadro 5.1.). El promedio de partos por hembra fue significativamente mayor en BALB/cAnN que en B6 ($P = 0.0001$) (gráfica 5.1.2).



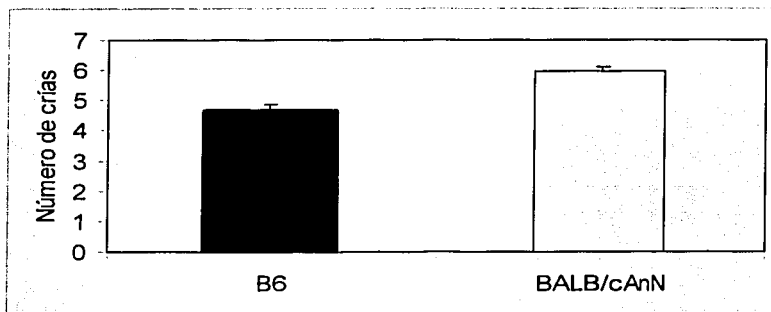
Gráfica 5.1.2. Promedio de partos por hembra en las cepas B6 y BALB/cAnN, se muestra el promedio y el error estándar. $P = 0.0001$

El parámetro tamaño de camada o crías nacidas por parto y el promedio de crías destetadas por parto, fueron determinados considerando los tres primeros partos por hembra, para las dos cepas el número de hembras fue de 89; la cepa B6 tuvo un promedio de 6.056 crías por parto, mientras que la cepa BALB/cAnN presentó un promedio de 6.363, diferencia que no fue significativa $P > 0.05$ (gráfica 5.1.3.).

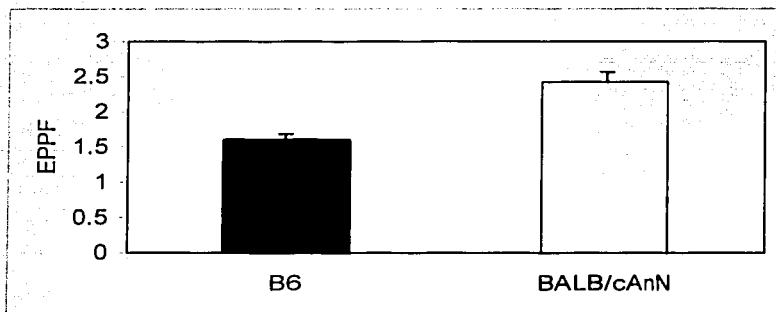


Gráfica 5.1.3. Promedio de crías por parto, en las cepas B6 y BALB/cAnN. se muestra el promedio y el error estándar. $P > 0.05$

Los parámetros de crías destetadas por parto y estro post-parto fértil, en la cepa BALB/cAnN fueron de 5.948 y 2.424 respectivamente, siendo significativamente mayor ($P= 0.001$) con respecto a la cepa B6, donde fueron de 4.659 y 1.597 (gráficas 5.1.4 y 5.1.5).



Gráfica 5.1.4. Promedio de crías destetadas por parto en las cepas de ratón B6 y BALB/cAnN. Se muestra el promedio y el error estándar. $P = 0.001$



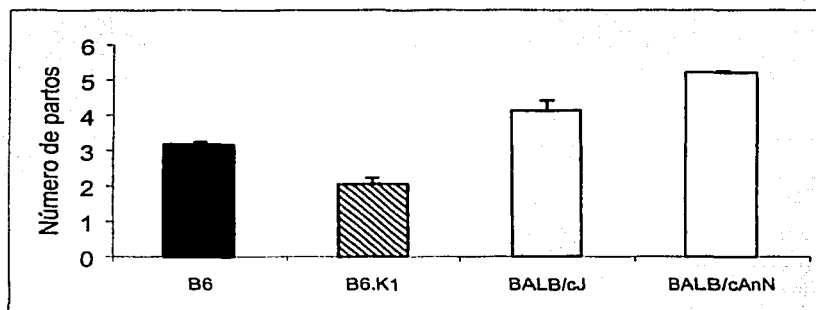
Gráfica 5.1.5. Promedio de estro post-parto fértil (EPPF), en las cepas de ratón B6 y BALB/cAnN. Se muestra el promedio y el error estándar. $P = 0.0001$

Para evaluar el efecto de Qa-2 sobre los parámetros reproductivos, en fondos genéticos similares, se recopilaron los datos que correspondieron al segundo período, comprendido entre enero del 2001 a junio del 2003. Los

parámetros evaluados fueron promedio de partos por hembra, promedio de crías nacidas por parto, promedio de crías destetadas por parto (cuadro 5.1.2.) y el porcentaje de mortalidad durante la lactancia, en las cepas B6, B6.K1, BALB/cJ y BALB/cAnN.

El número de camadas evaluadas fue de 473 en B6; 41 en B6.K1; 1852 en BALB/cAnN y 62 camadas en BALB/cJ.

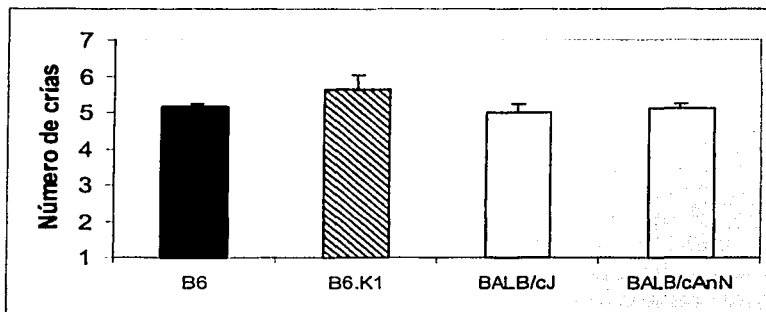
Se encontraron diferencias estadísticas significativas en el promedio de partos entre cepas, la cepa B6 presentó un promedio de 3.174 partos y la cepa B6.K1 de 2.05 ($P= 0.001$); la cepa BALB/cAnN tuvo el mayor número de partos por hembra con 5.216, mientras que para BALB/cJ fue de 4.133 ($P= 0.0001$) (gráfica 5.1.6.).



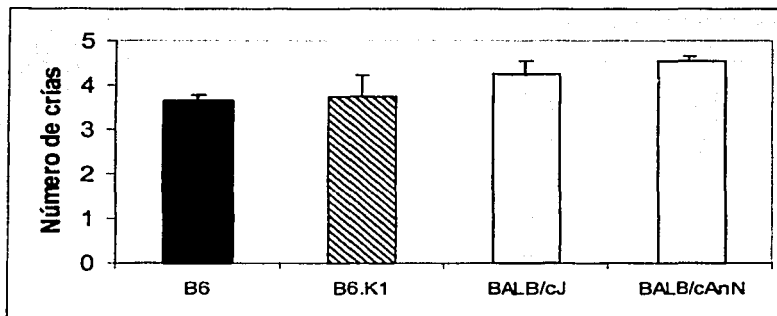
Gráfica 5.1.6. Promedio de partos por hembra en 4 cepas de ratones. Se compara B6 con B6.K1 y BALB/cJ con BALB/cAnN, se muestra el promedio y el error estándar. $P= 0.001$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para los parámetros promedio de crías nacidas por parto (gráfica 5.1.7.) y promedio de crías destetadas por parto (gráfica 5.1.8.) no se encontraron diferencias significativas entre las cepas Qa-2 negativas y Qa-2 positivas

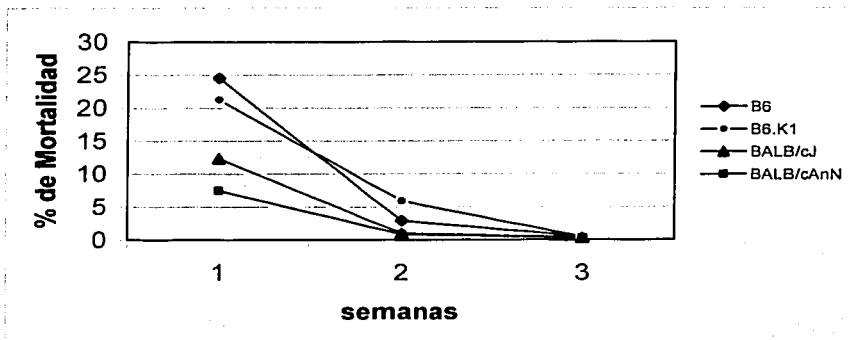


Gráfica 5.1.7. Promedio de crías por parto en 4 cepas de ratón. Se compara B6 con B6.K1 y BALB/cJ con BALB/cAnN, se muestra el promedio y el error estándar. $P > 0.05$



Gráfica 5.1.8. Promedio de crías destetadas por parto en cuatro cepas de ratón. Se compara B6 con B6.K1 y BALB/cJ con BALB/cAnN, se muestra el promedio y el error estándar. $P > 0.05$

Con respecto a la mortalidad en la lactancia, durante todo el periodo de estudio, las cepas Qa-2⁺ presentaron un mayor porcentaje de mortalidad en comparación con las cepas Qa-2⁻ durante la primera semana. La cepa B6 tuvo el mayor porcentaje de mortalidad durante la primera semana, superando a las otras tres cepas y B6.K1 tuvo el mayor porcentaje durante la segunda semana de la lactancia (gráfica 5.1.9.).



Gráfica 5.1.9. Porcentaje de mortalidad de crías B6, B6.K1, BALB/cJ y BALB/cAnN durante la lactancia, en el período comprendido entre enero del 2001 a junio del 2003

Cuadro 5.1.1 Análisis Reproductivo, 1^{er} período 1999-2000, de las cepas de ratón B6 y BALB/cAnN.

