

CAPÍTULO IV

Las líneas genéticamente estandarizadas y los controles de la pureza genética

4.1 Líneas genéticamente estandarizadas

4.1.1 Introducción

La posibilidad de contar con líneas de roedores de laboratorio que estén genéticamente definidas ha sido uno de los principales avances de la ciencia de los animales de laboratorio. Como veremos a continuación, las líneas consanguíneas son el prototipo de las líneas genéticamente estandarizadas, debido a que su constitución genética está fijada en forma casi definitiva. Hace más de 80 años que se cuenta con líneas consanguíneas de ratones, ratas y cobayos, todas de gran valor porque permiten hacer experimentos eliminando la variabilidad de origen genético. Como podemos observar en las siguientes citas, la importancia de las líneas consanguíneas fue reconocida hace tiempo por algunos de los pioneros de la genética del ratón:

"It is the conviction of many geneticists that the use of inbred mice in cancer research has made possible many contributions of a fundamental nature that would not have been made otherwise" (L.C. Strong, 1942).

"The introduction of inbred mice into biology is comparable in importance with that of the analytical balance into chemistry" (H. Gruneberg, 1952).

"...the development of inbred strains has constituted probably the greatest advance in all cancer research" (W.E. Heston, 1963)

Empezando por la oncología experimental, en la década de 1940, y siguiendo con la inmunología en 1960, el uso de las líneas consanguíneas de ratón ha ido creciendo en forma sostenida a lo largo de los años. Actualmente, más del 90% de los trabajos científicos publicados en estas dos áreas usan líneas consanguíneas. El uso de las mismas ha sido esencial en la elaboración de algunos trabajos (en particular en inmunología) que fueron laureados con premios Nobel. Por ejemplo, P. Medawar y F. Burnet (1960) por el descubrimiento de la intolerancia inmunológica; B. Benacerraf, J. Dausset y G. Snell (1980) por sus estudios sobre la genética de la histocompatibilidad; N. Jeme, G. Köhler y C. Milstein (1984) por el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales y P. Doherty y R. Zinkemagel (1996) por la restricción al complejo mayor de histocompatibilidad.

4.1.2 Líneas consanguíneas (*inbred strains*)

Una población es consanguínea cuando sus progenitores comparten uno o varios antecesores comunes. En otras palabras, la **consanguinidad** (o **endocria**) es el acoplamiento entre individuos emparentados. En el orden de los roedores, la consanguinidad es muy frecuente en el

estado salvaje, debido a que viven en territorios relativamente pequeños y las migraciones son poco frecuentes. Las poblaciones de roedores de laboratorio son también relativamente consanguíneas debido a que su tamaño es limitado y el apareamiento entre animales emparentados es muy frecuente. A principios del siglo XX, en los Estados Unidos, dos grupos independientes de investigadores empezaron a criar cobayos (*Cavia porcellus*) y ratones (*Mus musculus*) aplicando un sistema de acoplamiento consanguíneo a lo largo de varias generaciones. Estos trabajos posibilitaron la creación de una serie de líneas de animales que hoy llamamos **líneas consanguíneas, endocriadas o endogámicas** (del inglés, *inbred strains*). Una línea (o **cepa**) consanguínea es aquella que resulta del acoplamiento sistemático e ininterrumpido entre hermanos y hermanas (en inglés, *full-sib mating*), por más de 20 generaciones (las cuales se numeran F1, F2, F3 etc.). Para asegurar la consanguinidad de la línea, es muy importante que todos los animales desciendan de un único par de progenitores. En el caso de no disponer de hermanos de ambos sexos, se puede recurrir a una cruce excepcional (sólo una vez) del tipo padre/madre x cría.

Durante el desarrollo de una línea consanguínea nos podemos encontrar con el fenómeno denominado **depresión endogámica** en el cual se observa una baja en la fertilidad y una menor adaptación al medio, obstáculos que llevan, a veces, a la pérdida de la línea. La depresión endogámica se debe al hecho que, por azar, durante el desarrollo de la consanguinidad, ciertos alelos desfavorables son puestos al estado homocigota; en las poblaciones salvajes, los individuos en cuestión son contra-seleccionados y desaparecen. En el ratón y la rata, la depresión endogámica no es tan severa como en otras especies de mamífero y ocurre solamente en las primeras generaciones de la endocría, desapareciendo completamente una vez que una línea consanguínea ha sido establecida. De hecho, es relativamente sencillo derivar líneas consanguíneas a partir de ratones salvaje capturados en la misma área geográfica.

Por un lado, la práctica sistemática de la consanguinidad disminuye la frecuencia de los genotipos heterocigotas y, paralelamente, el número limitado de progenitores genera una progresión hacia el estado **homoalélico** (una sola variante alélica presente), donde algunos alelos (en principio al azar) son fijados en ese grupo de animales. De esta forma, cada línea consanguínea representa una colección única de genes (alelos) imposible de repetir. El aumento de la consanguinidad es la principal consecuencia de la cruce entre hermanos y la podemos medir por el coeficiente de consanguinidad (F) (no confundir con el número de generaciones de la consanguinidad: F1, F2, F3). El coeficiente F es la probabilidad de que dos alelos en un locus dado (en un individuo) sean idénticos por descendencia, es decir que ambos sean la réplica de un mismo alelo ancestral. Para considerar a un línea como consanguínea, ésta debe tener por lo menos un $F = 98,7\%$, valor alcanzado en la generación número 20 de endocría. Este valor alcanza el 100% (todos los loci homocigotas) en aquellas líneas con más de 150 generaciones, como es el caso de la mayoría de las líneas clásicas de laboratorio (**Figura 4.1**).

Se ha calculado que a, partir de la cuarta generación de endocría, el 19% de los loci en estado heterocigota pasan a ser homocigotas (para uno u otro alelo) en cada generación; por eso se considera que después de la generación 20, la cantidad de loci que aún no se han fijado en el estado homocigota es menor al 1,3%. Este pequeño porcentaje de loci heterocigotas se llama

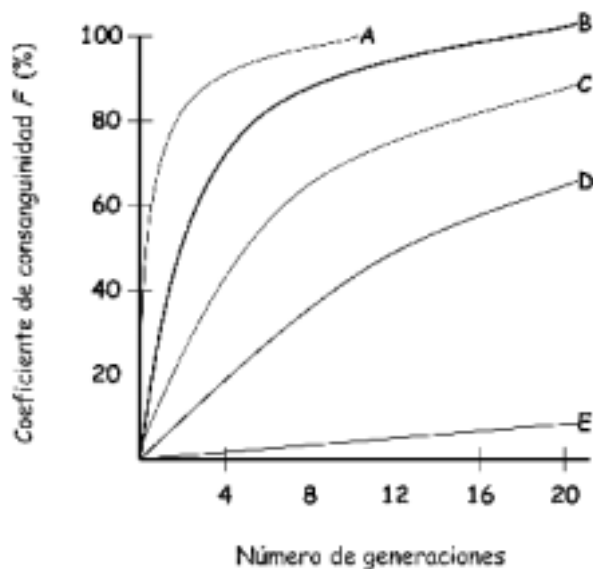


Figura 4.1. Coeficiente de consanguinidad. El gráfico muestra el aumento del coeficiente de consanguinidad (F) en distintos sistemas de acoplamiento. A, retrocruzando usando líneas consanguíneas; B, acoplamiento hermano x hermana; C, acoplamiento entre medio hermanos; D, acoplamiento al azar usando menos de 10 parejas iniciales; E, acoplamiento al azar usando 80 parejas iniciales. Como puede observarse, luego de 20 generaciones de acoplamiento hermano x hermana el coeficiente F es mayor a 98% y la línea puede ser considerada consanguínea (del inglés, *full inbred*). Adaptado de Festing MF. *Inbred strains in biomedical research*, Macmillan Press, London: Oxford University Press, New York, 1979.

heterocigosis residual. Se llega así a una situación donde encontramos dos fuerzas actuando en sentidos opuestos: la práctica sistemática de la consanguinidad, disminuyendo la variabilidad dentro de la población, y la aparición de mutaciones espontáneas, generando diversidad por la introducción de alelos nuevos. Cuando ocurre una mutación en un animal (asumiendo que sea neutra en términos de selección natural), luego de varias generaciones de endocria, existe un 25% de probabilidad de que sea fijada (reemplazando al alelo original) y un 75% de que sea eliminada de la colonia. Esta noción fundamental nos permite comprender por qué es indispensable continuar los acoplamientos consanguíneos en forma constante (aún después de la generación F20) cuando se mantiene una línea consanguínea. De no ser así, las mutaciones no son eliminadas y la heterocigosis aumenta.

4.1.2.1 Características de las líneas consanguíneas

Las principales características de las líneas consanguíneas son: (i) isogenicidad, (ii) homocigosis, (iii) individualidad, (iv) uniformidad fenotípica y (v) estabilidad genética a largo plazo.

La **isogenicidad**, o igualdad genética, es sin dudas la característica más importante de estas líneas. El hecho de que todos los individuos pertenecientes a una línea sean idénticos genética-

mente, facilita el intercambio de tejidos, como ser células del sistema inmune o células tumorales (en términos de histocompatibilidad se habla de animales **singeneicos**). En el caso del ratón, esto permitió el gran desarrollo de la oncología y la inmunología experimentales a partir de los años 1940. El alto porcentaje de **homocigosis** (mayor al 98%) es otro rasgo particular de estos animales. Por lo tanto, los individuos que pertenecen a una línea consanguínea no son equivalentes a una colección de gemelos idénticos (monocigóticos), ni tampoco a un grupo de animales clonados, ya que éstos son heterocigotas en muchos de sus loci.

La asociación de los caracteres fijados en cada línea particular genera una **individualidad** con respecto a sus cualidades, rasgo que habrá que tener en cuenta a la hora de la elección de una línea para un trabajo de investigación. En este aspecto, algunos autores dividen a las líneas consanguíneas en aquellas de **uso general** y las de **uso especial** (o particular). Aunque no existe una definición formal de una línea de uso general, son aquellas líneas que se encuentran ampliamente distribuidas y son usadas en diferentes disciplinas, más que en un tipo de estudio particular. La sensibilidad a ciertas enfermedades infecciosas, la tendencia a desarrollar enfermedades autoinmunes (como el lupus y la diabetes) y la susceptibilidad a los carcinógenos son sólo algunos ejemplos de la gran utilidad de estas líneas como animales de laboratorio de uso particular. Cada línea consanguínea tiene entonces su rango particular de características, incluyendo el tipo de tumores espontáneos, la habilidad para aprender, la vida media, la producción de leche, la agresividad y la susceptibilidad a los agentes infecciosos. Por esto mismo, la selección de la línea más apropiada es una parte crítica del diseño y la planificación de un experimento. Para obtener detalles de las características individuales de cada línea visitar la página de Internet http://www.informatics.jax.org/external/festing/search_form.cgi. Desde hace unos pocos años existe un proyecto internacional conjunto abocado a establecer una colección de datos fenotípicos proveniente de las líneas consanguíneas más comunes y de aquellas genéticamente más divergentes. Este proyecto se conoce como *Mouse Phenome Database* (MPD) y su página de Internet es <http://aretha.jax.org/pub-cgi/phenome/mpdcgi?rt=docs/home>.

Dado que se trata de animales genéticamente idénticos, la **uniformidad fenotípica** de las líneas consanguíneas es otro rasgo importante que nos permite afirmar que la variabilidad en los parámetros experimentales se debe exclusivamente a factores no genéticos (ambientales o metodológicos). Esta uniformidad nos permite lograr precisión estadística con muchos menos animales que los necesarios al trabajar con grupos no consanguíneos. Finalmente, la uniformidad hace posible la comparación de resultados experimentales entre animales de diferentes laboratorios y además, debido a su relativa **estabilidad genética**, a lo largo del tiempo.

El número de líneas consanguíneas censadas es actualmente 478 para el ratón y 234 para la rata, lo que da una idea de la enorme cantidad de información y bibliografía que se maneja. Se puede acceder a la última versión de estas listas a través de Internet (*Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory*, <http://www.informatics.jax.org/strains>) y (*International Mouse Strain Resources IMSR*, <http://www.jax.org/pub-cgi/imsrlist>). Para aquellos lectores interesados, existe un cuadro muy completo con la genealogía de las líneas consanguíneas del ratón que fue publicado originalmente en *Nature Genetics* (2000) y puede ser obtenido en forma gratuita a través del Internet: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/genealogy/>.

