

## Evaluación de la calidad genética de las ratas Wistar Kyoto del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por marcadores moleculares microsatélites.

Genetic control evaluation of Wistar Kyoto rats in bioterio of Faculty of Chemistry Sciences and Pharmacy by microsatellite molecular markers

Rudy Marroquin Rosales<sup>1</sup>, Dulce Saldaña Santiago<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Química Farmacéutica, Universidad de San Carlos de Guatemala, <sup>2</sup>Departamento de Investigación, Biotecnología Farmacéutica y Asesoría en Nutrición, S. A.

ramr.11@hotmail.es

Recibido: 23 de marzo 2017 Aceptado: 12 de octubre 2017

### Resumen

El control de calidad genético de los animales de experimentación utilizados en los bioterios debe ser prioritario, para asegurar que los estudios realizados tengan reproducibilidad y además validez científica. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la pureza genética de las ratas Wistar Kyoto (WKY) del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, “Dra. Amarillis Saravia Gómez”, las cuales nunca se han caracterizado genéticamente. Para realizar este análisis se seleccionaron los microsatélites D1Mgh6 y D17Mit3, los cuales muestran un alto grado de variabilidad y gran número de polimorfismos, por lo que permiten tener una visión general de las características genéticas de la cepa. Los análisis se realizaron utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los resultados obtenidos del análisis genético demostraron que el fragmento analizado para el microsatélite D17Mit3 de las WKY del bioterio fue el esperado con un peso molecular de 201 pb, que corresponde al tamaño reportado; en la base de datos genómicos de la rata, por los laboratorios Charles River y los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH). Por el contrario, el tamaño del microsatélite D1Mgh6 no corresponde al fragmento de 147 pb esperado. La colonia de ratas WKY se ha manejado con un método de reproducción consanguíneo lo que se confirmó con los resultados, ya que los microsatélites D17Mit3 y D1Mg6 mostraron una condición homocigota y homoalélica, por lo cual estos animales de experimentación pueden ser usados en ensayos como un modelo consanguíneo de características genéticas propias, puesto que no tienen las características genéticas esperadas para la raza WKY.

Palabras clave: PCR, polimorfismos, genealogía, control de calidad genético, animales de experimentación.

## Abstract

Genetic quality control of experimental animals used in laboratory animal centers must be priority, to ensure that studies have reproducibility and also scientific validity. This research aimed to evaluate the genetic purity of the Wistar Kyoto rats at bioterio of the Faculty of Chemistry Sciences and Pharmacy at the University of San Carlos of Guatemala, “Dr. Amarillis Saravia Gómez”, which never had been genetically characterized. The D1Mgh6 and D17Mit3 microsatellites were analyzed because they have a high grade of polymorphism and allows to have a general vision of genetic characteristics of the strain, the analysis was performed by the polymerase chain reaction technique (PCR).

The results of the genetic analysis showed that the colony of Wistar Kyoto rats corresponds to the estimated size for the microsatellite D17Mit3 (201 bp) as the genomic database rat and reported by Charles River Laboratories and the NIH. However, It doesn't correspond to the estimated size of the microsatellite D1Mgh6 (147 bp). The WKY strain has been manage with an inbreeding method, that was confirmed by the results because D17Mit3 and D1Mg6 showed an homogenic and homoallelic condition, so these experimental animals can be used in trials as a inbreed model, because do not have the genetic characteristics expected for the WKY breed.

Keywords: PCR, polymorphisms, genealogy, genetic quality control, experimental animals

## Introducción

Los animales de laboratorio son un instrumento biológico indispensable en la experimentación, utilizados en una amplia variedad de investigaciones. Estos son engendrados, producidos y mantenidos en condiciones controladas y deben ser capaces de dar una respuesta confiable y reproducible (Martínez, Osorio, Rodríguez, & Lolas, 2007). Por su amplia utilización, en los últimos años se han publicado diversos trabajos en relación con la calidad genética, entre ellos, algunos casos de líneas y colonias de ratones y ratas que han perdido sus características genéticas, conllevando a la desvalorización de los resultados obtenidos, pérdida de tiempo y de recursos.

El bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, es el único centro de crianza, manejo, mantenimiento y de investigaciones

preclínicas que cumple con los parámetros establecidos y responde a diversos convenios como bioterio a nivel nacional; actualmente cuenta con dos especies de roedores utilizados en investigación: la WKY y el ratón *Mus musculus*. Las WKY son los animales más utilizados en una gran variedad de investigaciones, siendo los principales ensayos de determinación de efecto farmacológico de plantas autóctonas y ensayos toxicológicos.

