

ANEXO I

Mantenimiento de las Mutaciones en el Animalario

Con el incremento exponencial en el uso de líneas de roedores mutantes en las investigaciones biomédicas se hace fundamental contar con animales que se encuentran genéticamente definidos. Los directores de animalarios (biotérios) desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de estas mutaciones, ya sean espontáneas o provocadas por manipulación genética. Como hemos visto en los Capítulos VII, VIII y IX, existe una gran variedad de mutaciones en términos del tipo de herencia, el origen, el fenotipo, la viabilidad y la fertilidad. En cuanto a la cría de estos roedores en los animalarios, y en función del protocolo utilizado para mantenerlas, existen tres categorías. Analizaremos cada una de ellas:

1. EL CASO MÁS SIMPLE: EL MANTENIMIENTO DE UN ALELO RECESIVO, VIABLE Y FÉRTIL

Cuando una mutación recesiva (símbolo *mut*) aparece *de novo* (un caso relativamente frecuente) en una línea consanguínea, se puede establecer una línea homocigota para el nuevo genotipo y de esta manera propagar esta nueva mutación en forma paralela a la línea consanguínea original. Como hemos visto en el Capítulo IV, estas líneas se denominan **coisogénicas** y difieren de la línea original en un único locus (en virtud de la sustitución del alelo original por el alelo mutante *mut*). Siempre que sea posible, se recomienda mantener estas mutaciones cruzando animales homocigotas *mut/mut* con heterocigotas *+/mut*. Estas líneas reciben el nombre de **consanguíneas segregantes** (del inglés *segregating inbred strains*) o de **heterocigosis forzada** y ofrecen la ventaja de producir, en cada generación, un número igual de fenotipos mutantes (*mut/mut*) y normales (*+/mut*), en este caso, 50% mutantes y 50% de fenotipo normal (animales de control). Como hemos visto en el Capítulo IV, cuando una mutación recesiva es descubierta (o inducida) en un grupo de roedores no consanguíneo, es posible transferirla a una línea consanguínea por medio de retrocruzas repetidas, lo que genera una línea **congénica**.

2. UN CASO UN POCO MÁS COMPLEJO: EL MANTENIMIENTO DE MUTACIONES DOMINANTES (O LÍNEAS TRANSGÉNICAS) SIN ALTERACIONES EN LA VIABILIDAD NI LA FERTILIDAD

En el caso de las mutaciones dominantes sin alteraciones en la viabilidad ni la fertilidad, es recomendable conservar el grupo de roedores que segrega para la mutación (*Mut*) cruzando, en cada generación, un individuo heterocigota (*Mut/+*) —con fenotipo mutante— con un individuo normal (*+/+*). Una vez más, cada camada presentará aproximadamente 50% de animales

mutantes (*Mut/+*) y 50% normales (*+/+*). Se puede también cruzar animales mutantes (*Mut/+*) entre sí, pero es preciso saber que la mayoría de las mutaciones dominantes (y muchas líneas transgénicas) son letales al estado homocigota. En estas condiciones, el genotipo (*Mut/Mut*) no aparece y las camadas se encuentran reducidas en número.

La principal ventaja de mantener una mutación dominante es que podemos ver el fenotipo en cada generación, aunque en la práctica es factible que una línea mutante se pierda debido a la baja fertilidad o viabilidad de los heterocigotas *Mut/+*. Por lo tanto, es indispensable mantener estas líneas usando varios planteles reproductores del tipo *Mut/+* × *+/+* y renovarlos frecuentemente. La baja expresividad o penetrancia de las mutaciones (ver Capítulo VII) pueden ser también la causa de que una línea se pierda, debido a que es difícil ver la diferencia entre los animales mutantes y los de fenotipo salvaje.

Las mutaciones semi-dominantes, cuyo fenotipo heterocigota es intermedio con respecto a los fenotipos homocigotas de cada tipo (*+/+* y *Mut/Mut*), son muy raras entre los mamíferos y son mantenidas de la misma forma que las dominantes. Al igual que lo visto para las mutaciones recesivas, se pueden crear líneas congénicas a partir de mutaciones dominantes, con la ventaja de no tener que realizar intercruzas para diferenciar los animales heterocigotas, ya que los individuos *Mut/+* expresan el fenotipo mutante.

