












Estructuración de una colonia de ratones *BALB/c* en la Unidad Experimental de Inmunoterapia de la Fundación Jacinto Convit – Venezuela

Duarte, M.A.¹ ; Navarro, E.¹ ; Carballo, J.² ; Negrón, E.¹ ; Blanca, I.¹ ; De Jesús, R.³ ; Rivodó, T.¹ ; Aranguren, D.¹ ; Convit, A.F.^{1,2*} 

¹Unidad Experimental de Inmunoterapia. Fundación Jacinto Convit. Caracas 1071. Venezuela. ²Jacinto Convit World Organization, Inc. Florida 33069. United States of America. ³Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología. Provincia de Panamá. Panamá.

✉ publicaciones@jacintoconvit.org

Resumen

Los modelos animales son parte fundamental de la investigación científica preclínica en el desarrollo de nuevas terapias, incluyendo drogas y terapias génicas. Para tales fines, es crucial contar con un modelo animal acorde con el estudio a realizar. En el bioterio de la Unidad Experimental de Inmunoterapia (UEI) de la Fundación Jacinto Convit (FJC) se estructuró una colonia de ratones *BALB/c* a fin de contar con una cepa pura para llevar a cabo proyectos de investigación experimental en cáncer de mama, utilizando la línea de células de tumor autólogo 4T1. Esta colonia se estableció a partir de dos parejas de ratones *BALB/c* proporcionados por la Universidad Simón Bolívar, asegurando condiciones estrictas de alojamiento en microaisladores, con alimentación adecuada, enriquecimiento ambiental y control detallado del micro y macroambiente requerido para la especie. El cuidado de los animales estuvo a cargo de un biólogo especializado. La expansión de esta cepa de ratones *BALB/c* se evaluó siguiendo un esquema de cruces endogámicos programados en cada tercer parto. La homocigisidad se determinó mediante la técnica de injerto de piel entre individuos de la misma cepa y el análisis comparativo de microsatélites. Se analizaron los datos obtenidos de 135 partos, con un máximo de 6 partos por caja reproductora, provenientes de parejas monógamas donde no ocurrieron muertes inesperadas y se obtuvo en promedio de $6,25 \pm 2,38$ crías por parto, y un periodo interparto de $27 \pm 7,5$ días. El conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo demostró que el protocolo de reproducción, cuidado y mantenimiento de la colonia de ratones *BALB/c* en el bioterio de la UEI de la FJC, es eficaz para garantizar la expansión y pureza genética de esta cepa, en adelante denominada *BALB/c//USB//FJC*.

Palabras clave: colonia de ratones, pureza de cepa, análisis de microsatélites, homocigisidad, bioterio mixto.

Structuring a *BALB/c* mice colony in the Unidad Experimental de Inmunoterapia of Fundación Jacinto Convit – Venezuela

Abstract. Animal models are a fundamental part of preclinical scientific research in the development of new therapies including drugs and gene therapies. For such purposes, it is crucial to have an animal model that is appropriate for specific study. At the animal facility of the Unidad Experimental de Inmunoterapia (UEI) of Fundación Jacinto Convit (FJC), a colony of *BALB/c* mice was established to maintain a pure strain for experimental research projects in breast cancer, using the 4T1 autologous tumor cell line. The colony was established from two pairs of *BALB/c* mice provided by Universidad Simón Bolívar, ensuring strict housing conditions in micro-isolators, with appropriate feeding, environmental enrichment, and detailed control of both micro and macroenvironment parameters required for the species. Animals care was managed by a specialized biologist. The expansion of this *BALB/c* mouse strain was monitored following a pattern of inbred crosses every third litter. Homozygosity was determined by using skin grafting technique among individuals of the same strain and comparative microsatellite analysis. Data from 135 births were analyzed, with a maximum of 6 births per breeding box. Monogamous pairs produced an average of 6.25 ± 2.38 pups

per litter, with no unexpected deaths, and an interbirth interval of 27 ± 7.5 days. The overall results obtained in this work demonstrated that the breeding, care, and maintenance protocol of the *BALB/c* mouse colony at the UEI animal facility of FJC is effective in ensuring the expansion and genetic purity of this strain, hereafter referred to as *BALB/c//USB//FJC*.

Key words: mice colony, strain purity, microsatellite analysis, homozygosity, mixed animal facility.

INTRODUCCIÓN

Los modelos animales son parte fundamental de la investigación científica preclínica y de la producción de reactivos de diagnósticos y terapéuticos, en las áreas de biología, biomedicina, farmacia, inmunología, entre otras. Como animales de investigación en cautiverio, se les debe proporcionar en los bioterios las mejores condiciones de alojamiento, que les garantice el albergue sin hacinamiento, micro y macro ambiente adecuado, libertad de movimiento apropiado, alimento balanceado, hidratación y los cuidados necesarios para garantizar su salud y bienestar; asimismo enriquecimiento ambiental (EA) como estrategia para mejorar el bienestar de los animales de laboratorio (Benavides y Guénet 2003, Brown et al. 2017, Fischer et al. 2021). Cualquier restricción de las necesidades fisiológicas o etológicas del animal debe limitarse a las inevitables, sin que se afecten los resultados del experimento que se realiza (Garber et al. 2011).

La elección de la cepa o cepas de ratones adecuadas como colonia fundadora de un bioterio en particular, depende de una serie de factores, como el fenotipo de interés, la disponibilidad de modelos genéticos y las consideraciones éticas (Lidster et al. 2016). Existen numerosas cepas de ratones, cada una con sus propias características y aplicaciones en investigación (Benavides y Guénet 2003).

Entre la gran cantidad de cepas consanguíneas que se utilizan en investigación se encuentran: la cepa de ratones *BALB/c*, conocidos por su susceptibilidad a enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, la diabetes tipo 1, alergias, asma y cáncer (Pulaski y Ostrand-Rosenberg 2000, Benavides y Guénet 2003, Godoy-Calderón et al. 2018); la cepa *DBA/2*, susceptible a la diabetes tipo 2 y utilizada en estudios de obesidad y trastornos metabólicos (Mori et al. 1991); y la cepa *C57BL/6*, resistente a las enfermedades autoinmunes, y usada comúnmente en modelos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Löhler et al. 1996, Song y Hwang 2017, Jia et al. 2020, Schepelmann et al. 2022).

Para garantizar el bienestar de los animales experimentales en un bioterio y obtener resultados confiables, es importante la aplicación de los principios de las 3Rs, propuestos por Russell y Burch (1959), en su manejo, reproducción, mantenimiento y experimentación. Las 3Rs significan: reemplazar el uso de animales en la investigación por métodos alternativos como modelos matemáticos y cultivos celulares; reducir el número de animales utilizados en la investigación a la cantidad mínima necesaria para obtener resultados válidos; y refinar los procedimientos para minimizar o eliminar el dolor, el sufrimiento y la angustia de los animales utilizados en la investigación (Russell y Burch 1959, Osorio 2006, Tannenbaum y Bennett 2015).