4.1.2.2 Las líneas consanguíneas estándar

Los primeros intentos de crear animales consanguíneos se realizaron en el año 1906 utilizando cobayos. Las líneas 2 y 13 desarrolladas en ese entonces por Sewall Wright y George M. Rommel todavía se encuentran disponibles. Como ya hemos visto en el Capítulo III, las primeras cruzas consanguíneas de ratones fueron comenzadas por Clarence C. Little en 1909 y tuvieron como consecuencia la creación de la línea DBA. En ese mismo año, Helen D. King inició las primeras líneas consanguíneas de rata, las cepas albinas WKA y PA, en el *Wistar Institute*. En el año 1918 Little se mudó al *Cold Spring Harbor Laboratory*, en el estado de New York, donde comenzó las cruzas que darían origen a las líneas de ratones más famosas, incluyendo C57BL/6, C57BL/10, C3H, CBA y BALB/c, muchas de las cuales tienen en la actualidad más de 150 generaciones de endocría (F150 +). Además del cobayo, la rata y el ratón, existen unas pocas líneas consanguíneas de hámster Sirio, jerbo y rata del algodón (ver Capítulo III).

La **Tabla 4.1** muestra las diez líneas consanguíneas de rata y ratón más utilizadas en la actualidad. A pesar de la existencia de cientos de líneas consanguíneas, el 70-80% de los trabajos de experimentación se realizan usando estas diez líneas más populares. La línea de ratón más popular es BALB/c, debido a su uso en la producción de anticuerpos monoclonales y al hecho de que es una excelente línea de uso general. Las líneas C3H, C57BL/6, CBA y DBA/2 también son muy aceptadas como líneas de uso general. C57BL/6 fue históricamente la línea más popular y actualmente es la línea más usada como fondo genético en la creación de líneas congénicas (incluyendo transgenes) y es la línea elegida por el *International Mouse Sequencing Consortium* para la secuenciación del genoma murino. La línea FVB y las distintas sublíneas de 129 han adquirido gran popularidad en las últimas dos décadas debido a que son las más adecuadas para la producción de ratones transgénicos y knock-out, respectivamente. Como ejemplo de línea de uso particular tenemos a la línea AKR, de gran utilidad en estudios de cáncer linfático, debido a su alto porcentaje de linfomas espontáneos. La línea Fischer 344 (F344) es sin dudas la línea consanguínea de rata (de uso general) más empleada, seguida por la línea LEW, muy usada en inmunología. Un

Posición en el "ranking"	Línea de ratón	Número de Laboratorios	Línea de rata	Número de Laboratorios
1	BALB/c	162	F344	51
2	C3H	145	LEW	37
3	C57BL/6	116	SHR	34
4	CBA	113	WKY	31
5	DBA/2	92	DA	28
6	C57BL/10	60	BN	26
7	AKR	52	WAG	21
8	A	51	PvG	17
9	129	50	BuF	17
10	3JL	40	WF	15

Tabla 4.1. Uso de las líneas consanguíneas. "Top ten ranking" de las líneas consanguíneas de ratón y rata de laboratorio. El orden de mérito está basado en el número de animalarios que mantienen cada línea en todo el mundo, incluyendo las respectivas sublíneas. No se incluyeron en este cálculo las líneas congénicas. Adaptado de *Festing MF. International Index of Laboratory Animals, 6th edition, 1993.*

ejemplo de línea de uso particular lo constituyen las ratas SHR (*spontaneously hypertensive rat*), esenciales en los estudios de hipertensión (ver Capítulo IX).

4.1.2.3 Las líneas consanguíneas salvajes

En los últimos 25 años, los genetistas del ratón han estado desarrollando una gran variedad de líneas consanguíneas a partir de animales atrapados en estado salvaje (ver Capítulo III). Entre las líneas más utilizadas podemos nombrar:

las líneas MAI/Pas (origen: Austria, 1981) y PWK/Ph (origen: República Checa, 1974) derivadas de animales de la especie *Mus musculus musculus*.

la línea CAST/Ei (origen: Tailandia, 1971) derivada de ratones *Mus musculus castaneus*.

la línea MOLC/Rk (origen: Japón, 1969) derivada de ratones *Mus musculus molossinus*

las líneas SEG/Pas y SPRET/Ei (origen: España, 1978) derivadas de la especie *Mus spretus*.

Hoy en día se encuentran disponibles muchas líneas de origen salvaje que ya han pasado las 40 generaciones de endocría e incluso algunos laboratorios (*The Jackson Laboratory, Bar Harbor*, Estados Unidos) ofrecen estos animales en forma comercial (ver <http://jaxmice.jax.org>).

4.1.2.4 La divergencia genética y la existencia de sublíneas

Como hemos visto, la aparición constante de mutaciones, fenómeno que actúa en sentido opuesto a la consanguinidad, genera diversidad genética por la introducción de nuevos alelos (ver Capítulo VII). Debido a la presencia de estas mutaciones espontáneas y a un mínimo grado de heterocigosis residual se puede generar, con el tiempo, la divergencia de las líneas en **sublíneas (subcepas)**. Una línea consanguínea se considera dividida en sublíneas cuando existen diferencias genéticas, conocidas o probables, en ramas separadas de la misma, según los siguientes casos: (i) cuando una línea se separa en ramas diferentes antes de la generación F40, por el fenómeno de heterocigosis residual; (ii) cuando la rama de una línea ha sido mantenida separada de otras por más de 100 generaciones, contando desde los ancestros comunes y (iii) cuando se descubren diferencias genéticas con otras ramas de la misma línea, ya sea por mutaciones o contaminación genética. Si la contaminación es reciente sería conveniente re-nombrar la línea, en vez de hablar de una sublínea. Esto sucedió con una colonia de ratones de la línea A, contaminada en los laboratorios Glaxo y renombrada como línea A2G. Lo mismo sucedió con la ex sublínea C57BL/Ks: debido a las diferencias genéticas que presentaba con C57BL/6 y C57BL/10, como consecuencia de una contaminación genética (probablemente con DBA), fue renombrada en 1994 como C57BLKS.

A modo de ejemplo, la línea BALB/c, que fue iniciada por BAGG en la década de 1910 (BALB/c viene de **B**agg **AL**binos), presenta más de 10 sublíneas que son relativamente diferentes unas de otras. Por ejemplo, la sublínea BALB/cj, originaria del *Jackson Laboratory*, es

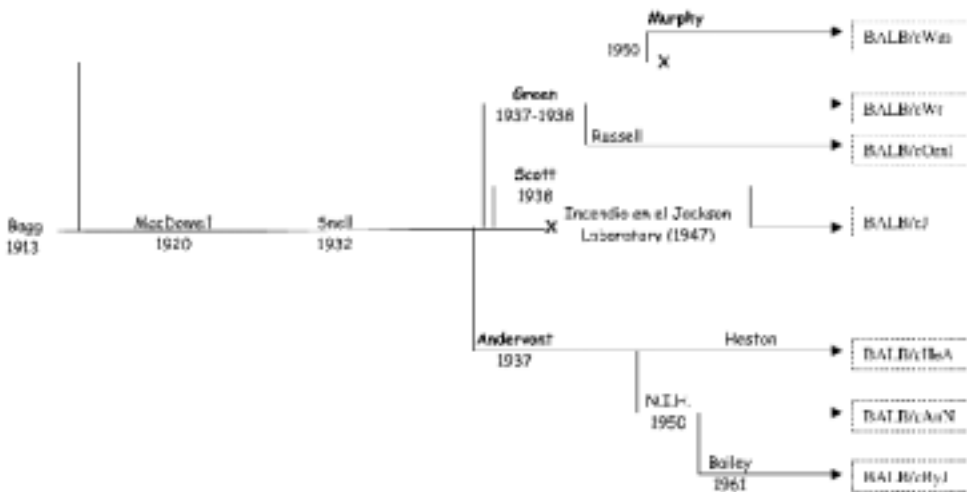


Figura 4.2. Línea consanguínea BALB/c. El diagrama muestra la historia genealógica de los ratones de la línea consanguínea BALB/c. El grupo actual de sublíneas de BALB/c fue formado básicamente por cuatro ramas principales: las colonias iniciadas por H. B. Anderwont, J. P. Scott, E. Green y W. H. Murphy en los Estados Unidos. Adaptado de Morse III, H. *Origins of Inbred Mice*. Academic Press, New York, 1978.

mucho mas agresiva que la BALB/cAnN, originaria de los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos (NIH). Además, la sublínea BALB/cJ es menos susceptible a los plasmocitomas inducidos por *pristane*, por lo que la sublínea BALB/cAnN es mejor para la producción de anticuerpos monoclonales. Estas sublíneas tienen mas de 60 años de separación (Figura 4.2).

Las diferencias acumuladas por mutaciones pueden tener, además, consecuencias patológicas para una línea, como ocurre en la sublínea C3H/HeJ. La misma porta en el cromosoma 4 una mutación que la hace insensible a la estimulación por lipopolisacáridos de bacterias gram negativas. Esta mutación se nombró como *Lps^d* (del inglés, *defective lipopolysaccharide response*) y ahora se sabe que es una delección en el gen *toll-like receptor 4* (*Tlr4^{Lps-d}*). En cambio, otras sublíneas de C3H, como la C3H/HeN, portan el gen normal (*Tlr4^{Lps-n}*), hecho que las hace 20 veces más susceptibles a las endotoxinas bacterianas. Otro ejemplo lo constituyen las sublíneas CBA/J y CBA/CaJ; la primera porta la mutación *rd* (*retinal degeneration*) y por lo tanto queda ciega dentro del primer mes de vida, la segunda no porta dicha mutación y por lo tanto su visión es normal.

El conjunto de sublíneas de I29 merece un párrafo aparte ya que se trata del origen de la mayoría de las líneas de células embrionarias (*ES cells*) empleadas en la construcción de ratones knock-out. Tienen la particularidad de formar un grupo heterogéneo de sublíneas segregando diferentes colores de pelaje. Las sublíneas I29X1/SvJ (resultante de una contaminación genética) y I29P3, son albinas (o chinchilla), mientras que otras sublíneas son de color agutí,

en particular las que pertenecen al denominado grupo *Steel* (I29S1, I29S2, I29S3, I29S4, I29S5, I29S6, I29S7 y I29S8). Debido a estas variantes y a problemas de contaminación genética, se ha revisado (y modificado) toda la nomenclatura de este grupo de sublíneas, la información completa puede obtenerse de Internet en *Mouse Genome Informatics* (http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strain_I29.shtml).

La divergencia de las líneas consanguíneas es por lo tanto un fenómeno lento pero insidioso e inevitable. Uno de los medios más eficaces para impedir este proceso es el establecimiento de bancos de embriones congelados, los cuales abastecerán, a intervalos regulares, la formación de nuevos núcleos reproductores (ver Capítulo II).

Nomenclatura de las líneas consanguíneas

La nomenclatura de las líneas es indispensable y debe ser seguida en forma rigurosa debido a que nos aporta mucha información. Las siguientes reglas de nomenclatura fueron tomadas del *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* (para obtener versiones actualizadas consultar el sitio <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>). Las reglas de nomenclatura para la rata son similares a la del ratón, tanto para las líneas consanguíneas como para los loci y alelos (ver <http://rgnc.gen.gu.se/#rgnc2>).

Los símbolos de línea. Las líneas consanguíneas deben designarse con letras mayúsculas o una combinación de letras mayúsculas y números (comenzando con letra). Por ejemplo, la línea de ratón DBA o la línea de rata SHR, aunque existen algunas excepciones en líneas muy conocidas como la línea I29. Los símbolos de las líneas nuevas deben ser preferentemente cortos y previamente confrontados con la lista existente, para evitar duplicaciones. Las líneas con un origen común, separadas antes de la generación 20 de endocría (F20), deben ser tomadas como líneas relacionadas y por lo tanto sugerirlo en el nombre, por ejemplo las líneas de ratón NZB, NZC, NZO.

Los símbolos abreviados. En algunos casos se permite utilizar abreviaturas para las líneas más conocidas. Por ejemplo, las líneas de ratón AKR (AK); BALB/c (C); C3H (C3); C57BL/6 (B6); C57BL/10 (B10); DBA/1 (D1); DBA/2 (D2).

Los símbolos de sublínea. Se debe utilizar el nombre de la línea de origen, seguido de una barra y un símbolo apropiado de sublínea. Símbolos de sublínea: (i) números (DBA/1, DBA/2), (ii) código de laboratorio, con la primera letra en mayúscula (BALB/c, la "J" es el código del Jackson Laboratory, USA), (iii) iniciales de un apellido, con primera letra mayúscula (C3H/He, por Heston) y (iv) la combinación de código y números. Algunas excepciones son permitidas en el caso de líneas muy conocidas como BALB/c, donde la "c" indica albinismo y no una sublínea.