Cepa	Promedio de partos	Crías nacidas por parto	Crías destetadas por parto	Estro posparto fértil
B6 Qa-2 ⁺	3.321 (± 0.058)***	6.056 (± 0.144)	4.659 (± 0.190)**	1.597 (± 0.080)***
BALB/cAnN Qa-2 ⁻	4.577 (± 0.067)	6.363 ± 0.149	5.948 (± 0.153)	2.424 (± 0.1414)

Se comparan las dos cepas en cada uno de los parámetros, por medio de la prueba U de Mann-Whitney; entre paréntesis se muestra el error estándar *** P=0.0001 ** P=0.001

Cuadro 5.1.2. Análisis Reproductivo, 2^{do} período 2001-2003, de las cepas de ratón B6, B6.K1 BALB/cJ y BALB/cAnN.

Cepa	Promedio de partos	Crías nacidas por parto	Crías destetadas por parto
B6 Qa-2 ⁺	3.174 (± 0.068)**	5.147 (± 0.103)	3.654 (± 0.126)
B6.K1 Qa-2 ⁻	2.05 (± 0.171)	5.643 (± 0.363)	3.738 (± 0.476)
BALB/cJ Qa-2 ⁺	4.133 (± 0.283)**	4.984 (± 0.258)	4.250 (± 0.301)
BALB/cAnN Qa-2 ⁻	5.216 (± 0.035)	5.132 (± 0.103)	4.534 (± 0.114)

Se compara B6 con B6.K1 y BALB/cAnN con BALB/cJ, en los tres parámetros, utilizando la prueba U de Mann-Whitney, entre paréntesis se muestra el error estándar ** P= 0.001

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2 Desarrollo embrionario *in vitro*.

Para el cultivo *in vitro* se formaron grupos de veinte y se cultivaron 15 grupos por cepa, lo que dio un total de 300 embriones; excepto para la cepa B6.K1 en la cual sólo se cultivaron 9 grupos de veinte embriones cada uno para tener un total de 180 embriones que iniciaron su desarrollo (cuadros 5.2.1 – 5.2.4).

Durante las primeras 36 horas el desarrollo de los embriones fue sincrónico, el 100 % de los cigotos estuvieron segmentados en dos células a las 24 hrs., y hasta las 36 horas todos los embriones se mantuvieron en etapa de 2 células. Las diferencias en la velocidad de desarrollo se presentaron a partir de las 48 hrs., en las cepas B6 y B6.K1, 86.66% y 64.44% respectivamente (gráfica 5.2.1) de los embriones estuvieron en la etapa de 4 células y sólo algunos de ellos se encontraron en las etapas de 2, 3, 5 y 6 células. A las 60 hrs. de incubación el 58% de los embriones de la cepa B6 alcanzó la etapa de 8 células, sin embargo hubo embriones en etapa de 4,5, 6 células y mórula; para la cepa B6.K1 la distribución de embriones fue semejante a B6, en las etapas antes mencionadas (gráfica 5.2.2). La evaluación a las 72 hrs. de incubación presentó diferencias importantes en el desarrollo, si bien las etapas en las cuales se encontraron los embriones fueron semejantes en las cepas evaluadas, la distribución de los mismos fue diferente. En la cepa B6 el 86.66% de los embriones estuvo en etapa de mórula compacta y estuvieron presentes blastocistos iniciales, sin embargo éstos sólo representaron el 1.66 % de los embriones. Con lo que respecta a la distribución de los embriones B6.K1, el 43.33 % estuvo en etapa de mórula compacta, 13.88% en etapa de mórula, y en etapa de 8 células el 15.55%, así mismo se presentaron blastocistos iniciales con un 2.89% (gráfica 5.2.3).

A las 84 hrs., la cepa B6.K1 tuvo un porcentaje de 37.77% de embriones en etapa de mórula compacta y B6 del 45 %, las diferencias se encontraron en etapa de blastocisto cavitario, favorable para la cepa B6 con 20.66% mientras que en B6.k1 fue de 6.66% y solamente la cepa B6 presentó blastocistos eclosionados (gráfica 5.2.4).

La velocidad de desarrollo mostró diferencias a las 96 hrs., la cepa B6 tuvo un porcentaje relativo de 35.11% de embriones en la etapa de blastocisto eclosionado, mientras que B6.K1 tuvo un 22.34% (cuadro 5.2.6), mientras que para la etapa de mórula compacta, B6 tuvo un 8% de embriones y B6.K1 tuvo un 18.88% (gráfica 5.2.5). Existió una diferencia estadística significativa ($P= 0.0001$) favorable a la cepa B6 (cuadro 5.2.5). Estas diferencias se pueden apreciar en la morfología embrionaria (figuras 1 y 2). Otra diferencia importante a las 96 hrs. fue el porcentaje de embriones viables. La cepa B6 presentó una viabilidad del 95.3 % mientras que B6.K1 tuvo un porcentaje del 72.22 % (cuadros 5.2.1 y 5.2.2).

Con lo que respecta a BALB/cAnN y BALB/cJ las diferencias, al igual que con las cepas anteriores, iniciaron a las 48 hrs. En BALB/cJ se observó un mayor porcentaje de embriones en 4 células ,58.33%, comparado con BALB/cAnN 36.33% , en contraste BALB/cAnN tuvo un mayor porcentaje de embriones en 2 y 3 células 31.66% y 22.66% respectivamente (gráfica 5.2.1) A las 60 hrs de cultivo, el desarrollo de BALB/cJ tuvo un 49% de embriones en etapa de 8 células, mientras que en BALB/cAnN tuvo un 4.66% de embriones en esta etapa (gráfica 5.2.2).

El desarrollo de BALB/cAnN mejoró hacia las 72 hrs. con un 46.33% de embriones en etapa de mórula, para BALB/cJ un 56% de los embriones estuvieron en etapa de mórula (gráfica 5.2.3) por otra parte el porcentaje de viabilidad fue diferente, entre estas dos sublíneas, BALB/cAnN tuvo un 65.3 % y BALB/cJ presentó una viabilidad del 78.6% (cuadros 5.2.1 y 5.2.2).

A las 84 hrs. de cultivo, estas dos sublíneas, presentaron un desarrollo similar en la etapa de mórula compacta, BALB/cJ presentó un 51.33% de embriones en ésta etapa y BALB/cAnN tuvo un porcentaje de 48.33%. (gráfica 5.2.4). En esta etapa el porcentaje de viabilidad fue diferente, para BALB/cJ fue igual que a las 72 hrs., 78.6%, y en BALB/cAnN fue del 63.3 % (cuadros 5.2.1 y 5.2.2).

Hacia las 96 hrs. el desarrollo *in vitro* de BALB/cJ mejoró notablemente, distribuyéndose el mayor número de embriones en etapa de blastocisto, con 180 y

para BALB/cAnN fue de 78; ($P= 0.0001$) (cuadro 5.2.5),y dentro de ellos los blastocistos expandidos fueron el mayor porcentaje con 30.33%; en contraste BALB/cAnN presentó un desarrollo menor y aún habiendo blastocistos el mayor número de embriones,105, estuvo en etapa de mórula compacta (cuadro 5.2.5) y representaron el 35% de los embriones (gráfica 5.2.5). La morfología se aprecia en la figura 5, BALB/cJ presento más blastocistos y BALB/cAnN, figura 6, presento más embriones en estadio de mórula compacta.

Para el análisis estadístico de la velocidad de desarrollo *in vitro*, se consideró a los blastocistos como los embriones que completaron el desarrollo preimplantatorio, se contabilizo el total de blastocistos iniciales, cavitarios, expandidos y eclosionados, y se comparó con el número de mórulas compactas a las 96 horas de cultivo *in vitro*, se obtuvo una diferencia significativa ($P=0.0001$), utilizando una razón de momios: En lo que se refiere al análisis de los blastocistos, los blastocistos eclosionados, en las cuatro cepas, se encontró una diferencia altamente significativa ($P= 0.00001$), en B6, utilizando la prueba de X_1^2 (cuadro 5.2.6).

El análisis anterior sólo consideró la morfología embrionaria, sin embargo otro aspecto que ha sido considerado como un indicador importante del desarrollo embrionario, lo constituye el número de células que presentan los embriones en etapa de mórula y blastocisto (Warner et al., 1998; Bolton et al., 1998 Montag et al., 2000); es por ello que se determinó el número de células promedio en etapa de mórula compacta y blastocisto, a las 96 horas de desarrollo *in vitro* en cada una de las cepas evaluadas (cuadros 5.2.7 y 5.2.8). Los resultados mostraron que para la etapa de mórula compacta hubo una diferencia significativa de $P= 0.005$, para B6 – B6.K1 y de $P< 0.0001$ para las sublíneas BALB/c. En la etapa de blastocisto también hubo diferencias significativas en el número promedio de células y fue de $P= 0.001$ para B6 – B6.K1 y de $P< 0.0001$ entre BALB/c, a favor de BALB/cJ, utilizando la prueba de t de student.

Así mismo se evaluó el desarrollo preimplantacional embrionario, utilizando el número promedio de células de las 48 a las 96 hrs. de cultivo *in vitro* en las

cuatro cepas, (el número de células para la etapa de mórula se obtuvo como promedio utilizando el número de células en mórula compacta y la etapa inmediata anterior a mórula, que fue 8 células, para las cuatro cepas en forma independiente) a través de la prueba de análisis de varianza (ANOVA) no se encontró diferencia en el número promedio de células de las 48 a las 96 horas en las cuatro cepas estudiadas ($P= 0.6048$), probablemente los datos inferiores influyen para que no se presenten diferencias significativas. (cuadro 5.2.9).

