

CAPÍTULO VIII

La transgénesis y la clonación en los roedores de laboratorio

8.1 La manipulación de los embriones

8.1.1 Perspectiva histórica

La introducción de genes “foráneos” (ya sean de otra especie o de la misma) en el genoma de embriones de mamífero para crear animales **transgénicos** es uno de los adelantos más valiosos de las últimas dos décadas en el área de la biotecnología. Si bien el término transgénico fue aplicado originalmente al ratón, con el tiempo su uso se extendió para describir todo animal o planta en el cual haya sido transferido material genético exógeno. De esta manera, se puede crear un organismo que adquiere en forma definitiva una información genética que no le ha llegado por los canales naturales de la evolución. La expresión de los genes transferidos (**transgenes**) puede ser ahora analizada en el tejido apropiado y en el estadio preciso del desarrollo, abriéndose múltiples posibilidades en el campo de la genética básica y aplicada.

Los primeros trabajos fueron realizados infectando embriones con retrovirus: se trata de la microinyección de *SV40* (*simian virus 40*) en blastocitos de ratón realizada por Rudolf Jaenich en 1974. La primera producción exitosa de ratones transgénicos utilizando la técnica de microinyección directa de ADN en el pronúcleo de un óvulo fertilizado (en inglés, *fertilized egg*) fue reportada por Jon Gordon y colaboradores en 1980, seguida por otros cuatro laboratorios en 1981. Gordon y sus colegas introdujeron un plásmido recombinante que portaba al gen de la tirosina quinasa del virus herpes (*HSV-tk*) conjuntamente con la región promotora del virus *SV40*. Una vez inyectados, los huevos fertilizados fueron transplantados a una hembra receptora y evaluados al nacimiento por técnicas de hibridación de ADN, obteniéndose pruebas inequívocas de que el ADN microinyectado había sido retenido a lo largo del desarrollo de los animales y transmitido, en las gametas del animal transgénico, a la descendencia. Estos experimentos dejaron en claro que, en principio, genes clonados de cualquier origen podían ser incorporados en forma permanente al genoma de un embrión de mamífero. En trabajos posteriores se demostró que los transgenes microinyectados en el pronúcleo eran capaces de expresarse funcionalmente, llegándose en 1982 al primer cambio fenotípico, descrito por Richard Palmiter y colaboradores, en ratones transgénicos portadores del gen estructural de la hormona de crecimiento de la rata (en dicha oportunidad, 6 de 21 ratones mostraron una tasa de crecimiento significativamente superior a la del grupo control). Con la aparición de esta poderosa técnica, la genética del ratón y de la rata de laboratorio ha cambiado drásticamente, aunque no deja de haber aspectos importantes —éticos y de manejo— a considerar: la posibilidad de que escapen roedores transgénicos y se crucen con animales salvajes y el aumento desmesurado del uso de ratas y ratones, entre otros. Hoy en día, la introducción de material genético por microinyección se ha convertido en un protocolo de rutina en la rata y el ratón (los únicos roedores donde se realiza), y la metodología detallada se encuentra presente en varios manuales, además de poder requerir de los servicios comerciales de muchos laboratorios dedicados a la producción de animales transgénicos (ver Anexo III).

8.1.2 Consideraciones generales

Las técnicas de laboratorio que nos permiten obtener embriones (antes de su implantación) del tracto reproductivo de una hembra gestante, cultivarlos *in vitro* y re-implantarlos en otra hembra receptora existen desde la década de 1950. Estas técnicas constituyen la base sobre la cual se logró la manipulación genética de los embriones, como ser el desarrollo de quimeras, el trasplante de núcleos, la transgénesis, los cultivos de células embrionarias pluripotenciales (conocidas también como células madre totipotentes o **células ES**, del inglés *embryonic stem cells*) y la clonación. A continuación veremos muy brevemente algunos aspectos generales de estas técnicas en el ratón de laboratorio, aunque las técnicas son básicamente las mismas para la rata.

