



105
24

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



MANTENIMIENTO DE UNA COLONIA DE RATONES
GNOTOBIOTICOS SPF HETEROCIGOTOS CON
DOBLE TRANSLOCACION ROBERTSONIANA PARA
OBTENER EMBRIONES TRISOMICOS

T E S I S

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MARTHA PATRICIA SILVA BUENROSTRO

ASESOR: MVZ. SILVIANO TREJO NUÑEZ

COASESOR: DR. CARLOS OROZCO BUENROSTRO



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 está 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.

INDICE

	PAG
I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	2
II.1. Antecedentes.	
II.2. Aspectos generales.	
II.3. Planteamiento del problema.	
III.- OBJETIVOS	9
IV.- MATERIAL Y METODOS	10
IV.1. Apareamiento de machos heterocigotos con hembras Balb/c.	
IV.2. Cuidado y manejo especiales de los ratones.	
IV.3. Monitoreo del aire y agua.	
IV.4. Esterilización del alimento, agua y cama de aserrín.	
V.- RESULTADOS	18
V.1. Muestreo del aire acondicionado.	
V.2. Muestreo del aire ambiental.	
V.3. Muestreo del agua.	

V.4. Apareamiento de ratones.

V.5. Producción de embriones trisómicos.

VI.- DISCUSION

24

VII.- CONCLUSIONES

27

VIII.- BIBLIOGRAFIA

28

I.- RESUMEN

Los embriones de ratón con trisomía del cromosoma 16 son un modelo del síndrome de Down, dada la homología genética entre el cromosoma 21 humano y el cromosoma 16 murino, lo que permite abordar experimentalmente estudios bioquímicos, fisiológicos, embriológicos y neurológicos, y que está produciendo un desarrollo rápido sobre las causas moleculares y celulares que producen las alteraciones fenotípicas que caracterizan a los individuos con síndrome de Down. Así mismo, permitirá experimentar con estrategias terapéuticas para resolver este importante problema de salud.

Los embriones son obtenidos mediante el apareamiento de machos con doble translocación Robertsoniana para el cromosoma 16 de la cepa 32 Lub Rb(16-17)/ 2H Rb(11-16), obtenidos de Alemania, con hembras normales Balb/c controladas del Bioterio de la Escuela Superior de Medicina. Los ratones machos son animales libres de gérmenes patógenos específicos, por lo que fue necesario desarrollar técnicas profilácticas para su sobrevivencia. En estas condiciones, los ratones SPF pudieron sobrevivir periodos mayores de 24 meses, lo que les permitió alcanzar una edad cercana a los 30 meses de edad, que es la duración normal de su ciclo de vida. También permitió obtener embriones normales y trisómicos para utilizarlos en estudios morfométricos y neurológicos.

II.- INTRODUCCION

II.1. Antecedentes

El ratón posee 20 pares de cromosomas acrocéntricos, con un solo brazo. Diecinueve pares son autosómicos y uno sexual. Con cierta frecuencia, los ratones presentan cromosomas metacéntricos con doble brazo que son el resultado de la fusión de dos cromosomas acrocéntricos. Los cromosomas fusionados reciben el nombre de Robertsonianos, en reconocimiento de quien los describió por primera vez. Dichos ratones Robertsonianos normales presentan 39 cromosomas en sus células somáticas, uno doble y 38 acrocéntricos. La dotación es balanceada porque hay un total de 40 brazos.

Cepas de ratón con translocaciones Robertsonianas cromosómicas han sido importantes para estudiar sistemáticamente las alteraciones del desarrollo que producen las aneuploidias de los cromosomas murinos (con desbalance del número normal de cromosomas). Dichas cepas, como se describe más adelante, han permitido desarrollar embriones con trisomías y monosomías para cada uno de los diferentes cromosomas murinos (2). Dadas las homologías que existen entre algunos cromosomas murinos con los humanos, estos ratones potencialmente, representan modelos experimentales para las trisomías humanas (8,10).

El patólogo Alfred Gropp y su grupo, desarrollaron en

Lubeck, Alemania en el año de 1975, un esquema de apareamientos para obtener embriones de ratón trisómicos y monosómicos. Dicho esquema - consiste en utilizar dos líneas de ratón cada una con la translocación de un cromosoma común con otro cromosoma autosómico, diferente éste en cada una de las dos líneas (5). Así se obtienen heterocigotos con doble translocación Robertsoniana con un número balanceado de - cromosomas. Estos machos heterocigotos se aparean con hembras normales. Algunas de las células germinales de estos machos contienen uno u otro de los cromosomas Robertsonianos. Otros espermatozoides, debido a la recombinación durante la meiosis, contienen uno, los dos o - ninguno de los cromosomas metacéntricos, lo que hace que al formarse el huevo por la fusión con un óvulo normal, en el primer caso se formen concepciones normales, en el segundo caso concepciones trisómicas y en el tercer caso concepciones monosómicas dentro de las mismas - camadas (12). Aproximadamente 50% de las concepciones son normales, 25% son trisómicas y el 25% restantes son monosómicas. Esta última, sin embargo, muere muy temprano durante la gestación.

II.2. Aspectos generales

El ratón de laboratorio (Mus musculus) es un animal muy - popular en los trabajos científicos, por su cuerpo pequeño, fácil manejo, bajo costo de mantenimiento y periodo breve de gestación (21 - días). Además, gran cantidad de cepas con características específicas han sido obtenidas, principalmente por la selección de mutantes genéticas (7).

La mayor proporción de especies seleccionadas en la investigación biomédica son cepas consanguíneas, de veinte o más generaciones de apareamientos de hermanos x hermanas (14,20). Esto determina un fenotipo uniforme y reproducibilidad elevada de los resultados experimentales. Cada individuo de la cepa homocigota es genéticamente idéntico en lo que respecta a los genes autosómicos.

Otro aspecto que debe ser considerado en la investigación biomédica, es la flora bacteriana que poseen los animales, ya que también influye en la reproducibilidad de los resultados experimentales.