Los códigos de registro para laboratorios. Los códigos únicos de registro para cada laboratorio y los símbolos de sublínea son asignados por el ILAR (*Institute for Laboratory Animal Resources*). Para ver los códigos existentes o para solicitar un código visitar la página de Internet

de ILAR (<http://dels.nas.edu/ilar/codes.asp?id=codes>). El uso de estos códigos es apropiado para designar colonias de la misma línea (sin diferencias genéticas) mantenidas por diferentes laboratorios. Debe colocarse al final del nombre completo de la línea el signo "@" seguido del código del laboratorio, por ejemplo C57BL/6J@Pas (la línea C57BL/6 importada del *Jackson Laboratory* y mantenida por el *Institut Pasteur*).

4.1.2.5 Mantenimiento de las líneas consanguíneas

Como hemos visto en el Capítulo II, para el mantenimiento de las líneas consanguíneas se recomienda un sistema basado en un núcleo reproductor (*foundation stock colony*) y una o más colonias de multiplicación o expansión (*multiplication colony*). El núcleo de reproducción es lo más valioso debido a que es la fuente de animales puros, genéticamente controlados. Este núcleo de reproducción está formado normalmente por 10 a 20 parejas monogámicas. Las principales medidas de manejo para prevenir la contaminación genética por cruza no deseadas son las siguientes: (i) Separación física de las colonias reproductoras, en particular los núcleos de fundación, en aisladores o en cuartos separados. (ii) Si la separación física no es posible, distribuir las líneas de acuerdo a su color de pelaje. (iii) Se debe elegir un sistema de cría que minimice el movimiento de animales entre cajas y cuartos. En este aspecto, las parejas monogámicas o los tríos estables son la mejor opción. Es importante tener presente que, dentro del núcleo reproductor, debe haber una línea de ancestro principal, pero con la menor cantidad posible de ramificaciones. Para lograr este objetivo se recomiendan dos sistemas de producción: (i) de **línea única** y (ii) de **líneas paralelas**.

En el sistema de línea única, las nuevas parejas reproductoras se seleccionan de un número limitado de jaulas (no más de 30) e, idealmente, se las somete a un control de la pureza genética. Lo más importante es que todos los animales de la generación presente descendan de una única pareja ancestral, no más de cinco generaciones atrás. En el sistema de líneas paralelas (modificado), la exigencia de perpetuar una línea única es menos estricta, lo que facilita un poco el manejo. Normalmente, se mantienen tres líneas en paralelo, usando entre 5 y 10 parejas por línea. Luego de cuatro generaciones, se seleccionan un macho y una hembra (hermanos), los cuales serán la pareja ancestral de las próximas cuatro generaciones. A partir de esta nueva pareja se vuelven a abrir tres líneas (tres hembras y tres machos de la misma camada) y se las mantiene por cuatro generaciones, y así sucesivamente (**Figura 4.3**). Este sistema está basado en el supuesto de que es casi imposible que se produzca una contaminación genética simultáneamente en las tres líneas. Para evitar accidentes, la pareja seleccionada debería pasar por un estricto control de calidad genética. Muchos encargados de animalarios seleccionan estos animales teniendo en cuenta el comportamiento reproductivo (por ejemplo el número de crías por hembra por semana), aunque es una medida discutible. Los libros de Festing (1979) y Hedrich (1990) contienen información detallada de estos esquemas de reproducción.

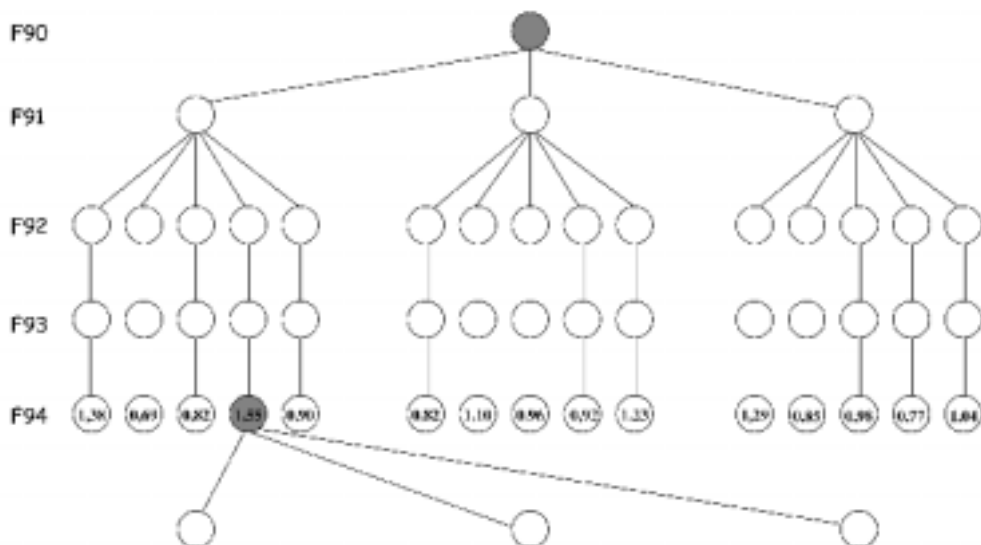


Figura 4.3. Sistemas de cría. Sistema de líneas paralelas usado para el mantenimiento de un núcleo reproductor de una línea consanguínea. Cada círculo representa una pareja reproductiva y todos los animales pueden ser referidos a una pareja ancestral (círculo gris de la generación F90). En este ejemplo se mantienen tres líneas en paralelo con cinco parejas por línea. Luego de cuatro generaciones se vuelve a elegir una pareja que será el futuro ancestro común (círculo gris de la generación F94); en este caso, seleccionada por tener el mejor comportamiento reproductivo. Los valores dados en la última generación son número de crías por hembra y por semana. Adaptado de Hedrich H. *Genetic monitoring of inbred strains of rats*. Stuttgart, New York. Gustav Fischer Verlag, 1990.

4.1.3 Híbridos F1 (*hybrid F1 mice*)

Son la primera generación obtenida de la cruce de dos líneas consanguíneas, no obstante ser genéticamente uniformes (isogénicas), serán heterocigotas para todos los loci en los que difieran las líneas parentales (**Figura 4.4**). Como consecuencia, los **híbridos F1** no pueden ser acoplados entre sí (como veremos en el Capítulo VI, esta cruce generará animales F2) sino que deben ser producidos, cada vez que se requiera, por la cruce de las líneas parentales. La uniformidad genética a través del tiempo es una de las ventajas más claras de estos animales. El **vigor híbrido** es otro de sus rasgos sobresalientes, expresado en un estado físico superior al de las líneas parentales y una mejor adaptación al medio. Una de las aplicaciones clásicas de los híbridos F1 en la investigación del cáncer es el análisis de “**pérdida de la heterocigosis**” (del inglés, *loss of heterozygosity-LOH*). Este método saca provecho de la presencia de marcadores polimórficos entre las líneas parentales (por ejemplo, un microsatélite dará dos bandas de electroforesis en el ADN normal) evaluando la pérdida de algún alelo en el ADN tumoral. Por ejemplo, los híbridos B6C3F1 son el estándar para el estudio de cáncer de hígado inducido por carcinógenos químicos.

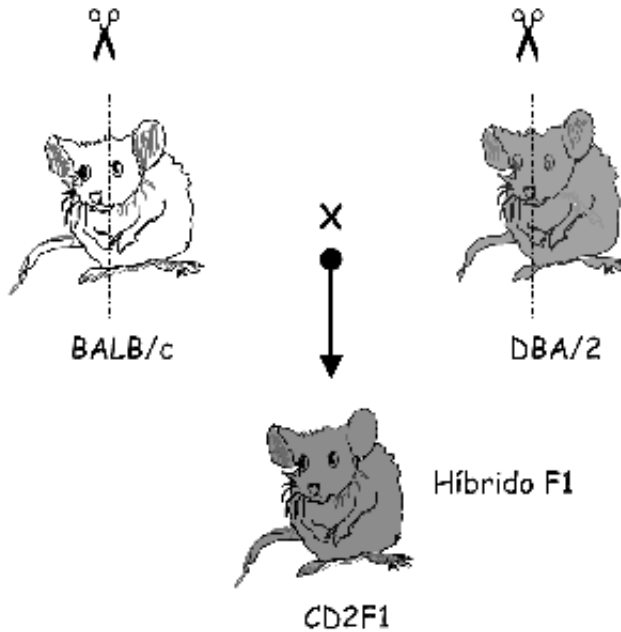


Figura 4.4. Animales híbridos F1. El dibujo representa lo que sucede cuando cruzamos ratones de dos líneas consanguíneas para generar animales híbridos F1. El ratón F1 hereda un juego de cromosomas completo de cada progenitor por lo tanto será heterocigota para todos aquellos loci en los cuales difieran las líneas parentales. Más allá de este rasgo, los ratones F1 generados a partir de las mismas líneas serán genéticamente idénticos (isogénicos).

Nomenclatura de los híbridos F1

Los híbridos F1 son designados anotando primero el progenitor hembra, una "x" que simboliza el cruzamiento y en segundo lugar el macho, más el símbolo F1. Puede utilizarse la forma completa del nombre, (C57BL/6 x DBA/2)F1, si es la primera vez que se lo menciona en un texto, o su forma abreviada (B6D2F1).

4.1.4 Líneas congénicas y coisogénicas (*congenic strains*)

Dos líneas que son genéticamente idénticas pero que difieren sólo en un locus, por ejemplo a causa de una mutación, se denominan **coisogénicas**. Esto puede suceder sólo cuando la mutación ha ocurrido en una línea consanguínea. Por lo tanto, podemos especular que estos animales son idénticos, a excepción del locus mutado.

De todas formas, existe la posibilidad de generar un análogo de las líneas coisogénicas transfiriendo, por medio de la reproducción sexual, la mutación de interés a un **fondo genético** (del

inglés, *genetic background*) determinado, normalmente una línea consanguínea estándar. Las líneas creadas por la introducción de una región cromosómica que contiene un locus diferencial se denominan **líneas congénicas**. Estas líneas se obtienen por retrocruzas repetidas de la línea donante (la cual porta la mutación) con una línea consanguínea receptora, a través de por lo menos 10 generaciones, llamadas sucesivamente N2, N3, N4 etc. (Figura 4.5). De esta forma, el gen transferido se encuentra “sumergido” en un segmento cromosómico cuyo tamaño se reduce, generación tras generación, a causa de las recombinaciones cromosómicas.

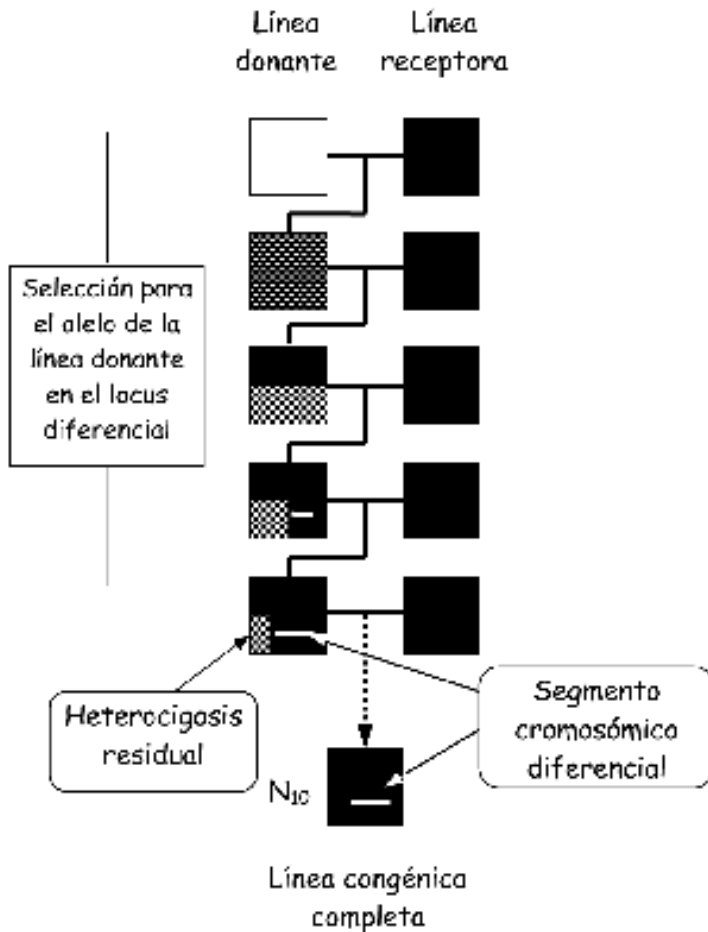


Figura 4.5. Líneas congénicas. El gráfico muestra la construcción de una línea congénica. Las retrocruzas sucesivas con la línea receptora (cuadrados negros) aumenta el porcentaje de ese genoma en cada generación (en promedio 50%), mientras que el porcentaje del genoma de la línea donante (cuadrados blancos) va disminuyendo en la misma proporción. La heterocigosis residual va desapareciendo y sólo queda el segmento del cromosoma que acompaña al locus diferencial, seleccionado en cada generación. En la generación N10, ya se puede considerar a la línea como congénica completa (del inglés, *full congenic*). Adaptado de Silver L. M. (ed) *Mouse Genetics. Concepts and applications*. Oxford University Press, Oxford, 1995

Es importante aclarar que en cada generación de retrocruza se seleccionan (como futuros progenitores) sólo aquellas crías que han recibido el alelo mutado, de lo contrario corremos el riesgo de perderlo. En cada generación de retrocruza el nivel de heterocigosis se reduce un 50% y aumenta en la misma proporción el fondo genético de la línea receptora (esto se aplica sólo a los cromosomas que no portan la mutación). Se puede calcular el porcentaje del genoma de la línea donante que aún persiste en el genoma receptor por la siguiente fórmula: $1/2^N$ (donde N es el número de generaciones de retrocruza). Para ocho generaciones (N8), $1/2^8 = 1/256 = 0,4\%$ del genoma de la línea donante (**Figura 4.6**). Con respecto al segmento cromosómico que porta el locus diferencial, existe una aproximación estadística que indica que el mismo tendría, en promedio, un tamaño de 20 cM (10 cM a cada lado del locus diferencial) en la generación N10 y alrededor de 5 cM si llegamos hasta N20 (**Figura 4.7**). Normalmente, estas líneas se desarrollan por medio del esquema denominado **cruza-intercruza**, donde (durante el proceso de retrocruzas) un animal homocigoto para la mutación es siempre cruzado con un ejemplar puro de la línea de fondo. En el caso de querer desarrollar líneas congénicas segregando para mutaciones letales o estériles al estado homocigoto se puede usar el método de cruce-intercruza con transplante de ovarios (ver Capítulo II). Por ejemplo, las mutaciones *microphthalmia* (*Mit^{fmi}*) y *obese* (*Lep^{ob}*) fueron históricamente mantenidas con este esquema.