El cumplimiento del principio de las 3Rs permite la estructuración de una colonia de ratones *BALB/c* de forma

más eficiente, al tener un control de la genética (pureza), la salud y el bienestar de los animales, facilitando la estandarización de los experimentos y la comparación de resultados entre diferentes estudios. Esto reduce la necesidad de adquirir nuevos animales de proveedores externos, lo que a su vez disminuye el número de animales utilizados en investigación. Asimismo, con una planificación de la reproducción se puede obtener el número de animales necesarios, evitando la sobreproducción y la necesidad de sacrificar animales.

La pureza genética de la cepa es un parámetro que garantiza la fiabilidad de los resultados experimentales. En el caso de los ratones, la pureza de la cepa se define como la ausencia de heterocigosis en los marcadores genéticos utilizados (Infante et al. 1998). Este criterio permite la confiabilidad de los resultados experimentales obtenidos, y la reproducibilidad de los mismos, debido a lo homogéneo de sus respuestas ante un mismo estímulo. Si una cepa no es genéticamente pura u homocigota, sus respuestas ante un mismo estímulo son heterogéneas y requiere incluir un mayor número de animales experimentales para llegar a conclusiones válidas. Esto, debido muchas veces a la presencia de genes recesivos que no se expresan en el fenotipo (De Jesús 2003, Chebib et al. 2021).

La determinación de la homocigosidad de una cepa de ratones puede realizarse por el método clásico de trasplante de piel entre individuos de la misma cepa, cuya lectura se basa en el rechazo o aceptación del trasplante. Esta pureza genética se basa en su identidad en el sistema principal de histocompatibilidad H-2 del ratón (Debre et al. 1976). Más recientemente, se utiliza el análisis de microsatélites, dado que es una técnica molecular precisa y fiable. Los microsatélites son secuencias cortas de ADN que se repiten a lo largo del genoma. Al ser muy variables, las diferentes cepas de ratones tienen patrones de microsatélites únicos. Este procedimiento se realiza mediante PCR convencional (Benavides y Guénet 2003, De Jesús 2003).

En la Unidad Experimental de Inmunoterapia (UEI) de la Fundación Jacinto Convit (FJC) de Venezuela, se seleccionó la cepa de ratones *BALB/c* como modelo para estudios experimentales de inmunoterapia contra el cáncer de mama metastásico, utilizando la línea celular derivada de ratones *BALB/c* conocida como 4T1 [4T1(ATCC CRL-2539)]; un cáncer de mama triple negativo (TNBC), altamente agresivo, metastásico y recurrente (Godoy-Calderón et al. 2018, 2019, Wang et al. 2023). El crecimiento tumoral y la diseminación metastásica de las células 4T1 en ratones *BALB/c* imitan muy de cerca el cáncer de mama humano en estadio IV (Yang et al. 2020, Wang et al. 2023). Los tumores inducidos por 4T1 se pueden utilizar como modelo posoperatorio y como modelo no quirúrgico, porque el tumor 4T1 metastatiza espontáneamente en ambos modelos con una cinética similar (Arroyo-Crespo et al. 2019).

Durante 5 años, el bioterio de la UEI sólo funcionó de manera experimental y con animales donados por otras instituciones tales como el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Sin embargo, debido a la importancia de las condiciones de la pureza de la cepa utilizada en el laboratorio para la obtención de resultados confiables, la UEI estructuró una colonia consanguínea de ratones *BALB/c*, creando así un bioterio mixto donde se lleva a cabo la reproducción y mantenimiento de dichos ratones. El establecimiento de la colonia fue asesorado por el Comité de Bioética para la Investigación en Animales de Laboratorio de la Fundación Jacinto Convit (CBIALFJC), que cuenta con biólogos y veterinarios especialistas en el área de manejo de animales de laboratorio y bioterios. Este comité fue constituido el 3 de abril del 2017, con la finalidad de proporcionar una respuesta ágil y efectiva a las necesidades que se planteen con respecto a las actividades experimentales que se desarrollan dentro de la institución. Su objeto es promover el cumplimiento de los criterios de la ética para la vida y protección de los animales utilizados con fines experimentales y científicos; y sus acciones están basadas en los principios de autonomía, beneficencia, no maleficencia, justicia, precaución y responsabilidad, así como también en la solidaridad, el altruismo, la confidencialidad, la honestidad y la lealtad, los cuales son orientadores del proceder diario de la institución.

En el presente trabajo se describe la estructuración de una colonia de ratones *BALB/c* en la UEI de la FJC y se determina la homocigosis de la misma, a través del trasplante de piel y la genotipificación con los microsatélites D10mit10, D1mit294, D1mit48, D7mit66 y D1mit501 seleccionados para caracterizar ratones *BALB/c*. A partir de estas pruebas en nuestro bioterio, se establece la cepa denominada *BALB/c//USB//FJC*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colonia de ratones *BALB/c*. Se estableció un núcleo reproductor con dos parejas de *BALB/c* provenientes del bioterio de la Universidad Simón Bolívar, Venezuela. Las parejas se mantuvieron en apareamientos monogámicos permanente por tres partos continuos, durante los cuales se realizaron mediciones de parámetros indicadores de la calidad de la pareja reproductiva. Las crías destetadas del tercer parto (21 días de nacidas) se seleccionaron como reproductoras para continuar la colonia. Estas se alojaron en cajas según el sexo, y se aparearon de forma monogámica a los 49 días de edad.

Estructura y equipamiento del bioterio. El bioterio de la FJC ocupa un área de 10,7 m² y está equipado con un mesón de trabajo que incluye un amplio fregadero para microaisladores, aire acondicionado, termómetro e higrómetro. Cuenta con un sistema de micro aislamiento en cajas de polisulfonato ventiladas individualmente (Tecniplast 2012) y un área de piso de 542 cm² con capacidad para alojar hasta 6 ratones adultos por caja (con peso mayor a 25 gramos). El lecho de cada caja es cubierto en viruta de madera de pino con espesor de llenado de 3 cm, al que se le realizan cambios con una frecuencia semanal.

Diariamente se mide la temperatura ambiental, la cual debe oscilar entre los 22 °C y 24 °C, mientras que la humedad nunca supera el 70% (Garber et al. 2011).