8.1.2.1 Obtención de embriones y superovulación

Hay varios factores a tener en cuenta antes de comenzar a trabajar manipulando embriones de ratón. Con respecto a la elección de una buena línea consanguínea, la misma debe presentar óvulos resistentes a la manipulación y en el caso de utilizar **superovulación**, será necesario contar con una línea que responda bien al tratamiento hormonal. Una de las líneas más utilizadas para la producción de ratones transgénicos por microinyección de ADN es la línea FVB/N. Esta línea es única en varios aspectos relacionados a la producción de transgénicos. Primero, su promedio natural de crías en la camada es cercano a 10, lo que la ubica muy lejos del resto de las líneas consanguíneas clásicas. Segundo, y quizás lo más importante, produce embriones (huevos fertilizados) cuyo pronúcleo masculino es muy grande y fácil de visualizar para la microinyección. Finalmente, el porcentaje de embriones inyectados que sobreviven y producen ratones vivos es mucho más alto que en el resto de las líneas consanguíneas.

Existen otras consideraciones de orden genético a la hora de elegir la línea donante de embriones, ya que será el fondo (del inglés *background*) genético sobre el cual se expresará el transgén. En el caso de poder utilizar embriones consanguíneos (la hembra donante de óvulos y el macho de la misma línea) para la introducción del transgén tendremos como ventaja que los ratones transgénicos serán coisogénicos con respecto a la línea consanguínea (ver Capítulo IV). En el caso de no ser necesaria la producción de líneas transgénicas en estado de coisogenicidad, la utilización de embriones híbridos (F1 o F2) favorecerá la producción, debido a la mejor performance reproductiva y a la mayor resistencia de los embriones a la manipulación (a causa del vigor híbrido). En este caso, se puede recurrir a la generación de una línea congénica asistida por marcadores genéticos (ver Capítulo IV).

La superovulación es una práctica muy útil y extendida entre los laboratorios de producción de transgénicos. Mientras que por acoplamiento natural podemos obtener en el orden de 5-10 embriones por hembra, por medio de la superovulación podemos aumentar ese número hasta 60 embriones por hembra, reduciendo de esta manera la cantidad de hembras utilizadas. Para dar una idea de la cantidad de embriones necesarios tengamos en cuenta que, en un solo experimento de microinyección, pueden usarse hasta 300 embriones. La superovulación se induce por medio de la inyección intraperitoneal (en tiempos muy precisos) de dos

hormonas (gonadotropina de suero de yegua preñada-PMSG y gonadotropina coriónica humana-hCG) que imitan las hormonas naturales de la hembra pero producen un número muy grande de folículos y por lo tanto de ovulaciones. La edad ideal para la estimulación hormonal varía con las líneas, pero, en general, es entre 3 y 4 semanas. La hormona PMSG se inyecta usualmente a las 2 p.m. del día 1 y la hormona hCG al mediodía del día 3 (aproximadamente 48 horas más tarde que PMSG). La superovulación, al igual que la ovulación natural, estimula el interés del macho por copular y la aceptación por parte de la hembra, lo que facilita la estandarización de los protocolos.

Es importante destacar que la respuesta a la superovulación varía enormemente entre las líneas consanguíneas de ratones, fenómeno nada inesperado por cierto. Entre las líneas de alta producción de embriones (40-60 embriones por hembra) se encuentran C57BL/6, BALB/cByJ, 129/SvJ (ahora 129X1/SvJ), CBA/CaJ y SJLJ. Las líneas de bajo rendimiento (menos de 15 embriones por hembra) son A/J, C3H/HeJ, BALB/cJ, 129/J (ahora 129P3/J) y DBA/2J. La línea FVB/J se encuentra en el medio de estos dos grupos con una producción de alrededor de 25 embriones por hembra. Es interesante observar el caso de dos sublíneas que evidencian fenotipos opuestos ante la superovulación, como son BALB/cJ versus BALB/cByJ. Este hallazgo sugiere que aún cambios muy sutiles en el genotipo pueden tener efectos muy grandes sobre este rasgo reproductivo.

