

Revisión

¿Cómo sabemos si los ratones consanguíneos usados en investigación son genéticamente puros?

Rosa De Jesús

El desarrollo de las cepas consanguíneas de ratón ha proporcionado modelos de animales genéticamente uniformes, para el estudio en diferentes áreas biomédicas y farmacéuticas, entre ellas la parasitología. Las características de estas cepas pueden ser alteradas por tres factores como son: la contaminación genética, las mutaciones y por la deriva genética debido a la heterocigosidad residual. Diferentes técnicas se han desarrollado con la finalidad de observar la posible pérdida de la condición genética de las cepas consanguíneas de los ratones que se producen en los bioterios con fines de experimentación. Las técnicas desarrolladas hasta la década de los ochenta se basaron en el análisis de caracteres fenotípicos, es decir, en el análisis del producto de la expresión de los genes; sin embargo, a partir de esta década se comenzaron a usar métodos de análisis directo del ADN mediante la detección de marcadores moleculares, debido a que pueden ocurrir variaciones genómicas que no trascienden al plano fenotípico, pasando por tanto casi inadvertidas. La presente revisión expone los diferentes métodos para realizar el control genético de las diferentes cepas consanguíneas de ratón usadas en la investigación y plantea las perspectivas futuras en el país en esta área.

Palabras claves: Ratones consanguíneos, control genético.

Los ratones producidos en diferentes bioterios son considerados la materia básica para el desarrollo de estudios en las áreas de Biomedicina, Toxicología, Bioquímica, Endocrinología, Parasitología, Biología del Desarrollo y Farmacia entre otras, además que son una poderosa herramienta para el estudio de la genética de los mamíferos (Benavides *et al*, 2001). En relación a la investigación en el área de la Parasitología, es bien conocido, entre los investigadores que desarrollan sus actividades en esta área la importancia que tiene la genética de las distintas cepas de ratones consanguíneos (entre estas las cepas *BALB/c* y *C57BL/6*) en la manifestación de la resistencia o susceptibilidad a diferentes parásitos. Entre estos mencionaremos: *Schistosoma mansoni* (Jones y Kusel, 1985); *Angiostrongylus costaricensis*

(Geiger *et al*, 2003); *Litomosoides sigmodontis* (Le Goff, *et al*, 2002); *Leishmania amazonensis* (Ji *et al*, 2003), *Leishmania major* (Mitchell, 1983; Muraille *et al*, 2003); *Leishmania mexicana* (Monroy-Ostria *et al*, 1994); *Trypanosoma cruzi* (Andrade *et al*, 2002; Roggero *et al*, 2002); *Toxoplasma gondii* (Liesenfeld *et al*, 1996; Schluter *et al*, 1999; Fux *et al*, 2003); entre otros.

Desde que el *background* o antecedente genético de los animales usados en la investigación, es reconocido como un factor importante en la investigación con animales, una gran cantidad de cepas consanguíneas de ratones han sido establecidas y distribuidas alrededor del mundo, por lo que el Comité Internacional de la Nomenclatura del ratón, ha definido las diferentes cepas y subcepas de acuerdo a su tipo genético. Considerado el ratón de laboratorio como un «reactivo biológico», éste debe ofrecer un nivel de calidad al menos similar al resto de los reactivos empleados en esta actividad (Zúñiga *et al*, 2001), que permita la reproducción de los resultados. La calidad del ratón de laboratorio viene dada por las

Laboratorio de Fisiología Animal. Departamento de Biología.
Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida,
Venezuela
e-mail: rosadej@ula.ve

¿Cómo sabemos si los ratones consanguíneos usados en investigación son genéticamente puros?

características fenotípicas que presentan, las cuales son el resultado de la interacción entre el genotipo y el ambiente (Zúñiga *et al*, 2001). Si las condiciones ambientales son controladas la variabilidad observada en las experiencias realizadas con estos animales se debe entonces principalmente al **patrimonio genético**. La diferencia en el patrimonio genético de los ratones de laboratorio determina las diferencias de las características que éstas presentan (Altman & Katz, 1979).