En este sentido existen dos modalidades: los animales convencionales y los derivados por Cesárea o gnotobióticos. Los primeros son aquellos que nacen en cama de aserrín. Estos a su vez pueden considerarse en dos subtipos. 1) Aquellos que poseen elevado grado de contaminación microbiológica, debido a que no hay un control de su ambiente. Este es el grupo de más baja calidad, que no garantiza confiabilidad alguna. 2) Los animales atendidos por profesionales que tienen controladas diferentes condiciones microbiológicas de su medio ambiente, aire, agua, alimento y cama, dentro de instalaciones adecuadas reciben el nombre de convencionales controlados. A estos se les aplican sistemas profilácticos para evitar enfermedades. Los resultados que de ellos se obtienen son de grado adecuado de confiabilidad.

Los animales derivados por Cesárea o gnotobióticos son obtenidos en condiciones de esterilidad y amamantados por nodrizas especiales en ambientes libres de gérmenes demostrables o de gérmenes

patógenos específicos. Para mantenerlos se requiere de instalaciones y tecnología especializadas. Los animales gnotobióticos pueden ser clasificados en tres subtipos:

a) Libres de gérmenes o axénicos.

b) Libres de gérmenes patógenos específicos o SPF.

c) De flora definida, que se han inoculado con una determinada flora microbiológica (3,11,19,23). Se debe observar que éstos dos últimos no son gnotobióticos estrictos. Los resultados obtenidos de estos animales permiten al investigador el grado más alto de confiabilidad, con un número reducido de factores de confusión.

Por otro lado, conviene mencionar que las características sexuales secundarias empiezan a aparecer en las hembras alrededor de los 25-30 días postnatales, por la acción de las hormonas gonadotróficas: la hormona foliculo estimulante que desarrolla los foliculos y eleva los niveles de estrógenos, que produce las características sexuales secundarias y la luteinizante que produce ovulación. La acción hormonal se evidencia por la apertura vaginal. La completa madurez sexual se alcanza a las 7-9 semanas (7). Los machos maduran aproximadamente entre 9 y 11 semanas y se manifiesta por el descenso y agrandamiento de los testículos (13).

El ciclo estral en las hembras se induce por la presencia del macho. Usualmente dura 4-5 días y rara vez es más largo. Se divide en cuatro etapas: Proestro, estro, metaestro y diestro. Estas diferentes etapas pueden ser identificadas por el aspecto externo de la vagina o mediante el exámen del frotis vaginal.

La ocurrencia de copulación queda de manifiesto por la presencia del tapón vaginal, que se forma aproximadamente 8 horas después del coito. Dicho tapón es una mezcla de espermatozoides, secreciones de las vesículas seminales y de las glándulas de copulación del macho. La edad gestacional de los productos puede ser definida considerando como día cero de gestación el día en que se presenta el tapón vaginal.

II.3. Planteamiento del problema

Uno de los problemas que enfrenta la investigación biomédica es que muchos de los estudios no pueden realizarse directamente en humanos por razones éticas. Por ello, es importante desarrollar modelos animales que reproduzcan las enfermedades humanas. Dichos modelos dan la oportunidad de realizar estudios morfológicos, inmunológicos y fisiológicos (6,21). Además, el modelo animal, frecuentemente, genera la cantidad necesaria de tejido que requieren los estudios bioquímicos. Todo lo anterior desarrolla el conocimiento médico rápidamente.

En México no existen animales SPF ya que las condiciones para su mantenimiento y logro requieren de instalaciones y tecnología especializada. México cuenta con un gran número de Bioterios los cuales en su mayoría no reúnen las condiciones necesarias para albergar a este tipo de animales. Estos animales permiten al investigador alcanzar un mayor grado de confiabilidad con menor número de factores de confusión.

Por tal motivo ha sido de gran importancia desarrollar las

condiciones profilácticas necesarias para mantener a estos animales gnotobióticos SPF de la cepa 32 Lub Rb(16-17)/ 2H Rb(11-16) en condiciones lo más cercanas al ideal, así como también desarrollar estrategias de apareamiento de estos machos con hembras convencionales de la cepa Balb/c para producir embriones trisómicos en México.

La trisomía cromosómica 21 humana, conocida como síndrome de Down (S.D.), es la aneuploidía más común en la que las concepciones sobreviven al nacimiento. También es la causa genética más frecuente de retardo mental (16). Existen evidencias que indican que basta la trisomía de una región pequeña de la porción distal del brazo largo del cromosoma 21 que coincide con la banda 21q22 --> term, para que se presenten todas las alteraciones fenotípicas que caracteriza el S.D. (8,10). Esta porción recibe el nombre de "región crítica del S.D.". Ocho de los genes localizados en esta región del cromosoma 21 (HSA 21) han sido localizados en el cromosoma 16 murino (MMU16). Incluyendo los genes de la superóxido dismutasa soluble (SOD1), del receptor de los interferones alfa y beta (IFRS), de las enzimas fosforribosilglicinamida sintetasa (PRGS), fosforribosilaminoimidazol sintetasa (PAIS), cistationina beta sintetasa (CBS), fosfofructo cina sa L (PFKL) y los protooncogenes RTS-2 y CYA1, los cuales representan marcadores de la región del S.D. (9). Dada la homología genética que existe entre el MMU16 y el HSA21, fue propuesto que el ratón con trisomía del cromosoma T-16, es un modelo del S.D. Los ratones T-16 comparten varias características comunes con los individuos con S.D. Ambos poseen malformaciones cardíacas, craneofaciales, alteraciones

neuroquímicas centrales, deficiencias linfocitarias, hematopoyéticas y microftalmia (5,17). Por lo tanto, los estudios en el ratón T-16 pueden proveer un mejor entendimiento de los mecanismos genéticos involucrados en la patogénesis de las alteraciones fenotípicas y cerebrales del S.D..

Los embriones T-16 no solamente presentan similitudes con los individuos con S.D., sino también diferencias. Una de ellas, es que los embriones T-16 murinos no sobreviven al nacimiento. Probablemente debido a que el cromosoma MMU16 es más grande que el HSA21 y con ello su carga genética, lo que hace que la trisomía 16 murina sea letal antes del nacimiento, en casi el 100% de los casos (5). Por ello los estudios tienen que hacerse en los fetos de ratón. Sin embargo, son las semejanzas en las alteraciones las que hacen invaluable al ratón T-16 en el estudio de los mecanismos que producen el S.D., ya que los mecanismos básicos de los desórdenes pueden ser semejantes en ambas especies. Por todo ello, los ratones T-16 pueden llegar a constituir no solamente el material de investigación, sino también, el sistema en el que se ensayen las terapias correctivas del S.D. (14).