Sin embargo al evaluar el número promedio de células a las 96 hrs. para las cuatro cepas, se encontró una diferencia significativa $P < 0.0001$, por medio de la prueba análisis de varianza (ANOVA), y al realizar una prueba para comparación de medias, diferencia mínima significativa (DMS) al 95% se encontró que sólo las cepas BALB/cJ y B6.K1, no fueron diferentes ($P > 0.05$); mientras que existió diferencias entre BALB/cJ con BALB/cAnN; B6 con B6.K1 y B6 presenta diferencias con BALB/cJ y B6.K1; y BALB/cAnN con B6.K1 ($P < 0.05$) (cuadro 5.2.10).

Cuadro 5.2.1 Cultivo *in vitro* de embriones de la cepa BALB/cAnN

Estadios del Desarrollo Embrionario Preimplantatorio
Número total de embriones

Hrs.	1	2	3	4	5	6	7	8	M	MC	BI	BC	BE	H	%
0	300														100
12	300														100
24		300													100
36		300													100
48		95	68	109	2	2									92.0
60			20	100	35	33	2	14							68.0
72				18		12		25	139	2					65.3
84								6	22	145	17				63.3
96									7	105	39	14	17	8	63.3

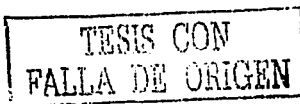
1-8 número de células por embrión; M: mórula; MC: mórula compacta; BI: blastocisto inicial; BC: Blastocisto cavitario; BE: blastocisto expandido; H: Blastocisto eclosionado (hatching); % porcentaje de viabilidad.

Cuadro 5.2.2 Cultivo *in vitro* de embriones de la cepa BALB/cJ

Estadios del Desarrollo Embrionario Preimplantatorio
Número total de embriones

Hrs.	1	2	3	4	5	6	7	8	M	MC	BI	BC	BE	H	%
0	300														100
12	300														100
24		300													100
36		300													100
48		73	38	175	12										99.3
60		11		48	4	30	2	147							80.6
72						11	1	56	168						78.6
84								10	43	154	29				78.6
96									1	54	32	29	91	28	78.3

1-8 número de células por embrión; M: mórula; MC: mórula compacta; BI: blastocisto inicial; BC: Blastocisto cavitario; BE: blastocisto expandido; H: Blastocisto eclosionado (hatching); % porcentaje de viabilidad



Cuadro 5.2.3 Cultivo *in vitro* de embriones de la cepa B6

Estadios del Desarrollo Embrionario Preimplantatorio
Número total de embriones

Hrs.	1	2	3	4	5	6	7	8	M	MC	BI	BC	BE	H	%
0	300														100
12	300														100
24		300													100
36		300													100
48		8	22	260	4	5									99.6
60				21	6	53		174	35						96.3
72								7	14	260	5				95.3
84									2	135	57	62	22	8	95.3
96										24	27	46	97	92	95.3

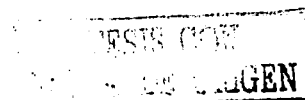
1-8 número de células por embrión; M: mórula; MC: mórula compacta; BI: blastocisto inicial; BC: Blastocisto cavitario; BE: blastocisto expandido; H: Blastocisto eclosionado (hatching); % porcentaje de viabilidad.

Cuadro 5.2.4 Cultivo *in vitro* de embriones de la cepa B6.K1

Estadios del Desarrollo Embrionario Preimplantatorio
Número total de embriones

Hrs.	1	2	3	4	5	6	7	8	M	MC	BI	BC	BE	H	%
0	180														100
12	180														100
24		180													100
36		180													100
48		37	17	116	7	3									100
60				8	5	25	14	78	13						79.4
72						3		28	25	78	4				76.6
84								7	3	68	23	12	19		73.3
96									2	34	12	24	37	21	72.2

1-8 número de células por embrión; M: mórula; MC: mórula compacta; BI: blastocisto inicial; BC: Blastocisto cavitario; BE: blastocisto expandido; H: Blastocisto eclosionado (hatching); % de viabilidad



Cuadro 5.2.5 Número total de embriones en etapa de blastocisto y de mórula compacta a las 96 hrs. de cultivo *in vitro*, en las cuatro cepas de ratón.

Cepa	Blastocistos	Mórula compacta	Total	% de Blastocistos	% de Mórulas compactas
BALB/cAnN	78*	105	183	42.62	57.37
BALB/cJ	180	54	234	76.92	23.08
B6	262**	24	286	91.60	8.4
B6.K1	94	34	128	73.42	26.56

*P < 0.0001 ** P < 0.0001 por medio de una razón de momios

Cuadro 5.2.6 Número de embriones en etapa de blastocisto y de blastocisto eclosionado a las 96 hrs. de cultivo *in vitro*, en las cuatro cepas de ratón.

Cepa	Blastocistos	Blastocistos Eclosionados	Total	%Blastocistos eclosionados
BALB/cAnN	70	8	78	10.25
BALB/cJ	152	28	180	15.55
B6	170	92	262	35.11
B6.K1	73	21	94	22.34

P < 0.00001 prueba de χ^2 .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Desarrollo *in vitro*, en etapa de mórula compacta y blastocisto.

Cuadro 5.2.7 Promedio de células en embriones en etapa de mórula compacta.

B6	B6.K1	BALB/cJ	BALB/cAnN
17.4 ± 2.17**	15.2 ± 2.41	14.6 ± 1.65***	11.9 ± 2.04

B6 - B6.K1 P = 0.005 BALB/cJ - BALB/cAnN P < 0.0001 Prueba t de student.

Cuadro 5.2.8 Promedio de células en embriones en etapa de Blastocisto.

B6	B6.K1	BALB/cJ	BALB/cAnN
36.066 ± 2.92**	33.6 ± 2.62	32.133 ± 2.71***	28.7 ± 2.21

B6 - B6.K1 P = 0.001 BALB/cJ - BALB/cAnN P < 0.0001 Prueba t de student.

Cuadro 5.2.9 Número promedio de células, en embriones pertenecientes a 4 cepas de ratón, de las 48 a las 96 hrs. de cultivo *in vitro*.

Hora	BALB/cAnN	BALB/cJ	B6	B6.K1
48	3.08	3.42	3.91	3.56
60	4.71	6.62	7.85	7.55
72	8.93	9.29	17.27	13.42
84	13.054	15.80	27.092	22.26
96	18.725	28.015	34.5	28.45

P= 0.6048 Prueba ANOVA . Los datos inferiores influyen para que no se presenten diferencias estadísticas en esta prueba

Cuadro 5.2.10 Número promedio de células en embriones de ratón pertenecientes a cuatro cepas, a las 96 hrs. de cultivo *in vitro*.

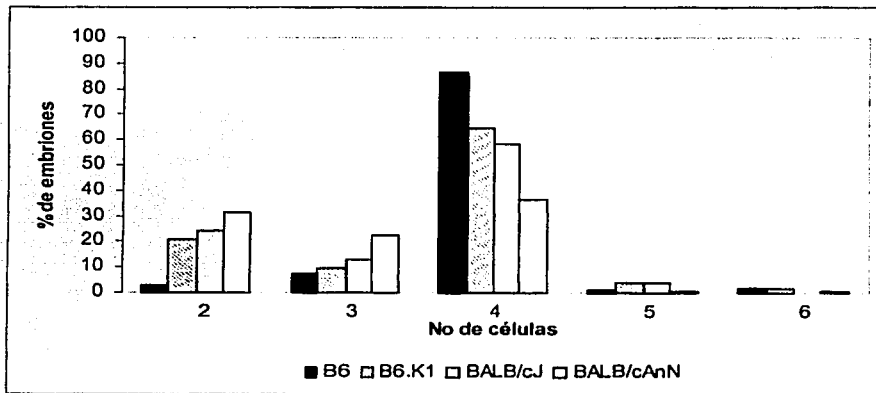
Columna 1	Columna 2
<p>B6</p> <p>34.465 (± 0.307)***</p>	<p>B6.K1</p> <p>28.449 (± 0.733)</p>
<p>B6</p> <p>34.465 (± 0.307)***</p>	<p>BALB/cJ</p> <p>28.015 (± 0.487)</p>
<p>B6</p> <p>34.465 (± 0.307)***</p>	<p>BALB/cAnN</p> <p>18.725 (± 0.606)</p>
<p>BALB/cJ</p> <p>28.015 (± 0.487)***</p>	<p>BALB/cAnN</p> <p>18.725 (± 0.606)</p>
<p>BALB/cJ</p> <p>28.015 (± 0.487)</p>	<p>B6.K1</p> <p>28.449 (± 0.733)</p>
<p>B6.K1</p> <p>28.449 (± 0.733)***</p>	<p>BALB/cAnN</p> <p>18.725 (± 0.606)</p>

Se compara la cepa de la columna 1 con la cepa de la columna 2, por medio de una comparación de medias, diferencia mínima significativa. ***P= 0.0001, entre paréntesis el error estándar.