TIPOS GENÉTICOS DE LOS RATONES DE LABORATORIO

Los tipos genéticos de ratones de laboratorio se establecen sobre la base de la no consanguinidad y la consanguinidad entre los animales. Estos términos significan: a) Los ratones no consanguíneos: son animales que tienden a mantener el coeficiente de consanguinidad en el nivel más bajo posible, determinado por el establecimiento de acoplamiento entre animales no emparentados por lazos familiares, lo que conlleva a que estos animales presenten un alto grado de heterocigosis no definido; b) Los ratones consanguíneos: son los que tienen un coeficiente de consanguinidad en el nivel más alto, $F=99,6\%$, lo cual significa que existe la probabilidad en un 99,6% de que dos genes de cualquier locus sean idénticos. Estos animales se obtienen luego de 20 o más generaciones de apareamientos consecutivos de hermanos por hermanas o padre por hijas. Centrando nuestra atención en las cepas consanguíneas de ratones podemos decir que la variación genética es reducida y como resultado (comparándolas con las no consanguíneas) son necesarios menos animales para obtener resultados estadísticamente significativos (Bulfield & Bantin, 1981), siendo esto una ventaja a su uso en la experimentación. En la actualidad se producen más de 3000 cepas de ratones definidas genéticamente; entre éstas, encontramos las cepas de ratones consanguíneos, congénicos, mutantes y transgénicos (Festing, 1993), algunas de las cuales se mantienen desde principios del siglo XX; cada una de ellas presentan características específicas que le dan individualidad y que permiten sean usadas en investigaciones particulares (Lodish *et al*, 2002; Silver, 2001; Van Zutphen *et al*, 1993). Entre las características que son señaladas para las cepas consanguíneas, debemos resaltar dos que son significativamente importantes y que sirven de fundamento para la realización del control genético. Estas son: 1.- la

isogenicidad, que significa que los animales presentan más del 99% de los *loci* idénticos; es decir, poseen el mismo genotipo en un locus determinado y 2.- la homocigosis: en más del 99% de los *loci* secretados desde la población parental. La alteración de estas características conlleva a la alteración del patrimonio genético de las cepas. Es por tanto indispensable que se mantengan programas de control de la calidad de la integridad genética de las cepas de ratones consanguíneos; estos programas son conocidos a nivel internacional como controles genéticos o *monitoreo* genético en el inglés.

CONTROL GENÉTICO

El control de la pureza genética es de gran importancia en toda cepa de ratones consanguíneos, pues cualquier alteración no detectada de su patrimonio genético puede suponer también alteración de sus características fenotípicas, conllevando a resultados alterados en los trabajos experimentales realizados con estos. Tales alteraciones pueden producirse, por mutaciones espontáneas, las cuales resulta inevitables. Estas tienen lugar de forma aleatoria y con frecuencia inadvertida, además que pueden acumularse en el tiempo, haciendo que la cepa se aleje progresivamente de su patrón genético inicial, hasta alcanzar diferencias inaceptables. En otras ocasiones, es posible que se produzca una contaminación genética con el genoma de otra cepa diferente, debido a errores en el manejo de las cepas, o debido a que las instalaciones en las cuales se mantienen estas cepas no cumplen con las condiciones que permitan que no ocurra la contaminación genética por incursión de animales de genotipos diferentes, pero de igual color de pelaje, dentro de las cajas de alojamiento de éstas. Estas alteraciones son fácilmente evitables mediante un programa de cruces apropiados y realizando correctivos a las instalaciones; sin embargo, cuando ocurren sus efectos son drásticos e irreversibles (Festing, 1992).