Las hembras que han ovulado, ya sea naturalmente o en forma inducida, deben recibir el servicio de un macho fértil (entre 2 y 8 meses de edad) para producir los embriones que serán utilizados para la microinyección. Aquellos machos que han sido previamente probados con otras hembras y han demostrado un buen índice de formación de **tapón vaginal** (indicativo de cópula), serán los ideales para este propósito. Para obtener resultados óptimos se debe mantener un macho y una hembra por jaula y una vez comprobado el servicio (por la presencia del tapón vaginal) dejar descansar al macho por 2 ó 3 días antes de colocarlo con otra hembra. Normalmente, la mañana siguiente al servicio se sacrifica la hembra y se extraen los oviductos, se realiza un lavado (en inglés, *flushing*) de los mismos y se recogen los embriones en una placa de Petri con medio de cultivo adecuado. Luego se separan los embriones (recordar que son unicelulares) entre sí y se los libera de las pegajosas células del cúmulo para dejarlos aislados en microgotas. Finalmente se los vuelve a colocar en medio de cultivo limpio, se los evalúa al microscopio óptico y se los deja en incubación hasta el momento de la microinyección del ADN (ver más adelante).

8.1.2.2 Transferencia de embriones

Una vez que hemos mantenido los embriones en cultivo (e inyectado el ADN en el pronúcleo), estamos en condiciones de colocarlos en el tracto reproductivo de una hembra receptora o madre adoptiva (en inglés, *foster mother*) que ha sido cruzada con un macho estéril, con el fin de que los embriones se desarrollen a término. Las hembras receptoras se anestesian y se exteriorizan los oviductos para proceder con la transferencia. Para tal propósito se usa una pipeta especial de transferencia (de vidrio y con un diámetro interno menor a 150 μm) la cual se carga alternando burbujas de aire y medio de cultivo con embriones (**Figura 8.1**).

Las consideraciones para elegir este “vientre sustituto” deben involucrar solamente los aspectos reproductivos y no los genéticos, ya que estas hembras no aportarán material genético a

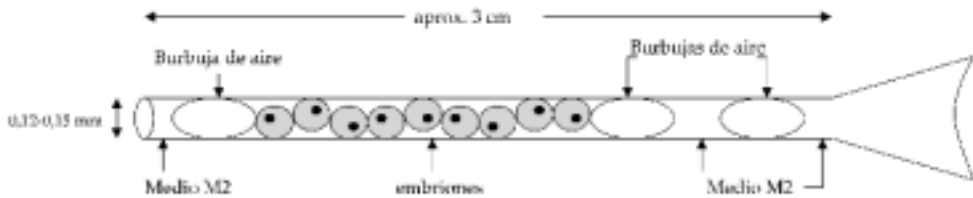


Figura 8.1. Diagrama de la pipeta de transferencia de embriones. Primero se llena la pipeta con medio de cultivo (por ejemplo M2), luego se toma una burbuja de aire, otra vez medio y una segunda burbuja de aire. Se toman los embriones alineados uno tras otro con la menor cantidad de medio posible entre ellos. Se toma una tercera burbuja de aire y un poco de medio. Este orden: medio-aire-embriones es esencial para controlar la manipulación durante la transferencia.