TESIS CON
FALLA DE REGISTRO

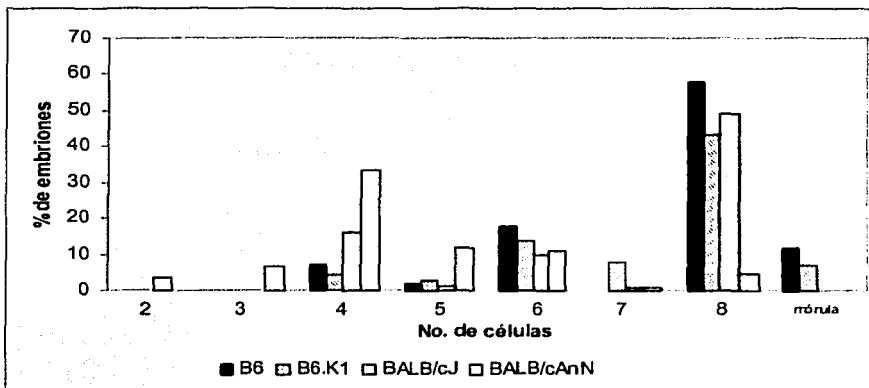
BALB/cJ 28.015 (± 0.487)	B6.K1 28.449 (± 0.733)
B6.K1 28.449 (± 0.733)***	BALB/cAnN 18.725 (± 0.606)

Se compara la cepa de la columna 1 con la cepa de la columna 2, por medio de una comparación de medias, diferencia mínima significativa. ***P= 0.0001, entre paréntesis el error estándar.

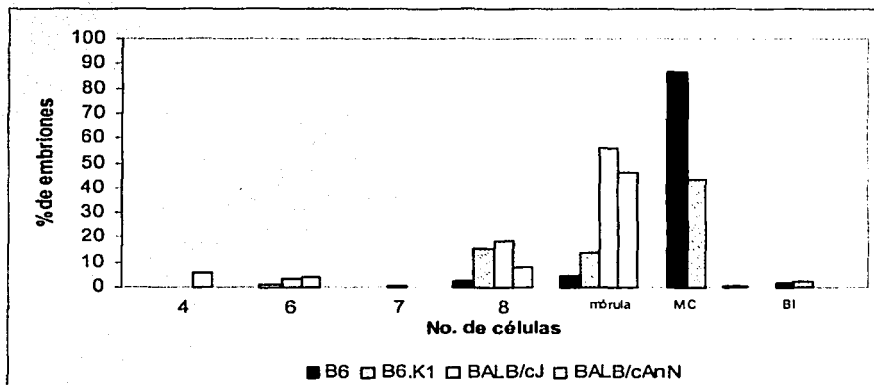


Gráfica 5.2.1 Desarrollo embrionario *in vitro* a las 48 hrs. en cuatro cepas de ratón, cada barra representa el porcentaje de embriones en los diferentes estadios.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

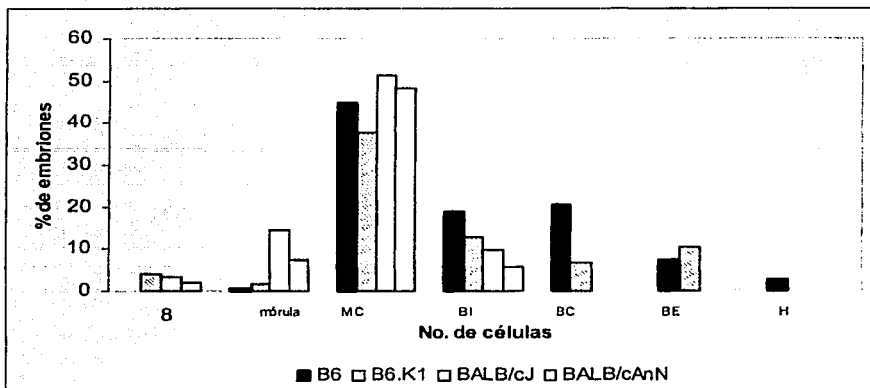


Gráfica 5.2.2. Desarrollo embrionario *in vitro* a las 60 hrs. en cuatro cepas de ratones, cada barra representa el porcentaje de embriones en los diferentes estadios.

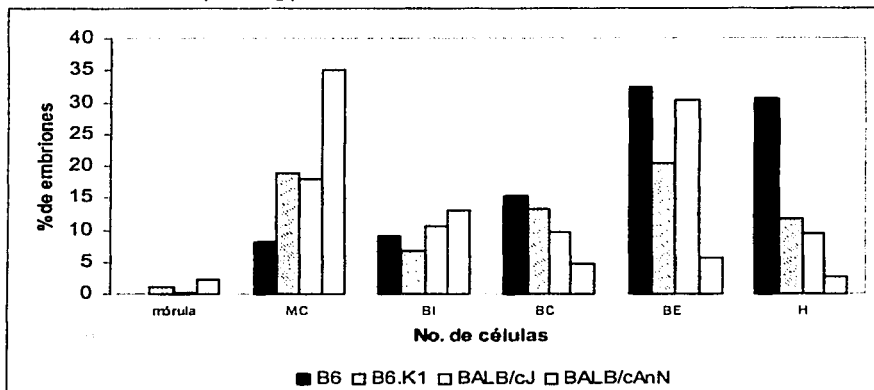


Gráfica 5.2.3 Desarrollo embrionario *in vitro* a las 72 hrs. en cuatro cepas de ratones, cada barra representa el porcentaje de embriones en los diferentes estadios. MC mórula compacta BI Blastocisto inicial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 5.2.4 Desarrollo embrionario *in vitro* a las 84 hrs. en cuatro cepas de ratones, cada barra representa el porcentaje de embriones en los diferentes estadios. MC Mórula compacta BI blastocisto inicial BC Blastocisto cavitario BE Blastocisto expandido H Blastocisto eclusionado (Hatching).



Gráfica 5.2.5 Desarrollo embrionario *in vitro* a las 96 hrs. en cuatro cepas de ratones, cada barra representa el porcentaje de embriones en los diferentes estadios. MC Mórula compacta BI blastocisto inicial BC Blastocisto cavitario BE Blastocisto expandido H Blastocisto eclusionado (Hatching).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Desarrollo embrionario a las 96 hrs. post- FIV

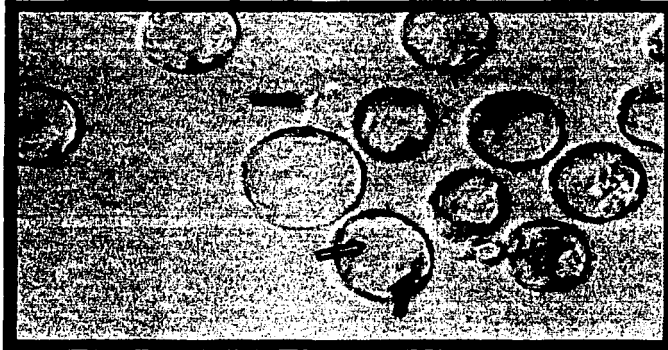


Figura 4. Embriones de la cepa B6. Se observan blastocistos expandidos y algunos que han empezado a eclosionar (hatching) flechas: en rojo, hatching; en azul, masa celular interna y en naranja blastocele.

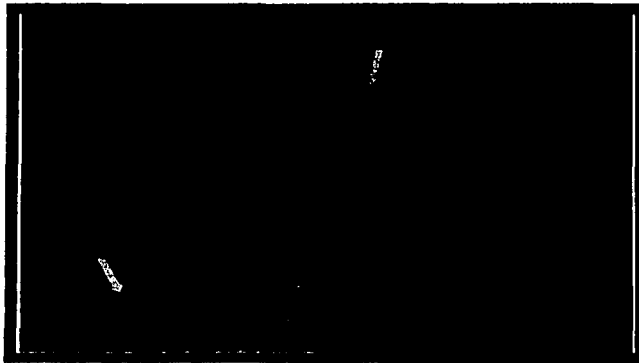


Figura 5. Embriones de la cepa B6.K1 Se observan blastocistos expandidos y cavitarios, algunos embriones están en dos células y presentan fragmentación (flechas).

RECIBO CON
FALLA DE ORIGEN

Desarrollo embrionario a las 96 hrs. post- FIV



Figura 6. Embriones de la cepa BALB/cJ. Hay presencia de blastocistos cavitarios, un blastocisto inicial. Flechas: en rojo, mórula compacta y en naranja embrión fragmentado.

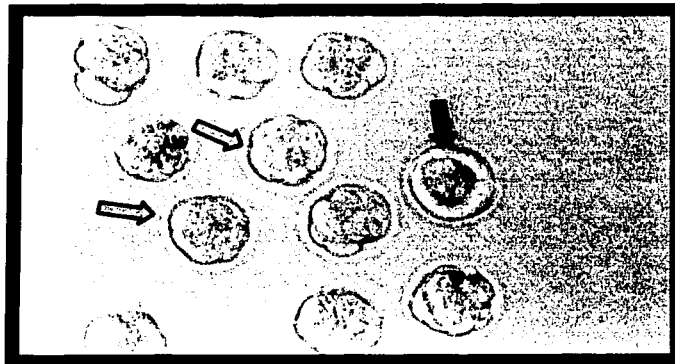


Figura 7. Embriones de la cepa BALB/cAnN. Se observan embriones en estadio de mórula compacta (flechas naranjas) y un blastocisto cavitario (flecha roja).

DISCUSION

Las funciones asociadas a Qa-2 sobre la reproducción en ratones, son importantes, porque hasta el día de hoy, la proteína Qa-2, es la única proteína que ha sido relacionada con influenciar la velocidad del desarrollo embrionario y por otra parte sus efectos sobre el tamaño de camada, son importantes desde el punto de vista productivo.