Alimentación. Ante la dificultad de conseguir alimento concentrado para ratones en Venezuela, se utilizó una dieta basada en las directrices del American Institute of Nutrition (AIN), de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062 y avalado por el CBIALFJC, con la composición bromatológica requerida para alimento de ratas y ratones de laboratorio en gestación, lactancia y crecimiento (Reeves et al. 1993). La fórmula alimenticia estuvo compuesta de un 82% de alimento canino concentrado, complementado con alimento concentrado para cerdos (molido de maíz, sorgo, arroz, trigo, cebada y aceite de soja), 6% de linaza y 12% de avena en hojuelas. Tanto el agua como el alimento fueron suministrados *ad libitum*. Los bebederos con agua filtrada se reemplazaron diariamente.

Enriquecimiento ambiental. El EA fue construido con tapabocas quirúrgicos dispuestos como hamacas, tubos cilíndricos de cartón y/o PVC a modo de túnel, recortes de batas quirúrgicas para complemento de construcción de nido y termorregulación, además de cajas de cartón reciclado para estimular la exploración y acción de roer.

Se evaluó el efecto del EA con el número de crías por camada, la ganancia de peso entre los 14 y 21 días, y la puntuación en la formación de nidos (Hess et al. 2008). Se cuantificó la calidad de los nidos empleando la escala de puntuación de nido naturalista propuesta por Hess et al. (2008), la cual evalúa la calidad del nido en función de su altura y el grado de cierre de las paredes que rodean la cavidad del nido. La puntuación indicó la calidad del nido: los nidos con puntuaciones más altas indicaron nidos de mayor complejidad, mientras que aquellos con puntuaciones más bajas eran más simples (Hess et al. 2008).

Adicionalmente, el rendimiento reproductivo de la colonia se evaluó semanalmente mediante la cuantificación de número de muertes por camada, porcentaje de crías destetadas, porcentaje de crías hembras, periodo interparto, número de crías nacidas y puntuación por fabricación del nido.

Validación de homocigosis

Trasplante de piel. El proceso fue iniciado con el ratón donador de piel, el cual fue anestesiado con ketamina (100 mg kg⁻¹ de peso) y xilacina (10 mg kg⁻¹ de peso), verificando luego de 5 minutos la ausencia completa de respuesta del animal. Seguidamente se colocó el ratón sobre la tabla de procedimientos, se limpió la cola del ratón con una gasa estéril empapada con solución de isopropanol al 70%, la cual se dejó evaporar. Posteriormente se realizó una incisión en la piel de la cola desde la base, se incidió longitudinalmente hasta el cartilago y la piel fue removida divulsionando con ayuda de pinzas y tijeras estériles. Luego, con tijeras estériles, la piel de la cola del ratón se cortó en un rectángulo de 5 mm x 10 mm, aproximadamente, para utilizar como injerto. La sección cortada fue mantenida envuelta en gasa estéril empapada en PBS y almacenada en una placa de Petri estéril cerrada dentro de una cava

con hielo hasta su uso. Al final del procedimiento, al ratón donador bajo anestesia, le fue aplicada la eutanasia por dislocación cervical (Debre et al. 1976).

Posteriormente, cada uno de los dos ratones receptores del trasplante de piel, de la tercera generación del bioterio de la UEI, fueron anestesiados con ketamina (100 mg kg⁻¹ de peso) y xilacina (10 mg kg⁻¹ de peso). Se dejaron en reposo por 5 minutos y luego se les aplicó por vía intraperitoneal una inyección de 0,02 mg kg⁻¹ de ketoprofeno, verificando la ausencia completa de respuesta del animal. Una vez en la tabla de procedimientos, se realizó la tricotomía (rasurado) a la zona del dorso lateral derecho del animal. Seguidamente se le limpió toda el área tricotomizada con una gasa estéril empapada con solución de isopropanol al 70%, que se dejó evaporar, tras lo cual se pintó con gasa estéril embebida con povidona iodada al 10% (Betadine) mediante frotamiento suave y circular, siguiendo una dirección desde el centro hacia la periferia. A continuación, se despintó la zona de modo similar al descrito utilizando una nueva gasa limpia y seca. El proceso de pintar y despintar se repitió tres veces. Luego, se le realizó una incisión superficial en el dorso lateral derecho sobre un área ligeramente mayor (10%) a la piel del injerto a trasplantar. La piel se retiró con la ayuda de tijeras y pinzas estériles (lecho del injerto). Seguidamente se colocó la piel del injerto en el centro del lomo del ratón receptor (lecho del injerto), evitando que el injerto de piel se plegara a lo largo de los bordes, y orientando el pelo en dirección opuesta a la natural para visualizar con facilidad el resultado del trasplante. El injerto fue fijado con 4 puntos de sutura interrumpida (tamaño 4.0), una en cada extremo del injerto de piel, tras lo cual el ratón se envolvió con un apósito en la zona trasplantada. El trasplante se evaluó semanalmente durante 4 semanas, y se determinó si el animal tenía aceptación o rechazo del tejido injertado (Zhao et al. 2019).

Microsatélites. Para el análisis de microsatélites se tomaron al azar 2 progenitores de la quinta generación (hembra y macho) de la colonia *BALB/c* estructurada en nuestro bioterio. Como controles se usaron un *BALB/c* y un

C57BL/6 provenientes del bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), para evaluar la identidad y diferencia genéticas, respectivamente.

A cada uno de los ratones seleccionados se le seccionó utilizando tijeras estériles, 1,2 cm de la punta de la cola, previa aplicación de anestesia local (lidocaína). Una vez realizado el corte y para detener el sangrado, se aplicó presión directa sobre la herida con una gasa estéril durante unos minutos.

Las muestras colectadas fueron procesadas para la obtención del ADN genómico (ADNg), el cual se extrajo con el uso del estuche comercial ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se eluyó con 50–200 µl de agua libre de nucleasas. La estimación de la concentración del ADN genómico se realizó mediante la relación de la absorbancia a 230, 260 y 280 nm, determinadas en un espectrofotómetro (TECAN, Infinite M200 PRO, Suiza). La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis a 90 Voltios (Thermo Scientific, EC 300XL power supply, EUA) por 1 hora en geles de agarosa al 2,5% en buffer TAE 0,5X, pH 8,2, usando como marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (IBI Scientific) y revelado con SYBR Safe (Invitrogen). Las bandas del electroferograma fueron visualizadas en un fotodocumentador de geles (Axygen, Gel Documentation System, Fisher Scientific, EUA).

Evaluación de microsatélites. Para este ensayo se evaluaron cinco microsatélites, cuyas secuencias se obtuvieron del listado de loci de ratón disponible en la web (<http://www.informatics.jax.org>): D10mit10, D1mit294, D1mit48, D7mit66 y D1mit501 (Tabla 1). Estos microsatélites se seleccionaron de acuerdo a su polimorfismo con respecto a la cepa *C57BL/6J*, su ubicación en distintos cromosomas, y en algunos casos, como el D1mit48, para determinar que no debían mostrar diferencia entre el tamaño amplificado por las dos cepas (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de los cebadores empleados para la amplificación de los microsatélites de interés por PCR.