La determinación de polimorfismos de secuencia simple repetida (microsatélites), los cuales son regiones de ADN que contienen di, tri, o tetra nucleótidos repetidos que son encontrados al azar en el genoma, son utilizados como marcadores moleculares en una gran variedad de aplicaciones en el campo de genética, como pueden ser parentescos y estudios de poblaciones. Esto se debe a su capacidad para generar una huella genética personal o perfil genético (Benavides & Guénet, 2003).

El análisis de microsatélites es el método más recomendado para el control genético; por lo cual se planteó llevar a cabo la determinación de dos microsatélites D1Mgh6 y D17Mit3, los cuales muestran una variación elevada y son altamente polimórficos. Tal y como fue demostrado por Deschepper, Prescott, Hendley y Reudelhuber (1997), en un estudio en el que se evaluaron 432 microsatélites en WKY y otras cepas relacionadas, D1Mgh6 y D17Mit3 muestran una variación elevada, dando además, una visión general de las características genéticas de cada cepa. En Guatemala no se ha llevado a cabo ninguna investigación del perfil genético o determinación de pureza genética de animales de laboratorio, a pesar de que varias universidades privadas y varios centros de investigación y facultades dentro de la Universidad de San Carlos realizan continuamente investigaciones utilizando diferentes animales de experimentación, por lo cual la presente investigación plantea crear una visión acerca de la condición genética de las ratas WKY del bioterio utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional determinando así el polimorfismo que muestran los microsatélites D1Mgh6 y D17Mit3 mediante el análisis del número de alelos y condición genética; además se llevó a cabo una comparación de los tamaños (pares de bases) teóricos característicos según el banco genómico de la rata y de los productores Charles Rivers y los NIH.

## Materiales y métodos

### Animales

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de ocho ratas (parejas reproductoras) que conforman todo el núcleo de fundación de la colonia WKY del bioterio. Todas las ratas utilizadas en experimentación provienen de estas parejas reproductoras, por lo que, al

realizar el análisis de las ocho ratas, se obtiene la información genética de la población completa razón por la cual no se realizó un cálculo estadístico para determinar el número de muestra.

### Extracción, cuantificación y pureza del ADN

Se llevó a cabo la toma de muestra para extracción de ADN a partir del tejido de oreja, utilizando el kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit. El ADN purificado fue almacenado a -20°C.

Se determinó la cantidad y pureza del ADN extraído mediante espectrofotometría, realizando la dilución de 20 µL de ADN purificado en 980 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8.0 (Invitrogen), para luego determinar la absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm, en espectrofotómetro Genesys 10 S (Sambrook & Russel, 2001).

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9% aplicando 6 µL de ADN purificado mezclados con 2 µL de RediLoad®, se empleó un marcador de peso molecular de 1 Kb. Las condiciones de la electroforesis fueron 90 V durante 80 min. Posteriormente el gel se reveló mediante inmersión en GelRed® durante 30 min y las bandas se visualizaron en transiluminador a 254 nm (Trasiluminator Benchtop UV).

### Análisis de microsatélites y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR para cada uno de los microsatélites se realizó utilizando 43 µL de Platinum PCR superMix (Promega®), 0.1 µM de los primers forward y reverse (Tabla 1), 5 µL de RediLoad 10X con 100 ng de ADN purificado, para un volumen final de reacción de 50 µL.

**Tabla 1.** Características de los primers

Microsatélite	Secuencia
<b>D1Mgh6</b>	Forward 5'-TGCATGCCCACAGTACACAT- 3'
	Reverse 5'-CCAAGCACACTAATGCCTGA- 3'
<b>D17Mit3</b>	Forward 5'-TAAGGTCCCTCCAGACTCCA- 3'
	Reverse 5'-TGGGCAGAGAACAGCAGTC- 3'

### Análisis del ADN

La amplificación se llevó a cabo en termociclador 2720 Applied Biosystems®, con 1 ciclo de desnaturalización a 95°C por 4 min, 30 ciclos de amplificación usando: 94°C por 45 s; 51 °C para el microsatélite D1Mgh6 y 52°C para el microsatélite D17Mit3 por 45 s; 72 °C por 30 s y un ciclo de extensión final a 72°C por 4 min.