La evaluación de estas funciones en el presente trabajo, se realizó dado que en un informe previo, del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, se mostró que cepas Qa-2⁻ tuvieron un mejor desempeño reproductivo que cepas Qa-2⁺, lo cual es diferente a lo reportado para la proteína Qa-2. Para la realización del éste trabajo, se utilizó un modelo de desarrollo *in vitro* para evaluar el desarrollo embrionario y tener un mejor control del momento en que inició el mismo; ya que otros estudios el cultivo *in vitro* sólo se ha realizado a partir de la etapa de 2 células y los medios de cultivo han sido diferentes. Con lo que respecta al parámetro reproductivo, tamaño de la camada, este fue evaluado bajo dos esquemas de producción intensivo, uno monogámico y el otro poligámico, a diferencia de otros trabajos donde éste parámetro se evaluó con un esquema de producción no intensivo.

Los resultados obtenidos en el cultivo *in vitro*, presentaron diferencias en la velocidad de desarrollo embrionario; así las cepas Qa-2⁺ se desarrollaron más rápido, comparadas con las cepas Qa-2⁻ bajo un mismo fondo genético.

Otra diferencia, entre cepas Qa-2⁺ y Qa-2⁻, obtenida en este trabajo, fue sobre la viabilidad embrionaria, donde las cepas Qa-2⁺ tuvieron un mejor desarrollo en cuanto al número de embriones viables, estas diferencias no han sido reportadas, probablemente porque el cultivo *in vitro* de embriones no se ha realizado desde la fertilización.

Y con lo que respecta al parámetro reproductivo, tamaño de camada, no se encontró diferencia entre cepas Qa-2⁺ y Qa-2⁻, la función de Qa-2 sobre éste parámetro parece no mantenerse o bien no estar influenciado por esta proteína.

El ratón se ha utilizado como modelo de estudio para conocer mejor los elementos que determinan el tamaño de camada, con la finalidad de diseñar estrategias óptimas para la reproducción (Eisen and Durrant 1980 a; Eisen and Durrant 1980 b; Kochera et al., 1993; Engelen et al., 1995; Fernández et al., 1998).

El tamaño de la camada tiene un índice de herencia bajo por tanto la selección artificial para este parámetro se espera que sea bajo en la mayoría de las especies multiparas, sin embargo en el ratón la selección para el tamaño de la camada ha presentado resultados favorables (Eisen EJ. et al., 1980 a; Johnson et al., 1984).

La selección para el tamaño de camada, se ha realizado utilizando tres criterios: 1) índice de componentes (IX), en una gestación, que es un índice de ovulación y de embriones a término, éste último representado por el número de crías nacidas; 2) capacidad uterina (UT) 3) tamaño de camada (LS) y 4) control no seleccionado (LC) (Kochera et al., 1993). Estos criterios han llevado a la creación de líneas de ratones que tienen un mayor tamaño de camada.

Por otra parte un incremento en el tamaño de la camada ha sido correlacionado con un aumento en el peso corporal de la hembra al momento del apareo (Engelen et al., 1995) también se ha reportado una correlación genética entre el tamaño de la camada y el peso de la misma (Fernández et al., 1998). Otros trabajos realizados para aumentar el tamaño de camada en ratones, incluyen esquemas de cruzamiento y selección para aumentar el número de crías vivas al parto, selección en términos de ovulación, de cambios hormonales (Durrat et al., 1980 b) y de supervivencia embrionaria (Ribeiro et al., 1996).

Sin embargo, existen reportes acerca del control genético del desarrollo embrionario, donde Qa-2 influencia la velocidad del desarrollo embrionario y como efectos adicionales aumenta el tamaño de la camada, el peso al nacer y al destete (Warner et al., 1998).

En el presente trabajo se evaluó la relevancia de Qa-2 en el tamaño de la camada, la cual es importante por las implicaciones reproductivas y económicas.

El tamaño de la camada se evaluó en cuatro cepas de ratones; obteniéndose en la cepa B6 resultados inferiores a los reportados. Los laboratorios Jackson reportan para la cepa B6 un promedio de crías por parto de 7.0 y los laboratorios Harland reporta un promedio de 6.5 crías por parto; por otra parte Eskola et al., (1999) obtienen resultados similares con 5.9 crías por parto; en contraste en el estudio realizado por Ramírez et al., (1992), en el instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, donde evaluó el desempeño reproductivo de B6, obtuvo resultados inferiores con un promedio de crías por parto de 4.48.

Al respecto del comportamiento de las sublíneas BALB/cAnN y BALB/cJ, aún cuando son endogámicas al igual que B6, los resultados obtenidos en el tamaño de la camada no difieren con lo reportado por los laboratorios Jackson. Además en BALB/cAnN los resultados obtenidos fueron semejantes a los reportados por Eskola et al., (1999) y por Ramírez et al., (1992); ésta cepa fue la que presentó valores más consistentes y concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores, en éste caso en particular un elemento diferente a las otras tres cepas es el temperamento más dócil de BALB/cAnN y probablemente esto le permite adaptarse mejor a los diferentes sistemas de producción y de manejo, presentando valores semejantes para el tamaño de camada en diferentes ambientes, y el ser más dócil puede corresponderse con un mejor instinto materno que le ayudo a destetar más crías.

Al comparar los resultados del tamaño de la camada en cepas Qa-2 positivas y Qa-2 negativas, durante el segundo período, no se encontró diferencia estadística entre ellas, lo que resulta contradictorio a lo reportado previamente utilizando a las cepas congénicas B6.K1 (Qa-2-) y B6.K2 (Qa-2+) (Warner et al., 1991). Estas diferencias pueden deberse a que el tamaño de camada puede estar afectado tanto por el ambiente, por el sistema de reproducción y por factores genéticos que están representados por las diferentes cepas de ratones. Los trabajos para aumentar el número de crías por parto, han tenido avances prometedores en forma parcial, porque las líneas desarrolladas para esta finalidad deben seguir un adecuado sistema de cruzamiento, sin embargo se afecta la

respuesta a la selección por la endogamia; se ha comprobado que la heterosis (vigor híbrido) confiere estabilidad y los individuos que la poseen son menos sensibles a los cambios ambientales (Davis et al.,1991) y la endogamia afecta negativamente al parámetro tamaño de la camada, lo que probablemente afecto a la cepa B6 (Hafez 1978); aunque otros factores intrínsecos pueden estar influenciando el desempeño reproductivo de las cepas.

Aún falta conocer mucho acerca de los factores que pueden estar influenciando el tamaño de camada, ya que una sola característica bajo dos ambientes diferentes no siempre es la misma. Esto podría explicar las discrepancias entre este trabajo y los trabajos de Warner (1991; 1998) y Exley (1999) al respecto de la relevancia de Qa-2 en el tamaño de la camada. Así las cepas positivas a Qa-2 pueden responder en forma diferente al ambiente. Otro elemento que puede influir es la alimentación y lo hace directa o indirectamente sobre la viabilidad de los embriones en forma negativa, Pomp et al., (1991) no mencionan un efecto en el tamaño de camada, pero si una relación entre el genotipo, el porcentaje de energía en la dieta y un aumento en las pérdidas embrionarias en embriones pre y post-implantados.

Un punto importante a mencionar es el sistema de producción, que en las camadas evaluadas fue monogámico intensivo, en el primer período y poligámico intensivo durante el segundo período, mientras que en los trabajos de Warner et al., (1991) las hembras no estuvieron sujetas a un sistema de producción específico, sólo aquellas en las que se detectó el estro se colocaron con el macho y se transfirieron a jaulas separadas al dar positivas a la presencia de un tapón de cruza; así el número de camadas evaluadas fue menor y en otras condiciones.

Por otra parte habría que considerar si las líneas seleccionadas para aumentar el número de camada, se correlacionan con la presencia y magnitud de de Qa-2.

Dentro de los efectos de Qa-2 sobre la reproducción también resultan importantes el peso de la camada o peso al nacer; y el peso al destete, ya que son características que han sido utilizadas para seleccionar líneas de ratones y

aumentar el tamaño de camada; de tal forma que al seleccionar hacia un mayor peso al nacer durante siete generaciones, se obtiene un aumento en el tamaño de camada (Fernández et al 1998) y de igual manera se obtiene un aumento en la camada al seleccionar hembras por su peso al destete (Eisen et al., 1980); esto se correlacionaría claramente con una influencia de Qa-2. Es importante tener en cuenta que las líneas seleccionadas para aumentar el tamaño de camada presentan diferencias hasta de 4 crías y tienen hasta 16 crías por camada, lo cual si es un contraste enorme con el tamaño de camada en cepas Qa-2 positivas y negativas de este trabajo, que al ser cepas endogámicas se reporta un rango para el tamaño de camada de 5.4 a 7.0 crías por parto.

Al respecto de los otros parámetros evaluados: promedio de partos por hembra, número de crías destetadas, porcentaje de mortalidad y estro post-parto fértil, durante el primer periodo sólo se obtuvieron datos de las cepas B6 y BALB/cAnN, por lo cual aunque son fondos genéticos diferentes se llevo a cabo la comparación entre ellas; el promedio de partos, las crías destetadas por parto y el estro post-parto fértil, tuvieron una diferencia significativa favorable a la cepa BALB/cAnN (Qa-2-) Tomando en conjunto los parámetros evaluados la cepa que tuvo el mejor desempeño reproductivo, fue la cepa BALB/cAnN, al tener un mayor número de partos, como consecuencia de un mayor número de estros post-parto fértiles, y aunque no hubo diferencia en el tamaño de camada, al tener un menor porcentaje de crías muertas esto le permitió destetar más crías por parto, lo que actuó en forma directa y positiva para obtener un mejor índice de eficiencia reproductiva, en 11 de las 12 generaciones filiales de estudio; estos datos se corresponden a los presentados por Ramírez et al., (1992).