Microsatélites	Pares de bases (pb)	Cepa
D10Mit10 Forward: CCAGTCTCAAAACAACAACAAAC Reverse: TTGCACCTAGATTGCCTGA	128	<i>BALB/c</i>
D1 Mit294 Forward: CCCAAGGACACCTACGTGAT Reverse: CTGGCAAGTTCTGCTTTAACC	180	<i>C57BL/6</i>
D1 Mit48 Forward: AAACCACCACAAATGTGCCT Reverse: TGACTTCCTCAGCAAGCCTT	212	<i>BALB/c</i>
D7Mit66 Forward: TTCACTCCCAGCCAGTCTCT Reverse: TAACCAGGAAACACACGAACC	150	<i>C57BL/6</i>
D1Mit501 Forward: TCTGAGCACAGCAGAAGGAA Reverse: GAATGATCTTTTACAACCAAAGTGG	142	<i>BALB/c</i>
	142	<i>C57BL/6</i>
	148	<i>BALB/c</i>
	164	<i>C57BL/6</i>
	130	<i>BALB/c</i>
	126	<i>C57BL/6</i>

La evaluación se llevó a cabo mediante un ensayo de la PCR convencional. La mezcla para PCR se preparó con 100 ng de ADN de ratón, añadido a una mezcla de reacción compuesta de dNTPs (2 mM), MgCl₂ (25 mM), un par de oligonucleótidos iniciadores (10 µM para el ADN de ratón), 1 U µl⁻¹ de Taq DNA polimerasa Pol G2 Flexi (1U) (Promega), buffer 1X, y agua libre de nucleasas, hasta completar un volumen final de 20 µl. La amplificación se realizó en un termociclador de triple bloque (Applied

Biosystems. ProFlex. EUA), empleando las condiciones indicadas en la Tabla 2.

El tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 2,5% en buffer TAE 1X pH 8,2. Las muestras se corrieron a 90 V, durante 60 minutos y las bandas se visualizaron en un documentador de geles (Axygen, Gel Documentation System, Fisher Scientific, EUA).

Tabla 2. Condiciones de la PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización	95	5	1x
Desnaturalización	94	0,5	40x
Hibridación*	58	1	40x
Extensión	72	1	40x
Extensión final	72	5	1x

*Rango de temperatura según oligonucleótido iniciador usado.

RESULTADOS

Establecimiento de colonia. Durante la instalación de la colonia de BALB/c se obtuvieron datos de 135 partos provenientes de parejas reproductoras monógamas, con

un máximo de 6 partos por caja, donde no se registraron muertes en el periodo de reproducción. Los resultados obtenidos en el establecimiento de la colonia se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos recolectados de cajas reproductoras del bioterio de la UEI de la FJC.

N=135 partos *	Número total crías	Periodo interparto (días)	Δ Peso (g) 14 días	Δ Peso (g) 21 días	Ganancia de peso (g)
Promedio de crías	6,252	27,222	9,279	10,798	1,456
Desviación estándar	2,381	7,503	1,848	1,781	0,871

*Datos calculados entre el segundo y sexto parto.

El peso promedio de las crías, obtenido a los 21 días de nacidas, fue de 10,798 ± 1,781 g, registrándose un peso mínimo de 7,75 g y uno máximo de 16,68 g. Asimismo, se evaluó la ganancia de peso de las crías entre los 14 y 21 días, resultando en un incremento de 1,456 ± 0,871 g en promedio. El porcentaje de crías destetadas fue del 100% en relación al número de crías al nacer, y el porcentaje de crías hembras fue 60,50%.

Es de destacar que, al evaluar la correlación entre los datos obtenidos, se observó una correlación importante (r = 0,525) entre el periodo interparto y el número de partos por los que ya habían pasado las parejas reproductoras (Figura 1A). De igual forma, la correlación existente entre el número de crías por parto y el peso alcanzado por éstas al momento del destete (r = 0,511) (Figura 1B).

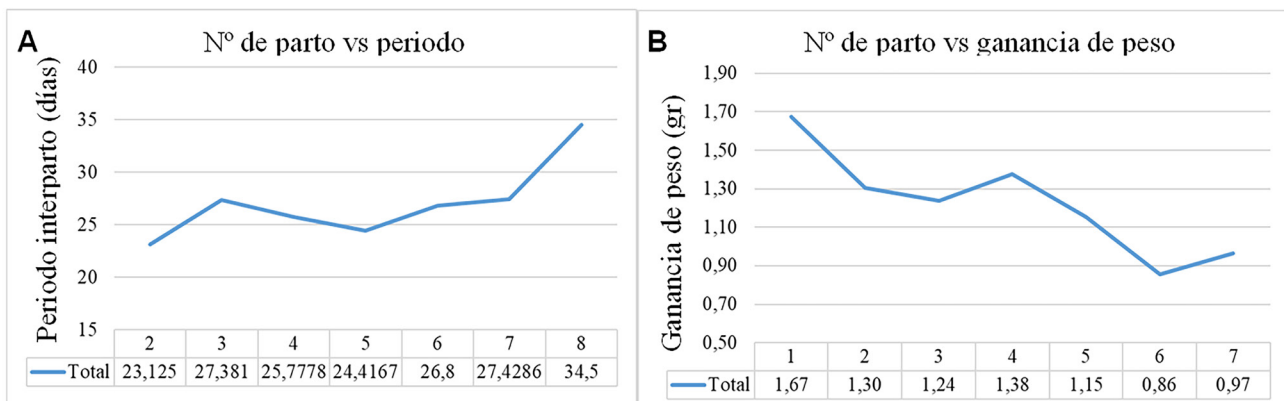


Figura 1. Correlación entre variables evaluadas. A. Correlación entre el número de partos y el periodo interparto. B. Correlación entre el número de partos y la ganancia de peso de las crías.

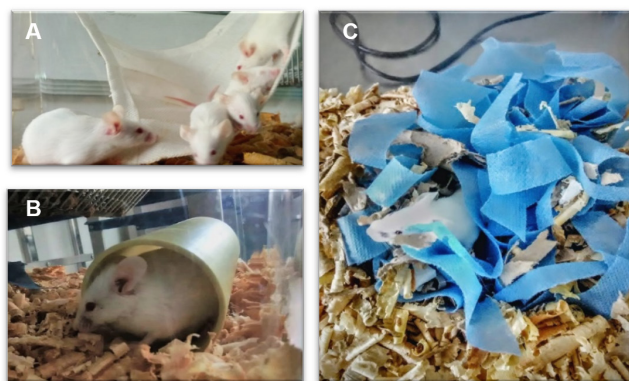


Figura 2. A. Tapabocas quirúrgicos dispuestos a modo de hamaca; B. Tubos cilíndricos de PVC a modo de túnel; C. Recortes de batas quirúrgicas.