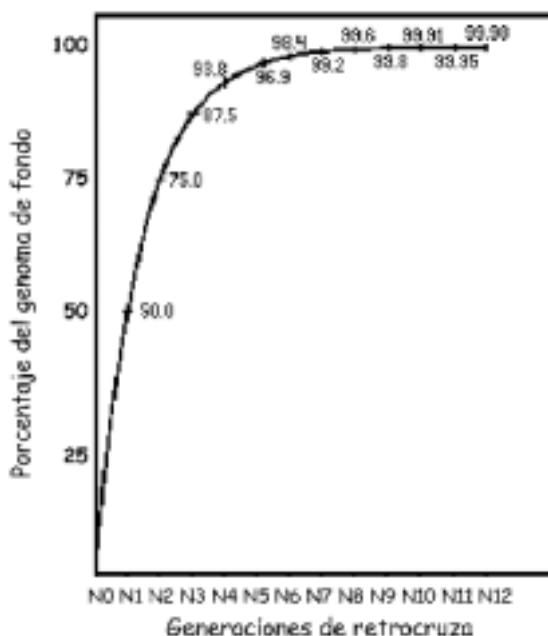


Figura 4.6. Retrocruzas contra una línea consanguínea. El gráfico muestra el aumento del porcentaje correspondiente al genoma de la línea de fondo (línea receptora) durante la construcción de una línea congénica. Como puede observarse, el porcentaje aumenta 50% en cada generación de retrocruza, llegando casi a 100% en la generación N12, momento en el cual se considera a la línea como congénica completa (del inglés, *full congenic*).

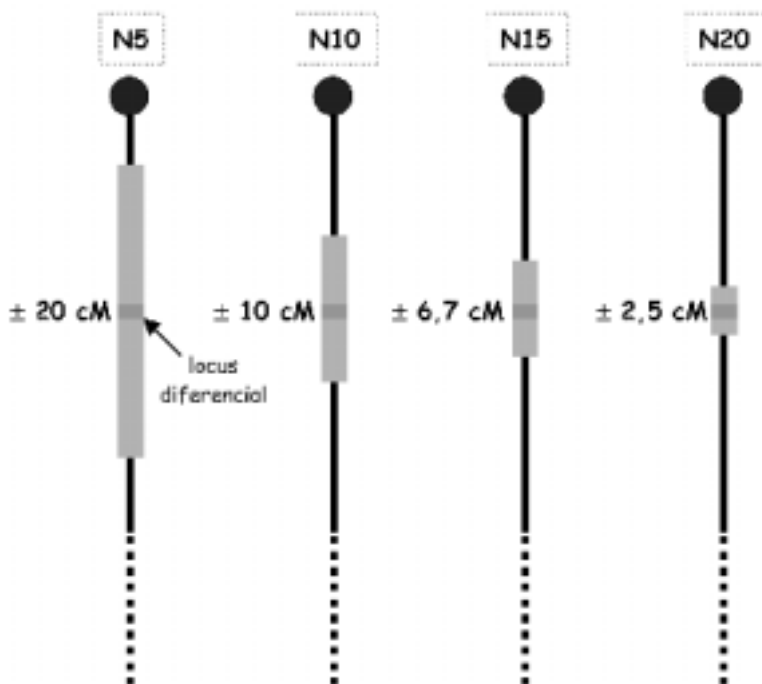


Figura 4.7. Desarrollo de una línea congénica. El dibujo muestra la disminución del tamaño del segmento diferencial (el cual porta el locus introducido por selección) durante la creación de una línea congénica. A medida que realizamos las retrocruzas con la línea receptora, el tamaño del fragmento cromosómico introducido (rectángulo gris) es menor, siendo de (aproximadamente) 20 cM (10 cM a cada lado) en la generación N10 y de 5 cM (2,5 cM a cada lado) en la N20.

En términos prácticos, se puede estimar que el desarrollo de una línea congénica llevará aproximadamente la mitad del tiempo que para desarrollar una consanguínea: alrededor de 5 años. Actualmente, desde la gran profusión de los marcadores moleculares (como los microsatélites), es posible acortar mucho estos tiempos, por un sistema de reproducción asistida por marcadores conocido en inglés como *speed congenic*. Esta metodología se basa en elegir, en cada generación de retrocruza, a aquellos progenitores que tengan la mayor proporción del genoma de la línea receptora (fondo genético), por medio del uso de marcadores polimórficos que cubran todos los cromosomas. Esto se realiza en base a que la proporción del genoma de la línea de fondo sigue una distribución normal; por ejemplo, el promedio de esa proporción es del 50% en la N2. Pero, en realidad, en un grupo de 100 ratones N2 existirán individuos con valores de 20% y otros de 80% del mismo fondo genético. La reproducción asistida con marcadores intenta rescatar estos animales con mayores proporciones para ser usados como progenitores. Por ejemplo, realizando un genotipado de alta densidad (con marcadores espaciados cada 10 cM) a 40 ratones machos en cada generación, Wakeland y colaboradores obtuvieron un promedio de 0,1% de genoma dador "contaminante" en la generación N5 (este porcentaje subió a 0,4% cuando usaron los marcadores espaciados cada 25 cM).

Las líneas congénicas (existen cientos de ellas en el ratón y la rata) son esenciales para estudiar el efecto de las mutaciones (sean espontáneas, inducidas o por manipulación genética), ya que permiten comparar animales en los cuales se han eliminado las diferencias en el fondo genético. Un ejemplo de esto es el panel de líneas congénicas de rata establecido por B. Voigt y colaboradores utilizando la línea normotensa BB/Ok (aunque proclive a desarrollar diabetes) y la línea hipertensa SHR/Mol (resistente a la diabetes). El panel BB.SHR se desarrolló de manera que cada línea lleve un segmento único de la línea SHR (conocido por estar involucrado en el desarrollo de la hipertensión) sobre fondo BB. En el ratón, las líneas congénicas creadas con los diferentes genes de histocompatibilidad, han jugado un papel muy importante en el estudio de la biología de los trasplantes. Los trabajos de George D. Snell con las líneas **congénicas resistentes** permitieron el descubrimiento de las leyes que gobiernan el rechazo de los injertos, trabajos por los que recibió el único premio Nobel relacionado directamente a la genética de ratones (ver Capítulo V).

Recientemente, se dio a conocer la creación de los ratones GTM (del inglés *genome tagged mice*). Olga Iakoubova y colaboradores generaron, por medio de cruces asistidas por marcadores moleculares, 60 líneas congénicas, cada una portando un segmento (entre 8 y 58 cM de tamaño) proveniente de DBA/2 o CAST/Ei sobre fondo C57BL/6J. Estas líneas serán de gran utilidad en el análisis de enfermedades genéticas complejas.

Nomenclatura de las líneas coisogénicas y congénicas

Las líneas coisogénicas deben designarse por el símbolo de la línea más, seguido de un guión, el símbolo del gen o alelo diferencial, por ejemplo C3H/N-*lpr*. Las líneas congénicas se designan con un nombre compuesto por dos partes (separadas por un punto). La primera es el nombre completo, o abreviado, de la línea de fondo (la que recibe el locus diferencial) y, luego del punto, se coloca la abreviatura de la línea donante, un guión y, seguido, el símbolo del locus o alelo diferencial. Por ejemplo, B10.129-*H12^b* es una línea con fondo C57BL/10Sn (= B10) pero que difiere de esa línea original en el alelo *H12^b*, derivado de la línea 129. Si el origen de la línea donante de la mutación es desconocido puede indicarse como B6.Cg-*nkt*, en donde "Cg" indica línea congénica.

4.1.5 Líneas consanguíneas recombinantes (**recombinant inbred strains-RIS**)

Debido a su importancia en el desarrollo de los mapas genéticos, las líneas **consanguíneas recombinantes** serán vistas en detalle en el Capítulo VI. Básicamente, se trata de grupos o paneles (del inglés, *set*) de líneas que se producen por 20 ó más generaciones de endocria sistemática de las crías sucesivas de una cruce entre dos animales F1, tomadas al azar desde la F2 (ver Figura 6.13 en el Capítulo VI). Tratándose de líneas consanguíneas, cada línea de un panel de ratones RIS representa una colección de individuos con genomas idénticos, homocigotas para todos sus loci, y que pueden ser criados en número ilimitado, lo que significa una gran ventaja. Estas líneas también permanecen estables a lo largo de las generaciones, con la

sola excepción de la posibilidad de mutaciones. En términos genéticos, los cromosomas de estas líneas son un “tapiz” hecho de “trozos” (de tamaño variable) de cromosomas derivados, al azar, de las dos líneas parentales (50% y 50% en promedio). La gran ventaja que presentan estas líneas para el análisis de ligamiento es la posibilidad de acumular información en forma aditiva a lo largo de los años sobre el mismo panel de ratones RIS. Las líneas consanguíneas recombinantes están volviendo a tener protagonismo ya que permiten estudiar la herencia de caracteres complejos y cuantitativos. De hecho, en la actualidad se encuentran en desarrollo nuevos paneles RIS.

Nomenclatura de las líneas consanguíneas recombinantes

Las líneas consanguíneas recombinantes deben designarse con los símbolos abreviados de las líneas parentales separados por la letra “X” (en mayúscula y sin dejar espacios). Por ejemplo, CXB será un grupo de RIS derivado de una cruce entre una madre BALB/c (C) y un padre C57BL/6 (B). Las líneas individuales dentro de la serie se designan con números (CXB1, CXB2, CXB3 etc.).

4.1.6 Líneas congénicas recombinantes (**recombinant congenic strains-RCS**)

Estas líneas son una variación de la filosofía de las RIS y por lo tanto se empiezan cruzando dos líneas consanguíneas. Una vez obtenidos los animales F1, se realizan algunas generaciones de retrocruza contra una de las líneas parentales (la que será la línea de fondo) para finalmente proseguir con la endocría (sin selección) de estos animales. De esta manera, la proporción de la línea de fondo y la donante no será, como en el caso de las RIS, 50% y 50%. Por ejemplo, para el caso de dos generaciones de retrocruza, será 87,5% de la línea de fondo y 12,5% de la línea donante. Como veremos en el Capítulo VI, las RCS son especialmente útiles para la localización de genes asociados a caracteres hereditarios complejos, como son los genes de susceptibilidad al cáncer.

Una variante de las líneas congénicas recombinantes surgió de la cruce de líneas de ratones *Mus spretus* y *Mus musculus*. Xavier Montagutelli y colaboradores (*Institut Pasteur*, París) han desarrollado 50 líneas conocidas como **líneas congénicas recombinantes inter-específicas** (*inter-specific recombinant congenic strains*, IRCS), donde C57BL/6 es la línea de fondo y SEG/Pas la línea donante. Según el esquema de cruces utilizado, se esperaba (en teoría) una contribución de alrededor del 9% del genoma de origen *Mus spretus*. En realidad (aunque no se realizó selección durante la endocría) se encontró que ese porcentaje era sólo del 1,6%, debido a la contra-selección de los alelos *Mus spretus*. De esta forma, cada línea IRCS lleva un bajo número de segmentos cromosómicos pequeños de origen *Mus spretus*, representando una línea “multi-congénica”. Estas líneas han sido muy útiles a la hora de localizar loci de resistencia a la formación de linfomas por radiación γ en el ratón.