El protocolo de mantenimiento de las líneas transgénicas (*Tg*) presenta muchas analogías con el protocolo que acabamos de describir para las mutaciones dominantes. En ciertos casos, el animal **hemicigota** (*Tg/+*) posee un fenotipo fácil de identificar, como sucede con las mutaciones dominantes. En otros casos, el animal transgénico (*Tg/+*) no tiene un fenotipo perceptible y es necesario recurrir a técnicas moleculares, especialmente PCR y Southern blot (descriptas en el Capítulo I).

Siempre que sea posible, es recomendable colocar el transgén en estado de homocigosis (*Tg/Tg*), ya que de esta manera se economiza espacio y se evita el corte de cola (para obtención de ADN) y el genotipado por PCR. La probabilidad de obtener un macho y una hembra *Tg/Tg* a partir de una cruce *Tg/+* × *Tg/+* es, *a priori*, de 1/16 (1/4 para que el macho sea *Tg/Tg* y 1/4 para que la hembra sea *Tg/Tg*). Esto no siempre es posible debido a dos razones. Primero, alrededor del 10% de los transgenes son letales al estado homocigota (mutación recesiva letal). Segundo, durante el genotipado del ADN por PCR es muy difícil distinguir los animales *Tg/+* de los individuos *Tg/Tg*. La técnica de Southern blot es una mejor opción porque permite evaluar el número de copias del transgén. De todas formas, el único método confiable es hacer una **cruza de prueba** (del inglés *progeny test*), donde podremos observar que los animales *Tg/Tg*, contrariamente a los *Tg/+*, nunca generan individuos de genotipo *+/+*, al ser cruzados con animales normales. Si el transgén es viable al estado homocigota, lo mejor será localizar –lo más rápido posible– estos machos *Tg/Tg*, lo que permitiría suprimir los genotipados por PCR de su descendencia, ya que el 100% de las crías resultantes de un cruce con hembras salvajes (*+/+*) será *Tg/+*.

3. EL CASO MÁS COMPLEJO: EL MANTENIMIENTO DE UN ALELO RECESIVO LETAL O QUE PROVOQUE ESTERILIDAD (O BAJA FERTILIDAD) AL ESTADO HOMOCIGOTA

Algunos ejemplos de mutaciones no viables son las mutaciones neurológicas *reeler* (*Reln^{rl}*) y *staggerer* (*Rora^{sg}*), la mutación muscular *dystrophia muscularis* (*Lama2^{dy}*) y la mutación *Hertwig's anemia* (*an*); donde todos los ratones homocigotas mueren antes del destete. Las mutaciones metabólicas como *obese* (*Lep^{ob}*) y diabetes (*Lepr^{db}*) son ejemplos de mutaciones viables pero con problemas de fertilidad en ambos sexos. Algunas mutaciones neurológicas como *jerker* (*Espr^{je}*) y *pirouette* (*pi*) son viables y fértiles, pero las hembras son incapaces de atender sus crías. En estos caso, es necesario intervenir modificando el sistema de reproducción o el ambiente, con el fin de salvaguardar el alelo en cuestión.

Situaciones similares a las descritas pueden presentarse con diversas mutaciones dirigidas. En la mayoría de los casos, los **alelos nulos** generados por ingeniería genética (**ratones KO**) se comportan como alelos recesivos. Estas mutaciones dirigidas suelen presentar fenotipos evidentes, aunque muchas veces este fenotipo es tan severo que produce muerte embrionaria. Cuando no existen diferencias fenotípicas entre los animales heterocigotas nulos (+/-) y homocigotas salvajes (+/+), es muy importante realizar genotipados de ADN para asegurarse de que no se pierda la mutación. Normalmente, esto no es un problema para los directores de animalario ya que se suele trabajar en colaboración con el laboratorio que diseñó la mutación. En la minoría de los casos (por ejemplo el KO de la **vimentina**) los ratones homocigotas no evidencian ningún fenotipo. Es aquí donde se hace esencial una estrategia molecular de seguimiento del alelo nulo (PCR y Southern blot), ya que no podemos contar con un fenotipo para su identificación.

A continuación veremos las distintas estrategias que se pueden seguir con el fin de salvaguardar el alelo mutante.