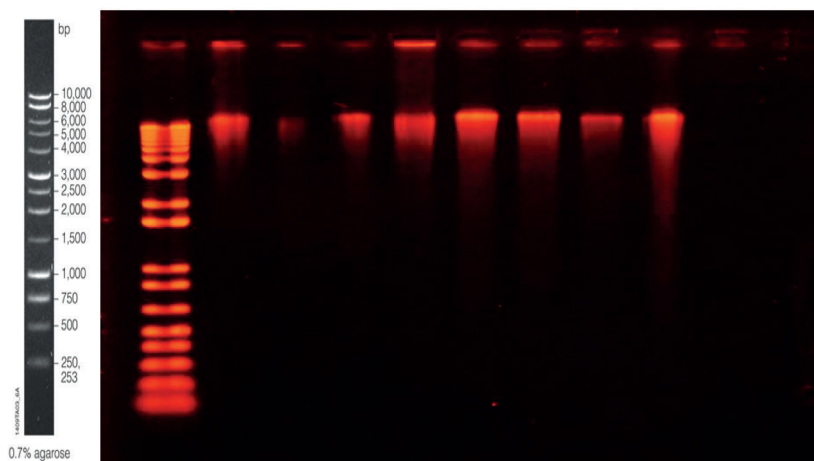
Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% (p/v) con buffer TBE 0.5 X, cargando 8 µL del producto de PCR. La electroforesis se corrió a 110 V por 30 min. El gel fue revelado utilizando GelRed 3X, las bandas se visualizaron en transiluminador a 254 nm.

El tamaño del fragmento amplificado fue determinado observando y comparando el

tamaño de la banda obtenida con un marcador de peso molecular de 100 pb. Los fragmentos esperados para las ratas WKY son 145 pb para D1Mgh6 y 201 pb para D17Mit3.

### Resultados

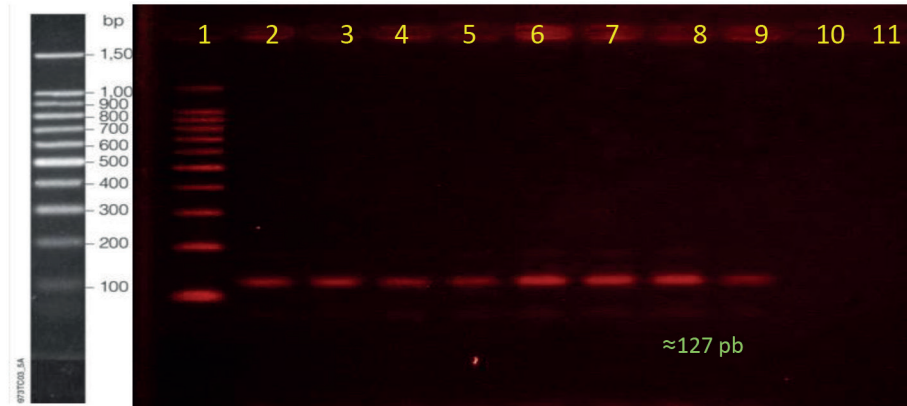
En la figura 1 se observan las ocho muestras analizadas (pozo 2 - 9), en las cuales se logró una extracción adecuada de ADN, observándose una banda arriba de 10,000 pares de bases la cual corresponde al ADN completo de la rata; idealmente en una muestra de ADN íntegra se debería observar una banda estrecha cercana al pozo, como se observa en los pozos 2, 3, 4, 5 y 8; sin embargo en los pozos 6, 7 y 9 el ADN muestra una cola, lo que corresponde a cierto grado de fragmentación de ADN.



**Figura 1.** Resultados de la electroforesis de integridad del ADN extraído de la colonia de WKY obtenido en gel de agarosa al 0.9 % a 90 v por 75 min, pozo 1: escalera 1kb, pozo 2-9 muestras de ADN WKY, pozo 10: control negativo (sin ADN) y pozo 11: vacío.

Los resultados para la amplificación del microsatélite D1Mgh6 se muestra en la figura 2. Las ocho ratas de la cepa WKY muestran una condición monomórfica y homocigota,

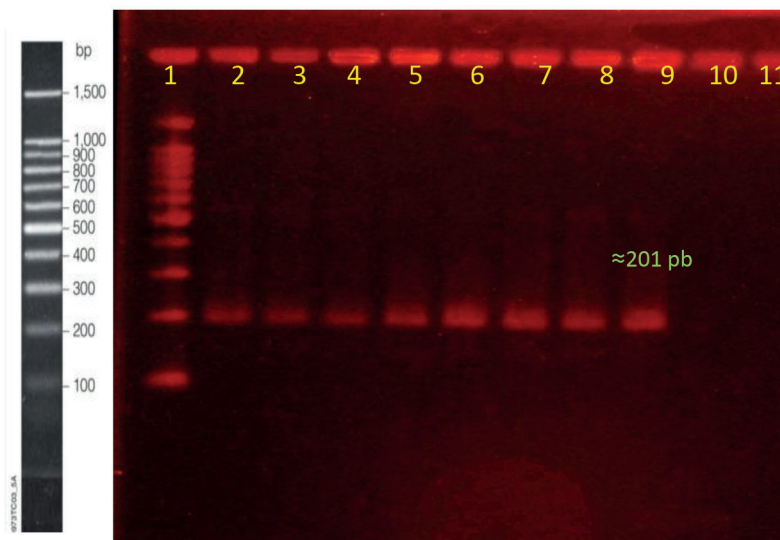
debido a que solamente se observa una banda con un tamaño estimado para el microsatélite de 127 pares de bases.