MÉTODOS USADOS EN EL CONTROL GENÉTICO DE LOS RATONES CONSANGUÍNEOS

Análisis de la Función Reproductiva

Los índices de productividad o función reproductiva de las diferentes cepas que se producen en los bioterios deben ser registrados como parte del trabajo de rutina dentro de las prácticas de producción y mantenimiento. Estos índices de productividad de

las cepas, a controlar genéticamente, son indicadores valiosos, ya que las cepas de ratones consanguíneos normalmente presentan una función reproductiva pobre como resultado de la «depresión de consanguinidad» originada por tener un número de genes recesivos medianamente deletéreos en estado de homocigosis. Por tal motivo, las generaciones producidas por F1 híbridos (provenientes del cruce de dos cepas consanguíneas diferentes) presentan una excelente función reproductiva debida al vigor híbrido que se manifiesta; por lo tanto, si una pareja perteneciente a una cepa consanguínea presenta un número de crías superior al establecido no necesariamente puede ser una mutación; sin embargo, se debe verificar realizando otras pruebas de control que corroboren tal hecho. Los índices normales de productividad en forma general, suelen ser: para las cepas de ratones no consanguíneos de 8-16 crías por camada; para las cepas de ratones consanguíneos de 4-8 crías por camada y para las cepas F1 híbridas de 9-11 crías por camada. Cuando existen contaminaciones genéticas pueden presentarse variaciones fuera de estos rangos; sin embargo, se debe tener en cuenta que los valores pueden variar dentro de los rangos dependiendo de la cepa de la cual se trate y de las condiciones ambientales en las cuales se encuentren éstas (Altman & Katz, 1979).

Injertos de Piel

Este método es sólo conveniente para probar la isogenicidad de los animales pertenecientes a una determinada cepa (F=98.6%). La aceptación permanente de injertos de piel entre individuos de la misma cepa define si ésta es isohistogénica o no (Bailey & Usama, 1960). Esta técnica se utiliza con la finalidad de detectar alteraciones a nivel del locus H2; es decir, de los genes que codifican las proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad los cuales están implicados en el rechazo o aceptación de los injertos o transplantes. El injerto de piel es una de las técnicas más sensibles y fue la técnica de preferencia en la década de los setenta, aunque aun es usada. Cuando los animales analizados son consanguíneos y se realiza un trasplante o injerto de piel entre ellos, los alelos del *locus* H2 deben ser compatibles, entre el receptor y el donador en consecuencia, debe ocurrir una aceptación del injerto de piel por parte del receptor. En el caso de que exista una contaminación genética, dentro de una cepa consanguínea y se realice el control genético mediante esta técnica, ocurre el rechazo del injerto.

Análisis osteométrico o de la Morfología mandibular

Cuando se aplica un método para analizar el patrimonio genético de una cepa consanguínea, se buscan características que sean altamente heredables y suficientemente variables entre éstas, para que exista la oportunidad de que las mismas puedan servir para identificarlas, diferenciarlas y caracterizarlas genéticamente. Varias características del esqueleto cumplen perfectamente con estos requerimientos. La técnica que analiza la morfología del esqueleto es relativamente rápida, económica y muy sensible. Mediante este método se examinan las características de la mandíbula en 11 medidas y se comparan con las medidas de referencia de la cepa analizada, para lo cual se utilizan paquetes estadísticos básicos que presentan análisis de regresión sobre las variables dependientes ya establecidas dentro del programa para las diferentes cepas; se analizan y se realizan las comparaciones de las medidas resultantes y se discrimina entre éstas (Festing & Totman, 1980).

Análisis del polimorfismo bioquímico

Los «métodos bioquímicos» utilizan la electroforesis como técnica fundamental para realizar el control genético de las cepas de ratones consanguíneos (Hayden & Sharp, 2001; Kahan *et al*, 1982; Kurtz *et al*, 1989; Groen, 1977). Este método ha sido aplicado con éxito en la caracterización de las cepas consanguíneas, ya que cada una de éstas viene definida por un patrón de variantes isoenzimáticas a modo de carnet de identidad bioquímica. Este método estudia las diferencias existentes entre los distintos alelos de los genes de las enzimas (isoenzimas), por lo que se fundamenta en el polimorfismo de las proteínas y de las enzimas; éstos pueden ser identificados indirectamente analizando sus productos mediante electroforesis y usando métodos de coloración adecuada para visualizar los resultados. Se han descrito cientos de enzimas polimórficas para definir todas las cepas consanguíneas y subcepas de ratones de laboratorio existentes; sin embargo, en la práctica para evidenciar contaminación cruzada entre cepas, es suficiente utilizar alrededor de 10-20 para evidenciar la contaminación, especialmente entre cepas albinas (Demant, 1980). Algunos marcadores bioquímicos más comúnmente usados para la caracterización genética de los animales de laboratorio, son: glucosa fosfato isomerasa (Gpi-1), fosfatasa alcalina (Akp-1); Anhidrasa carbónica (Car-2), Estereasa 1 (Es-1);

¿Cómo sabemos si los ratones consanguíneos usados en investigación son genéticamente puros?