Con relación al EA se observó que los ratones utilizaban el material suministrado, volviéndolo parte de su entorno y tomándolo para la elaboración de sus nidos (Figura 2).

Adicionalmente, se evaluó en 7 parejas reproductivas de 7 semanas de edad, el efecto del EA con respecto al nacimiento de crías por camada, la ganancia de peso entre los 14 y 21 días, y la puntuación en la formación de nidos. En el número de crías y peso entre los 14 y 21 días no hubo diferencias significativas; sin embargo, sí se observó un incremento significativo en la puntuación de nido a los 21 días de nacidos en los ratones con EA (Figura 3).

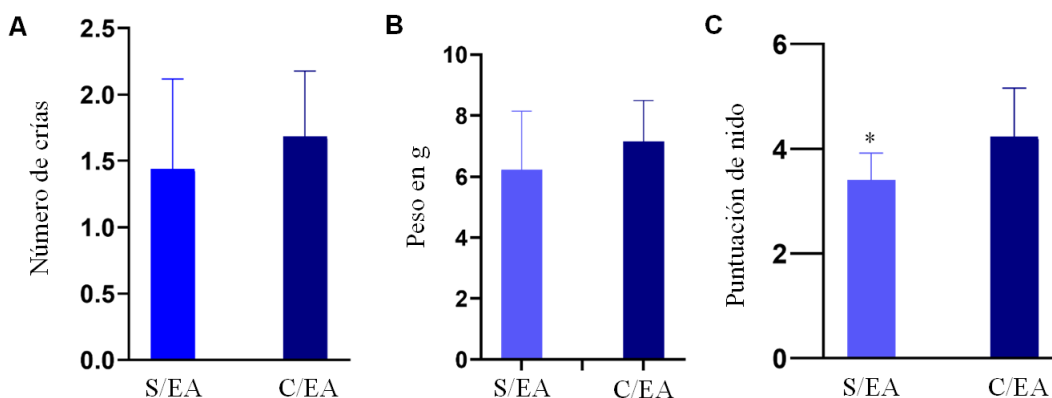


Figura 3. Enriquecimiento ambiental. A. Crías nacidas por camada. B. Promedio de ganancia de peso de crías entre los 14 y los 21 días de nacidos. C. Promedio de la puntuación de nido a los 21 días de nacidos. S/EA: Sin enriquecimiento ambiental; C/EA: Con enriquecimiento ambiental.

Trasplante. En la evaluación del trasplante injertado se determinó que hubo aceptación del mismo, observándose que en la piel injertada luego de 4 semanas, el pelo creció en dirección opuesta al crecimiento natural, tal como fue posicionada en el procedimiento de trasplante.

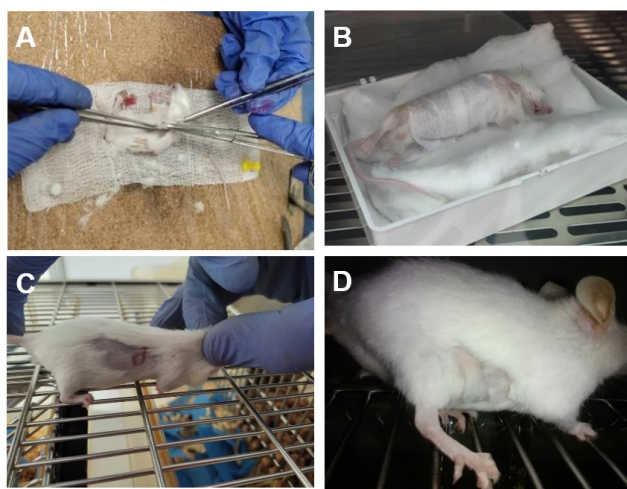


Figura 4. Proceso de trasplante de piel en ratones *BALB/c*. A. Procedimiento quirúrgico para la preparación del lecho del injerto en el receptor. B. Ratón trasplantado en recuperación. C. Evolución del injerto luego de 2 semanas de la intervención. D. Evolución del injerto luego de 4 semanas de la intervención.

Microsatélites. Se analizaron cinco microsatélites en 4 ratones, tal como se describió en la metodología. Específicamente, los oligonucleótidos (cebadores) para el microsatélite D10mit10 amplificó un fragmento de 128 pb para la cepa *BALB/c* y 180 pb para la cepa *C57BL/6* (Figura 5A); para el microsatélite D1mit294 amplificó un fragmento de 212 pb para la cepa *BALB/c* y 150 pb para la cepa *C57BL/6* (Figura 5C); para el microsatélite D1mit48 amplificó un fragmento de 142 pb para la cepa *BALB/c* y para la cepa *C57BL/6*; para el microsatélite D7mit66 amplificó un fragmento de 148 pb para la cepa *BALB/c* y 164 pb para la cepa *C57BL/6* (Figura 5B); y para el microsatélite D1mit501 amplificó un fragmento de alrededor de 130 pb para la cepa *BALB/c* y para la cepa *C57BL/6* (Figura 5).

DISCUSIÓN

La investigación con animales es vital para la ciencia y el progreso médico. Aunque se han hecho grandes esfuerzos por sustituir los modelos animales con modelos alternativos para la investigación científica, aún resulta inevitable llevar a cabo muchas de estas investigaciones en modelos animales, suscitándose la necesidad de aplicar los más altos estándares en producción, mantenimiento del animal, así como el control de la pureza de las cepas, para garantizar la validez y reproducibilidad de los resultados (Ferrara et al. 2022).