III.- OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo, son:

1) Establecer las condiciones adecuadas en el Bioterio de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional para mantener los machos SPF de la cepa 32 Lub Rb(16-17)/ 2H Rb(11-16) producidos en el Institut Fur Biologie de la Escuela de Medicina de - Lubeck, Alemania.

2) Obtención de embriones trisómicos T-16 de edad gestacional controlada a partir del cruzamiento de: machos 32 Lub Rb(16-17)/ 2H Rb(11-16) SPF, con hembras Balb/c convencionales.

IV.- MATERIAL Y METODOS

IV.1 Apareamiento de machos heterocigotos con hembras Balb/c.

En el presente trabajo se emplearon 15 machos SPF, con doble translocación Robertsoniana de la cepa 32 Lub Rb(16-17)/ 2H Rb (11-16). (Figura No.1), donados por el Dr. Heinz Winking del Institut fur Biologie de la Escuela de Medicina de la Universidad de Lubeck, - Alemania. Estos son rigurosamente identificados por su cariotipo - antes de ser enviados de Alemania, los cuales fueron apareados con - hembras normales convencionales controladas de la cepa Balb/c producidas en el Bioterio de la Escuela Superior de Medicina con el propósito de obtener embriones normales y trisómicos de edad gestacional definida. Los embriones normales de una camada serán tomados como controles de los trisómicos en los estudios morfométricos y electrofisiológicos.

Dada la condición de los machos de ser animales SPF, se - diseñaron condiciones especiales de esterilidad microbiológica en el manejo y mantenimiento de ellos en el Bioterio de la Escuela Superior de Medicina (ver más adelante).

Las hembras Balb/c controladas, prepúberes (con el orificio vaginal cerrado), con tres semanas de edad, fueron colocadas en grupos de 10 y mantenidas en las mismas condiciones de esterilidad en -

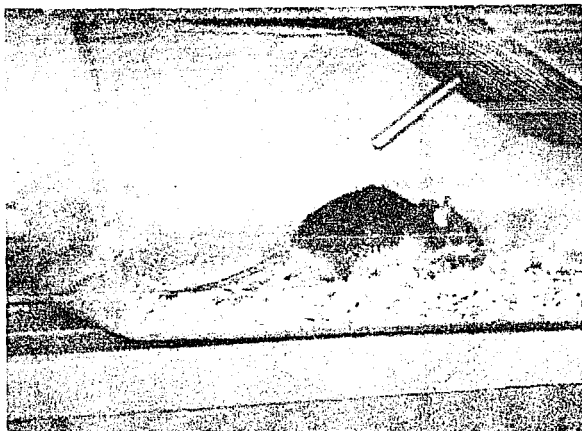


Figura No.1. Ratón macho SPF. Con doble translocación Robertsoniana.

las que se encontraban los machos (Figura No.2). Se esperó a que alcanzaran la madurez sexual, lo cual ocurre entre las 7-9 semanas de vida (45 días). En este intervalo de tiempo la salud de las hembras fue constantemente vigilada. En caso de que alguna de ellas presentase algún signo de enfermedad, el grupo completo de hembras sería retirado.

Sincronización del estro: el ciclo estral en el cual la hembra es receptiva al macho, fue inducido mediante la aplicación intraperitoneal de la hormona gonadotropina sérica en una dosis de 0.25 ml (Folligon 50 U.I./ ml), lo que produce superovulación en las hembras para compensar la baja fertilidad reportada en los machos (9). A las 48 horas se les aplicó la gonadotropina coriónica en una dosis 0.2 ml (Chorulon 200 U.I./ ml) para inducir la ovulación y finalmente el estro, el cual se identificó por la turgencia e hiperemia de la vulva. Inmediatamente después de esta aplicación, las hembras se colocaron en la jaula de los machos, en una relación de dos hembras por macho (Figura No.3). Se utilizaron 5 machos por semana y los otros descansaban, los cuales estaban colocados individualmente en jaulas de acrílico. La aplicación de las hormonas en la secuencia mencionada permite además sincronizar el estro de las 10 hembras empleadas semanalmente, produciéndose así una ovulación sincronizada de todas ellas. Con esto se consigue que la edad gestacional de los embriones de las diferentes hembras sea similar.

Después de la segunda inyección las hembras se pesaron antes de ser colocadas con los machos. Al día siguiente de la unión

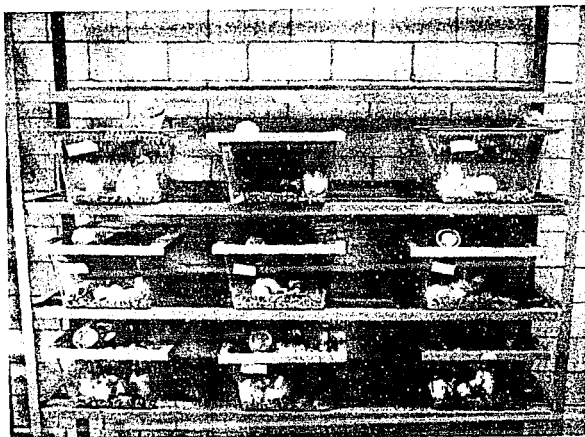


Figura No.2. Grupo de hembras vírgenes Balb/c convencionales controladas.