Nomenclatura de las líneas congénicas recombinantes

Las líneas congénicas recombinantes deben designarse con los símbolos abreviados de las líneas parentales (primero la receptora y luego la donante) separados por la letra "c" minúscula. Por ejemplo, CcS será un panel de RCS derivado de una cruce entre BALB/c (C) y STS (S), donde BALB/c es la línea receptora (fondo genético). Las líneas individuales dentro de la serie se designan con números (CcS1, CcS2 etc.).

4.1.7 Líneas consómicas (*consomic strains*)

Las líneas **consómicas** son líneas en las cuales se introduce un cromosoma entero (en vez de un segmento) en una línea receptora, también por medio de retrocruzas. Son conocidas también como **líneas con sustitución de cromosoma** (del inglés, *chromosome substitution strains*). Igual que para las líneas congénicas, se necesitan por lo menos diez generaciones de retrocruzas para lograrlas. Una de sus formas más simples es utilizar el cromosoma Y como donante, por ejemplo para obtener animales con fondo C57BL6 pero que porten un cromosoma Y en su totalidad *Mus musculus castaneus* (la nomenclatura sería B6-Y^{CAS}). También pueden introducirse cromosomas autosómicos pero, en este caso, las cruces deben ser asistidas por marcadores moleculares (normalmente microsatélites). Guénet y colaboradores (*Institut Pasteur*) han desarrollado un grupo de líneas **consómicas inter-específicas** entre C57BL6 y STF/Pas (*Mus spretus*) para algunos cromosomas de origen *Mus spretus*. Debido a problemas de reproducción no se pudieron lograr líneas para todos los cromosomas y sólo los cromosomas 14, 16 y 19 han quedado en estado de homocigosis. De todas formas, estas líneas han sido usadas para localizar loci de resistencia a la formación de linfomas por radiación γ . Otro ejemplo del valor de estos modelos son las cinco líneas de ratas consómicas desarrolladas en el *Medical College of Wisconsin*, Estados Unidos. En este caso, los fondos genéticos involucrados fueron las líneas Brown Norway (BN), Fawn-Hooded Hypertensive (FHH) y Dahl Salt-Sensitive (SS). Se espera que estas líneas consómicas sean útiles en la disección genética de la hipertensión.

4.1.8 Líneas conplásticas (*conplastic strains*)

Las líneas **conplásticas** tienen el genoma mitocondrial (completo) perteneciente a otra línea consanguínea. Teniendo en cuenta que el ADNmt (de un tamaño aproximado de 16,3 kb en el ratón) es indistinguible entre las líneas clásicas de laboratorio, este tipo de acercamiento sólo tiene sentido para cruces inter-específicas o inter-subespecíficas. Se pueden obtener, por ejemplo, ratones con fondo C57BL6 pero que porten el genoma mitocondrial de origen *Mus musculus castaneus*. En este caso, la nomenclatura sería B6-mt^{CAS}.

4.1.9 Los roedores no consanguíneos (*outbred stocks*)

Una gran mayoría de las ratas y ratones vendidos en todo el mundo para ser usados en investigación pertenece a grupos (del inglés, *stocks*) de animales **no consanguíneos, exocriados o exogámicos** (en inglés *random bred* o *outbred*). Para ser más exactos, datos recientes muestran que alrededor del 75% de las ratas y ratones producidos comercialmente (por lo menos en Estados Unidos) son animales no consanguíneos. Su gran popularidad se debe especialmente a que son mucho más baratos que las líneas consanguíneas, son muy buenos reproductores y mansos para el manejo de laboratorio, pero es importante destacar que se trata de animales no definidos genéticamente. Para mantener correctamente estos grupos de roedores no debe sobrepasarse del 1% de endocría por generación, tratando de cruzar siempre animales no emparentados. En una colonia cerrada, esto es muy difícil de lograr, por lo tanto dependerá del tamaño inicial de la colonia. Lo ideal es contar con alrededor de 80 parejas reproductoras como fundadores del núcleo; de esta manera el coeficiente de endocría F no llega a superar el 10% dentro de las 20 generaciones. Existen varios sistemas de cría para mantener animales exocriados, dependiendo del número de animales que se tenga en la colonia. El sistema Poiley, del tipo rotativo, se ajusta mejor para grandes colonias, otros sistemas, como el Han, donde se intercalan una o dos veces las generaciones de apareamientos, son más aptos para colonias pequeñas. Para más información sobre la genética de las poblaciones exocriadas consultar el artículo de Daniel L. Hartl (2001) *Genetic Management of Outbred Laboratory Rodent Populations* (<http://www.criver.com/techdocs/index.html>) y el libro *Microbial Status and Genetic Evaluation of Mice and Rats* (2000).

Entre los ratones no consanguíneos más populares podemos citar los Swiss-Webster, CD-1, ICR, y CF-1, todos de uso general. Los ratones llamados Swiss o Swiss-Webster derivan todos de un grupo de 9 ratones llevados desde Suiza hacia Estados Unidos por Clara Lynch en 1926. Allí fueron criados en el *Rockefeller Institute*, Nueva York, desde donde fueron distribuidos a distintos institutos, siempre como ratones exocriados. En la década de 1930, Leslie Webster los pasó a manos de vendedores comerciales, de allí el origen del nombre Swiss-Webster. Los ratones ICR (*Institute of Cancer Research*), originalmente HA(ICR), derivan totalmente de ratones Swiss-Webster, aunque existen dudas sobre la contribución de ratones albino de origen desconocido (vendedores comerciales). Este grupo lo comenzó John Hauschka en el año 1947 en el *Institute of Cancer Research, Philadelphia*, Estados Unidos. Es importante tener en cuenta que también existen muchas líneas consanguíneas que han sido desarrolladas a partir de ratones Swiss, como SJL/J, SWR, HSFS, ICR/Ha y NIH/Ola, entre otras (**Figura 4.8**).

Las ratas Wistar Hannover, Wistar Kyoto (WKY), Sprague-Dawley (SD), Long Evans (LE) y Zucker (ZUC) son los grupos de ratas no consanguíneas más populares. Las primeras colonias de ratas albinas fueron comenzadas en 1906 en el *Wistar Institute*, donde se originaron la mayoría de estos grupos exocriados. Por ejemplo, las ratas Long Evans provienen de cruces de ratas Wistar con ratas salvajes. Existen también grupos no consanguíneos de cobayos (Hartley e IAF), hámsters (LVG) y jerbos (MON) empleados en distintas áreas de la investigación biomédica (ver Capítulo III).

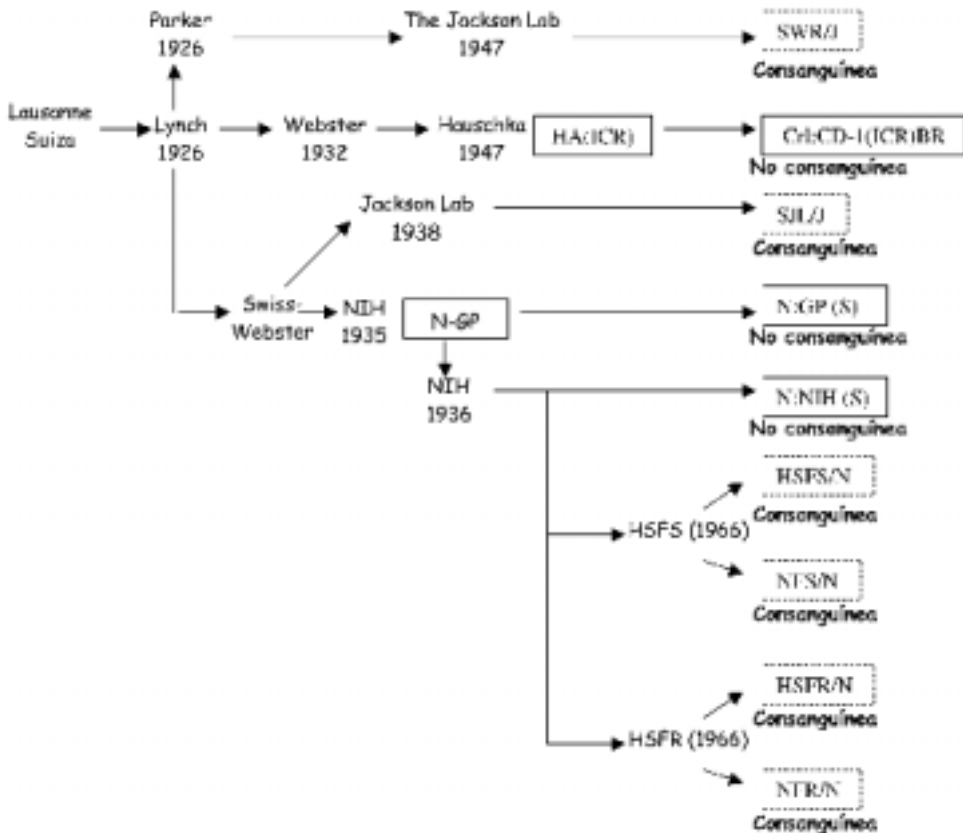


Figura 4.8. Ratones de la familia Swiss. El diagrama muestra la historia genealógica de los ratones de la familia Swiss. Se muestran los orígenes de los distintos grupos de ratones exocriados y también algunas de las líneas consanguíneas que se derivaron a partir de esos grupos. Adaptado de Rice MC, O'Brien SJ. *Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice.* Nature 283: 157, 1980.

Estos grupos de roedores son los que mejor representan la variabilidad genética de una población humana típica; rasgo que puede ser confirmado al estudiar la frecuencia génica de un grupo de genes (isoenzimas) o el porcentaje de heterocigosis de marcadores moleculares (microsatélites). Por esta característica, los grupos de ratas y ratones exocriados son muy usados en toxicología y farmacología, aunque actualmente su uso está cada vez más cuestionado, ya que se puede obtener mayor variabilidad utilizando un conjunto de líneas consanguíneas. Otra forma de generar variabilidad es produciendo híbridos F1 de líneas bien distantes (por ejemplo, unos entre ratones AKR y BALB/c y otros entre las líneas C3H y DBA) y cruzando luego estos híbridos entre sí. A este grupo de animales se los conocen como **híbridos multi-cruza** (en inglés, *multicross hybrids*); en el ejemplo dado sería un cruce de cuatro vías (*four-way cross*). El polimorfismo generado con estas cruza es muy alto y se acerca al de las poblacio-

nes humanas. Aún así, existen algunas circunstancias donde el uso de grupos no consanguíneos podría estar indicado, como sucedería en experimentos de selección (por ejemplo tamaño corporal), donde una línea consanguínea será completamente inadecuada debido a la falta de variación genética. Además, algunos roedores no consanguíneos pueden ser valiosos modelos de enfermedades humanas, como lo son las ratas Zucker para la obesidad y las ratas BB para la diabetes mellitus.

Nomenclatura de los roedores no consanguíneos

Debido a la falta de homogeneidad genética, estos grupos de animales deben ser nombrados como "grupos" (*stocks*) o "colonias" y no como líneas (o cepas). Por la misma razón, no existe una nomenclatura oficial sobre estos animales; los últimos reglamentos son de 1972 y no son aplicados con uniformidad. Actualmente existen dos tendencias: (i) utilizar nombres con 2 a 6 letras en mayúscula y aclarar en el texto que se trata de animales exocriados (ratones SENCAR, NMRI o ratas WISTAR, LONG EVANS) y (ii), usar un nombre compuesto, colocando en primer lugar el código del laboratorio y, luego de dos puntos, el nombre del grupo (puede agregarse entre paréntesis el origen). Por ejemplo, CrI:CD-1(ICR)BR es el *stock* CD-1 (de origen ICR) criado en el *Charles River Laboratories*, N:NIH (S) es un *stock* denominado NIH de origen Swiss (S) criado en el NIH (N), CrI:(LE)BR y CrI:(WI)BR son las ratas Long Evans y Wistar, respectivamente, criadas en el *Charles River Laboratories*.

La **Tabla 4.2** resume las características comunes a las líneas consanguíneas, los híbridos F1 y los grupos de roedores no consanguíneos.

Característica	Líneas consanguíneas	Híbridos F1	Animales no consanguíneos
Homocigosis	Muy alta	Baja	Baja (variable)
Isogenicidad	Alta	Alta	Baja (variable)
Estabilidad a largo plazo	Alta	Muy alta	Baja
Uniformidad	Alta	Alta	Intermedia
Individualidad	Alta	Alta	Intermedia
Vigor híbrido	bajo	Alto	Variable

Tabla 4.2. Características de las líneas genéticamente definidas. Resumen de las características comunes a las líneas consanguíneas, los híbridos F1 y los grupos no consanguíneos de roedores. Adaptado de Festing MF. *Inbred strains in biomedical research*, Macmillan Press, London: Oxford University Press, New York, 1979.