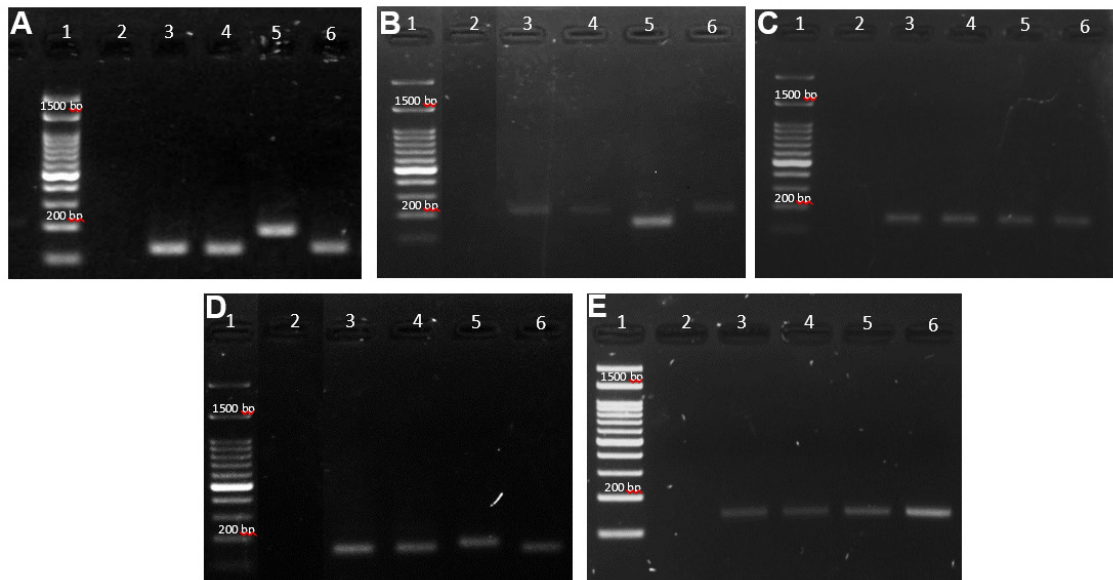


Figura 5. Amplificación de microsatélites por PCR. A. Microsatélite D10mit10. B. Microsatélite D1mit294. C. Microsatélite D1mit48. D. Microsatélite D7mit66. E. Microsatélite D1mit501. Carril 1: Peso molecular 100pb DNA Ladder (IBI Scientific), Carril 2: Control negativo, Carril 3: *BALB/c* 5ta generación hembra, Carril 4: *BALB/c* quinta generación macho, Carril 5: *C57BL/6* proveniente del IVIC, Carril 6: *BALB/c* proveniente del IVIC.

Los resultados del estudio demuestran que el esquema de reproducción, cuidado y mantenimiento de los ratones *BALB/c* que se implementó para la estructuración de la colonia, resultó eficaz en los parámetros morfométricos evaluados como peso promedio obtenido a los 21 días de nacidas las crías ($10,798 \pm 1,781$ g) y la ganancia promedio del peso de las crías entre los 14 y 21 días ($1,456 \pm 0,871$ g); además, son similares a los reportados por Garber et al. (2011) los cuales son referidos a colonias ya establecidas. Entre los 14 y 21 días (periodo de 7 días), es de suma importancia que las crías alcancen un peso dentro del rango idóneo reportado para esta cepa.

Adicionalmente, se observó una correlación positiva significativa ($r = 0,525$) entre el número de partos y el periodo interparto de las parejas reproductoras, mostrando que a medida que aumenta el número de partos, también tiende a aumentar el período interparto. Esto sugiere que las hembras pueden experimentar un desgaste fisiológico después de varios partos, lo que podría afectar su capacidad para producir y cuidar a las crías, en correspondencia con lo observado por otros autores (Garber et al. 2011, Wasson 2017, Spielmann et al. 2021). Estos resultados respaldan la recomendación de sustituir las parejas reproductoras después del sexto parto (Sánchez Treto et al. 2002, Galassi Geréz y Gullace 2004, Fuentes et al. 2008). Además, la correlación observada, entre el número de crías por parto y el peso alcanzado por las crías al momento del destete ($r = 0,511$), sugiere que el tamaño de la camada puede influir en el crecimiento y desarrollo de las crías (Spielmann et al. 2021, Bond et al. 2022).

Los animales utilizados en experimentos disponen de un bienestar reducido y están expuestos al dolor y al sufrimiento (Garber et al. 2011). Considerando que el EA aumenta la calidad de vida de los animales en cautiverio (Bayne 2018), en este trabajo se hizo especial énfasis en la aplicación del EA en el ámbito de la promoción del bienestar de los ratones *BALB/c* como reconocimiento a la vulnerabilidad de los modelos biológicos.

El EA se ha aplicado principalmente en estudios de neurociencia, respaldando su viabilidad y mejora en el aprendizaje (Bayne 2018). La justificación para su utilización se ha limitado al desarrollo exitoso de la investigación en el área, y no a un reconocimiento de la vulnerabilidad, bienestar y calidad de vida del animal. Por el contrario, se propone la aplicación de EA en animales de laboratorio en un marco de contractualismo científico y de responsabilidad del investigador, como un estándar a ser adoptado para el beneficio mutuo del desarrollo científico y de la calidad de vida de los animales. Los datos evaluados en el EA muestran una tendencia a incrementar el número de crías y el peso ganado, así como una diferencia significativa en la calidad de los nidos de los ratones con EA (Tannenbaum y Bennett 2015, Bayne 2018, Ghasemi et al. 2021).

Una vez que fueron apropiadas las condiciones de reproducción, cuidado y mantenimiento de los animales del bioterio mixto de la UEI, se evaluó la homocigosis de esta cepa y se comparó con ratones *BALB/c* y/o *C57BL/6* donados por el IVIC. Esta evaluación se realizó a través de dos métodos: el trasplante de piel y los microsatélites. Con el trasplante de piel observamos que hubo aceptación del injerto y que a las 4 semanas se apreció el crecimiento del pelaje del tejido injertado, demostrando que hay una homocigosis a nivel del complejo principal de histocompatibilidad H-2 de estos ratones (Debre et al. 1976). Esta compatibilidad genética a nivel del H-2 garantiza que el patrón de respuesta inmune contra diferentes antígenos sea altamente homogéneo, siempre y cuando todos los ratones pertenezcan al mismo bioterio. Estudios realizados en ratones *BALB/c*, procedentes de diferentes colonias, reportan que, aunque las colonias *BALB/c* desarrollan uniformemente la artropatía en respuesta a la inmunización con cartílago humano, existen diferencias significativas entre las colonias *BALB/c* mantenidas incluso por el mismo proveedor en diferentes lugares (Farkas et al. 2009). Esta puede ser una característica crítica cuando los

investigadores utilizan diferentes colonias de una misma cepa para inducir otras enfermedades.

El punto clave en el procedimiento de producción de animales endogámicos es comprobar la pureza genética. Los injertos de piel y las pruebas de color del pelaje se utilizan tradicionalmente para demostrar esta pureza, pero tienen algunas desventajas; por lo que los avances recientes en los perfiles de ADN de las distintas cepas han permitido a los científicos comprobar fácilmente la pureza genética de animales de laboratorio (Cohan et al. 2019). En el estudio actual, la evaluación de los cinco microsatélites (D10mit10, D1mit294, D1mit48, D7mit66, D1mit501) permitió validar que la cepa establecida denominada *BALB/c//USB//FJC* es pura (alta homogeneidad genética), ya que cumplió con la amplificación y el tamaño de las secuencias esperadas para cada uno de los microsatélites evaluados (De Jesús 2003, Simon et al. 2013). Esta alta homogeneidad genética es fundamental para garantizar la reproducibilidad de los resultados experimentales (Festing 2014). El conjunto de los resultados obtenidos demuestra que el protocolo de reproducción, cuidado y mantenimiento de ratones *BALB/c* es eficaz para garantizar la pureza de nuestra cepa, convirtiéndola en un modelo animal confiable para futuras investigaciones.