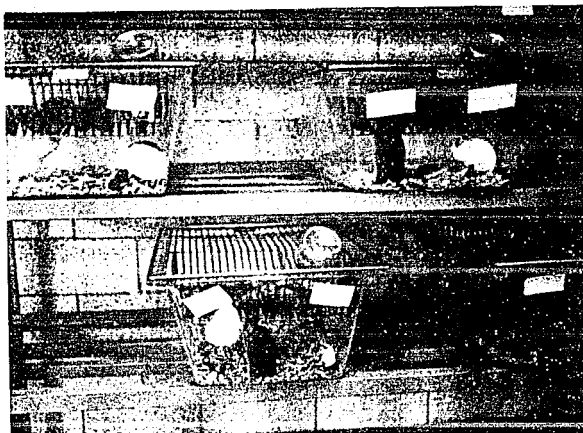


Figura No.3. Machos heterocigotos en unión con hembras - Balb/c.

las hembras eran retiradas y revisadas para determinar la presencia - del tapón vaginal, que es indicativo de copulación. Este día se tomo como día cero de gestación. Las hembras que presentaron dicho tapón - fueron nuevamente pesadas y colocadas en otra jaula. El aumento de peso fue tomado como un indicador de gestación. A los diez días se pesaron nuevamente, para verificar si habia aumento significativo de peso, como indicativo de que la hembra estaba gestante. Tres días después nuevamente eran pesadas para confirmar el estado gestante. Al final las hembras no gestantes fueron retiradas y no se utilizaron nuevamente.

A los 14 días de gestación, las hembras se llevaron al departamento de Fisiología Humana de la E.S.M., donde se obtuvieron - embriones para realizar experimentos Neurofisiológicos y Electrofisiológicos así como para hacer estudios morfométricos.

Los embriones fueron identificados fenotípicamente por la - presencia de anasarca y microftalmia apoyado en estudios preliminares donde también se hizo cariotipo como se muestra en la figura No. 4.

IV.2 Cuidado y manejo especiales de los ratones.

Los 16 ratones machos heterocigotos que se recibieron de - Alemania venían en cajas de madera y alimentados con manzanas, de - donde obtenían agua y nutrientes durante los 3 días que duró el viaje y que fueron liberados de la Aduana del Aeropuerto de la Ciudad de - México.

Los machos se colocaron en un cuarto de cuarentena cuyas -



CONTROL



TRISOMICO

Figura No.4. Cariotipo de los embriones control y trisómico. El primero se caracteriza por poseer un cromosoma Robertsoniano (indicado con flecha) con dos cromosomas unidos con el cromosoma 16 translocado al 11-16 ó 16-17, con un número total de 40 cromosomas (38 acrocéntricos y 1 doble). El cariotipo del T-16 muestra dos cromosomas metacéntricos (16-17 y 11-16) con un número total de 41 cromosomas (37 acrocéntricos y 2 metacéntricos). (Epstein y cols. 1985).

dimensiones son de 4 X 4 mts y que cuenta con lámparas de luz solar - de 37 watts, que proporciona un fotoperíodo de 12 horas. El aire acondicionado del cuarto proporciona de 8 a 12 cambios de aire por hora, lo que reduce la acumulación de amoníaco en el ambiente y disminuye - la posibilidad de infecciones respiratorias de los ratones. Las partículas de polvo en el ambiente fueron reducidas con un precipitador - electrónico de partículas. La temperatura del cuarto se mantuvo a - 22°C y la humedad relativa de 40 - 70%. La distribución del cuarto se presenta en la figura No. 5.

IV.3. Monitoreo del aire y agua.

La calidad del aire y del agua fue analizada microbiológicamente. Estos se realizaron mensualmente, durante 7 meses de Octubre a Abril cada uno por triplicado, en tres días consecutivos. Para ello - se empleó el medio de agar BHI (Infusión cerebro corazón). El medio - de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 Lb/plg², 15 - minutos. El vaciado de cultivo BHI a las cajas de Petri de 100 mm de diámetro, fue realizado en condiciones de esterilidad. Posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 24 horas para verificar que no hubiera crecimiento bacteriano, que corresponde a la prueba de esterilidad.

Las cajas de Petri se abrían y eran expuestas al aire del - medio ambiente en el cuarto de animales. Una caja en la mesa de lavado, una en el estante de los animales, durante 15 minutos y otra a la salida del aire acondicionado, que se exponía un minuto, pasándola sq



Figura No.5. Cuarto de cuarentena, mostrando los estantes de animales y en el piso el precipitador electrónico de partículas.

bre la rejilla de éste. Las cajas eran cerradas e incubadas a 37°C - durante 24 horas. Al término de este tiempo, las cajas se retiraron - de la incubadora y se realizó el conteo de colonias bacterianas en un cuenta colonias. Ahí se identificaron las características de las colo- nias, que incluye tamaño, color, forma, elevación, superficie, aspec- to, bordes y consistencia (1).

De cada colonia se tomó una muestra con asa de inoculación metálica estéril con la que se hizo un frotis. Se dejó secar al aire y se fijó mediante calor. A las preparaciones se les realizó la tinción de Gram cuya secuencia es cristal violeta, lugol, alcohol-aceto- na y safranina. Las bacterias que se tiñeron de color morado fueron - identificadas como Gram (+) y aquellas que se decoloraron y quedaron de color rosado por la safranina se identificaron como Gram (-) (4). Los frotis fueron observados al microscopio con el objetivo de inmer- sión 100X.

El monitoreo de agua se realizó mensualmente en medio de - caldo nutritivo y agar noble. El medio se esterilizó a 121°C, - 15 Lb/plg² de presión, 15 minutos. Para la toma de muestra de agua se desinfectó la llave con alcohol al 70%, se dejó correr el agua de- la llave por un momento y la muestra se tomó en un tubo de ensaye de tapón de rosca estéril. En un ambiente estéril se abrió el tubo y se- tomó una muestra de 1ml., la cual se depositó en la caja de Petri. Se vació el medio de cultivo líquido en la caja y se esperó a que solidi- ficara. Fueron entonces incubadas a 37°C durante 24 horas, al cabo del cual se procedió a contar e identificar las colonias bacterianas

como en el caso del aire.

IV.4. Esterilización del alimento, agua y cama de aserrín.

Un kilogramo de alimento comercial para roedores se colocó en una bolsa de papel estraza a la que se le practicaron pequeñas perforaciones para facilitar la penetración del vapor, se selló con cinta testigo de esterilidad y se introdujo en una bolsa de manta la cual era esterilizada en autoclave a una temperatura de 121°C, 15 Lb/plg² de presión, 15 minutos. El alimento se proporcionó a libre acceso.

