

MANUAL DE GENÉTICA DE ROEDORES DE LABORATORIO

Principios básicos y aplicaciones

Fernando J. Benavides y Jean-Louis Guénet

Fernando J. Benavides

The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Science Park-Research Division, Park Road 1C,
P.O. Box 389, Smithville, Texas 78957, Estados Unidos.

Tel: (512) 237-9343

Fax: (512) 237-2444

E-Mail: fbenavides@sprdl.mdacc.tmc.edu

Jean-Louis Guénet

Unité de Génétique des Mammifères, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux
F-75724 Paris, Cedex 15, Francia.

Tel: 33 (0)1 45 68 85 55

Fax: 33 (0)1 45 68 86 34

E-Mail: guenet@pasteur.fr

Presentación

Es un placer para mi presentar en nombre de la Universidad de Alcalá, *Laboratory Animals Ltd.* y la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL) el primer libro en Español sobre la genética de los roedores de laboratorio.

Cuando hace unos meses se nos planteó la posibilidad de publicar un libro sobre genética de roedores, nos dimos cuenta de la carencia en todo el planeta de publicaciones en Español que pudieran servir tanto de consulta como de texto. Por ello nos pusimos a trabajar y a coordinar los recursos de las tres instituciones para llevar a buen fin la obra que ahora tienen en sus manos.

Escrita por los veterinarios Fernando Benavides y Jean Louis Guénet cubre aspectos de la genética clásica y molecular, haciendo especial hincapié en el ratón y la rata.

El tratamiento actualizado de los temas recogidos en el texto, desde los más básicos hasta los más novedosos, permite asegurar que se trata, tanto de una herramienta útil como libro de texto para la formación de estudiantes y personal técnico, como un libro de consulta para los profesionales relacionados con la genética de animales de laboratorio.

El Dr. Jean Louis Guénet es jefe de la *Unité de Génétique des Mammifères* del Instituto Pasteur de París (Francia). Reconocida autoridad mundial en la genética del ratón, tiene en su haber más de 300 publicaciones relacionadas con dicha materia. Fernando Benavides, discípulo aventajado suyo, realizó con él su tesis doctoral en genética. Se encuentra actualmente trabajando en el área de la genética del ratón en *The University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center* de los Estados Unidos de América del Norte.

En mi calidad de coordinador de la publicación y de miembro de las tres instituciones implicadas, quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad de Alcalá, a *Laboratory Animals Ltd.* y a la SECAL por haber hecho posible la edición de esta obra.

José María ORELLANA MURIANA
Universidad de Alcalá
Laboratory Animals Ltd.
SECAL

Índice General

PRÓLOGO	13
---------------	----

CAPÍTULO I EL GENOMA DE LOS MAMÍFEROS

I.1 EL GENOMA: ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN	15
I.1.1 Los ácidos nucleicos	15
I.1.1.1 Estructura del ADN	15
I.1.1.2 La replicación del ADN	17
I.1.1.3 La organización del ADN en cromosomas	17
I.1.1.4 El código genético	19
I.1.1.5 Estructura del ARN	20
I.1.2 El ADN genómico es heterogéneo: secuencias codificantes versus no codificantes	21
I.1.2.1 Secuencias codificantes: ¿Qué es un gen?	21
I.1.2.2 Secuencias no codificantes	23
I.1.3 La talla del genoma: estimando el número total de genes	25
I.2 EXPRESIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA: ¿CÓMO FUNCIONAN LOS GENES?	25
I.2.1 La transcripción y la traducción del ADN	25
I.2.2 La regulación de la actividad de los genes	27
I.2.2.1 Regulación a nivel del ADN	30
I.2.2.2 Regulación a nivel de la transcripción	31
I.2.2.3 Regulación postranscripcional	33
I.2.2.4 Los genes de globinas: modelo de regulación de genes en mamíferos	33
I.3 EL ANÁLISIS DEL ADN AL NIVEL MOLECULAR	35
I.3.1 Las herramientas utilizadas en biología molecular	35
I.3.1.1 Enzimas de restricción	35
I.3.1.2 Las técnicas de hibridación (Southern blot)	36
I.3.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa de ADN	36
I.3.1.4 Técnicas DGGE y SSCP: detección de mutaciones	38
I.3.1.5 Los chips de ADN	41
I.3.2 Clonado de ADN y construcción de bibliotecas genómicas	42
I.3.3 La secuenciación del genoma	45
I.3.3.1 Las técnicas de secuenciación	45
I.3.3.2 Las estrategias de secuenciación de genomas	48