Los resultados obtenidos, durante el segundo periodo, en el parámetro tamaño de camada no existió diferencia entre las cepas Qa-2⁺ y Qa-2⁻.

En el parámetro crías destetadas por parto tampoco hubo diferencia entre B6 - B6.K1 y BALB/cAnN - BALB/cJ. En cuanto al parámetro número de partos por hembra, en el segundo periodo B6 tuvo más partos que B6.K1 y BALB/cAnN

tuvo más partos por hembra que BALB/cJ. Sin embargo estos dos parámetros no están bajo influencia de Qa-2.

Desarrollo Preimplantatorio *in vitro*.

En el presente trabajo se buscaron las mejores condiciones de cultivo, para eliminar la influencia de los factores ambientales y con ello evaluar el desarrollo dado por la cepa de ratón asociada con la presencia de la proteína Qa-2; tomando en cuenta el medio de cultivo a utilizar, el número de embriones y el volumen del medio de cultivo.

Varios trabajos han mostrado diferencias en la velocidad de desarrollo *in vitro* en el ratón (Erbach et al., 1994), por su parte Scott (1996) mostró que el medio de desarrollo ejerce influencia en el desarrollo *in vitro*, y al utilizar diferentes medios de cultivo, algunos de ellos retrasaron más el desarrollo embrionario, aunque las diferencias existentes entre las cepas utilizadas se mantuvieron; por su parte Warner (1988) utilizó embriones de cepas congénicas cultivados en medio Whitten y también encontró diferencias en el desarrollo, en este caso fueron asociadas a la presencia de Qa-2, y en el presente trabajo se utilizó el medio mKSOM, que es mejor para el cultivo *in vitro* que el medio Whitten y también se encontraron diferencias en la velocidad de desarrollo, utilizando cepas endogámicas y una cepa congénica, la diferencia en el desarrollo también se encontró asociada con la presencia de Qa-2.

Así los resultados obtenidos presentan diferencias en la velocidad de desarrollo entre las cepas Qa-2 positivas y negativas, utilizadas en el presente trabajo. El inicio del desarrollo embrionario fue sincrónico en las cuatro cepas utilizadas, desde el momento de la fertilización, hasta la primera segmentación; aunque posteriormente B6 se vio favorecida con una mayor velocidad de desarrollo. Sin embargo no podemos descartar que los embriones B6 tengan una mayor velocidad de desarrollo en la primera segmentación, ya que el intervalo para la evaluación del desarrollo fue de 12 hrs. y se ha mencionado que el tiempo de la primera segmentación puede ser desde 18 a 24 hrs. dependiendo la cepa que se utilice. Para BALB/c Niwa (1980) menciona un promedio de 24.8 hrs.

para la primera segmentación y reporta un tiempo de 20 hrs. para la primera segmentación en la cepa B6; el considerar que B6 se desarrolla más rápido en la primera segmentación tendría una influencia directa en la segunda segmentación ya que a partir de las 48 hrs. se observó diferente grado de desarrollo y diferentes estadios embrionarios, en B6 la mayor parte de los embriones estuvieron en cuatro células y en B6.K1 se presentaron embriones en etapa de 3 y 2 células. Considerando que B6 y B6.k1 difieren principalmente en la expresión de Qa-2, esta proteína clase Ib podría tener efectos importantes desde la primera segmentación. Con lo que respecta a BALB/c ambas sublíneas BALB/c tuvieron más embriones en el estadio de dos células, lo que puede correlacionarse con un menor desarrollo o bien estar asociado con el fenómeno conocido como arresto en dos células, que esta presente en BALB/c (Fraser, 1994). El bloqueo coincide con el tiempo de activación de genoma embrionario, que en el ratón es en la etapa de dos células y al presentar fallas en la activación se presentaría el arresto; de igual manera esta presente una mayor asincronía en la segunda segmentación ya que diferencias en la segmentación han sido encontradas por Piotrowska (2001) y estas diferencias en la segunda segmentación contribuyen a retrasar el desarrollo embrionario: Este fenómeno podría explicar en parte porque las sublíneas BALB/c presentaron más embriones en 3 células; como resultado de un desarrollo asincrónico de los blastómeros.

Otro factor que puede estar influenciando el desarrollo y por el cual los embriones B6 se desarrollan sincrónicamente es la presencia de Qa-2 que de acuerdo a Warner (1998) se empieza a expresar a partir del segundo ciclo celular y coincide con la activación del genoma embrionario

Otro evento importante en el desarrollo preimplantacional lo constituye la compactación del embrión, en esta etapa fue evidente una diferencia en la velocidad de desarrollo, donde para B6 y B6.K1 los embriones empezaron a compactarse a las 72 hrs., mientras que en BALB/cJ este evento inicio hasta las 84 hrs., al igual que en BALB/cAnN, en ésta última sólo 2 embriones se habían compactado a las 72 hrs.; cabe mencionar que los embriones BALB/cJ y

BALB/cAnN se compactaron con un número menor de células con respecto a las otras 2 cepas de ratones, (cuadro 5.2.7) esto es posible ya que este evento ha mostrado ser independiente de la replicación del DNA (Smith et al., 1985) y se puede llevar a cabo sin llegar a un número determinado de células en el desarrollo (cuadro 5.2.9).

Hacia el final del cultivo *in vitro* presentaron diferencias en la velocidad del desarrollo; así la cepa B6 presentó un 91.60 % de blastocistos y un 8.4 % de mórulas compactas; B6.K1 tuvo 73.42% de blastocistos y 26.56% de mórulas compactas, cabe aclarar que estos porcentajes fueron en base al número de embriones viables (cuadro 5.2.5).

Con respecto a BALB/c, el número de mórulas compactas a las 84 horas fue similar en las dos sublíneas (gráfica 5.2.4), sin embargo BALB/cJ, mostró una mayor velocidad de desarrollo en las últimas 12 hrs. con respecto a BALB/cAnN, la cual a las 96 hrs. aún tuvo un porcentaje del 35 % de mórulas compactas, lo que evidencia un claro retraso en la velocidad de desarrollo, sin embargo no podemos saber si los embriones BALB/cAnN que estuvieron en mórula compacta hacia las 96 hrs. continuarían su desarrollo por 12 ó 24 hrs. más ya que el cultivo *in vitro* se interrumpió a las 96 hrs.

El porcentaje de blastocistos obtenidos para B6, en este trabajo, fue mayor a los reportados por Suzuki (1996) donde el período de cultivo utilizado se extendió hasta las 120 hrs. post-*in vitro* fertilización, aunque este desarrollo lento probablemente estuvo influenciado por su cultivo en el medio Whitten. B6 fue la cepa que presentó un mejor desarrollo tanto en cantidad como en velocidad, en segundo lugar estuvieron BALB/cJ y B6.K1, entre estas dos cepas no hubo diferencia en el desarrollo a las 96 hrs.

La presencia de Qa-2 mejoró el desarrollo de BALB/cJ con respecto a BALB/cAnN que fue la cepa que tuvo el menor desarrollo y un porcentaje de viabilidad inferior a las otras 3 cepas.

Warner (1992) utilizó la cepa congénica B6.K2, que es Qa-2 positiva, y su velocidad de desarrollo fue mayor a B6.K1; sin embargo B6 tiene un mayor

número de células que B6.K2, porque en ésta última Qa-2 es codificada sólo por el gen Q9 (Warner et al.,1998), mientras que en B6 esta codificada por Q7 y Q9, que codifican una mayor cantidad de mRNAs produciendo así una mayor cantidad de proteína Qa-2 y por consecuencia se desarrollará más rápido.

El desarrollo similar entre BALB/cJ (Qa-2 +) y B6.K1 (Qa-2-), que tienen un fondo genético diferente, es compatible con la presencia de otros factores que pudieron influir en la velocidad de desarrollo y le permitieron a B6.K1 desarrollarse a una velocidad semejante a BALB/cJ; dichos factores podrían no expresarse en BALB/cAnN (Qa-2⁻) que fue la cepa que tuvo el desarrollo embrionario más lento.

Qa-2 sólo fue detectada por inmunofluorescencia en etapa de mórula compacta y blastocisto; sin embargo esto no es excluyente de que no este presente en etapas anteriores, la dificultad para la localización por inmunofluorescencia concuerda con diferentes estudios, donde se reportan resultados variables, en algunos casos proteínas del MHC, en humanos, han sido detectadas por medio de inmunofluorescencia, sin embargo otros autores mencionan que no están presentes (Fernández, 1999); la presencia de Qa-2 en bajas cantidades, así como su localización pueden estar influyendo para dar estos resultados variables. Aunque la técnica de inmunofluorescencia ha sido utilizada con éxito para detectar a la proteína Qa-2 en espermatozoides (Ungchusri et al., 2001), en embriones se obtienen resultados variables. Es posible que procedimientos más sensibles, como la técnica de RT-PCR nos permitieran identificar mRNA de Qa-2, en etapas anteriores a mórula compacta y blastocisto.

Considerando los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros reproductivos así como los del desarrollo embrionario *in vitro*, es evidente que los embriones B6 que tuvieron el mejor desarrollo, no afectaron el tamaño de camada *in vivo*, resultados compatibles con las observaciones de Warner et al., (1999) de que un desarrollo embrionario más rápido no conduce a que haya una implantación temprana de los embriones más desarrollados, ya que es hasta la mitad de la gestación donde se han encontrado un mayor número de embriones

Qa-2 positivos. Sin embargo otros factores deben estar influenciando este fenómeno probablemente factores de crecimiento presentes en el ambiente uterino, o una interacción entre los mismos embriones; lo que pudiera explicar que las sublíneas BALB/c tuvieran camadas similares en número a B6. Si bien Warner (1991) menciona que las camadas de ratones Qa-2 positivas tienden a ser mayores, en número y peso con respecto a cepas Qa-2 negativas, no siempre los embriones más desarrollados influirán de manera positiva en el tamaño de camada y parece existir interacción entre los embriones con un desarrollo más lento que les permiten mantenerse viables Young et al., (1993).