Estereasa 2 (Es-2), Estereasa 3 (Es-3), Estereasa 10 (Es-10), Glucosa -6-fosfato deshidrogenasa (Gpd-1); (Nomura *et al*, 1984)

Análisis con marcadores inmunológicos o inmunogenéticos

Un gran número de marcadores inmunogenéticos pueden ser usados para el control genético. Sin embargo; solamente un cierto número de estos marcadores se procesan mediante procedimientos que son relativamente fáciles de desarrollar en las pruebas rutinarias usadas en el control de la calidad genética de las cepas de ratones consanguíneos. Los marcadores inmunogenéticos, son un grupo de proteínas que actúan a nivel inmunológico y su codificación está determinada genéticamente; éstas son clasificadas de acuerdo a su naturaleza y función dentro del *loci* aloantígeno: las proteínas asociadas a la membrana celular (antígenos de eritrocitos) y las asociadas a la diferenciación (antígenos de células del tejido linfóide). Entre éstos últimos tenemos, los *loci* aloantígenos de histocompatibilidad, presentes sobre todas las células, de las cuales se ha asumido que sirven de marcadores virtualmente para todos los cromosomas (Ferraro *et al*, 1998).

Tenemos también dentro de los marcadores inmunogenéticos los alotipos. Los más usados son: los alotipos de inmunoglobulinas: en este caso nos referimos a moléculas de inmunoglobulinas de la misma clase, con variación polimórfica controladas genéticamente y a los alotipos de proteínas del suero, dentro de los cuales se catalogan ciertas proteínas conocidas como complemento hemolítico (*HC*) las cuales son los cinco componentes del complemento. Para el desarrollo de la técnica se utilizan antisueros monoclonales mientras que los métodos de detección usados son la prueba de citotoxicidad, hemaglutinación, ELISA, injerto de piel e inmunodifusión (Festing, 1982).

Marcadores del color del pelaje

Mediante esta técnica se revelan los genes del color del pelaje «ocultos» los cuales son observados en el cruce albino por pigmentado. Los colores del pelaje son distinguibles a simple vista y no requieren un equipo especial para la realización de la prueba. Existe un número grande de variaciones

genéticas en el color del pelaje de los ratones (Tanaka *et al*, 2000), pero solamente son usadas un número limitado en el control genético. Los fenotipos relacionados con los alelos del color del pelaje son: **cc** manifiesta albinidad, **aa** manifiesta color agouti, **bb** manifiesta el color negro, **dd** el color se presenta diluido, **PP** se presentan ojos color rojo (Peterson *et al*, 2001; Griffiths *et al*, 1995). Existe, a nivel de los investigadores, una alta preferencia por el uso de cepas albinas en sus experimentos, y esto causa serios problemas en términos de enmascaramiento de contaminación genética por el amplio número de cepas que tienen pelaje de color blanco. Esto se debe a que los alelos dominantes cubren la apariencia de los alelos recesivos y el efecto epistático de un locus siempre enmascara toda expresión fenotípica de los *loci* hipostáticos, por lo que son necesarias pruebas de cruzamientos para descubrir el color exacto de los genotipos. Esta técnica es de fácil desarrollo y de relativamente fácil interpretación, pero es una técnica que lleva mucho tiempo para la obtención de los resultados, además de que se debe contar con conocimientos de la genética Mendeliana. Ésta consiste solamente, en realizar diferentes tipos de cruzamientos entre una cepa de color, generalmente, la cepa *DBA/2*, con la cepa albina a analizar (Peterson *et al*, 2001). Para obtener el resultado de estas pruebas se requieren algunas semanas hasta que la progenie de la *F1* haya alcanzado la edad en la cual la expresión del color del pelaje sea completo. Cuando se realizan los cruces de prueba y encontramos fenotipos diferentes a los esperados se debe pensar en la existencia de una contaminación genética.