I.4 ELEMENTOS DE CITOGENÉTICA	49
1.4.1 El cariotipo normal en los roedores de laboratorio	49
1.4.2 Las anomalías en el número de cromosomas (Heteroploidías)	54
1.4.2.1 Las heteroploidías euploides	54
1.4.2.2 Las heteroploidías aneuploides	54
1.4.3 Las anomalías en la estructura de los cromosomas	55
1.4.3.1 Rearreglos estructurales resultantes de rotura única	55
1.4.3.2 Rearreglos estructurales resultantes de dos roturas	55
1.4.3.3 Rearreglos estructurales complejos	57
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	57

CAPÍTULO II

BIOLOGÍA Y MANEJO REPRODUCTIVO DEL RATÓN

2.1 BIOLOGÍA DEL RATÓN	59
2.1.1 Hábitat	59
2.1.2 Comportamiento	59
2.1.3 Reproducción	60
2.1.3.1 Maduración sexual y ciclo estral	60
2.1.3.2 Comportamiento sexual en las poblaciones salvajes	61
2.1.3.3 Apareamiento, preñez y amamantamiento	61
2.2 MANEJO REPRODUCTIVO DEL RATÓN EN EL ANIMALARIO	66
2.2.1 Generalidades	66
2.2.2 Sistemas de cría	68
2.2.3 Sistemas de reproducción asistida	70
2.2.3.1 Inseminación artificial (IA)	70
2.2.3.2 Transplante de ovarios	70
2.2.3.3 Fertilización in vitro (FIV)	71
2.2.3.4 Método ICSI	72
2.2.4 Rederivación de embriones y recién nacidos	73
2.3 CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES Y GAMETOS	73
2.3.1 Principios de criobiología	73
2.3.2 Congelación de embriones	75
2.3.3 Congelación de gametos y gónadas	76
2.3.3.1 Congelación de esperma	76
2.3.3.2 Congelación de oocitos y tejidos ováricos	78
2.3.4 Bancos de embriones y gametos congelados	79
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	81

CAPÍTULO III

SISTEMÁTICA DE LOS RATONES UTILIZADOS EN EL LABORATORIO

3.1 SISTEMÁTICA DEL RATÓN	85
3.1.1 Origen filogenético de los roedores	85
3.1.2 Sistemática del género <i>Mus</i>	86
3.1.3 El ratón como animal de laboratorio	90
3.1.4 Origen de las líneas de ratones de laboratorio	91
3.1.5 Las líneas de ratones de origen salvaje	94
3.2 SISTEMÁTICA DE LA RATA	95
3.3 SISTEMÁTICA DEL HÁMSTER	97
3.4 SISTEMÁTICA DEL COBAYO	99
3.5 SISTEMÁTICA DEL JERBO	100
3.6 OTROS ROEDORES UTILIZADOS COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	101
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	103