**Figura 2.** Electroforesis de productos de amplificación del microsatélite D1Mgh6 de la colonia de WKY, obtenidos en gel de agarosa al 0.9 % a 110 V, pozo 1: escalera 100pb, pozo 2 -9 productos de amplificación microsatélite D1Mgh6 de WKY, pozo 10: control negativo (sin ADN), pozo 11: vacío.

Los productos de amplificación del microsatélite D17Mit3 que se observan en la figura 3 muestran una condición monomórfica y homocigota para

las muestras de rata WKY que corresponden a un tamaño aproximado de 201 pb.



**Figura 3.** Electroforesis de productos de amplificación del microsatélite D17Mit3 de la colonia de WKY. Productos de amplificación observados en gel de agarosa al 0.9 %, pozo 1: escalera 100pb, pozo 2-9 productos de amplificación microsatélite D17Mit3 de ratas Wistar Kyoto, pozo 10: control negativo (sin ADN), pozo 11: vacío.

## Discusión

En el trabajo con animales de laboratorio es necesario garantizar la calidad de estos, con la finalidad de asegurar la validez y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Las ratas WKY del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia se han utilizado durante mucho tiempo en ensayos de experimentación y nunca se han realizado estudios acerca de su caracterización genética.

Para llevar a cabo la evaluación genética de las ratas WKY se hizo la determinación de polimorfismos de secuencia simple repetida (microsatélites) de D1Mgh6 y D17Mit3, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este es uno de los métodos mejor recomendados como control de calidad genética, debido a su capacidad para generar una huella genética personal o perfil genético, ya que además presenta variaciones características entre diferentes poblaciones y especies (Bryda & Riley, 2008).

La elección de los oligonucleótidos iniciadores D1Mgh6 y D17Mit3 se basó en los datos reportados en The Rat Genome Database (RGD); estos se encuentran en el cromosoma 1 y 17 de la rata respectivamente, además que muestran un alto grado de polimorfismo y tienen diferentes variaciones en su longitud dependiendo de la cepa de ratas a estudiar y también se han evaluado específicamente en otros estudios en ratas WKY (Serikawa et al., 1992; Deschepper et al., 1997; Mashimo, et al., 2006).

Obtener un ADN de buena calidad es importante para llevar a cabo la técnica de PCR, a pesar de que como se mencionó en la figura 1, hay cierto grado de fragmentación en tres muestras, estas no alteran los datos obtenidos en la investigación debido que la fragmentación es mínima y la principal desventaja de tener ADN

fragmentado es cuando se necesita llevar a cabo la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular (Romero, Díaz, Rendón, & Rocha, 2014), ya que los microsatélites a amplificar tienen un tamaño de 100-200 pb, esto no representa ningún problema.

Según la base de datos genómicos de la rata (RGD, 2015) las variaciones reportadas para el microsatélite D1Mgh6, en diferentes cepas de ratas son: 127, 129, 137, 141 y 145 pares de bases, debido a que la cepa que se está evaluando corresponde a ratas WKY el tamaño del microsatélite debe de ser de 145 pares de bases, por lo cual la cepa de ratas WKY en estudio no corresponde al tamaño específico del microsatélite para la cepa (Figura 2).

De igual forma al compararlo con el estudio llevado a cabo por Deschepper et al., (1997), en el cual se reportan las variaciones que pueden existir en las ratas WKY obtenidas de dos proveedores (Charles River y NIH), el microsatélite D1Mgh6 debe corresponder a un tamaño de 145 pares de bases para una condición homocigota para las ratas WKY de los NIH y una condición heterocigota con un tamaño de 145 y 147 pares de base para las ratas WKY del proveedor Charles River. También en el estudio de Mashimo et al., (2006), se determinó que existe una gran variabilidad genética con respecto a los microsatélites de las cepas de ratas WKY obtenidas de diferentes laboratorios de producción de animales de laboratorio.

La variación en la longitud del microsatélite con respecto a la esperada puede deberse a mutaciones por deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN (Romero et al., 2014) en la primera pareja o en las primeras generaciones de ratas WKY del bioterio, causando de esta manera una disminución en el número de pares de bases de 145 a 127.