En resumen, estos resultados describen la estructuración de una colonia de *BALB/c* en el bioterio mixto en la UEI de la FJC donde se llevaron a cabo cuidados, alimentación y condiciones de bienestar animal, demostrando una tendencia a mejorar la reproducción de la colonia estructurada. Asimismo, a través de la evaluación de homocigosidad, empleando el injerto de piel a ratones de la tercera generación y cinco microsatélites a ratones de la quinta generación, se determinó que la cepa *BALB/c//USB//FJC* establecida en la UEI es pura. La pureza de la cepa es fundamental para continuar con nuestras investigaciones preclínicas empleando el modelo 4T1 para la evaluación de la inmunoterapia ConvitVax en cáncer de mama. Con este modelo, publicaciones previas han demostrado la capacidad de nuestra terapia para inducir una potente activación del sistema inmune, una significativa reducción del tamaño del tumor, así como una disminución del porcentaje de células inmunosupresoras (Godoy-Calderón et al. 2018, 2019).

Es importante mencionar que la pureza genética de una cepa no es estática y puede verse afectada por factores como la deriva genética y la contaminación. Por lo tanto, se recomienda realizar evaluaciones periódicas de la pureza genética para asegurar la calidad de las cepas utilizadas en los laboratorios. En estudios futuros, sería interesante ampliar el panel de microsatélites analizados para obtener una caracterización genética más completa de la cepa *BALB/c//USB//FJC*.

Adicionalmente, es importante destacar que, al igual que en trabajos publicados por otros autores, se observó un desgaste fisiológico de las hembras reproductoras y del tamaño de la camada, por lo que se recomienda el reemplazo de las parejas reproductoras después del sexto parto para así optimizar los posteriores cruces.

Agradecimientos. Los autores agradecen al bioterio de la Universidad Simón Bolívar, al Instituto de Estudios Avanzados, y al Instituto Venezolano de Investigaciones

Científicas, por el aporte de las cepas que fueron utilizadas durante el presente estudio. Adicionalmente, los autores extienden un especial agradecimiento a la Dra. Mirian Rodríguez por sus importantes aportes en la revisión y edición del manuscrito. El financiamiento de este trabajo fue realizado por la Fundación Jacinto Convit y Jacinto Convit World Organization, Inc.

ORCID

Duarte, M. A.  <https://orcid.org/0000-0001-8083-8783>

Navarro, E.  <https://orcid.org/0000-0001-5069-7887>

Carballo, J.  <https://orcid.org/0000-0001-9370-686X>

Negrón, E.  <https://orcid.org/0009-0006-2842-5248>

Blanca, I.  <https://orcid.org/0009-0002-4441-1488>

De Jesus, R.  <https://orcid.org/0000-0001-9670-291X>

Rivodó, T.  <https://orcid.org/0000-0002-0553-8534>

Aranguren, D.  <https://orcid.org/0000-0003-0692-8240>

Convit A. F.  <https://orcid.org/0000-0003-1596-1675>

REFERENCIAS

1. Arroyo-Crespo JJ, Armiñán A, Charbonnier D, Deladriere C, Palomino-Schätzlein M, Lamas-Domingo R, Forteza J, Pineda-Lucena A, Vicent M. Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. *Int J Cancer*. 2019; 145(8): 2267-81.
2. Bayne K. Environmental enrichment and mouse models: Current perspectives. *Animal Model Exp Med*. 2018; 1(2): 82-90.
3. Benavides FJ, Guénet JL. Manual de genética de roedores de laboratorio. Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio, ed.; Universidad de Alcalá, ed. D.L. 2003.
4. Bond TA, Richmond RC, Karhunen V, Cuellar-Partida G, Borges MC, Zuber V, Couto Alves A, Mason D, Yang T, Gunter M, Dehghan A, Tzoulaki I, Sebert S, Evans D, Lewin A, O'Reilly P, Lawlor D, Järvelin M. Exploring the causal effect of maternal pregnancy adiposity on offspring adiposity: Mendelian randomisation using polygenic risk scores. *BMC Med*. 2022; 20(1): 34.
5. Brown MJ, Symonowicz C, Medina L V., Bratcher NA, Buckmaster CA, Klein H, Anderson L. Culture of Care: Organizational Responsibilities. In: Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing. Second edition. Boca Raton: Taylor & Francis, 2018. CRC Press; 2017. p. 11-26.
6. Chebib J, Jackson BC, López-Cortegano E, Tautz D, Keightley PD. Inbred lab mice are not isogenic: genetic variation within inbred strains used to infer the mutation rate per nucleotide site. *Heredity (Edinb)*. 2021;126(1):107-16.
7. Cohan RA, Inanlou DN, Samiee Aref MH, Zeinali S, Farhoudi R. Microsatellite Marker Analysis for Laboratory Mice Profiling. *Adv Biomed Res*. 2019;8(1):40.