CAPÍTULO IV

LAS LÍNEAS GENÉTICAMENTE ESTANDARIZADAS Y LOS CONTROLES DE LA PUREZA GENÉTICA

4.1 LÍNEAS GENÉTICAMENTE ESTANDARIZADAS	105
4.1.1 Introducción	105
4.1.2 Líneas consanguíneas (inbred strains)	105
4.1.2.1 Características de las líneas consanguíneas	107
4.1.2.2 Las líneas consanguíneas estándar	109
4.1.2.3 Las líneas consanguíneas salvajes	110
4.1.2.4 La divergencia genética y la existencia de sublíneas	110
4.1.2.5 Mantenimiento de las líneas consanguíneas	113
4.1.3 Híbridos F1 (hybrid F1 mice)	114
4.1.4 Líneas congénicas y coisogénicas (congenic strains)	115
Nomenclatura de las líneas coisogénicas y congénicas	119
4.1.5 Líneas consanguíneas recombinantes (recombinant inbred strains -RIS) ...	119
Nomenclatura de las líneas consanguíneas recombinantes	120
4.1.6 Líneas congénicas recombinantes (recombinant congenic strains -RCS) ...	120
Nomenclatura de las líneas congénicas recombinantes	121
4.1.7 Líneas consómicas (consomic strains)	121
4.1.8 Líneas conplásticas (conplastic strains)	121
4.1.9 Los roedores no consanguíneos (outbred stocks)	122
Nomenclatura de los roedores no consanguíneos	124

4.2 LA CONTAMINACIÓN GENÉTICA Y LOS CONTROLES DE CALIDAD . . .	125
4.2.1 Generalidades	125
4.2.2 Marcadores bioquímicos	126
4.2.3 Marcadores Inmunológicos	127
4.2.4 Análisis del color del pelaje	128
4.2.5 Injertos de piel	129
4.2.6 Caracteres morfológicos (Osteometría)	130
4.2.7 Caracteres reproductivos	131
4.2.8 Marcadores de ADN	131
4.2.8.1 Fingerprinting de ADN	131
4.2.8.2 Análisis de microsatélites por PCR	132
4.2.8.3 Otras técnicas moleculares	134
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	134

CAPÍTULO V

GENÉTICA DE LA HISTOCOMPATIBILIDAD

5.1 FUNDAMENTOS GENÉTICOS DE LA COMPATIBILIDAD TISULAR	137
5.1.1 Clasificación de los trasplantes	137
5.1.2 Las leyes que gobiernan la aceptación o el rechazo de los trasplantes . . .	138
5.1.3 Biología de los trasplantes	139
5.2 LA IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE HISTOCOMPATIBILIDAD	141
5.3 EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH)	144
5.3.1 El CMH en el ratón: H2	145
5.3.2 El polimorfismo del CMH	147
5.3.3 Origen y evolución del CMH	148
5.3.4 El CMH en los roedores de laboratorio	149
5.3.5 El CMH y la elección de pareja reproductiva.	150
5.3.6 Asociación entre haplotipos del CMH y enfermedad	151
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	152

CAPÍTULO VI

LOS MAPAS GENÉTICOS

6.1 INTRODUCCIÓN	155
6.2 TIPOS DE MAPA DEL GENOMA	156

6.2.1	Mapas de Ligamiento	156
6.2.2	Mapas Cromosómicos	160
6.2.2.1	Hibridación In Situ	161
6.2.2.2	Híbridos de Células Somáticas	161
6.2.2.3	Híbridos de Radiación (HR)	162
6.2.3	Mapas Físicos	164
6.2.4	Secuenciando Genomas	166
6.2.5	Mapas de Transcripción	169
6.2.6	Integración de Mapas (Mapas Consenso)	171
6.2.7	Programas de Mapeo a Gran Escala	171
6.2.8	Mapeos Comparativos	172
6.2.9	Localización de rasgos cuantitativos (Quantitative Trait Loci)	173
6.3	MARCADORES UTILIZADOS EN LA CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE LIGAMIENTO	
	DE LIGAMIENTO	175
6.3.1	Marcadores Fenotípicos	175
6.3.2	Marcadores Proteicos	176
6.3.3	Marcadores de ADN	176
6.3.3.1	RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphisms)	176
6.3.3.2	Minisatélites	177
6.3.3.3	Microsatélites	179
6.3.3.4	RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA)	181
6.3.3.5	SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms)	181
6.4	CRUZAS PARA ANÁLISIS DE LIGAMIENTO	183
6.4.1	Retrocruzas	183
6.4.2	Intercruzas	184
6.4.3	Líneas Consanguíneas Recombinantes	186
6.4.4	Líneas Congénicas Recombinantes	188
6.4.5	Cruzas inter-específicas (la contribución de los ratones salvajes)	188
6.4.5.1	Los ratones salvajes como fuente de polimorfismo genético	189
6.4.5.2	El valor de los ratones salvajes para el clonaje posicional de genes	191
6.5	APLICACIONES DE LOS MAPAS GENÉTICOS	191
6.5.1	Identificación de Genotipos Específicos	192
6.5.2	Estudios de Evolución del Genoma	192
6.5.3	Establecimiento de Homologías Cromosómicas entre Especies	193
6.5.4	Clonaje Posicional de Mutaciones	194
	BIBLIOGRAFÍA GENERAL	195