Las variaciones reportadas para el microsatélite D17Mit3 según el RGD (2015) son: 187, 191, 193, 195, 199, 201, 211 y 213 pb. Los productos obtenidos del microsatélite (Figura 3), tienen un tamaño aproximado de 201 pb, este tamaño corresponde al reportado para la cepa de ratas WKY en el rat genómico database. Al compararlo con el estudio de Deschepper et al., (1997), las variaciones para el microsatélite D17Mit3 corresponden a 201 pb para las ratas WKY de NIH y a 201 y 205 pb representando una condición heterocigota para las ratas WKY de los laboratorios Charles River; por lo cual las ratas WKY de bioterio sí cumplen con este parámetro de calidad genética para la cepa.

El resultado obtenido con el microsatélite D1Mgh6 no significa que la cepa WKY del bioterio ya no se pueda utilizar en estudios de experimentación, ya que en el estudio llevado a cabo por Rodríguez (2008) en donde se llevó a cabo el monitoreo genético y fenotípico en ratas no consanguíneas Sprague-Dawley, evaluando ocho microsatélites, se determinó que la cepa no ha conservado la variabilidad que caracteriza a estos roedores y algunos microsatélites no cumplieron con el tamaño estimado para la cepa.

Por lo anterior en investigaciones futuras en el bioterio deberían de evaluarse más microsatélites ya que en esta investigación únicamente se evaluaron dos, esto permitirá tener un panorama general de la cepa y su variación con respecto a lo reportado por las bases de datos. Además, se debe considerar que la cepa WKY ha variado con respecto a sus características genéticas debido al manejo de la colonia desde su origen (Howes & Louis, 1990) y que los estudios actuales demuestran que existe variabilidad en los microsatélites de la rata WKY de diferentes laboratorios productores (Mashimo et al., 2006).

Sin embargo debido a que la cepa de ratas WKY es consanguínea y como se mencionó anteriormente tiene una condición homocigota y homoalélica para los microsatélites evaluados, no se puede utilizar en estudios de experimentación de efecto farmacológico o estudios toxicológicos donde sea necesario tener un modelo poblacional (no consanguíneo). además, según los diferentes productores de animales de laboratorio, la cepa WKY se debe utilizar únicamente como grupo control en estudios con ratas SHR (espontáneamente hipertensas).

### Agradecimientos

Al personal de Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por su apoyo en la realización del experimento y al Licenciado Rodrigo Vargas por su asesoría.

### Referencias

- Benavides, F., & Guénet J.L., (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones*. Madrid: Universidad de Alcalá.
- Bryda, E. C., & Riley, L. K. (2008). multiplex microsatellite marker panels for genetic monitoring of common rat strains. *Journal of the american association for laboratory animal science*, 47(3), 37-41.
- De Jesús, R., Moreno, N., & Martínez, J. A., (2005). Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de ratones consanguíneos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista científica. XV* (2), 134-140.
- Deschepper, C.F., Prescott, G., Hendley, E.D., & Reudelhuber, T.L., (1997). Genetic characterization of novel strains of rats

- derived from crosses between wistar-kyoto and spontaneously hypertensive rats, and comparisons with their parental strains. *Journal of laboratory animal science*. 47(6), 638-646.
- Howes, L.G., & Louis, W.J., (1990). Genealogy of the spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat strains: Implications for studies of inherited hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 16(7), 1-5
- Martínez, C., Osorio, M., Rodríguez, E., & Lolas F. (2007). *El animal como sujeto experimental: Aspectos técnicos y éticos*. Chile: Universidad de Chile.
- Mashimo, T., Voigt, B., Tsurumi, T., Naoi, K., Nakanishi, S., Yamasaki, K., ... Serikawa, T. (2006). A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains. *BMC Genetics*, 7(19),1-8. doi:10.1186/1471-2156-7-19
- Romero, A., Díaz, A., Rendón, B., & Rocha, M. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. México: Secretaria de medio ambiente y recursos naturales.
- Rodríguez, N. (2008). *Monitoreo genético y fenotípico en ratas no consanguíneas Sprague-Dawley producidas en el Bioterio de la Universidad de los Andes*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes, Venezuela.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*. New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Serikawa, T., Kuramoto, T., Hilbert, P., Mori, M., Yamada, J., Dubay, C. J., ... Beckmann, J. S. (1992). Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics*, 131(3), 701-721.
- The rat genome database (2015). Genomic, phenotypic and environmental variations and disease. Nucleic acids research. Wisconsin: Medical college of Wisconsin. Recuperado de <http://rgd.mcw.edu/>.