4.2 La contaminación genética y los controles de calidad

4.2.1 Generalidades

A lo largo de los últimos 30 años, se han publicado varios casos de líneas de ratas y ratones genéticamente contaminadas (no auténticas), con el correspondiente detrimento de los resultados obtenidos y las pérdidas de tiempo y dinero que acarrea. De aquí la necesidad de establecer **controles genéticos** (en inglés, *genetic monitoring*) en las colonias de animales utilizados en investigación, para que los resultados sean reproducibles y tengan validez científica. Frecuentemente, la obtención de resultados erróneos en la investigación es atribuida a distintos factores experimentales, pero muy pocas veces se repara en verificar la pureza genética de los animales utilizados.

El control genético es un conjunto de técnicas que nos permite verificar si los animales que estamos utilizando aún conservan las características genéticas originales de la línea a la cual pertenecen, o han sufrido algún cambio debido a una **contaminación genética** (por cruza accidentales). Lamentablemente, estos controles no están diseñados para detectar la presencia de mutaciones espontáneas, ya que al producirse al azar sería necesario evaluar la totalidad del genoma. El fundamento de los controles de pureza genética consiste en analizar caracteres cualitativos o cuantitativos (enzimas, marcadores inmunológicos, marcadores de ADN) y compararlos con valores de referencia establecidos internacionalmente para la línea consanguínea. En todos los casos se trata de utilizar marcadores lo suficientemente polimórficos entre líneas como para detectar cruza accidentales. Según Michael F. Festing, podemos dividir a estos controles en tres categorías: (i) **Caracterización**: es para describir el genotipo de una línea nueva, analizando el mayor número de loci posible. (ii) **Control tipo I**: se emplea sólo para confirmar el perfil genético de una línea. (iii) **Control tipo II**: se analiza un grupo mínimo de loci seleccionados especialmente para discriminar entre varias líneas.

El último tipo de control es el que debería aplicarse periódicamente en los animalarios de roedores consanguíneos. Ante la inquietud de saber cuándo se debe realizar un control de pureza genética, podemos decir que una colonia debe ser controlada genéticamente fundamentalmente en dos casos: (i) al establecer una colonia nueva y (ii) cuando se sospecha de contaminación genética. Mas allá de estos casos, un control de rutina debería estar presente en aquellas colonias con alto riesgo de contaminación, como ser aquellas que mantienen más de una línea albina simultáneamente. Con motivos didácticos, podemos agrupar las técnicas de control genético en aquellas que controlan loci individuales y las que lo hacen sobre varios loci simultáneamente. Dentro del primer grupo encontramos los marcadores bioquímicos, los marcadores inmunológicos, el análisis del color del pelaje y la tipificación de microsatélites de ADN. Dentro de las técnicas que controlan varios loci simultáneamente encontramos los injertos de piel, los estudios morfológicos, el comportamiento reproductivo y el *fingerprinting* de ADN.

4.2.2 Marcadores bioquímicos

Excepto algunas proteínas específicas como la hemoglobina con sus cadenas alfa y beta (*Hba* y *Hbb*), las transferrinas (*Trf*) y la proteína mayor urinaria (*Mup*), la mayoría de los **marcadores bioquímicos** son enzimas. Se denominan **isoenzimas** a las diferentes formas moleculares que adopta una determinada enzima y que poseen similares pero no necesariamente idénticas propiedades catalíticas, por ejemplo esterasa 1 (*Es1*), esterasa 2 (*Es2*), esterasa 3 (*Es3*), etc. Existen por lo menos 20 loci de isoenzimas utilizados en los controles genéticos, algunos de los cuales se analizan en la **Tabla 4.3**. Por otro lado, las diferencias moleculares en los distintos alelos de un mismo locus de isoenzima se denominan **aloenzimas** y se designan con las letras *a*, *b*, *c*, etc. según su comportamiento electroforético (*Es1^a*, *Es1^b*, *Es1^c*).

En nuestro caso, y asumiendo el estado isogénico de las líneas consanguíneas, cabe esperar un patrón único de aloenzimas para cada línea en particular, lo que constituye el arma fundamental de nuestro control. La electroforesis es el método de elección para determinar los productos de estos loci polimórficos y caracterizar así una línea de ratones determinada. Por

Ratón							
	<i>Es1</i>	<i>Es3</i>	<i>G6pd1</i>	<i>Gpi1</i>	<i>Idh1</i>	<i>Mod1</i>	<i>Pgm1</i>
AKR	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
BALB/c	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
CBA	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
C3H	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
C57BL/6	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
DBA/2	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>

Rata							
	<i>Ahd2</i>	<i>Es3</i>	<i>Fh1</i>	<i>Gst1</i>	<i>Lap1</i>	<i>Pep3</i>	<i>Svp1</i>
BN	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	-	<i>b</i>
F344	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
LEW	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>

Tabla 4.3. Control genético por marcadores bioquímicos. Alelos de aloenzimas y proteínas usados como marcadores bioquímicos en los controles de la pureza genética para las líneas consanguíneas de ratón y rata. Se muestran sólo algunas de las líneas más comunes. Los alelos se designan según el patrón en el gel de electroforesis como *a*, *b*, *c*, o *d*. *Es1*, esterasa 1; *Es3*, esterasa 3; *G6pd1*, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa 1; *Gpi1*, glucosa fosfato isomerasa 1; *Idh1*, isocitrato deshidrogenasa 1; *Mod1*, malato deshidrogenasa 1; *Pgm1*, fosfoglucomutasa 1; *Ahd2*, aldehído deshidrogenasa 2; *Fh1*, fumarato hidratasa 1; *Gst1*, glutatión S transferasa 1; *Lap1*, leucil aril aminopeptidasa 1; *Pep3*, peptidasa 3; *Svp1*, proteína de la vesícula seminal 1.

medio de esta técnica obtenemos información indirecta, pero precisa, sobre la constitución genética de los animales, pudiendo detectarse contaminación con la sola presencia de patrones anormales para la línea. Los principales inconvenientes de estos marcadores son que deben llevarse a cabo protocolos específicos para cada isoenzima y que requieren de grandes cantidades de tejido (con el consecuente sacrificio de los animales) y de una estricta cadena de frío. A pesar de que esto complica la aplicación rutinaria de estos marcadores, algunos criadores comerciales todavía los utilizan. Los protocolos precisos para estos controles en el ratón se encuentran en el libro de Tatsuji Nomura y colaboradores *ICLAS manual for genetic monitoring of inbred mice* (1984) y para la rata en el libro de Hans Hedrich *Genetic monitoring of inbred strains of rats* (1990).

4.2.3 Marcadores Inmunológicos

A pesar de contar con un gran número de **marcadores inmunológicos** (Tabla 4.4), los antígenos de histocompatibilidad son los más usados en controles genéticos. Estos antígenos, que intervienen en los mecanismos íntimos de la respuesta inmune y están involucrados en los procesos de rechazo de injertos, se encuentran distribuidos en cientos de loci independientes en el genoma, abarcando virtualmente todos los cromosomas. Dentro de ellos, los más descriptos han sido los pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), denominado complejo *H2* en el ratón y complejo *RT1* en la rata. Sus productos, los antígenos de histocompatibilidad de clase I (loci *H2-K*, *H2-D*, *H2-L*) y clase II (loci *H2-A*, *H2-E*), son las moléculas más polimórficas que se conocen y serán descriptas en detalle en el Capítulo V. Los **haplotipos estándar** para cada línea consanguínea de ratón han sido definidos por serología, conociéndose más de 50 haplotipos diferentes, sin contar mutantes ni ratones salvajes (ver Tablas 5.1 y 5.2 en el Capítulo V). En términos prácticos, los diferentes haplotipos se analizan por métodos serológicos (test de citotoxicidad o citometría de flujo), para lo cual es indispensable contar con los antisueros o los anticuerpos monoclonales adecuados.

	<i>Haplotipo H2</i>	<i>Cd72</i> (<i>Lyb-2</i>)	<i>Cd8a</i> (<i>Lyt-2</i>)	<i>Thy1</i>	<i>H2-T18</i> (<i>Tla</i>)	<i>Cd5</i> (<i>Lyt-1</i>)
BALB/c	<i>d</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
C3H	<i>k</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
C57BL/6	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
DBA/2	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>

Tabla 4.4. Control genético por marcadores inmunológicos. Alelos de moléculas de superficie de linfocitos usadas como marcadores inmunológicos en los controles de la pureza genética de líneas consanguíneas de ratón. Se muestran sólo algunas de las cepas más comunes. Para más detalle sobre los haplotipos *H2* referirse al Capítulo V.

El fundamento del test de citotoxicidad es la presencia de toxicidad celular mediada por los anticuerpos específicos en presencia de complemento, medida con la utilización de colorantes vitales o por la liberación de cromo radioactivo. Históricamente, el método recomendado fue el que utilizaba las placas de microcitotoxicidad de *Terasaki* con células provenientes del ganglio linfático. En la actualidad, el **citómetro de flujo** está reemplazando a las técnicas de citotoxicidad en el análisis de antígenos de los complejos *H2* y *RTI*. Trabaja cuantificando fluorescencia de los antisueros conjugados con **isotiocianato de fluoresceína (FITC)** u otras sustancias fluorescentes. Su precisión y velocidad de trabajo son óptimos, pero el costo de estos equipos es muy elevado. También se podrían realizar trabajos de tipificación de estos genes por medio de la utilización de sondas moleculares (RFLP's) o con el uso de un termociclador de PCR e iniciadores específicos (ver Capítulo I). Algunos laboratorios agregan a la lista de marcadores inmunogenéticos a los antígenos de glóbulos rojos del ratón (la serie *Ea1* a *Ea10*) (*erythrocyte antigen*) y los grupos sanguíneos *Rt2*, *Rt3* y *Rt8* de la rata.

4.2.4 Análisis del color del pelaje

La herencia del color del pelaje en roedores es sumamente compleja: en los ratones se describieron más de 60 genes que afectan la pigmentación del pelo y muchos de ellos interactúa entre sí dando un vasto número de combinaciones. No obstante, para este análisis se controlan solamente cuatro loci:

El locus *C* (cromosoma 7), denominado históricamente **locus albino**, es el gen de la **tirosinasa** (*Tyr*), enzima que realiza la oxidación de la tirosina hacia melanina, lo que determina la presencia de pigmentos. El alelo *c* es una mutación en el gen de la tirosinasa (*Tyr^c*). El alelo salvaje *C* (dominante) produce un fenotipo con color, pues permite la expresión de los loci *A* y *B* (determinantes del tipo de color). El alelo *c* (recesivo) reprime la expresión de los loci *A* y *B* dando por resultado un fenotipo albino en los animales homocigotas (*Tyr^c/Tyr^c*), debido a la ausencia de pigmentos.

El locus *D* (cromosoma 9), cuyo nombre actual es *Myo5a* (*myosin Va*), regula la distribución de los gránulos de melanina dentro de los melanocitos. El alelo salvaje *D* (dominante) produce una distribución regular de pigmentos, no afectando el fenotipo final. Se sabe que el alelo *d* (recesivo) es una mutación de este gen (*Myo5a^d*) y que produce una distribución irregular de los pigmentos dando como resultado un fenotipo con una notable dilución del color.

El locus *A* (cromosoma 2) controla la cantidad relativa y la distribución de los pigmentos amarillo (**feomelanina**) y negro/marrón (**eumelanina**). Este locus presenta dos alelos que nos interesan para los controles genéticos (aunque existen alrededor de 25 alelos diferentes reportados en la literatura): *A* (*agouti*, alelo salvaje) y *a* (*non agouti*, alelo mutado). El locus *B* (cromosoma 4), ahora llamado *Tyrp1* (*tyrosinase related protein*), presenta los alelos *B* (*black*) y *b* (*brown*). Ambos loci (*A* y *B*) se ven afectados por la regulación del locus *C*, que activa o reprime

Genes del color del pelo en el ratón

Genotipo	Color	Línea
<i>A/A; B/B; C/C; D/D</i>	Agutí	C3H y CBA
<i>a/a; B/B; C/C; D/D</i>	Negro	C57BL
<i>a/a; b/b; C/C; D/D</i>	Marrón	C57BR
<i>a/a; b/b; C/C; d/d</i>	Marrón diluido	DBA
<i>A/A; b/b; C/C; D/D</i>	Canela	NC
<i>A/A; b/b; c/c; D/D</i>	Albino	BALB/c
<i>a/a; B/B; c/c; D/D</i>	Albino	AKR

Tabla 4.5. Control genético por genes del color. El color del pelo de las líneas consanguíneas de ratón resulta de la combinación de los alelos presentes en los cuatro loci descritos en el texto. En el caso del albinismo (ratones homocigotas *Tyr^c/Tyr^c*), no importando cuales sean los alelos presentes en los otros tres loci, la ausencia de pigmentos hará que los ratones sean blancos y con

me su expresión, y por el locus *D* que determina la dilución del color. Estos loci son los responsables de la determinación del tipo de color (ver **Lámina Color**) que resulta de las interacciones detalladas en la **Tabla 4.5**.