Marcadores de ADN

Todos los métodos de control genético en ratones planteados hasta ahora se basan en el análisis de caracteres fenotípicos, producto de la expresión de los genes. Puede ocurrir, sin embargo, que se produzcan variaciones genómicas que no trasciendan al plano fenotípico, pasando casi inadvertidas. Por esta razón, los métodos de análisis directo del ADN, mediante la detección de marcadores moleculares, son incomparablemente más exactos y adecuados si deseamos tener un control estricto de la pureza genética de los ratones consanguíneos. Existe un grupo de técnicas moleculares para el análisis genético que permiten la caracterización precisa de individuos las cuales son aplicadas exitosamente en el caso de los ratones consanguíneos (Love *et al*, 1990). Entre estas técnicas moleculares tenemos: el análisis del

polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (*RFLP's*; iniciales en inglés), polimorfismos de repetición o de longitud (*SSLP's* iniciales en inglés) y la huella del ADN (*fingerprinting*: en el inglés), (Griffiths *et al*, 1999).

Análisis del Polimorfismos de Repetición o de longitud:

Estos análisis son conocidos también como Análisis de Repeticiones en tandem de número variable (*VNTR's*; iniciales en inglés). Estos marcadores están formados por un número variable de secuencias cortas y repetidas. Dentro de éstos encontramos dos tipos rutinariamente usados en los estudios del genoma: los que usan marcadores de minisatélites y los que usan marcadores de microsatélites (Bulfield & Bantin, 1981). Se denominan minisatélites algunas secuencias simples de ADN que se encuentran en regiones relativamente cortas de 1-5 kb, formadas por hasta 20-50 unidades repetidas, cada una compuesta por 15-100 pares de bases, repetidas desde 10 a miles de veces (Tanaka *et al*, 2000). El polimorfismo de los minisatélites son ampliamente distribuidos en el genoma del ratón por lo que pueden ser una fuente de un gran número de marcadores polimórficos en estudios de relación entre cepas consanguíneas (Benavides *et al*, 2001). Los microsatélites son elementos genómicos que consisten en la repetición de secuencias di-,tri- o tetraméricas de nucleótidos. Los más comunes en el genoma del ratón son miembros de la clase dinucleótidos $(CA)_n$ y $(GA)_n$ repetidas múltiples de veces (frecuentemente entre 20 a 400 bases de longitud) en arreglos tandem (Montagutelli *et al*, 1991; Tanaka *et al*, 2000). Para el análisis de estos polimorfismos, es necesario realizar su amplificación mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Benavides *et al*, 2001). Los microsatélites son altamente polimórficos y están dispersos también a través del genoma de muchos eucariotas (Hearne *et al*, 1991), además de que su frecuencia es mayor que la de los minisatélites. Por ejemplo, se calcula que existen acerca de 100.000 copias del dinucleótido $(CA)_n$ (con un n mayor de 10) en el genoma del ratón, dando un promedio de un locus cada 30 kb. Presentan también la ventaja de estar distribuidos al azar, en intrones, regiones codificantes o intergénicas. El análisis de los microsatélites es particularmente usado en el control genético de las cepas consanguíneas de ratón por ser una forma rápida y económica. Se usa para detectar contaminación entre cepas albino estrechamente relacionadas, donde los marcadores bioquímicos e inmunológicos son insuficientes (Bongers *et al*, 1998). Una de las ventajas

del uso de marcadores de microsatélites, para el control genético de las cepas de ratones de laboratorio, es que la técnica de la PCR es relativamente menos complicada de aplicar que la de los marcadores bioquímicos e inmunológicos. Además de que algunos oligonucleótidos cebadores identifican más de cuatro alelos diferentes en las cepas comunes de ratones consanguíneos (Benavides *et al*, 2001) esto la hace una técnica sensible para el control de la pureza de la genética de las cepas consanguíneas de ratones, a pesar de que el porcentaje de polimorfismo de microsatélites entre animales consanguíneos de laboratorio sea muy estrecho (Hoffman, 1978).