El agua fue esterilizada en las mismas condiciones que el alimento en matraz Erlenmeyer de un litro al que se le colocó un tapón de gasa y un capuchón de papel estraza. En estas condiciones no hubo crecimiento bacteriano. El agua era colocada en botellas estériles suplementada con vitaminas (2.115 g en 240 ml de agua) (Cuadro No. 1) (15) y se dejaba a libre acceso. Posteriormente, el agua se esterilizó mediante la adición de ácido perclórico en una proporción de .26 ml por litro de agua con los mismos resultados.

El aserrín para las camas también se esterilizaba en forma muy similar al alimento, dado que puede estar contaminado con heces fecales de animales, ya que los proveedores de aserrín no tienen control higiénico de éste, él que se sacaba a enfriar a la intemperie, para evitar la acumulación de gases tóxicos en el interior del cuarto de los animales. La cama así como las botellas de agua eran renovadas dos veces por semana.

Cuadro No.1. Suplemento vitaminico para el agua.

Vitamina A	55,000	U. I.	
Vitamina E	3	g	
Vitamina K	5	mg	
Niacina	1	g	
Vitamina B6	60	mg	
Colina	45	g	
Sacarosa	1	g	
Tiamina	825	mg	
Riboflavina	300	mg	
Acido pantoténico	750	mg	
Acido fólico	25	mg	
Biotina	20	mg	
Vitamina D	7 500	U. I.	0.001875 g
Vitamina B12	750	mg	0.000750 g
Azúcar	1	Kg	

La desinfección del piso se hizo con soluciones de cloro y se efectuó dos veces por semana.

Las jaulas de acrílico fueron desinfectadas con cloruro de benzalconio, después de haber sido lavadas con detergente y agua.

Medios de cultivo:

- a) BHI (Infusión cerebro corazón).
- b) Caldo nutritivo + Agar noble.

Pruebas estadísticas.

Los pesos de las hembras en unión, así como los resultados microbiológicos se sometieron a las siguientes pruebas estadísticas.

La significancia estadística de las diferencias se estableció para $p < 0.05$ de acuerdo con la prueba estadística de la "t" de Student para muestras pareadas.

El error estandar del promedio fue calculado como:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n-1}}$$

Donde SD es la desviación estandar.

n = número de muestras.

La que a su vez se calculo mediante la fórmula:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde \bar{X} es el valor promedio.

La "t" fue calculada como la relación:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\Sigma_1^2 + \Sigma_2^2}}$$

$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$ = diferencia del promedio control menos el trisómico.
mico.

Σ_1 y Σ_2 error estandar del control y trisómico respectivamente.

Lo que se comparó en las tablas de "t" de Student para conocer la p considerando los grados de libertad como n - 1.

Fórmula para obtener el Intervalo de confianza:

$$\bar{x} \pm t_v \frac{S}{\sqrt{n}}$$

\bar{x} = valor promedio de la muestra.

t_v = "t" Student con v grados de libertad.

S = desviación estandar muestral.

n = tamaño de la muestra.

V. - RESULTADOS

V.1. Muestreo del aire acondicionado.

En los siete muestreos de la salida del aire acondicionado se aislaron 51 colonias en las 21 cajas de Petri expuestas, usando 3 cajas por muestreo. Los valores del número de colonias variaron de - cero hasta veinte, con un valor promedio de 2.4 ± 4.91 SEM colonias por caja con un intervalo de confianza de 2.28 (I.C), siendo el valor mínimo de 0.12 y un máximo de 4.68.

Cuarenta y nueve por ciento de las colonias fueron identificadas mediante la tinción de Gram, como cocos Gram (+), cuarenta y tres por ciento cocos Gram (-) y ocho por ciento bacilos largos Gram (+). (Tabla No. 1).

V.2. Muestreo del aire ambiental.

En los siete muestreos mensuales realizados del aire ambiental también por triplicado, de las cajas localizadas arriba del estante de los animales y en la tarja del cuarto se aislaron 263 colonias en 42 cajas. Los valores del número de colonias variaron de cero hasta treinta y siete, con un valor promedio de 6.2 ± 6.09 SEM colonias por caja con un intervalo de confianza de 1.90, con un mínimo de 4.3 y un máximo de 8.1.

Cincuenta y uno punto tres por ciento de las colonias fue-

Tabla No.1. Muestras microbiológicas del aire acondicionado.

Colonias	No.	%
Cocos Gram (+)	25	49
Cocos Gram (-)	22	43
Bacilos largos Gram (+)	4	8

No. de cajas	21	I.C.
No. total de colonias	51	
Promedio de colonias por caja	2.4 +/-	2.28
Desviación estandar	5.03	

I.C. Intervalo de confianza.

Silva B.M. 1992.

ron cocos Gram (+), cuarenta punto tres por ciento cocos Gram (-), - cinco punto cuatro por ciento bacilos cortos Gram (-), dos punto siete por ciento bacilos largos Gram (+) y punto tres por ciento bacilos cortos Gram (+). (Tabla No. 2). Estos resultados son 2.3 veces mayor que el número de colonias de la salida del aire acondicionado, lo que parece ser resultado de las partículas que levanta el movimiento y - los aerosoles de los animales. La identificación bioquímica de las - bacterias solo se realizó en la necropsia de un ratón muerto.

Sin embargo, muchas más partículas son removidas con el - precipitador electrónico de partículas, como lo demuestra un estudio preliminar (18). En caso de estar apagado la cantidad de colonias - aumenta 10 veces.

Los resultados mencionados arriba fueron muy semejantes a - los encontrados en un estudio piloto, que permitió mantener una colonia de ratones Balb/c convencionales, libre de enfermedades respiratorias (18).

El único animal que murió por enfermedad respiratoria lo hizo a los cinco días de su arribo de Alemania. Este presentó congestión pulmonar, con infiltración de gran cantidad de leucocitos. El - estudio microbiológico de muestras tomadas en pulmón y otros tejidos mostró la presencia de bacilos Gram (-), los que fueron identificados como Klebsiella pneumoniae, por pruebas bioquímicas.

Los machos heterocigotos de la cepa 32 Lub Rb(16-17)/ 2H - Rb(11-16) solo empezaron a morir después de 24 meses de estancia en - el Bioterio, en las condiciones de manejo y cuidados antes menciona-

Tabla No.2 Muestras microbiológicas del aire ambiental.

