

ÍNDICE

Contenido	Pág.
1.Resumen	1
2.Introducción	3
3.Marco teórico	5
1.Aterosclerosis y enfermedad cardiovascular.....	5
2.Modelos animales de enfermedad cardiovascular	8
2.1 Generación de animales genoprivos y transgénicos.....	9
2.1.1 Inyección pronuclear	9
2.1.2 Recombinación homóloga en células madre Embrionarias.....	10
2.1.3 Mutagénesis de células somáticas y transferencia nuclear. 11	
2.1.4 Vectores retrovirales.....	12
2.1.5 Sistema Cre/loxP	12
3.Apolipoproteína E	15
3.1 Genética y estructura proteica	15
3.2 Isoformas	16
3.3 Rol de la apoE en el metabolismo de las lipoproteínas	18
3.4 Rol de la apoE en la aterosclerosis	22
4.Métodos de genotipificación	22
4.1 PCR	22
4.2 Otras técnicas de genotipificación	23
4.Objetivos	24
1.Objetivo general	24
2.Objetivos específicos	24
5.Materiales y métodos	25
1. Animales	25
2. Extracción de ADN genómico	25
3. Genotipificación	28

3.1 PCR	28
3.1.1 Primers	28
3.1.2 Mix de PCR	29
3.1.3 Ciclos de amplificación	30
3.2 Electroforesis	32
3.2.1 Preparación del gel de agarosa	32
3.2.2 Carga de las muestras	33
3.2.3 Visualización de las bandas	33
4. Categorización y selección poblacional	34
6.Resultados	35
1. Estandarización de la temperatura de annealing de la PCR	35
2. Prueba de especificidad de los primers	37
3. Genotipificación de la población de ratones C57BL/6	40
7.Discusión	56
8.Conclusiones	63
9.Bibliografía	66

INDICE DE FIGURAS

Figura.	Pág
Figura N°1: Disfunción endotelial en la aterosclerosis.....	5
Figura N°2: Formación de la estría grasa en la aterosclerosis.....	6
Figura N°3: Formación de la lesión avanzada y complicada en la aterosclerosis.....	7
Figura N°4: Ruptura de la capa fibrosa en la aterosclerosis.....	7
Figura N°5: Esquema del método de Recombinación homóloga.....	11
Figura N°6: Esquema del sistema Cre/loxP para la generación de animales Knock-out	13
Figura N°7: Esquema del sistema Cre/loxP inducible por tamoxifeno.....	14
Figura N°8: Estructura de la apoE, con sus principales dominios.....	16
Figura N°9: Enfoque isoeléctrico de las isoformas de la apoE.....	17
Figura N°10: Genotipos y fenotipos de la apoE.....	17
Figura N°11: Vías involucradas en el aclaramiento de remanentes por el hígado.....	19
Figura N°12: Efecto de las diferentes apoE en los parámetros lipídicos.....	21
Figura N°13: Principio básico de la PCR	23
Figura N°14: Patrón de bandas esperado tras la genotipificación de la población de ratones C57BL/6	34
Figura N°15: Gradiente de temperatura de annealing, muestra apoE KO.....	35
Figura N°16: Gradiente de temperaturas de annealing, muestra Wild type.....	36
Figura N°17: PCR realizada con una muestra apoE KO y los tres primers en reacción	38
Figura N°18: PCR realizada con una muestra apoE KO, sin el primer “Mutant reverse”.....	38
Figura N°19: PCR realizada con una muestra tipo Wild type, sin el primer “Wild type reverse”.....	39
Figura N°20: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 1 al 6.....	40
Figura N°21: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 7 al 15.....	41
Figura N°22: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 16 al 23.....	41

Figura N°23: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 24 al 32.....	41
Figura N°24: Genotipificación de ratones C57BL/6 número 6,7,8,9,11 y 15.....	42
Figura N°25: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 33 al 40.....	43
Figura N°26: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 41 al 48.....	43
Figura N°27: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 49 al 56.....	43
Figura N°28: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 57 al 64.....	44
Figura N°29: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 65 al 72.....	44
Figura N°30: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 73 al 80.....	44
Figura N°31: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 81 al 89.....	45
Figura N°32: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 90 al 98.....	45
Figura N°33: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 99 al 106.....	46
Figura N°34: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 107 al 115.....	46
Figura N°35: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 116 al 124.....	46
Figura N°36: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 125 al 132.....	47
Figura N°37: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 133 al 140.....	47
Figura N°38: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 141 al 149.....	48
Figura N°39: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 150 al 158.....	48
Figura N°40: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 159 al 167.....	48
Figura N°41: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 168 al 176.....	49
Figura N°42: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 177 al 185.....	49
Figura N°43: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 186 al 194.....	49
Figura N°44: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 195 al 201.....	50
Figura N°45: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 202 al 210.....	50
Figura N°46: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 211 al 219.....	51
Figura N°47: Genotipificación de ratones C57BL/6 del 220 al 228.....	51
Figura N°48: Genotipificación de ratones C57BL/6 número 66, 72, 79, 80, 154, 155, 156, 157 Y 161.....	52