Perspectivas futuras para el control genético de los ratones consanguíneos en el país:

Como se planteó al inicio, para que la investigación biomédica y farmacéutica que involucra el uso de animales de laboratorio sea eficaz y proporcione resultados reproducibles y comparables entre laboratorios, el criterio del cuidado animal incluyendo la constitución genética debe mantenerse en cuenta. En relación a ésta, la pérdida de autenticidad o contaminación genética de los grupos de ratones consanguíneos se ha convertido en un serio problema (Krog, 1976; Lamoreux, 2000). El uso de animales contaminados genéticamente resulta en considerable pérdida financiera, de tiempo valioso y de datos de investigación (Benavides *et al*, 200; Festing & Roderick, 1989). La bibliografía no reporta que los animales que son producidos por los diferentes bioterios del país y con los cuales se realiza la experimentación tanto Básica, Biomédica como Farmacéutica en todos los Institutos de Investigación y en las Universidades, hayan sido sometidos a controles genéticos, mediante técnicas de biología molecular, para comprobar su condición genética. No se ha determinado si los ratones consanguíneos pertenecientes a las cepas *BALB/c*, *C57BL/6*, *DBA/2* y *C3H/He* mantienen su integridad genética original de acuerdo a lo especificado por los laboratorios internacionales de las cuales fueron adquiridas. Para conocer si en el país se están usando ratones genéticamente puros, se está estandarizando la técnica de la PCR para realizar amplificación de marcadores de microsatélites y realizar el análisis genético de éstos; ya que ésta es una de las técnicas que ofrece mayor eficiencia en el objetivo de detectar cualquier contaminación genética (Zúñiga *et al*, 2001). Una vez estandarizada la técnica será establecida como técnica de control genético rutinario con la cual se mantendrá la vigilancia de la integridad genética de las mismas

¿Cómo sabemos si los ratones consanguíneos usados en investigación son genéticamente puros?

para garantizarle a la investigación Biomédica y Farmacéutica entre otras, que pueden contar con una materia básica para la investigación con calidad genética.

SUMMARY

Inbred strains of mice have provided genetically uniform animals for biomedical and pharmaceutical research, including parasitology. The characteristics of these strains can be altered by three factors: genetic contamination; mutation; and genetic drift resulting from residual heterozygosity. Various techniques have been elaborated to detect potential genetic deterioration in inbred strains of laboratory mice. Those developed before the 80s were based on the analysis of phenotypic characteristics, in other words on an analysis of what the genes produced. However, from the 80s on, direct DNA analysis using molecular markers became increasingly common. This was due to the fact that genomic variation might not appear at the phenotypic level and thus would be almost unnoticeable. The present work reviews the different methods of genetic control in inbred strains of laboratory mice and discusses future developments in this area in Venezuela.