3.1 Modificaciones del ambiente

Las modificaciones del ambiente pueden permitir la supervivencia de ciertos fenotipos mutantes en diversos aspectos:

3.1.1 Modificación de la alimentación

Las modificaciones que podemos introducir en el régimen alimentario son muchas y dependen del conocimiento que se tenga de las malformaciones anatómicas o de los disturbios metabólicos (o fisiológicos) de la mutación en cuestión. Uno ejemplo clásico es la restricción cualitativa (de azúcares y grasas) o cuantitativa de las raciones de mutantes con propensión a la obesidad, como los ratones *obese* y las ratas *fatty* (*fa*) (ver Capítulo IX). Otro ejemplo es el

uso de dietas granuladas o gelatinas nutritivas para aquellas mutaciones con defectos en la dentición, como los ratones **downless** (*Edar^{dl}*). Un último ejemplo lo constituyen las mutaciones con defectos neurológicos o musculares, las cuales muchas veces mueren de hambre por la incapacidad de obtener el alimento del comedero o tomar agua de los biberones. En estos casos se recomienda dejarlos en forma individual con una madre sustituta (las primeras cuatro semanas de vida) y suministrarles comidas blandas (con alto tenor de energía) y botella de agua de fácil acceso.

3.1.2 Modificación del nido

Las hembras desprovistas de pelo [ratones **nude** (*Foxn1^{nu}*) y **hairless** (*hr*); ratas **Rowett nude** (*rnu*)], o con pelo ralo [ratones **Ragged** (*Ra*), **fuzzy** (*fz*) y **nackt** (*Cts^{hkt}*)] son muchas veces incapaces de asegurar la protección térmica necesaria a sus crías. Para garantizar la sobrevivencia de las crías se puede agregar algodón u otras sustancias de origen comercial (en inglés, **nestlets**) para que las madres puedan construir un nido apropiado. También se recomienda el uso de iglúes o tubos de PVC para su uso como refugio y construcción de nidos (enriquecimiento del medio ambiente). Estos aditivos funcionan muy bien en las hembras que “valsean” (como **jerker**) y en muchas líneas derivadas de ratones salvajes, como MBT/Pas, MAI/Pas, CAST/Ei etc. En estos últimos, se recomienda además colocar las jaulas en cuartos muy tranquilos, en los estantes más oscuros y no perturbar a las hembras (por ejemplo, no cambiar las camas durante las primeras dos semanas después del parto).

3.1.3 Administración de terapéuticos

Algunos ejemplos de administración de drogas terapéuticas son el uso del ácido amino-oxia-cético en los mutantes **spastic** (*Glr^{spa}/Glr^{spa}*), lo que les permite vivir normalmente e incluso reproducirse, y el uso de hormonas de crecimiento en los ratones **dwarf** (*Pit1^{dw}/Pit1^{dw}*) y **little** (*Ghrhr^{lit}/Ghrhr^{lit}*), lo que corrige el defecto en el crecimiento.

3.1.4 Modificación de la flora microbiana

El desarrollo de los animales libres de gérmenes (axénicos o **germ free**) y de los animalarios con barrera o libres de patógenos específicos (del inglés **SPF**), ha permitido la cría de cientos de mutaciones espontáneas, ratones transgénicos y KO inmunodeficientes. Los mismos no podrían sobrevivir en animalarios con infecciones endémicas de patógenos como el virus de la hepatitis murina (MHV) o *Myoplasma pulmonis*. Un ejemplo son las mutaciones espontáneas **nude** (*Foxn1^{nu}*), **scid** (*Prkdc^{scid}*), **xid** (*Btk^{xid}*), **nackt** (*Cts^{hkt}*) y **beige** (*Lyst^{bg}*), y los ratones KO para distintas moléculas implicadas en el desarrollo o funcionamiento del sistema inmune, como **Cd4**, **Cd8**, **Rag1**, **Rag2** etc.

3.1.5 Adopción (madres sustitutas)

En todos los casos donde el amamantamiento de las crías corra riesgo de ser perturbado, la opción más simple es tener a mano un grupo de madres sustitutas. Las mismas deben haber parido cerca de la misma fecha que los mutantes que queremos salvaguardar. Es conveniente mezclar los ratones a ser adoptados con los propios para que la madre no los perciba como extraños y los amamante, tomando la precaución de marcarlos previamente o usar colores de pelaje distintivos.