Colonias	No.	%
Cocos Gram (+)	135	51.3
Cocos Gram (-)	106	40.3
Bacilos cortos Gram (-)	14	5.4
Bacilos largos Gram (+)	7	2.7
Bacilos cortos Gram (+)	1	0.3

No. de cajas	42	I. C
No. total de colonias	283	
Promedio de colonias por caja	6.2 +/- 1.90	
Desviación estandar	6.1	

I.C. Intervalo de confianza.

Silva B.M. 1992.

das. Tomando en consideración que llegaron con 4 y 5 meses de edad, - resulta una edad de aproximadamente 30 meses, que corresponde a su - ciclo normal de vida.

V.3. Muestreo del agua:

De los siete muestreos mensuales realizados en el agua potable del cuarto de los animales se aislaron 20 colonias, en las 21 cajas de Petri utilizadas. Los valores del número de colonias variaron de cero hasta trece, con un valor promedio de 0.95 ± 2.77 SEM colonias por caja con un intervalo de confianza de 1.28, con un mínimo de 0.33 y un máximo de 2.23. Este valor fue el más bajo de los encontrados en los muestreos que se realizaron en el cuarto de los animales, encontrándose que el sesenta y cuatro por ciento correspondía a bacilos cortos Gram (+), veintitrés por ciento cocos Gram (-), nueve por ciento bacilos cortos Gram (-) y el cuatro por ciento cocos Gram (+). (Tabla No. 3).

Como se mencionó en la metodología el agua de bebida siempre se esterilizó mediante autoclave, o bien mediante la adición de ácido perclórico, para evitar infecciones gastrointestinales. En estas dos condiciones el muestreo microbiológico del agua no reveló la presencia de ninguna colonia bacteriana.

En las condiciones señaladas no se presentaron enfermedades diarreicas en ninguno de los animales machos SPF ni en las hembras Balb/c.

Tabla No.3. Muestras microbiológicas del agua de la llave.

Colonias	No.	%
Bacilos cortos Gram (+)	14	64
Cocos Gram (-)	3	23
Bacilos cortos Gram (-)	2	9
Cocos Gram (+)	1	4

No. de cajas	21	I. C.
No. total de colonias	20	
Promedio de colonias por caja	0.95 +/-	1.28
Desviación estandar	2.83	
Se muestreo 1 ml de agua por caja		

I.C. Intervalo de confianza.

Silva B.M. 1992.

V.4. Apareamiento de ratones.

Con el propósito de obtener embriones trisómicos T-16 y normales se realizaron 30 uniones. En cada una de ellas se emplearon 10 hembras Balb/c. El número total de hembras utilizadas fue de 300, en las cuales se sincronizó el ciclo estral. Se usaron 5 machos heterocigotos SPF por semana en una relación de dos hembras por macho. (Figura No.3).

El peso promedio de las hembras vírgenes con 60 días de edad fue de 24.6 ± 1.3 g (n=300). Este era el peso de las hembras al ser colocadas con los machos, y es tomada como control.

Noventa y seis de ellas presentaron tapón vaginal el día siguiente de colocadas con los machos, lo que indicaba la copulación.

A los 10 días fueron pesadas nuevamente. Cincuenta y una de ellas no modificaron su peso dando un valor promedio de 26.8 ± 1.4 g (n=51). Estas mismas a los 14 días confirmaron no estar gestantes al presentar un peso promedio de 24.8 ± 0.4 g (n=51). Este peso no era estadísticamente diferente del valor control de las hembras vírgenes.

Cuarenta y cinco hembras presentaron, al término de los 10 días de la formación del tapón vaginal, un aumento de peso en promedio de 6.6 g mayor que el control cuando vírgenes. El valor promedio del peso corporal de estas hembras fue de 31.2 ± 0.3 g (n=45), lo que es estadísticamente significativo ($p < 0.01$).

En esta etapa no se observó abultamiento del abdomen, ni se

palpaban los embriones, por lo que el aumento de peso era el método más sensible para diagnosticar la gestación.

Cuarenta y cuatro de estas últimas hembras fueron confirmadas como gestantes a los 14 días después de la formación del tapón vaginal, tanto por el aumento de peso corporal que alcanzó 37.7 +/- 0.2 g (n=44) como por el agrandamiento del abdomen a la inspección. (Tabla No. 4).

El único caso falso positivo se presentó en una hembra que habiendo ganado peso, no estaba gestante, y el aumento había ocurrido por producción de líquido ascítico, probablemente por la presencia de un tumor hepático.

Lo anterior muestra que 44 hembras quedaron preñadas de las 96 que presentaron tapón vaginal. Esto representa un 45.8% de gestantes y 58.3% de no gestantes. También cabe mencionar que las 44 hembras gestantes representan el 15% del total de hembras empleadas (n=300).

La curva de peso de las hembras gestantes puede ser ajustada a una recta con coeficiente de correlación de 0.99 y cuya pendiente es de 0.77, lo que es estadísticamente diferente de una pendiente de cero ($p < 0.01$). La pendiente de la recta del peso de las hembras no gestantes no fue significativamente diferente de cero. (Figura No. 6).

V.5. Producción de embriones trisómicos.

Cuarenta y cinco hembras se enviaron al Departamento de

VARIACION DE PESO DE HEMBRAS BALB/C CON TAPON VAGINAL.

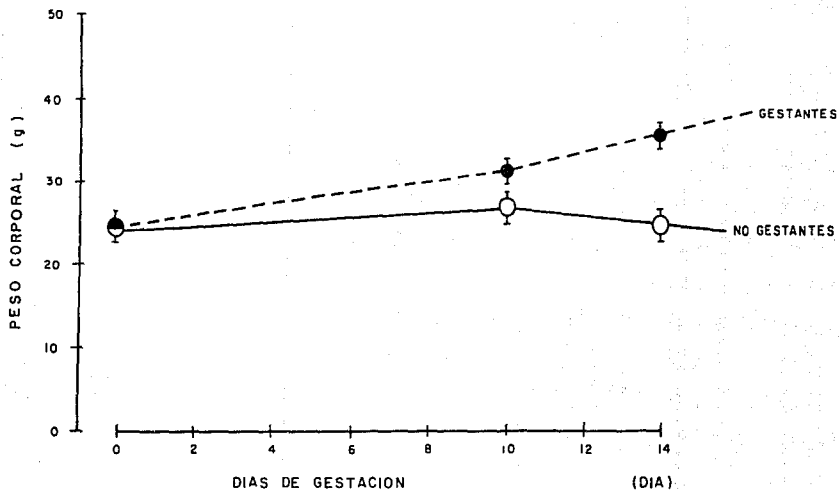


Fig. No. 6 Se muestra las variaciones de peso de las hembras que presentaron tapón vaginal. Tanto las gestantes (♀) como las no gestantes (♀). Las variaciones en el peso de estas ultimas no fue estadísticamente significativo respecto al valor \bar{X} inicial de las hembras vírgenes.