REFERENCIAS

- Altman, P.L. & Katz, D.D. (1979). Inbred and genetically defined strains of laboratory animals. Part I. Mouse and Rats. Part II. Hamster, Guinea Pig, Rabbit and Chicken. Federation of American Society for Experimental of Biology. Bethesda. Maryland. 7- 320.
- Andrade L.O., Machado C.R., Chiari E., Pena S.D. & Macedo A.M. (2002). *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp. Parasitol.* **100**: 269-75.
- Bailey D.W. & Usama B. (1960). A rapid method of grafting skin on tails of mice. *Plastic and Reconstructive Surgery and the Transplantation Bulletin.* **25**: 424-425.
- Benavides F., Cazalla D., Fontanals A., Salaverri M., Goldman A. Buggiano V., *et al*, (1998). Evidence of genetic heterogeneity in a BALB/c mouse colony as determined by DNA fingerprint. *Laboratory Animals.* **32**: 80-85.
- Benavides F., Glasscock E., Coghlan L.G, Stern M.C., Weiss D.A. & Conti C.J. (2001). PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. *Laboratory Animals* **35**: 157-162.
- Bongers A.B.J., Sukkel M., Gort G, Komen K., & Ritchert C.J.J. (1998). Development and use of genetically uniform strains of common carp in experimental animal research. *Laboratory Animals.* **32**: 349-363.
- Bulfield G. & Bantin G (1981). Genetic monitoring of inbred strains of mice using electrophoresis and electrofocusing. *Laboratory Animals.* **15**: 147-149.
- Demant P. (1980). Histocompatibility genes and their use in genetic control of laboratory mice. En: Spiegel A, Erichsen S. and Solleved A. (eds) *Animal Quality and Models in Biomedical Research.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 299-306 pp.
- Ferraro T.N., Schill J.F., Ballas C., Mulholland N., Golden G.T. & Smith G.G., *et al*, (1998). Application to quantitative trait loci analysis of seizure susceptibility in mice. *Psychiatry Genet* **8**: 227-33.
- Festing M.F.W. & Totman P. (1980). Polyvalent strain-specific alloantisera as tools for routine genetic quality control of inbred and congenic strains of rats and mice. *Laboratory Animals* **14**: 173-177.
- Festing M.F.W. (1982). Genetic contamination of laboratory animal colonies: an increasingly serious problem. *ILAR News,* **25**: 6-10.
- Festing M.F.W. & Roderick T.H. (1989). Correlation between genetic distances based on single loci and on skeletal morphology in inbred mice. *Gen.Res.Camb.* **53**: 45-55.
- Festing M.F.W. (1992). Laboratory animal genetics: current status. *Laboratory Animals* **26**: 140.
- Festing M.F.W. (1993). Genetic quality control in laboratory rodents. *Aging Clin.Exp.Res.* **5**: 309-315.
- Fux B., Rodrigues C.V., Portela R.W., Silva N.M., Su C. Sibley D. *et al*, (2003). Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **71**: 392-401.
- Geiger S.M., Hoffmann W.H., Soboslay P.T., Pfaff A.W., Graeff-Teixeira C. & Schulz-Key H. (2003). *Angiostrongylus costaricensis* infection in C57BL/6 mice: MHC-II deficiency results in increased larval elimination but unaltered mortality. *Parasitol Res.* **90**: 415-20.
- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C. & Gelbart W.M. (1995). *Genética.* V Edición. Interamericana-McGraw-Hill.