los recién nacidos. Las hembras receptoras deben tener un buen funcionamiento reproductivo y un comportamiento maternal adecuado. Para este propósito se suele utilizar hembras provenientes de grupos (*stocks*) exocriados, como CD-1, CF-1 y todos los derivados de la familia Swiss Webster, o híbridos F1 entre líneas consanguíneas estándar [por ejemplo (C57BL/6 × CBA)F1]. Otra consideración a la hora de elegir la hembra receptora de los embriones es la posibilidad de que el investigador pueda distinguir (sin genotipar) las crías provenientes del trasplante embrionario de posibles crías naturales de esa hembra. Como veremos más adelante, esta preocupación está basada en que la cirugía para producir el macho estéril (**vasectomía**) puede haber fallado y el macho retiene entonces cierto nivel de fertilización. Esto se soluciona muy fácilmente con la elección de un color de pelaje adecuado. Por ejemplo, si los embriones transplantados son pigmentados, la hembra receptora y el macho vasectomizado deben ser albinos; si los embriones transplantados son albinos, el macho vasectomizado debe ser pigmentado (el 100% de las crías –potenciales– de este macho serán pigmentados).

8.1.2.3 Inducción de pseudopreñez

La inducción del estado de **pseudopreñez** es fundamental debido a que los roedores (y muchos mamíferos), a diferencia de los primates, necesitan el estímulo del acto sexual para preparar el tracto reproductivo para la implantación de los embriones. Este estímulo también genera cambios hormonales que alterarán el ciclo estral de la hembra y llevarán la preñez a término. Cuando tiene lugar una estimulación sexual exitosa –pero sin posterior implantación de embriones– se habla de estado de pseudopreñez. Esto es crucial para el éxito del trasplante embrionario, de otra forma los embriones transplantados no se implantarán y no habrá desarrollo embrionario. La pseudopreñez se puede lograr por medio del servicio de un macho estéril o a través del uso de aparatos de masturbación, aunque el servicio natural es mucho

más eficiente. Si bien existe la posibilidad de usar machos genéticamente infértiles (por mutaciones o rearrreglos cromosómicos), el método más común para producir machos estériles es la vasectomía, cirugía muy simple que consiste en remover un trozo de ambos vasos deferentes. Los híbridos F1 y los ratones exocriados son los más utilizados para este propósito. Es conveniente probar el éxito de la vasectomía colocando al macho junto a hembras fértiles antes de su uso de rutina. Para una descripción más detallada de estos procedimientos visitar los sitios de Internet del Anexo III o consultar los manuales específicos mencionados en la Bibliografía General de este capítulo.

8.2 Transgénicos generados por inyección de ADN en el pronúcleo

8.2.1 Técnica clásica de microinyección de ADN

La microinyección directa de fragmentos de ADN clonado en el pronúcleo de un embrión de 24 horas es el método más utilizado y uno de los más exitosos en la producción de animales transgénicos. Su principal ventaja es la gran eficiencia en generar líneas de animales que expresen el gen deseado de una forma predecible, además de lograr la mayor proporción de integración del transgén a la línea germinal. Sin embargo, esta técnica tiene la limitante de no poder ser utilizada para introducir genes en estadíos más avanzados del desarrollo del embrión y de sólo poder agregar material genético (nunca sustraer o reemplazar). La tecnología de microinyección de ADN nos permite estudiar muchos aspectos de la biología de la rata y el ratón además de la función y regulación de los genes:

- (i) Una de las posibilidades es analizar los efectos de la expresión alterada (ya sea en altos niveles de expresión o en tejidos alternativos) de un gen natural para la especie. El fenotipo mutante que resulte de esa expresión anormal puede usarse para inferir la función del gen en su forma normal (en inglés, *wild type*). Uno de los ejemplos más conocidos es la sobreexpresión de **oncogenes** (entre ellos los ratones comercializados como *OncomouseTM*), de gran valor como modelo en medicina experimental (ver Capítulo IX) debido al gran abanico de posibilidades que genera (**Figura 8.2**).
- (ii) Otra clase de experimentos con roedores transgénicos son aquellos en los cuales se inserta una copia normal de un gen que se encuentra anulado en ratones portadores de una mutación, lo que se conoce como **rescate de fenotipo** (en inglés, *transgenic rescue*). Esta es la manera más adecuada para probar que un **gen candidato** (ver Capítulo VI) es en realidad el gen responsable de un determinado fenotipo mutante.
- (iii) Los animales transgénicos son muy apreciados en medicina experimental porque facilitan la creación de nuevos modelos animales, y en la industria farmacéutica a causa de la posibilidad de producir proteínas de alto valor comercial (como ser enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, entre otros).