Si Qa-2 influencia la velocidad de desarrollo embrionario, la forma por la cual aumenta el tamaño de camada debe ser muy sensible a los factores ambientales y los efectos de Qa-2 sobre el peso al nacer y peso al destete pueden ser secundarios,

En las cepas Qa-2 positivas, los embriones al tener un desarrollo sincrónico con el ambiente uterino, tomarán ventaja de ello y no serán tan sensibles como los embriones Qa-2 negativos a una diferencia en el ambiente uterino. Y en las cepas Qa-2 negativas, la interacción entre ellos puede ayudarles a superar efectos de asincronía uterina y resultar en camadas similares en número a las cepas Qa-2 positivas; pero tendrán un menor peso como efecto del ambiente uterino; en cerdos ha sido comprobada la influencia del ambiente uterino sobre el peso de los productos (Wilson et al., 2001).

En conclusión en éste trabajo se encontró que el desarrollo preimplantacional *in vitro* estuvo influenciado por la proteína Qa-2, la influencia fue sobre la velocidad de desarrollo. Así las cepas Qa-2 positivas se desarrollaron mejor que las cepas Qa-2 negativas; también Qa-2 influyó de manera positiva la viabilidad embrionaria. Se presentan evidencias que involucran otros elementos en la velocidad de desarrollo, al no existir diferencia en el desarrollo entre una cepa Qa-2 positiva, BALB/cJ, y una negativa, B6.K1, donde el fondo genético puede contribuir a enmascarar el efecto de Qa-2.

Por otra parte los resultados obtenidos en el análisis de los parámetros reproductivos no muestran influencia de Qa-2, al no existir diferencia en el tamaño de camada entre cepas Qa-2 positivas y negativas.

8. – Anexo 1

8.1. Protocolo para la detección de Qa-2 en embriones por inmunofluorescencia.

- Remover la zona pellucida, con pronasa 5% en M2.
- Lavar 2 veces los embriones/ovocitos sin zona pelúcida en PBS/PVP (3 mg/ml polivinylpirrolidona) durante 15 minutos
- Fijar los embriones/ovocitos en paraformaldehído 3.7%, 60 minutos.
- Todos los pasos siguientes son realizados a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- Lavar los embriones en 2 gotas de PBS/PVP 15 minutos.
- Permeabilizar los embriones en 0.1% triton X-100/PBS por 5 minutos.
- Lavar los embriones en 2 gotas de PBS/PVP 15 minutos, por lavado.
- Colocar los embriones en solución bloqueadora (0.1 % BSA , 0.01 % tween 20 PBS) por 15 minutos.
- Todos los siguientes pasos son realizados en solución bloqueadora.
- Incubar los embriones con el Anticuerpo primario, monoclonal antiQa-2 (clona 1-1-2) Pharmigen; en una dilución 1:100. durante 12 hrs.
- Lavar los embriones en 4 gotas de solución bloqueadora, 15 minutos por gota.
- Incubar en el anticuerpo secundario, IgG antimouse (H + L) conjugado con el fluorocromo rojo Texas a una dilución 1:100.
- Lavar en 4 gotas de solución bloqueadora, 15 minutos por gota.
- Montar con vectaShield. Y observar bajo el microscopio de luz ultravioleta. (Diaz-Cueto et al., 2000)

9.- REFERENCIAS

- Biggers JD, McGinnis LK, Raffin M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod* 2000; 63: 281 – 293.
- Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, Parsons JH. Development of spare human preimplantation embryos *in vitro*: An analysis of the correlation among gross morphology, cleavage rates and development to the blastocyst. *J In vitro Fertil Emb Trans* 1989; 6: 30 – 35.
- Braud VM, Allan DS, McMichael AJ. Functions of nonclassical MHC and non-MHC- encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 100 – 8.
- Brownell MS, Warner CM. Ped gene expression by embryos cultured in vitro. *Biol Reprod* 1988; 39: 806 – 811.
- Bouvier M. Accessory proteins and the assembly of human class I molecules: a molecular and structural perspective. *Mol Immunol* 2003; 39: 697-706.
- Cai W, Cao W, Wu L, Exley GE, Waneck GL, Karger BL, Warner CM. Sequence and transcription of Qa-2 encoding genes in mouse lymphocytes and blastocysts. *Immunogenetics*. 1996; 45: 97 – 107.
- Choudhury SR and Knapp LA. Human reproductive failure II: immunogenetic and interacting factors. Review *Hum Reprod Update*. 2000; 7 :135-60.
- Das BG, Gould DS, Augustine MM, Fragoso G, Sciutto E, Stroynowski I, Kaer LV, Schust D, Ploegh H, Janewy Ch A Jr. Qa-2-dependent selection of CD8 α/α T cell receptor α/β cells in murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 1521 – 1527.
- Davis JA. And Lamberson WR. Effect of heterosis on performance of mice differentiation and preimplantation cell growth. *Hum Reprod* 1994; 9: 1730-1732.
- Diaz-Cueto L., Stein P, Jacobs A, Schultz RM, Gerton GL. Modulation of preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor) *Dev Biol* 2000; 217: 406-418.
- Durrat BS., Eisen EJ. and Ulberg LC. Ovulation rate, embryo survival and ovarian sensitivity to gonadotrophins in mice selected for litter size and body weight.

- J Reprod Fert 1980; 59: 329 – 339.
- Edidin, M. MHC antigens and non-immune functions. Immunology Today 1983; 4: 269-70.
- Eisen EJ and Durrant BS. Genetic and maternal environmental factors influencing litter size and reproductive efficiency in mice. J Anim Sci 1980 a; 50: 428-441.
- Eisen EJ and Durrant BS. Effects of the maternal environment and selection for litter size and body weight and biomass and feed efficiency in mice. J Anim Sci 1980 b; 50: 664-679.
- Engelen van MAJ., Nielsen MK and Ribeiro A. Differences in pup birth weight, pup variability within litters, and Dam weight of mice selected for alternative criteria to increase litter size. J Ani Sci 1995; 73: 1948-1953 .
- Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, biggers JD. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. Biol Reprod 1994; 50: 1027 – 1033.
- Eskola S and Kaliste-Korhonen E. Nesting material and number of females per cage: effects on mouse productivity in BALB/c, C57BL/6J, DBA/2 and NIH/S mice. Lab Anim 1999; 33: 122 – 128.
- Exley GE and Warner CM. Selection in favor of the *Ped fast* haplotype occurs between mid-gestation and birth. Immunogenetics 1999; 49: 653 – 659.
- Fahrner K, Hogan BLM, Flavell RA. Transcription of H-2 and Qa genes in embryonic and adult mice. EMBO J 1987; 6: 1265 – 1271.
- Fernández N, Cooper J, Sprinks M, Dealtry G. Impaired reproduction of the β_2 -M deficient transgenic mouse. Hum Immunol 1996; 47: 146 Abst.
- Fernández N, Cooper J, Sprinks M, AbdElrahman H, Fiszer D, Kurpisz M, Dealtry G. A critical review of the role of the major histocompatibility complex in fertilization, preimplantation development and feto-maternal interactions. Hum Reprod 1999; 5: 234 – 248.

- Fernández J., Moreno A., Gutiérrez JP., Nieto B., Piqueras P. and Salgado C. Direct and correlated selection response for litter size and litter weight at birth in the first parity in mice. *Livestock Prod Sci* 1998; 53: 217-223.
- Flaherty L, Elliot E, Tine JA, Walsh AC, Waters JB. Immunogenetics of the Q and TL regions of the mouse. *Crit. Rev Immunol* 1990; 10: 131 – 175.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Govezensky T, Sciotto E. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology* 1996; 112: 119 – 124.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernández M, Sciotto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cisticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Inf Immun* 1998; 66: 760 – 64.
- Fraser LR. In vitro capacitation and Fertilization in: Wassarman PM and DePamphilis ML, editors. *Guide to techniques in mouse development* Meth Enz Academic Press 1994 239 – 263.
- Gill TJ Mechanisms of action of Major –Histocompatibility-Complex-Linked genes affecting reproduction. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41: 23 – 33.
- Goldbard SB Warner CM. Genes affect the timing of early mouse embryo development. *Biol Reprod* 1982; 27: 419 – 424.
- Goldbard SB, Verbanac KM, Warner CM. Role of the H2 complex in preimplantation mouse embryo development. *Biol Reprod* 1982; 26: 591 – 596.
- Hafez, E S E. *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Lea and Febiger, Philadelphia, USA, 1978.
- He XL, Tabaczewski P, Ho J, Stroynowski I. Promiscuous antigen presentation by the nonclassical MHC Ib Qa-2 is enable by a shallow, hydrophobic groove and self-stabilized peptide conformation. *Structure* 2001; 9: 1213 – 1224.
- Ho Y, Wigglesworth, Eppig JJ, Schultz RM. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: Augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol Reprod Dev*. 1995; 41: 232 – 238.