- Griffiths A.J.F., Gelbart W.M., Miller J.H. & Lewontin R.C. (1999). *Modern Genetic Analysis*. W.H. Freeman and Company. New York.
- Groen A. (1977). Identification and genetic monitoring of mouse inbred strains using biochemical polymorphisms. *Laboratory Animals* **11**: 209-214.
- Hayden M.J & Sharp P.J. (2001). Targeted development of informative microsatellites (SSR) marked. *Nucleic Acids Research*. **29**: 1-10.
- Hearne C.M., McAleer, Love J.M., Aitman T.J., Cornall R.J. & Ghosh S., *et al*, (1991). Additional microsatellites markers for mouse genome mapping. *Mammalian Genome* **1**: 273-282.
- Hoffman H.A. (1978). Genetic quality control of the laboratory mouse (*Mus musculus*). En: *Origins of inbred mice*. ed. HC Morse III. Academic Press. 217-234.
- Ji J., Sun J. & Soong L. (2003). Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* **71**: 4278-88.
- Jones J.T. & Kusel J.R. (1985). The inheritance of responses to *Schistosomiasis mansoni* in two pairs of inbred strains of mice. *Parasitology* **90**: 289-300.
- Kahan B., Anerbach R., Alter B.J., & Bach F.H. (1982). Histocompatibility and isoenzyme differences in commercially supplied «BALB/c» mice. *Science* **217**: 379-382.
- Krog H.H. (1976). Identification of inbred strains of mice *Mus musculus* I. Genetic control of inbred strains of mice using starch gel-electrophoresis. *Biochemical Genetics*. **14**: 319-326.
- Kurtz W.T., Montano M., Chan L & Kabra P. (1989). Molecular evidence of genetic heterogeneity in *Wistar-Kyoto* rats: implications for research with spontaneously hypertensive rats. *Hypertensión* **13**: 188-192.
- Lamoreux M.L. (2000). The inbred mouse in pigmentation research: significance of a congenic developmental system. *Pigment Cell Res* **13**: 421-430.
- Le Goff L., Lamb T.J., Graham A.L., Harcus Y. & Allen J.E. (2002). IL-4 is required to prevent filarial nematode development in resistant but not susceptible strains of mice. *Int J Parasitol* **32**: 1277-84.
- Liesenfeld O., Kosek J., Remington J.S. & Suzuki Y. (1996). Association of CD4+T cell-dependent, interferon-gamma mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* **184**: 597-607.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira, Baltimore D. & Darnell J. (2002). *Biología Celular y Molecular*. Editorial Panamericana. Cuarta Edición.
- Love J., Knight A., McAleer M. & Todd J. (1990). Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analyzed microsatellites. *Nucleic Acids Research* **18**: 4123-30.
- Mitchell G.f. (1983). Murine cutaneous leishmaniasis: resistance in reconstituted nude mice and several F1 hybrids infected with *Leishmania tropica major*. *J. Immunogenet* **10**: 395-412.
- Montagutelli X., Serikawa T. & Guénet J-L. (1991). PCR-analyzed microsatellites: Data concerning laboratory and wild-derived mouse inbred strains. *Mammalian Genome* **1**: 255-259.
- Monroy-Ostria A., Fuentes-Fraga I., García-Flores C. & Favila-Castillo L. (1994). Infection of *BALB/c*, *C576B1/6* mice and F1 hybrid *CB6F1* mice with strains of *Leishmania mexicana* isolated from Mexican patients with localized or diffuse cutaneous leishmaniasis. *Arch Med Res* **25**: 401-406.
- Muraille E., De Trez C., Brait M., De Baetselier P., Leo O. & Carlier Y. (2003). Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized TH2 response. *J Immunol* **170**: 4237-41
- Incáni N.R., Morales G. & Cesari I.M. (2001). Parasite and vertebrate host genetic heterogeneity determine the outcome of infection by *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* **87**: 131-137.
- Nomura T., Esaki K., & Tomita T. (1984). *ICLAS. Manual for Genetic Monitoring of Inbred Mice*. University of Tokyo. 38-161.
- Nomura, T., Esaki K. & Tomita T. (1984). *Manual for Genetic Monitoring in inbred mice*. ICLAS. University of Tokyo Press. Cap. 1-3; 3-114.
- Peterson R.A., Danon S.J. & Eaton K.A. (2001) Comparison of gastritis and gastric epithelial proliferation in *Helicobacter heilmannii*-infected Nude and *BALB/c* mice. *Veterinary Pathology* **38**: 173-183.

¿Cómo sabemos si los ratones consanguíneos usados en investigación son genéticamente puros?

- Roggero E., Pérez A., Tamae-Kakazu M., Piazzon I., Nepomnaschy I. & Wietzerbin J. *et al.* (2002). Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in *BALB/c* y *C57BL/6* mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin Exp Immunol* **128**: 421-428.
- Silver L.M. (2001). *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. New York: Oxford University Press. Cp.7 y 8. 133-194.
- Schluter D., Deckert-Schulter M., Loreuz E., Meyer T., Rollinhoff M. & Bogdan C. (1999). Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondi*-susceptible *C57BL/6* mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii* – resistant *BALB/c* mice. *J. Immunol* **162**: 3512-18.
- Tanaka S., Itohara S., Sato M., Tanigochi T., & Yokomizo Y. (2000). Reduced Formation of granulomata in gd T cell Knockout *BALB/c* Mice Inoculated with *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*. **37**: 415-421.
- Van Zutphen L.F.M., Baumans V., & Beynen A.C. (1993). *Principles of laboratory animal science*. Elsevier NY. 127-142.
- Zúñiga J.M., Tur Marí J.A., Milocco S.N. & Piñeiro R. (2001). *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal*. McGraw-Hill. Interamericana. 179-202.
-