CAPÍTULO VII LAS MUTACIONES

7.1. UN GENOMA CAMBIANTE	201
7.2. LOS DIFERENTES TIPOS DE MUTACIONES	202
7.2.1 Mutaciones tradicionales versus mutaciones dirigidas	202
7.2.2 Mutaciones puntuales y cromosómicas	204
7.2.2.1 Sustituciones	204
7.2.2.2 Deleciones e inserciones	206
7.3. LAS MUTACIONES ESPONTÁNEAS	207
7.3.1 Frecuencia de las mutaciones espontáneas	207
7.3.2 Identificación de las mutaciones en los animalarios	208
Determinación de la base genética de un fenotipo mutante	208
7.3.3 El vacío fenotípico (Phenotype Gap)	212
7.4. LOS AGENTES MUTÁGENOS	213
7.4.1 Las radiaciones	213
7.4.2 Los agentes químicos	215
Mutagénesis por N-etil N-nitrosourea (ENU)	216
7.5. MUTAGÉNESIS POR INSERCIÓN	220
7.6. MUTAGÉNESIS POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	221
7.7. MUTAGÉNESIS POR “TRAMPA DE GENES” (GENE-TRAP MUTAGENESIS)	222
7.8. LA INFLUENCIA DEL FONDO GENÉTICO SOBRE EL FENOTIPO MUTANTE	224
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	225

CAPÍTULO VIII LA TRANSGÉNESIS Y LA CLONACIÓN EN LOS ROEDORES DE LABORATORIO

8.1 LA MANIPULACIÓN DE LOS EMBRIONES	227
8.1.1 Perspectiva histórica	227
8.1.2 Consideraciones generales	228
8.1.2.1 Obtención de embriones y superovulación	228
8.1.2.2 Transferencia de embriones	229
8.1.2.3 Inducción de pseudopreñez	230

8.2 TRANSGÉNICOS GENERADOS POR INYECCIÓN DE ADN EN EL PRONÚCLEO	231
8.2.1 Técnica clásica de microinyección de ADN	231
8.2.1.1 La microinyección	233
8.2.1.2 Desarrollo de líneas transgénicas	235
8.2.1.3 Nomenclatura de los loci y las líneas transgénicas	237
8.2.2 Creación de ratones transgénicos a partir de BACs y YACs	239
8.3 OTRAS TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS ..	240
8.3.1 Infección por retrovirus	240
8.3.2 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides y ADN	241
8.4 LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA EN EL RATÓN	241
8.4.1 Cultivo de células primordiales embrionarias -células ES-	242
8.4.2 La recombinación homóloga	243
8.4.3 Creación de ratones knock-out (KO)	245
Nomenclatura de los KO	249
8.4.4 El uso de recombinasas sitio-específicas para generar ratones KO condicionales ..	249
8.4.5 Influencia del fondo genético en los animales genéticamente modificados . . .	253
8.5 LA CLONACIÓN	254
8.5.1 Historia de la clonación	254
8.5.2 Métodos de clonación en el ratón	255
8.5.3 Relevancia de la clonación para los roedores de laboratorio	258
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	259