TABLA No.4. Peso de las hembras vírgenes con 60 días de edad.

Peso \bar{X} de hembras vírgenes 24.6 +/- 1.3 g

96 Tapón vaginal

204 Sin tapón vaginal

Gestantes

No gestantes

No gestantes

44

51

204

Peso a los
10 días *

31.2
+/- 0.3 g

26.8
+/- 1.4 g

No se pesaron.

Peso a los
14 días **

37.7
+/- 0.2 g

24.8
+/- 0.4 g

No se pesaron.

* $p < 0.05$
** $p < 0.01$

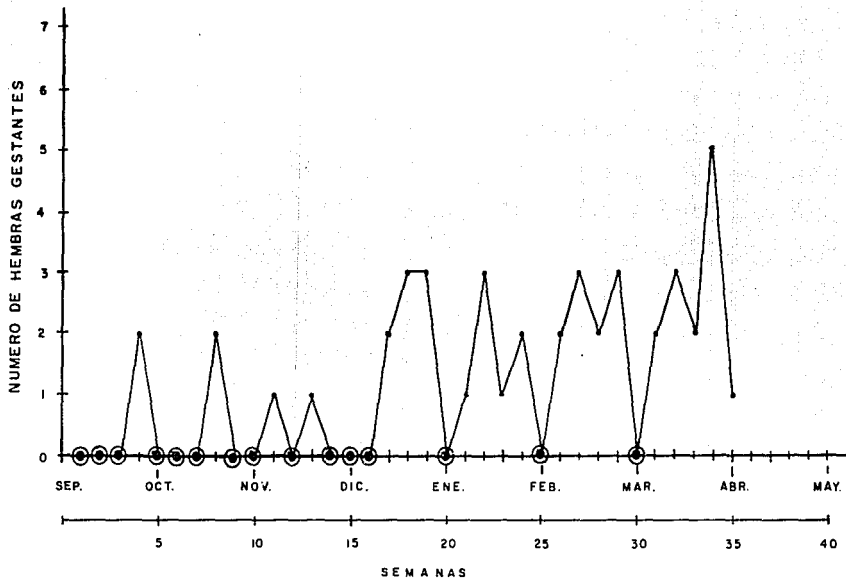
Silva B.M. 1992.

Fisiología Humana de la E.S.M. a los 14 días de gestación. La edad gestacional de los fetos fue muy semejante en las diferentes camadas, juzgando por el desarrollo de los miembros anteriores y posteriores (21), lo que probablemente estuvo determinado por la sincronización de las hembras.

Las 44 hembras gestantes se obtuvieron en un periodo de 32 semanas (7 meses), lo que dió un promedio de 1.3 ± 0.3 hembras por semana con embriones trisómicos y normales. El número de hembras gestantes es más regular apartir de Enero e incluso aumenta marcadamente en el mes de Abril. (Figura No.7).

Los embriones normales y trisómicos T-16 con 15 a 16 días de gestación, se emplearon para realizar experimentos electrofisiológicos y morfométricos. Las camadas contenian entre 6-8 embriones, aunque este número decreció con la edad de los machos. Estos números son compatibles con la baja fertilidad de los machos. Treinta y un embriones resultaron con trisomía del cromosoma 16, juzgados por la presencia de anasarca (edema generalizado) y cardiomegalia (aumento de las cavidades cardiacas generalmente con disminución del espesor de las paredes del corazón que son manifestaciones de la insuficiencia cardiaca). Doscientos setenta y cinco fueron normales, lo que representa que un 10% del total de embriones, fueron trisómicos. Los resultados son semejantes a los reportados anteriormente (9).

HEMBRAS GESTANTES OBTENIDAS SEMANALMENTE.



⊙ CERO

Fig. No. 7 Hembras con 15-16 días de gestación entregadas semanalmente al Departamento de Fisiología Humana durante el período de estudio.

VI.- DISCUSION

Los resultados del presente trabajo muestran que los 16 ratones SPF 32 Lub Rb(16-17)/ 2H Rb(11-16), con excepción de uno, pudieron mantenerse en el Bioterio de la Escuela Superior de Medicina por periodos mayores de 24 meses, libres de enfermedades respiratorias y gastrointestinales lo que permitió que estos ratones concluyeran su ciclo normal de vida, que es de 24-36 meses. Los resultados también muestran que los machos heterocigotos pudieron fertilizar hembras Balb/c convencionales, obteniendo embriones normales y trisómicos con 14 y 16 días de gestación. Esto muestra que las condiciones en las que se mantuvieron en el Bioterio de la E.S.M. son adecuadas para mantener ratones SPF.

El hecho de que sólo un ratón heterocigoto murió de enfermedad respiratoria pocos días después de haber llegado de Alemania sugiere que la infección la adquirió durante el viaje, tal vez por una disminución de su respuesta inmunológica debida al estrés del viaje y no por las condiciones adversas en el cuarto de los animales. El resto de los animales vivieron por periodos mayores de 24 meses. Los decesos ocurrieron en ausencia de infecciones respiratorias y gastrointestinales, juzgado por la falta de lesiones observadas durante la necropsia.

Aún cuando los monitoreos microbiológicos no se llevaron - hasta la identificación de los microorganismos nos dan una idea de la contaminación del cuarto de los animales y nos sirvan de referencia para saber cuando éstas no sean satisfactorias.

Este resultado es importante ya que muestra por primera vez que pueden mantenerse ratones SPF en buenas condiciones de salud en el Bioterio de la K.S.M., lo cual fue fuertemente cuestionado antes - de iniciar el presente proyecto. Esto permitirá realizar proyectos futuros utilizando animales SPF en los que se tiene gran confiabilidad de los resultados experimentales.