3.2 Modificaciones genéticas del sistema de cruzamientos

3.2.1 Acoplamiento de heterocigotas

En muchas mutaciones recesivas, los animales homocigotas son incapaces de reproducirse, inclusive utilizando los medios descritos anteriormente. En estos casos se puede mantener el alelo mutante cruzando animales heterocigotas, de cuyas crías se espera alrededor de un 25% de mutantes homocigotas. Dentro de las crías nacidas de estos cruces encontraremos alrededor del 75% de animales de aspecto normal; los mismos serán una mezcla de animales $+/+$ y $+/mut?$, por lo que se los suele identificar como $+/mut?$. La mutación **nude** es un ejemplo de una mutación que podemos mantener con este esquema, ya que los homocigotas **nu/nu** tienen dificultades de reproducción (en particular las hembras); aunque en la práctica muchos realizan cruces del tipo macho **nu/nu** x hembra **+/nu**.

En el momento de renovar los planteles heterocigotas se plantea el desafío de poder identificar nuevos heterocigotas dentro del grupo de animales de fenotipo normal ($+/mut?$). La única manera práctica de encontrar heterocigotas (sin realizar genotipado molecular) es realizando cruzamientos de prueba (con tríos de un macho y dos hembras o rotando el macho con varias hembras). Es importante evaluar más de una camada antes de eliminar los planteles ya que cada recién nacido tiene $1/4$ de probabilidad de ser **mut/mut**. Para dos recién nacidos, la probabilidad de que ambos sean **mut/mut** es $1/4 \times 1/4 = 1/16$. En la práctica, la probabilidad de no hallar un mutante (**mut/mut**) entre 12 crías de una pareja de animales heterocigotas (si el gen en cuestión tiene 100% de penetrancia y no es letal durante el desarrollo embrionario) es prácticamente nula. Si la penetrancia (P) del alelo en cuestión es inferior a 100%, en el mismo ejemplo es necesario realizar el cálculo $12 \times 1/P$.

Por ejemplo, el alelo **eyeless 1** (**Rax^{ey1}**) tiene una penetrancia del 60% ($P = 0,6$); en una cruce $+/ey \times +/ey$, la posibilidad de no observar animales **ey1/ey1** será casi nula luego de 20 crías ($12 \times 1/0,6 = 20$). Por otro lado, la observación de un solo animal con fenotipo mutante (homocigota) es suficiente para confirmar el genotipo de los padres. La probabilidad de que estos planteles realizados a ciegas ($+/mut? \times +/mut?$) sean adecuados (ambos heterocigotas) es de $4/9$; mientras que la probabilidad de que no lo sean (uno o ambos $+/+$) es de $5/9$. De esta forma, la probabilidad de que nos encontremos con una pareja conveniente (ambos he-

terocigotas) es de $p = 1 - (5/9)^n$, donde n es el número de parejas establecidas. Si acoplamos seis hembras con seis machos (hermanos provenientes de padres $+/\text{mut}$), la probabilidad de formar una pareja $+/\text{mut} \times +/\text{mut}$ es casi del 100% ($p = 0,97$). En la práctica, es suficiente con mantener dos jaulas con parejas de genotipo certificado ($+/\text{mut}$), cuatro jaulas conteniendo parejas a genotipar ($+/\text{mut}?$), dos jaulas con machos $+/\text{mut}?$ y dos jaulas con hembras $+/\text{mut}?$.

3.2.2 Establecimiento de mutaciones balanceadas

Cuando es posible realizarla, esta elegante estrategia de mantenimiento de mutaciones recesivas es de una gran eficacia. Lamentablemente, esta estrategia puede ser aplicada sólo en aquellos casos donde se encuentra una mutación (de fenotipo fácilmente identificable) en el mismo cromosoma (ligadas genéticamente) de la mutación que se quiere mantener. Un buen ejemplo es el mantenimiento de la mutación recesiva *progressive motor neuronopathy* ($Tbce^{pnn}$), en la cual los ratones homocigotas mueren a las tres semanas de vida. Por trabajos de mapeo, se localizó esta mutación muy cerca ($< 0,2$ cM) de la mutación dominante *Extra toes* ($Gli3^{Xt}$) en el cromosoma 13. Esta localización ha permitido aumentar la eficiencia de los programas de cría de mutantes pnn/pnn utilizando al dedo extra en las patas de los ratones $+/\text{Xt}$ como marcador fenotípico de fácil identificación.