El análisis del color consiste en la cruce de prueba de un ratón albino (de la línea que estamos controlando) con otro de color marrón diluido (línea DBA/2), para desenmascarar el genotipo oculto por el albinismo (genes **hipostáticos**). La línea DBA/2 es triple homocigota para los genes recesivos (*a/a; b/b; d/d*), lo cual nos permite analizar todas las combinaciones de alelos que se expresen en la F1 y así confrontarlo con el estándar para la línea (**Figura 4.9**). Es importante tener en cuenta que el fenotipo puede presentar variaciones con la edad, por lo que se aconseja trabajar con animales de entre dos y ocho meses. Este es un método muy económico, fácil de realizar y muy eficiente para detectar cruces accidentales recientes en una colonia de líneas albinas. Un esquema similar podría ser aplicado en ratas albinas usando la línea consanguínea ABH (*a/a; b/b; h/h*).

4.2.5 Injertos de piel

Por medio de esta técnica se pueden evaluar cientos de loci de histocompatibilidad simultáneamente en forma accesible a cualquier laboratorio, pues no requiere ni reactivos ni instrumental específico. El protocolo más recomendable consiste en transplantar recíprocamente un pequeño fragmento de piel de la cola entre dos (o más) animales y observar, durante no menos de 60 días, la evolución del injerto. También puede usarse piel proveniente de las orejas o del dorso del animal como fuente del injerto. Por el estado de isogenicidad de las líneas

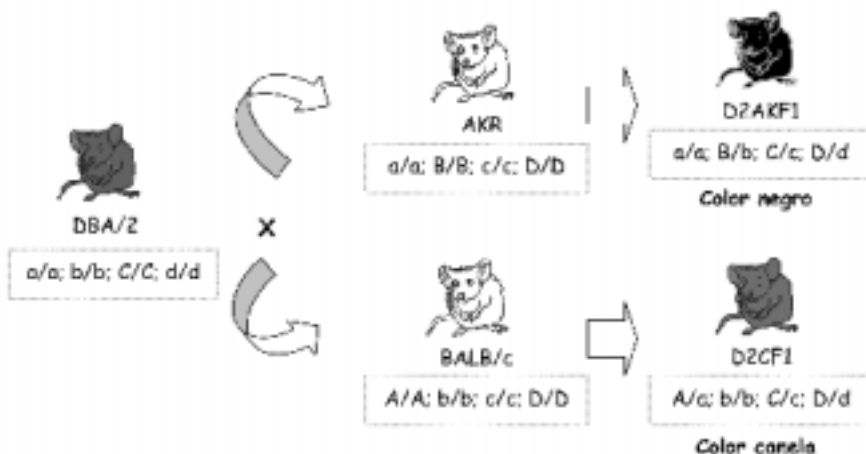


Figura 4.9. Análisis del color del pelaje. Cruzando ratones DBA/2 (color marrón diluido) con ratones albinos podemos desenmascarar los genes ocultos en estos últimos simplemente observando el color de las crías F1. En el caso de la cepa AKR, el color del híbrido F1 será negro y en el caso de BALB/c, el híbrido F1 tendrá un color canela. Este simple estudio nos permite descubrir cruces accidentales (particularmente las más recientes) en cepas albinas sin utilizar protocolos de biología molecular y con un costo mínimo.

consanguíneas, es lógico esperar la aceptación de los injertos entre individuos de una misma línea, caso contrario, la presencia de un rechazo puede atribuirse a una contaminación genética, o bien a fallas en la técnica quirúrgica (5-10% de los casos). Si existen dudas acerca del rechazo o aceptación de un injerto, es necesario repetir la prueba sobre el mismo animal: si era un caso real de incompatibilidad, el segundo injerto será rechazado más rápidamente y de una forma más evidente. Esta técnica se encuentra actualmente en desuso por ser poco confiable y por el largo tiempo que lleva su lectura. Los libros de Festing (1979) y Hedrich (1990) contienen protocolos detallados de esta técnica.

4.2.6 Caracteres morfológicos (Osteometría)

Muchas características óseas cumplen los requisitos para ser utilizadas en un control genético. Uno de los controles utilizados en el ratón fue el **test de mandíbula**, ya que permite detectar desviaciones en muchos loci simultáneamente. Podemos dividir al test en tres pasos principales. El primero consiste en la extracción de la hemi-mandíbula derecha a una muestra de animales del mismo sexo y aproximadamente del mismo peso. Luego se toman 11 (a veces 13) medidas pertenecientes a puntos anatómicos de referencia en dichas mandíbulas, utilizando para ello un pequeño tablero cuadrículado y una lupa. El último paso es el procesamiento estadístico de los datos para poder compararlos con valores de referencia y determinar si existen o no diferencias significativas que denoten desviaciones genéticas en la muestra. Esta técnica se encuentra también en desuso por ser poco precisa y por lo subjetivo de su lectura.

4.2.7 Caracteres reproductivos

Como hemos visto en el Capítulo II, el número de crías por camada es una característica propia de cada línea (ver Tabla 2.1). Su promedio es utilizado frecuentemente como un primer indicador de la pureza genética de la línea. Un importante factor de alerta de contaminación genética en la colonia será la detección de camadas que difieran ampliamente del promedio calculado para la línea. En este caso es aconsejable realizar otros controles más precisos para confirmar dicha sospecha.

4.2.8 Marcadores de ADN

Todos los marcadores que hemos descrito, para ser utilizados en controles genéticos, son rasgos fenotípicos que nos dan información indirecta del genoma de los animales. Por el contrario, los métodos de tipificación de ADN analizan directamente rasgos genotípicos. Los más utilizados en los controles de calidad genética de líneas consanguíneas son el *fingerprinting* de ADN y el análisis de microsátélites por PCR.

4.2.8.1 Fingerprinting de ADN

El ***fingerprinting* de ADN** (o “huella digital” del ADN) es el patrón único e individual de bandas obtenido de la hibridación, por la técnica de Southern blot, con sondas para regiones extremadamente polimórficas del ADN (secuencias **minisatélites**). Estas regiones hipervariables del ADN contienen secuencias cortas (entre 4 y 40 pb), repetidas en tandem, con un tamaño final para la secuencia de 5 a 10 kb. Estos minisatélites se encuentran esparcidos a lo largo del genoma de los vertebrados y muchos comparten entre sí una secuencia corta llamada *core*, formando así grupos de minisatélites con un *core* común. Cuando el ADN es digerido por enzimas de restricción y sus fragmentos posteriormente separados en un gel de agarosa e hibridados con sondas específicas para la secuencia *core*, se obtiene un patrón de bandas extremadamente variable entre individuos (excepto para los gemelos monocigóticos). La longitud de cada banda está dada por el número de repeticiones en tandem que posea el individuo en ese fragmento. Como este número es muy variable, el patrón de bandas es altamente específico para cada individuo, siendo además estable en todas las células, somáticas y germinales, y heredado en forma mendeliana. Por lo tanto, el patrón de bandas obtenido de animales consanguíneos será único e individual para la línea, dado su estado de isogenicidad (ver Figura 6.8 en el Capítulo VI). Es por ello que el *fingerprinting* de ADN ha sido utilizado en los controles de la calidad genética en la rata y el ratón, aunque su aplicación nunca fue muy extendida. Las grandes desventajas de esta técnica son que deben usarse protocolos de Southern blot y que requiere (relativamente) grandes cantidades de ADN (5 a 10 microgramos). A pesar de esto, algunos criadores comerciales utilizan el *fingerprinting* de ADN como un control complementario de la pureza genética.

4.2.8.2 Análisis de microsatélites por PCR

Se conoce como **microsatélites** o **SSLP** (*simple sequence length polymorphisms*) a las secuencias de ADN repetitivo conteniendo un motivo de repetición de 1 a 6 nucleótidos. El número de repeticiones comprende un rango de entre 15 y 40, lo que facilita la posibilidad de amplificación de estos pequeños segmentos por medio de la técnica de PCR (ver Capítulo I). Su presencia es más frecuente que la de los de minisatélites calculándose que su número podría superar los 200.000 por genoma, dando un promedio de un locus cada 30 kb. Aproximadamente el 50 % de los microsatélites descritos hasta el momento en el ratón muestra polimorfismo entre las distintas líneas consanguíneas clásicas, aunque ese porcentaje se eleva al 77% entre la línea C57BL/6 y *M. m. castaneus*, y al 90% si se trata de *M. spretus*. Muchas de estas variaciones, en el rango de 2 a 40 bp, son detectables por la observación de los productos de PCR en geles de agarosa o poliacrilamida. En un estudio que abarcó 61 líneas consanguíneas de rata y la utilización de 37 microsatélites, se pudo obtener un perfil único para cada línea, incluyendo líneas muy relacionadas como BN/M y BN/Cub-1x, o SHR/OlaHsd y SHRSP/Riv. Algunos de

Microsatélite	BALB/c	C57BL/6	DBA	C3H	AKR
D1Mit24	202	202	218	202	218
D2Mit59	120	146	134	120	146
D3Mit200	127	131	107	131	115
D4Mit32	184	148	142	184	182
D5Mit222	104	104	89	104	89
D6Mit150	140	140	150	150	150
D8Mit155	139	115	151	151	151
D9Mit179	147	147	149	149	151
D11Mit78	80	106	80	80	122
D11Mit228	124	134	114	114	120
D13Mit67	140	152	162	160	162
D13Mit185	152	146	148	152	146
D16Mit139	174	148	174	172	148
D17Mit123	137	133	155	155	155
D18Mit202	143	111	143	143	133

Tabla 4.6. Control genético por marcadores microsatélites. Selección de 15 marcadores microsatélites (SSLPs) abarcando 13 cromosomas del genoma del ratón. Esta lista es sólo un ejemplo de un grupo de microsatélites polimórficos entre las líneas AKR, BALB/c, C57BL/6, C3H y DBA/2. Como se puede ver, se trata de elegir aquellos loci que tengan productos de PCR cuyos tamaños se puedan diferenciar en geles de agarosa. Los valores representan los alelos de microsatélite en pares de base. La nomenclatura de los microsatélites es: D [número del cromosoma] [código del laboratorio] [número del marcador]. Por ejemplo, *D18Mit202* es el microsatélite asignado con el número 202 en el cromosoma 18, identificado en el *Massachusetts Institute of Technology* (MIT).

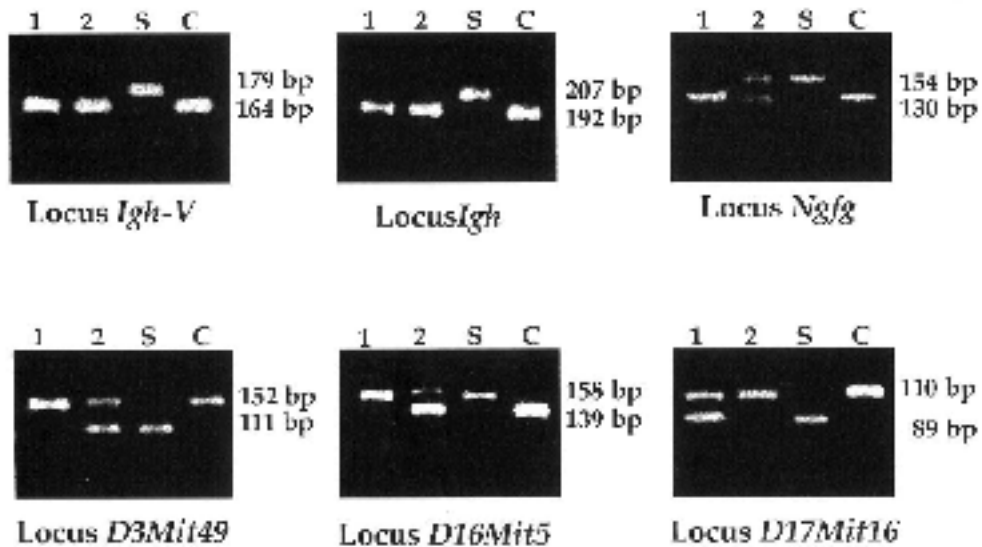


Figura 4.10. Control genético por PCR-microsatélites. Las fotografías muestran un caso de contaminación genética detectado en una colonia de ratones SJL. El control de la pureza genética se realizó por medio de 6 microsatélites (amplificados por PCR) elegidos por ser polimórficos entre SJL y BALB/c, la otra línea albina mantenida en las instalaciones. Se observan varios loci heterocigotas y otros homocigotas de origen BALB/c (alelo fijado), lo que evidencia una cruce accidental entre estas dos líneas consanguíneas. **1 y 2**, muestras de ADN analizadas, **S**, control SJL; **C**, control BALB/c. A la derecha de las fotografías se indican los tamaños estándar de los alelos para SJL y BALB/c (en pares de bases). Tomado de Benavides F. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* 38: 54-55, 1999.

estos marcadores microsatélite mostraron hasta 14 alelos diferentes en el mencionado estudio. Comparaciones entre líneas de rata de laboratorio (consanguíneas) y ratas capturadas en la naturaleza (todas pertenecientes a la especie *Rattus norvegicus*) mostraron que alrededor de 80% de los microsatélites estudiados (de 58 analizados) fueron polimórficos.