Como se observa en los resultados se presentaron variaciones en el número de hembras gestantes obtenidas semanalmente durante los meses de estudio, lo que sugiere que aunque el fotoperiodo en el cuarto de los animales es controlado, el periodo de luz exterior puede lograr influir en los ciclos sexuales como se observa en la figura No. 7.

Lo anterior nos indica que pueden obtenerse embriones trisómicos y normales de manera regular, para estudiar las alteraciones - genéticas similares al síndrome de Down, los cuáles por razones éticas y técnicas es difícil llevar a cabo en fetos humanos.

De las 300 hembras empleadas solo 96 presentaron tapón - vaginal, lo cual indica que los machos realizaron la copula con 32% de las hembras. De estas últimas solo 44 quedaron gestantes. Las camadas estuvieron formadas por 6 a 8 embriones, lo que corrobora lo reportado en la literatura de que estos machos tienen baja fertilidad -

(9) y solo 15% de hembras resultaron gestantes del total (300), a pesar de que las hembras fueron superovuladas.

VII.- CONCLUSIONES

1) El estado de salud de los machos heterocigotos SPF se mantuvo en forma adecuada en el cuarto de cuarentena del Bioterio de la E.S.M..

2) Embriones trisómicos T-16 y normales con 14-16 días de gestación fueron obtenidos de los apareamientos con los machos de la cepa 32 Lub Rb(16-17)/ 2H Rb(11-16), con doble translocación Robertsoniana con las hembras de la cepa Balb/c convencionales controladas en el Bioterio de la E.S.M..

3) El desarrollo de dichas condiciones permitira obtener directamente en México los machos heterocigotos con doble translocación Robertsoniana apartir de las líneas homocigotas.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barrón, R.L.B., y cols.: Manual de prácticas de Microbiología general. E.S.M.-I.P.N. México. 1982.
- 2.- Bersu, E.T.: Morphologic development of fetal trisomy 19 mouse. Teratology. 29:117-129. 1984.
- 3.- Bonilla, R.L.R.: Enfermedad crónica respiratoria de la rata de laboratorio. Tesis de Maestría. Fac. de Est. Sup. Cuautitlán. U.N.A.. México. 1986.
- 4.- Burdon, K.L. y R.P. Williams.: Microbiología. 5a. ed. - Publicaciones culturales. México. 1980.
- 5.- Coyle, J.T.; Oster Granite, M.L.; Reeves, R.H. and Gearhart, J.D.: Down syndrome, Alzheimer's disease and the trisomy - 16 mouse. Tins. Vol 11. No 9. 390-394. 1988.
- 6.- Cruz, R.C.: Determinación de los costos de producción - de los animales de laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. México. 1979.
- 7.- Cunliffe, B.T. and E.P Les.: The laboratory mouse. - Chapter 18. in: The case and management of laboratory animals. 6th. - ed. Logman Scientific and technical. Great Britain. 1987.
- 8.- Epstein, J.Ch.; Hofmeister, G.B.; Yee, D.; Smith, A.S;

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Philip, R.; Cox, R.D. and L.B. Epstein.: Stem cell deficiencies and -
thymic abnormalities in fetal mouse trisomy 16. J. Exp. Med. Vol. -
162: 95-712. 1985.

9.- Gearhart, J.D.; Davisson, M.T. and Oster Granite, M.L.:
Autosomal aneuploidy in mice: Generation and developmental consecuen-
ces. Brain Research Bolletin. Vol.16:789-801. 1986.

10.- Gearhart, D.J.; Singer, S.H.; G.L.M. and J.T.Coyle.: -
Mouse chimeras composed of trisomy 16 and normal (2N) CELLS: Prelimi-
nary Studies. Brain Research Bolletin. Vol.16:815-824. 1986.

11.- Gonzalez, H.R.: Primer curso de manejo de animales de
de laboratorio para la investigación. El ratón de laboratorio. -
E.S.M.-I.P.N. México. 1990.

12.- Mc. Ginniss, M.J.; Kazazian, H.H.; Stetten, G.; -
Petersen, M.B.; Boman, H.: Mechanisms of ring chromosome formation in
11 cases of human ring chromosome 21. Am. J. Hum. Genet. 50:15-28.
1992.

13.- Miyabara, S.; Gropp, A. and Winking, H.: Trisomy 16 in
the mouse fetus associated with generalized edema and cardiovascular
and urinary tract anomalies. Teratology. 25:369-380. 1982.

14.- Morse, H.C.: The laboratory mouse. A Historical pers-
pective. Chapter 1 in: The mouse in biomedical research. Vol:1. -
Academic Press, Inc. U.S.A. 1981.

15.- Oltjen, R.R. et al.: Nutrient Requirements of Laborato
ry Animals. Number 10. 3rd. ed. The National Research Council. -
U.S.A. 1978.

16.- Orozco, B.C.; Epstein, J.C. and Rapoport, S.: Voltage activated sodium conductances in cultured normal and trisomy 16 dorsal root ganglion neurons from the fetal mouse. Developmental Brain Research 8:265-274. 1988.

17.- Oster, G.M.L.: The neurobiologic consequences of autosomal trisomy in mice and men. Brain Research Bulletin Vol.16: 767-771. 1986.

18.- Ramos, Escobar.O. y Orozco Buenrostro.C. Comunicación personal. 1992.

19.- Reeves, R.H.; Gearhart, J.D. and Littlefiel, J.W.: Genetic basis for a mouse model of down syndrome. Brain Research Bulletin Vol:16:803-814. 1986.

20.-Staats, J.: Inbred and segregating inbred strains. Chapter 9 in: The mouse in biomedical research. Vol.1. Academic Press, Inc. U.S.A. 1981.

21.- Tapia, P.G.: La importancia del ratón hipotímico un mutante homocigotico (nu/nu) en la investigación. Revisión bibliográfica.. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. 1980.

22.- Theiler, K.: Embryology. Chapter 8. in: The mouse in biomedical research. Vol. 3. Academic press, Inc. U.S.A. 1983.

23.- Trexler, P.C.: Animals of defined microbiological 6th. ed. Logman scientific and technical. Great. 1987.