La estrategia consiste en mantener un grupo de ratones doble heterocigotas (estos animales tienen un dedo extra por tener un genotipo $\text{Xt} +/+ pnn$) con la mutación Xt en repulsión, es decir sobre el cromosoma que no porta el alelo mutante pnn . Por ejemplo: el cromosoma materno lleva el alelo mutante Xt y, muy cerca, presenta el alelo salvaje (+) de pnn , mientras que el cromosoma paterno lleva el alelo salvaje (+) de Xt y, al lado, el alelo mutante pnn . De esta forma, las gametas producidas por estos animales (siempre que las mutaciones no recombinen) serán solo de dos tipos: $\text{Xt} +$ o $+ pnn$, lo que resultará en crías con tres genotipos posibles: $\text{Xt} +/+ pnn$; $\text{Xt} +/\text{Xt} +$ y $+ pnn/+ pnn$. Haciendo uso de esta ayuda, lo que se hace para mantener la mutación pnn es cruzar ratones dobles heterocigotas $\text{Xt} +/+ pnn$ (dedo suplementario) y seleccionar las crías. Los animales $\text{Xt} +/\text{Xt} +$, que no portan más el alelo pnn , mueren *in utero*; los ratones de genotipo $\text{Xt} +/+ pnn$ presentan un dedo extra; mientras que los homocigotas $+ pnn/+ pnn$ tienen un número de dedos normales y pueden ser reconocidos desde recién nacidos, antes de que enfermen.

Otros ejemplos de mutaciones balanceadas son las mutaciones *Trembler* ($Pmp22^{Tr}$) y *nude* en el cromosoma 11 (se cruzan animales $Tr +/ + nu$); las mutaciones *mahoganoid* (md) y *severe combined immunodeficiency* ($Prkdc^{scid}$) en el cromosoma 16 (cruzas $md +/ + scid$); y las mutaciones *misty* (m) y *diabetes* (Lep^{db}) en el cromosoma 4 (cruzas $m +/ + db$).

3.2.3 Uso de marcadores moleculares

La existencia de miles de marcadores moleculares (en particular los microsatélites y los SNP's) cubriendo la totalidad del genoma del ratón y la rata agrega una nueva estrategia para mantener mutaciones de difícil manejo. Volviendo al ejemplo del ratón *scid* (ver Capítulo IX), si partimos de una cruce BALB/c-*scid/scid* × C57BL/6J, el 100% de los animales F1 será *+/scid*, hasta aquí no necesitamos de técnicas moleculares. Si entrecruzamos estos ratones F1 para obtener animales F2, alrededor del 25% de los ratones serán de genotipo *scid/scid*. Estos animales homocigotas, más allá de su inmunodeficiencia, poseen un fenotipo normal, por lo que necesitamos hacer un genotipado con marcadores que se encuentren bien cerca (preferentemente menos de 1 cM) del locus *scid* en el cromosoma 16 y que, además, sean polimórficos entre BALB/c y C57BL/6J. Tomemos como ejemplo el marcador microsatélite D16Mit73 (ubicado a 0,5 cM de distancia del locus *scid*), donde el alelo BALB/c es de 153 bp y el alelo C57BL/6J tiene 147 bp. Debido al hecho de que el segmento del cromosoma 16 donde se encuentra “embebido” el locus *scid* es de origen BALB/c, los ratones *scid/scid* serán homocigotas BALB/c para este marcador molecular, es decir veremos una sola banda en el gel, del tamaño reportado para BALB/c (153 bp). De la misma forma, en el caso de querer distinguir heterocigotas (*+/scid*) de homocigotas salvajes (*+/+*), el mismo genotipado por PCR nos dará la respuesta: los ratones *+/scid* serán forzosamente genotipo 153 bp/147 bp (dos bandas) y los (*+/+*) serán 147 bp/ 147 bp (una banda). Esto se debe a que, según el esquema de cruces utilizado, el alelo + proviene siempre de C57BL/6J y el alelo mutante *scid* de BALB/c.

3.3 Reproducción asistida

En el Capítulo II hemos descripto las principales técnicas de reproducción asistida que existen disponibles en la actualidad para el ratón y la rata de laboratorio. Estas técnicas son esenciales a la hora de preservar alelos mutantes y evitar la pérdida de líneas transgénicas. Las más importantes son el trasplante de ovarios, la fertilización in vitro y, en el futuro, el método ICSI.

4. TRANSFERENCIA DE UN ALELO DE UNA LÍNEA CONSANGUÍNEA A OTRA (ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CONGÉNICAS)

Esta estrategia ya fue vista en detalle en el Capítulo IV, incluida la nueva metodología asistida por marcadores moleculares (llamada en inglés *speed congenics*), con la cual se aceleran considerablemente los tiempos de realización de estas líneas.