- Johnson RK, Zimmerman DR and Kittok RI : Selection for components of reproduction in swine. *Livestock Prod Sci* 1984; 11: 544-558.
- Juriscicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 161-5.
- Ke X, Warner CM. Role of Ped gene expression by TAP protein. *J Reprod Immunol* 2000; 46: 1 – 15.
- Kochera KY and Nielsen MK. Alternative Methods of selection for litter size in mice: III. Response to 21 generations of selection. *J Anim Sci* 1993 71: 571-578.
- Kochhar HPS, Peippo J, King WA. Sex related embryo development. *Theriogenology* 2001; 55: 3 – 14.
- Lane M, Gardner DK. Effect of incubation volumen and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod* 1992; 7: 558 – 562.
- LeBouteiller P. HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* 1994; 14: 89
- McElhinny AS, Kadow N, Warner C. The expression pattern of the Qa-2 antigen in mouse preimplantation embryos and its correlation with the Ped gen phenotype. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 966 – 971.
- McElhinny AS, Warner CM. Cross-linking of Qa-2 protein, the Ped gene product, increases the cleavage rate of C57BL/6 preimplantation mouse embryos. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 517 – 522.
- McElhinny AS, Exley GE, Warner CM. Painting Qa-2 onto Ped slow preimplantation embryos increases the rate of cleavage. 2000; 44: 52 – 58.
- Mellor AL, Antoniou J, Robinson PJ. Structure and expresión of genes encoding murine Qa-2 class I antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5920 – 4.
- Mittwoch U. Blastocysts prepare for the race to be male. *Hum Reprod* 1993; 8: 1550 – 1555.

NOVA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Montag M, Koll B, Holmes P, Ven van der H. Significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts in vitro versus in vivo. *Biol Reprod* 2000; 62: 1738 – 1744.
- Nakayama K, Tokito C, Pannetier C, Nakauchi H, Gachelin G. MHC gene Q8/9^d of the BALB/cJ mouse strain cannot encode a Qa-2,3 class I antigen. *Immunogenetics* 1991; 33: 225 – 234.
- Niederkorn JY, Chiang EY, Ungchusri T and Stroynowski I. Expression of a nonclassical MHC class Ib molecule in the eye. *Transplantation* 1999; 15; 68(11):1790-9.
- Niwa K., Araki M. and Iritani A. Fertilization in vitro of eggs and first cleavage of ovarian sensitivity to gonadotrophins in mice selected for litter size and body weight. 1980 *J Reprod Fert* 59 329 – 339.
- O’neill A, Reid K, Garberi JC, Karl M, Flaherty L. Extensive deletions in the Q region of the mouse major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 1986; 24: 368 – 373.
- Peipo J. and Bredbacka P. Sex-related growth differences in mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro. *Mol Repro Dev* 1995; 40: 56-61.
- Pergament E., Fiddler M., Cho N., Johnson D. and Holmgren WJ. Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Hum Reprod* 1994; 9: 1730-1732.
- Piotrowska K, Wianny F, Pedersen RA, Zernicka-Goetz M. Blastomeres arising from the first cleavage division distinguishable fates in normal mouse development. *Development* 2001; 128: 3739 – 48.
- Pomp D and Eisen J. Genetic variation in reproductive responses to a high-energy diet in mice. *J Ani Sci* 1991; 69: 1875 – 1874.
- Poole T. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals Blackwell Science 1999.
- Potter M. History of the BALB/c Family. *Curr. Top Microbiol Immunol* 1985; 22: 100-120.

- Ramírez SS. Aplicación de un método reproductivo y un sistema genético para ratones endogámicos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Tesis de Licenciatura. Fac Med Vet y Zootec Universidad Nacional Autónoma de México. México DF 1992.
- Ribeiro A., Engelen van MAJ and Nielsen MK. . Embryonal survival to 6 days in mice selected on different criteria for litter size. *J Ani Sci* 1996; 74: 610 – 615.
- Roderick TH, Lanagley SH and Leiter EH. Genetic differences in BALB/c sublimes. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1985; 122: 9-18.
- Scott L and Whittingham DG. Influence of genetic background and media components on the development of mouse embryos in vitro. *Mol Reprod Dev* 1996; 43: 336 – 346.
- Smith RK and Johnson M. DNA replication and compaction in the cleaving embryos of the mouse. *J Embryol Exp Morph* 1985; 89: 133-148.
- Steel RG y Torrie JH. Bioestadística: Principios y procedimientos Mc Graw Hill México 1990.
- Stroynowski I. Tissue –specific, peptide-binding transplantation antigens: lessons from the Qa-2 System. *Immunol Rev* 1995; 147: 90 – 108.
- Stroynowski I. Molecules related to class-I major histocompatibility complex antigens. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 501 – 30.
- Summers MC, Bhatnagar PR, Lawitts JA, Biggers J. Fertilization in vitro of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM. *Biol Reprod* 1995; 53: 431 – 437.
- Suzuki O., Asano T., Yamamoto Y., Takano K and Koura M. . Development in vitro of preimplantation embryos from 55 mouse strains. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 975-980.
- Tabaczewski P. Shirwan H, Lewis K and Stroynowski I. Alternative splicing of class Ib major histocompatibility complex transcripts in vivo leads to the expresión

- of soluble Qa-2 molecules in murine blood. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91 (5): 1883-7.
- Tarin JJ. Do the fastest concepti have a shorter life span ? *Hum Reprod* 1997; 12: 885 – 889.
- Tian Z, Xu Y, Warner CM. Removal of Qa-2 antigen alters the Ped gene phenotype of preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 1992; 47: 271 – 276.
- Tyan ML. Fetal weight at term influenced by H-2 associated loci. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994; 205: 85 – 88.
- Ulker N, Lewis KD, Hood LE, Strynowsky I. Activated T cells transcribe an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of Qa-2 antigen. *EMBO J* 1990; 9: 3839.
- Ungchusri T, Chiang EY, Brown G, Chen M, Tabaczewski P, Timares L, Strynowski I. Widespread expression of the nonclassical class I Qa-2 antigens in hemopoietic and nonhemopoietic cells. *Immunogenetics* 2001; 53: 455 – 467.
- Wang Q and Flaherty L. Developmental expression of the mouse MHC genes. *Eur J Immunogenet* 1996; 23: 121 – 127.
- Warner C. Genetic manipulation of the major histocompatibility complex. *Biol Reprod* 1986; 63: 279 – 287.
- Warner CM, Almquist CD, Toulimat MH, Xu Yuanxin. Induction of embryonic major histocompatibility complex antigen expression by gamma IFN. *J Reprod Immunol* 1993; 24: 111 – 121.
- Warner C, Brownell Ms, Ewoldsen M. Why aren't embryos immunologically rejected by their mothers? *Biol Reprod* 1988; 38: 17 – 29.
- Warner CM, Browell MS, Rothschild M. Analysis of litter size and weight in mice differing in Ped gene phenotype and the Q region of the H-2 complex. *J Reprod Immunol* 1991; 19: 303 – 313.

- Warner CM, Cao W, Exley GE, McElhinny AS, Alinaki M, Cohen J, Scott RT, Brenner CA. Genetic regulation of egg and embryo survival. *Hum Reprod* 1998; 13: 178 – 191.
- Warner CM, Exley GE, McElhinny AS, Tang CH. Genetic regulation of preimplantation mouse embryo survival. *J Exp Med Zoo* 1998; 282: 272-279.
- Warner CM, Gollnik SO, Flaherty L, Goldbard SB. Analysis of Qa-2 antigen expression by preimplantation mouse embryos: possible relationship to the preimplantation-embryo-development (Ped) gene product. *Biol Reprod* 1987a; 36: 611 – 616.
- Warner CM, Gollnick SO, Goldbard S. Linkage of the mouse preimplantation-embryo-development (Ped) gene of the mouse major histocompatibility complex (MHC) *Biol Reprod* 1987; 36: 606 – 610.
- Warner CM, McElhinny AS, Wu L, Cieluch C, Ke X, Cao W, Tang C, Exley GE. Role of the Ped gene and apoptosis genes in control of preimplantation development. *J Ass Reprod Gen* 1998; 15: 331 – 334.
- Warner CM, Panda P, Almquist CD, Xu Y. Preferential survival of mice expression the Qa-2 antigen. 1993; 99: 145 – 147.
- Wilmut I, Sales DI, Asworth Cj. Maternal and embryonic factors associated with perinatal loss in mammals. *J Reprod Fertil* 1986; 76: 851 – 864.
- Wilson ME., Vonnahme KA nad Ford SP. The role of altered uterine-embryo synchrony on conceptus growth in the pig. *J Ani Sci* 2001; 79: 1863-1867.
- Wu L, Exely GE, Warner CM. Differential expression of Ped gene candidates in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 1998; 59: 941 – 952.
- Wu L, Feng H, Warner CM. Identification of the two histocompatibility complex class 1b genes, Q7 and Q9, as the Ped gene in the mouse. *Biol Reprod* 1999; 60: 1114 – 1119.
- Xu Y, Jin P, Mellor A, Warner CM. Identification of the Ped gene at the molecular level: the Q9 MHC Class 1 transgene converts the Ped slow to the Ped fast phenotype. *Biol Reprod* 1994; 51: 695 – 699.

- Xu Y, Jin P, Warner CM.. Modulation of preimplantation embryonic development by antisense oligonucleotides to major histocompatibility complex genes. *Biol Reprod* 1993; 48: 1042 – 1046.
- Yang Y. Generation of major histocompatibility complex class I antigens. *Microb Infect* 2003; 5: 39 - 47.
- Young CR., Ford SP., McGinnis LK. and Anderson LH. Investigations into the control of litter size in swine: I. Comparative studies on in vitro development of meishan and Yorkshire preimplantation embryos. *J Ani Sci* 1993; 71: 1561-1565