En particular, el uso de los microsatélites en controles de calidad genética presenta varias ventajas sobre las demás técnicas: (i) por ser tan polimórficos resulta más fácil la selección de un juego de microsatélites para controlar un grupo de líneas (Tabla 4.6), (ii) su gran abundancia (hay más de 8.000 disponibles para el ratón y la rata) y (iii) todos los microsatélites pueden ser analizados con el mismo protocolo y a partir de cantidades ínfimas de ADN (50 nanogramos) provenientes, por ejemplo, de unos pocos microlitros de sangre o de una punta de cola. Normalmente, se debe identificar previamente un grupo de loci (entre 8 y 10 SSLP) que nos permita diferenciar un grupo de líneas consanguíneas de interés y cuyos alelos puedan ser resueltos en geles de agarosa al 4%. En los últimos años esta técnica ha sido adoptada por la mayoría de los animalarios (bioteros) y grandes criadores comerciales de ratas y ratones como un control genético rápido, eficaz y económico (Figura 4.10). Para más detalles sobre los marcadores microsatélites ver el Capítulo VI.

4.2.8.3 Otras técnicas moleculares

En esencia, cualquier metodología que nos permita discriminar entre líneas consanguíneas puede ser empleada para un control genético. Aquellos laboratorios que realizan técnicas de PCR en forma rutinaria podrán incorporar otras variantes del control genético, más allá del análisis de marcadores microsatélites. Entre esas posibilidades se encuentran las técnicas RAPD's (*random amplified polymorphic DNA*), *LINE repeat sequence-PCR*, *Inter-SSR PCR*, análisis de SNP's, entre otras (ver Capítulo VI).

Bibliografía General

- BAILEY DW AND USAMA. *A rapid method of grafting skin on tails of mice*. *Plast. Reconstr. Transplantation Bulletin* 25: 424-425, 1960.
- BAILEY DW. *Recombinant inbred strains, an aid to finding identity, linkage, and function of histocompatibility and other genes*. *Transplantation* 11: 325-327, 1971.
- BECK JA, LLOYD S, HAFEZPARAST M, LENNON-PIERCE M, EPPIG JT, FESTING MF, FISHER EM. *Genealogies of mouse inbred strains*. *Nature Genetics* 24: 23-25, 2000.
- BENAVIDES F, PEREIRA C. *Evaluación de la calidad genética en ratones utilizados en investigaciones biomédicas*. *Revista Argentina de Microbiología* 25: 100-109, 1993.
- BENAVIDES F, CAZALLA D, PEREIRA C. *Evidence of genetic heterogeneity in a BALB/c mouse colony as determined by DNA fingerprinting*. *Laboratory Animals* 32: 80-85, 1998.
- BENAVIDES F. *Genetic Contamination in a SJL mouse colony: fast diagnostic by PCR-microsatellites markers*. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* 38: 54-55, 1999.
- BENAVIDES F, GLASSCOCK E, COGHLAN LG, STERN MC, WEISS DA, CONTI CJ. *PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SEN-CAR mouse strains*. *Laboratory Animals* 35: 157-162, 2001.
- BENAVIDES F, ZAMISCH M, FLORES M, CAMPBELL MR, ANDREW SE, ANGEL JM, LICCHESI J, STERNIK G, RICHIE ER, CONTI CJ. *Application of inter-simple sequence repeat PCR to mouse models: assessment of genetic alterations in carcinogenesis*. *Genes Chromosomes and Cancer* 35: 299-310, 2002.
- COMMITTEE ON RAT NOMENCLATURE, INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES COMMISSION ON LIFE SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Definition, Nomenclature, and Conservation of Rat Strains*. *ILAR News* 34 (4): S3-S26, 1992.
- DAVISSON MT. *Rules and guidelines for genetic nomenclature in mice*. *Mouse Genome* 92 vii-xxxii, 1994.
- DAVISSON MT. *Rules for nomenclature of inbred strains*, pp. 1532-1536. In: *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Lyon, M.F., Rastan, S., and Brown, S.D.M. (Eds.), Third Edition, Volume 2, Oxford University Press, Oxford, 1996.
- DEMANT P, HART AAM. *Recombinant congenic strains— a new tool for analyzing genetic traits determined by more than one gene*. *Immunogenetics* 24: 416-422, 1986.
- DIETRICH WF, MILLER J, STEEN R, MERCHANT MA, DAMRON-BOLES D, HUSAIN Z, DREDGE R, DALY MJ, INGALLS KA, O'CONNOR TJ, et al. *A comprehensive genetic map of the mouse genome*. *Nature* 380: 149-152, 1996.
- FESTING MF. *Inbred strains in biomedical research*. Macmillan Press, London: Oxford University Press, New York, 1979.
- FESTING MF. *Genetic contamination of laboratory animal colonies: An increasingly serious problem*. *ILAR News* 25: 6-10, 1982.
- FESTING MF. *Introduction to genetic monitoring*. *Scandinavian Journal of Laboratory Animals Science* 17: 119-125, 1990.
- FESTING MF. *International Index of Laboratory Animals, 6th edition*, 1993.

- FESTING MF. *Origins and characteristics of inbred strains of mice, 11th listing*. Mouse Genome 91: 393-550, 1993.
- FESTING MF. *Experimental approaches to the determination of genetic variability*. Toxicology Letters 120: 293-300, 2001.
- FOSTER HL, SMALL JD AND FOX JG (Eds.). *The Mouse in Biomedical Research, Vol. 1*. Academic Press, New York, 1981.
- FOX RR, WITHAM BA (Eds.). *Handbook on Genetically Standardized Jax Mice, 5th ed.* Bar Harbor: The Jackson Laboratory, 1997.
- GROEN A. *Identification and genetic monitoring of mouse inbred strains using biochemical polymorphisms*. Laboratory Animals 11: 209-214, 1977.
- GUÉNET J-L, MONTAGUTELLI X. *Genetic monitoring of inbred strains: principles and practice. Fifth Symposium of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations*. Royal Society of Medicine Press, London, 1994.
- GUÉNET JL, BONHOMME F. *Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model*. Trends in Genetics 19: 24-31, 2003.
- HEDRICH H. *Genetic monitoring of inbred strains of rats*. Stuttgart, New York. Gustav Fischer Verlag, 1990.
- IAKOUBOVA OA, OLSSON CL, DAINS KM, ROSS DA, ANDALIBI A, LAU K, CHOI J, KALCHEVA I, CUNANAN M, LOUIE J, NIMON V, MACHRUS M, BENTLEY LG, BEAUHEIM C, SILVEY S, CAVALCOLI J, LUSIS AJ, WEST DB. *Genome-tagged mice (GTM): two sets of genome-wide congenic strains*. Genomics 74: 89-104, 2001.
- INTERNATIONAL COMMITTEE OF THE INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Microbial Status and Genetic Evaluation of Mice and Rats: Proceedings of the 1999 US/Japan Conference*. National Academy Press, Washington, D.C., 2000.
- JACKSON I AND ABBOTT C (Eds.). *Mouse Genetics and Transgenics. A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, 2000.
- JEFFREYS A, WILSON V, KELLY R, TAYLOR B, GRAHAME B. *Mouse DNA fingerprints: analysis of chromosome localization and germ-line stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains*. Nucleic Acids Research 15: 2823-2837, 1987.
- JULIER C, GOUYON B DE, GEORGES M, GUÉNET J, NAKAMURA Y, AVNER P, LATHROP M. *Minisatellite linkage maps in the mouse by cross-hybridization with human probes containing tandem repeats*. Proceedings of the National Academy of Science of USA 87: 4585-4589, 1990.
- KAHAN B, AUERBACH R, ALTER B, BACH FH. *Histocompatibility and isoenzyme differences in commercially supplied BALB/c mice*. Science 217: 379-381, 1982.
- KLÖTING I, VOIGT B, KOVACS P. *Comparison of genetic variability at microsatellite loci in wild rats and inbred rat strains (Rattus norvegicus)*. Mammalian Genome 8: 589-591, 1997.
- KURTZ T, MONTANO M, CHAN L, KABRA P. *Molecular evidence of genetic heterogeneity in Wistar-Kyoto rats: Implications for research with Spontaneously Hypertensive Rat*. Hypertension 13: 188-192, 1989.
- LOVE J, KNIGHT A, MC ALEER M, TODD J. *Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analyzed microsatellites*. Nucleic Acids Research 18: 4123-4130, 1990.
- LYON M, RASTAN S AND BROWN S (Eds.). *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*. Oxford University Press, New York, 1996.
- MARKEL P, SHU P, EBELING C, CARLSON GA, NAGLE DL, SMUTKO JS, MOORE KJ. *Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains*. Nature Genetics 17: 280-284, 1997.
- MONTAGUTELLI X., GUÉNET J-L. *Genetic monitoring of inbred strains by analysis of microsatellite polymorphisms. Fifth Symposium of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations*. Royal Society of Medicine Press, London, 1994.
- MORSE III, H. *Origins of Inbred Mice*. Academic Press, New York, 1978.
- NOMURA T, ESAKI K AND TOMITA T (Eds.). *ICLAS manual for genetic monitoring of inbred mice*. University of Tokyo Press, Tokyo, 1984.
- OTSEN M, DEN BIEMAN M, WINER ES, JACOB HJ, SZPIRER J, SZPIRER C, BENDER K, VAN ZUTPHJEN LF. *Use of simple sequence length polymorphisms for genetic characterization of rat inbred strains*. Mammalian Genome 6: 595-601, 1995.
- PAIGEN K, EPPIG JT. *A mouse phenome project*. Mammalian Genome 11: 715-717, 2000.
- PENNLIN KJ, SMITH JP, BITTER-SUERMAN H. *My kingdom for an inbred rat*. Transplantation 34: 70, 1982.
- POILEY SM. *A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory animals colonies*. Proceedings of the Animal Care Panel 10: 159-166, 1960.
- POTTER M. *History of the BALB/c family*. Current Topics in Microbiology and Immunology 122: 1-5, 1985.

- REINHARD C, EDER G, FUCHS H, ZIESENIS A, HEYDER J, SCHULZ H. *Inbred strain variation in lung function*. Mammalian Genome 13: 429-437, 2002.
- RICE MC, O'BRIEN SJ. *Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice*. Nature 283: 157-161, 1980.
- SANTOS J, MONTAGUTELLI X, ACEVEDO A, LOPEZ P, VAQUERO C, FERNANDEZ M, ARNAU MR, SZATANIK M, SALIDO E, GUÉNIET JL, FERNANDEZ-PIQUERAS J. *A new locus for resistance to gamma-radiation-induced thymic lymphoma identified using inter-specific consomic and inter-specific recombinant congenic strains of mice*. Oncogene 21: 6680-6683, 2002.
- SILVER L. M. (ed.) *Mouse Genetics. Concepts and applications*. Oxford University Press, Oxford, 1995. (Versión online disponible en <http://www.informatics.jax.org/silver/>)
- SILVERS W. *The Coat Colors of Mouse*. Springer-Verlag, New York, 1979.
- SIMPSON EM, LINDER CC, SARGENT EE, DAVISSON MT, MO-BRAATEN LE, SHARP JJ. *Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice*. Nature Genetics 16: 19-27, 1997.
- VOIGT B, BERG S, KOVACS P, VOGT L, KLOTING I. *Congenit spontaneously diabetic hypertensive BB.SHR rats*. Transplant Proceedings 29: 1677-1678, 1997.
- WELSH J, PETERSEN C, MCCLELLAND M. *Polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping*. Nucleic Acids Research 19: 303-306, 1991.
- WOOD PA, HAMM DA, CARTNER SC, LINDSEY JR. *Simple sequence length polymorphism analysis of mice for genetic monitoring*. Contemporary Topics in Laboratory Animal Science 35: 60-62, 1996.