CAPÍTULO IX

LOS ROEDORES DE LABORATORIO COMO MODELOS DE ENFERMEDADES HUMANAS

9.1 EL RATÓN COMO MODELO EN MEDICINA EXPERIMENTAL	263
9.1.1 Modelos provenientes de mutaciones espontáneas o inducidas	264
9.1.2 Modelos generados por transgénesis	264
9.1.2.1 Modelos producidos a través de la eliminación de un determinado tipo celular	264
9.1.2.2 Modelos producidos a través de una regulación anormal del gen ..	265
9.1.2.3 Modelos producidos por la incorporación de genes humanos	265
9.1.2.4 Modelos transgénicos producidos por la incorporación de grandes fragmentos de ADN	265
9.1.3 Modelos generados in vitro por manipulación de células ES	266
9.1.4 Modelos generados por transgénesis condicional (sistemas Cre/loxP y Flp/frt)	267

9.2 MODELOS MURINOS PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES HUMANAS	267
9.2.1 Modelos murinos de enfermedades hereditarias simples (mendelianas) . . .	267
9.2.1.1 Enfermedades que involucran células derivadas de la cresta neural .	267
Enfermedad de Hirschsprung (HSCR)	268
Piebaldismo	269
Síndrome de Waardenburg (WS)	269
9.2.1.2 Desórdenes en la visión	270
9.2.1.3 Desórdenes en la audición	271
9.2.1.4 Enfermedades de los huesos y cartílagos	272
9.2.1.5 Desórdenes neurológicos y neuromusculares	273
Enfermedad de Alzheimer (EA)	274
Desórdenes neuromusculares	275
9.2.1.6 Enfermedades de la piel y el pelo	276
9.2.1.7 Enfermedades hematológicas e inmunodeficiencias	277
Anemias	278
Inmunodeficiencias	279
Fenómenos autoinmunes y linfoproliferativos	281
9.2.1.8 Enfermedades metabólicas	281
Desórdenes en el metabolismo de la purina	282
Fibrosis Quística (FQ)	282
Arteriosclerosis	283
9.2.2 Modelos murinos de enfermedades hereditarias complejas (multigénicas) . . .	283
9.2.2.1 Cáncer	283
Cáncer colorectal	286
Síndrome de Li-Fraumeni	286
9.2.2.2 Obesidad y diabetes	287
9.3 OTROS ROEDORES UTILIZADOS COMO MODELO EXPERIMENTAL	288
9.3.1 La rata como modelo de diabetes dependiente de insulina (diabetes tipo I) . .	289
9.3.2 La rata como modelo de obesidad y diabetes tipo II	289
9.3.3 La rata como modelo de hipertensión y obesidad	290
9.3.4 La rata como modelo de Epilepsia	291
9.3.5 El hámster como modelo experimental	292
9.4 EL VALOR Y LAS LIMITACIONES DE LAS MUTACIONES COMO MODELO DE ENFERMEDADES HUMANAS	292
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	294
ANEXO I. MANTENIMIENTO DE LAS MUTACIONES EN EL ANIMALARIO	299
ANEXO II. GLOSARIO Y NOMENCLATURA	307
ANEXO III. DIRECCIONES DE INTERNET	309

Prólogo

La idea de escribir este libro nació un día de septiembre de 1995, año en el que un joven veterinario argentino (FB) llegó a París decidido a descubrir la vieja Europa y a pasar algunos meses trabajando en el laboratorio de otro veterinario más maduro (JLG), jefe de la Unidad de Genética de Mamíferos en el *Institut Pasteur*. Siendo ambos apasionados por la genética y compartiendo el deseo de poner sus conocimientos a disposición de la comunidad hispano-parlante, la idea de escribir un manual de Genética de Roedores de Laboratorio en español surgió en forma natural.