8. De Jesús R. ¿Cómo sabemos si los ratones consanguíneos usados en investigación son genéticamente puros? *Bol Malarial Salud Ambient.* 2003; XLIII: 15-22.
9. Debre P, Waltenbaugh C, Dorf M, Benacerraf B. Genetic Control of Specific Immune Suppression III. Mapping of H-2 Complex Complementing Genes Controlling Immune Suppression by the Random Copolymer L-Glutamic Acid-'L-Tyrosine-'(GT)* [Internet]. *The Journal of Experimental Medicine.* 1976; 144. Disponible en: <http://rupress.org/jem/article-pdf/144/1/272/1657862/272.pdf>
10. Farkas B, Boldizsar F, Tarjanyi O, Laszlo A, Lin SM, Hutas G, et al. BALB/c mice genetically susceptible to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis show colony-dependent differences in disease penetrance. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(1): R21.
11. Ferrara F, Hiebl B, Kunzmann P, Hutter F, Afkham F, LaFollette M, Gruber C. Culture of care in animal research – Expanding the 3Rs to include people. *Lab Anim.* 2022; 56(6): 511-8.
12. Festing MF. Evidence should trump intuition by preferring inbred strains to outbred stocks in preclinical research. *ILAR J.* 2014; 55(3): 399-404.
13. Fischer ML, Rodrigues GS, Aguero WP, Zotz R, Simão-Silva DP. Refinement as ethics principle in animal research: Is it necessary to standardize the Environmental enrichment in laboratory animals? *An Acad Bras Cienc.* 2021; 93(1): e20191526.
14. Fuentes Paredes F, Yanavilca QFA, Tarmeño R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Centro Nacional de Productos Biológicos, *Instituto Nacional de Salud*, Ministerio de Salud del Perú. Lima, Perú. 2008.
15. Galassi Geréz PF, Gullace FA. Reproducción en animales de Laboratorio. 1º Parte: Ratas y Ratomnes. *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.* Buenos Aires, Argentina. 2004; 22 pp. Disponible en: <http://dpd.fvet.uba.ar/cartelera/00010199.pdf>
16. Garber J, Wayne R, Bielitzki J, Clayton LA, Donovan JC, Hendriksen C, Kohn D, Lipman N, Locke PA, Melcher J, Quimby FW, Turner PV, Wood GA, Würbel H. National Research Council (US). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. PMID: 21595115.
17. Ghasemi A, Jeddi S, Kashfi K. The laboratory rat: Age and body weight matter. *EXCLI J.* 2021; 23; 20:1431-1445.
18. Godoy-Calderón MJ, Salazar V, González-Marcano E, Convit AF. Autologous tumor cells/bacillus Calmette-Guérin/formalin-based novel breast cancer vaccine induces an immune antitumor response. *Oncotarget.* 2018; 9: 20222-38.
19. Godoy-Calderón MJ, González-Marcano E, Carballo J, Convit AF. Evaluation of a ConvitVax/anti-PD-1 combined immunotherapy for breast cancer treatment. *Oncotarget.* 2019; 10(61): 6546-60.
20. Hess SE, Rohr S, Dufour BD, Gaskill BN, Pajor EA, Garner JP. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* 2008; 47(6): 25-31.
21. Infante JF, Pérez P, Sifontes S, Izquierdo L, Fariñas M, Balboa J, Joó L, Muñoz E, Oliva R, Caro E, Gutiérrez M, Pérez V. Efectividad de la inmunoglobulina antimeningocócica BC en diferentes dosis y su aplicación fraccionada en ratones. *Academia.edu.* 1998.
22. Jia T, Wang C, Han Z, Wang X, Ding M, Wang Q. Experimental Rodent Models of Cardiovascular Diseases. *Front Cardiovasc Med.* 2020; 7: 588075.
23. Lidster K, Jefferys JG, Blümcke I, Crunelli V, Flecknell P, Frenguelli BG, Gray W, Kaminski R, Pitkänen A, Ragan I, Shah M, Simonato M, Trevelyan A, Volk H, Walker M, Yates N, Prescott M. Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures. *J Neurosci Methods.* 2016; 260:2–25.
24. Löhler J, Sadlack B, Schorle H, Klebb G, Haber H, Horak I. Generalized autoimmune diseases in BALB/c mice with a genetically dependent interleukin-2 deficiency. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 1996; 80:293–6.
25. Mori Y, Hosono M, Murakami K, Katoh H, Yoshikawa Y, Kuribayashi K, Kannagi R, Sakai M, Okuma M, Masuda T. Genetic studies on experimental autoimmune gastritis induced by neonatal thymectomy using recombinant inbred strains between a high-incidence strain, BALB/c, and a low-incidence strain, DBA/2. *Clin Exp Immunol.* 1991; 84(1): 145-52.
26. Osorio AM. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. *Revista Colombiana de Bioética (en línea).* 2006; 163-83.
27. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Curr Protoc Immunol.* 2000; 39(1).
28. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* 1993. 123.
29. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen, London, 1959. *Universities Federation for Animal Welfare.* 1959.
30. Sánchez Treto N, Jiménez Pardo ML, Torres Romo U, Bolaño Escofet R, Ramírez Vázquez G, Hernández Valdés Y. Algunas características biológicas de ratones balb/c del bioterio de la facultad de Ciencias Médicas de Ciego de Ávila. *Mediciego.* 1995; 1(1): 1-4.
31. Schepelmann M, Kupper N, Gushchina V, Mesteri I, Manhardt T, Moritsch S, Müller C, Piatek K, Salzmann M, Vlasaty A, Eferl R, Kallay E. AOM/DSS Induced Colitis-Associated Colorectal Cancer in 14-Month-Old Female Balb/C and C57/Bl6 Mice—A Pilot Study. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(9).
32. Simon MM, Greenaway S, White JK, Fuchs H, Gailus-Durner V, Wells S, Sorg T, Wong K, Bedu E, Cartwright E, Dacquin R, Djebali S, Estabel J, Graw J, Ingham N, Jackson I, Lengeling A, Mandillo S,

- Marvel J, Meziane H, Preitner F, Puk O, Roux M, Adams D, Atkins S, Ayadi A, Becker L, Blake A, Brooker D, Cater H, Champy M, Combe R, Danecek P, di Fenza A, Gates H, Gerdin A, Golini E, Hancock J, Hans W, Hölter S, Hough T, Jurdic P, Keane T, Morgan H, Müller W, Neff F, Nicholson G, Pasche B, Roberson L, Rozman J, Sanderson M, Santos L, Selloum M, Shannon C, Southwell A, Tocchini-Valentini G, Vancollie V, Westerberg H, Wurst W, Zi M, Yalcin B, Ramirez-Solis R, Steel K, Mallon A, de Angelis M, Herault Y, Brown S. A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol.* 2013; 14(7): R82.
33. Song HK, Hwang DY. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Lab Anim Res.* 2017; 33(2): 119.
34. Spielmann J, Naujoks W, Emde M, Allweyer M, Fänder J, Kielstein H, Quandt D, Bähr I. The Impact of High-Fat Diet and Restrictive Feeding on Natural Killer Cells in Obese-Resistant BALB/c Mice. *Front Nutr.* 2021; 23: 8.
35. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015; 54(2): 120-32.
36. Wang C, Xu YH, Xu HZ, Li K, Zhang Q, Shi L, Zhao L, Chen X. PD-L1 blockade TAM-dependently potentiates mild photothermal therapy against triple-negative breast cancer. *J Nanobiotechnology.* 2023; 11; 21(1): 476.
37. Wasson K. Retrospective Analysis of Reproductive Performance of Pair-bred Compared with Trio-bred Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2017; 1;56(2): 190-3.
38. Yang L, Yong L, Zhu X, Feng Y, Fu Y, Kong D, et al. Disease progression model of 4T1 metastatic breast cancer. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2020; 22; 47(1): 105-16.
39. Zhao X, Zhang K, Daniel P, Wisbrun N, Fuchs H, Fan H. Delayed allogeneic skin graft rejection in CD26-deficient mice. *Cell Mol Immunol.* 2019; 16(6): 557-567.