Años más tarde, en la primavera Tejana de 1998, ya como colaboradores y amigos, decidimos poner manos a la obra. En aquel momento pensamos, ingenuamente, que reuniendo las notas y apuntes acumulados a lo largo de los años por el más experimentado de nosotros, y dejando al novato la tarea de ponerlos al día y adaptarlos, la redacción del manuscrito no debería durar más de un año, a lo sumo un año y medio. Rápidamente nos dimos cuenta de que nuestra empresa era mucho más importante de lo que pensábamos y que el proyecto era un verdadero desafío. Aunque ninguno de los dos lo haya mencionado jamás, es muy probable que la idea de abandonar la escritura del libro se nos haya cruzado por la mente más de una vez. Pero una de las ventajas de escribir un libro de a dos es que la debilidad de uno suele coincidir con el punto fuerte del otro. De esta manera, apoyándonos mutuamente, es que hemos llevado a término nuestro proyecto y estamos inmensamente felices de ver que nuestro libro, el primero en su género en idioma español, es hoy una realidad.

Somos conscientes de que la redacción de esta obra nos ha tomado mucho tiempo, pero tenemos varias excusas. Una de las más importantes es el hecho de que, en los últimos cinco años, la genética del ratón y la rata se han desarrollado en forma muy considerable, enviando ráfagas sucesivas de nueva información. Por lo tanto, nos parecía inconcebible no hablar de los progresos más recientes en la materia en un libro destinado a investigadores, veterinarios y técnicos que trabajan con roedores de laboratorio. Hoy en día los genomas del ratón y la rata se encuentran secuenciados, pero podemos prever que harán falta aún muchos años para analizar la enorme cantidad de información puesta a disposición de la comunidad científica. Simultáneamente, prevemos que la próxima etapa en esta carrera será la que atañe al análisis de los caracteres genéticos complejos (multigénicos), las interacciones entre genes (genes modificadores), los fenómenos epigenéticos y la relación genética/ambiente. Ante este panorama, pensamos que este momento de calma era el tiempo ideal para salir con nuestro libro a la calle. Una cosa segura es que al libro que estamos publicando hoy le ha quedado muy poco de aquellos apuntes desordenados mencionados al principio.

En la redacción de este libro nos hemos limitado a la descripción de los conceptos y datos esenciales, con el fin de conservar un volumen (y un precio) razonables. Para obtener infor-

mación más detallada, el lector encontrará numerosas referencias de artículos, revisiones y libros pertinentes, y podrá también consultar la enorme cantidad de sitios Web que hemos incluido. Si bien estamos orgullosos de nuestra obra, sabemos muy bien que el libro no es perfecto y que está lejos de ser un tratado completo sobre la materia. Siendo ésta la primera edición del libro, estamos dispuestos a recibir sugerencias de nuestros colegas hispanoparlantes, las cuales podríamos tener en cuenta para una próxima edición. Más allá de lo expresado, la redacción de este libro ha tenido una consecuencia mayor: ha contribuido a reforzar considerablemente la amistad que une a los autores.

Los autores agradecen a la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL) y a *Laboratory Animals Ltd.* por el interés en nuestro libro, al colega Claudio J. Conti (*The University of Texas, MD Anderson Cancer Center*) por su apoyo desinteresado durante la preparación de esta obra y a los colegas Jorge Sztejn (*National Eye Institute, National Institutes of Health*), Charles Babinet y Xavier Montagutelli (*Institut Pasteur*), Göran Levan (*Göteborg University*) y Heinz Winking (*Medizinische Hochschule Lübeck*), por sus sugerencias y material fotográfico. Fernando Benavides agradece a Jean-Louis Guénet por ser un maestro excepcional (generoso, detallista y divertido). De la misma forma, agradece a su mentor en Argentina, Christiane Dosne Pasqualini, y a sus compañeros Norberto Barassi, Antonio Morales y Juan Portaluppi por haberle enseñado (contagiado) su afición por los pequeños roedores.