A la hora de analizar el fenotipo de los ratones transgénicos, es fundamental tener en mente la posibilidad de que el transgén se inserte –sólo por azar– dentro de la secuencia de un gen funcional. En la mayoría de los casos analizados hasta la actualidad, la interrupción de secuencias endógenas causada por la inserción de transgenes no ha resultado en un fenotipo aparente. Sin embargo, se considera que cualquier gen puede ser blanco de una interrupción debido a la inserción de un transgén y existen algunas mutaciones que han dado origen a disfunciones neurológicas, trastornos en la función renal, infertilidad en machos y a deformaciones en extremidades de carácter heredable. Estas mutaciones son muy valiosas ya que nos permiten clonar el gen “noqueado” sin necesidad de hacer un extenso proyecto de **clonaje posicional** (ver Capítulo VI). Por lo tanto, será crucial analizar la información proveniente de dos o más líneas transgénicas independientes (de distintos animales fundadores) portando el mismo transgén, antes de llegar a conclusiones definitivas sobre el efecto de un gen.

La llamada **construcción transgénica** o **cassette de expresión** se realiza en el laboratorio de biología molecular, ya que se requiere de experiencia, equipos y reactivos apropiados (enzimas de restricción, ligasas, *polylinkers* etc.). El proceso para obtener el **cassette** insertado en un vector (clonado), listo para ser inyectado, puede durar varios meses y hasta años. Los transgenes constan, esencialmente, de dos componentes: el **gen estructural**, el cual queremos estudiar, y los llamados **elementos reguladores**. El primero será el portador de la información genética necesaria para la síntesis de la proteína que queremos analizar. Los elementos regula-

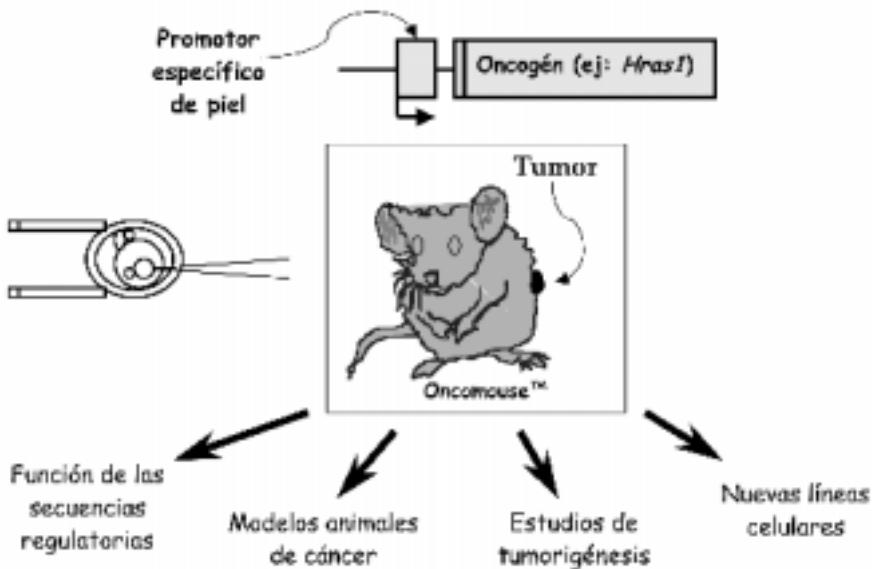


Figura 8.2. Modelos transgénicos. El esquema muestra algunas de las posibilidades que brinda un ratón transgénico que sobre expresa un oncogén como modelo en oncología experimental. En el ejemplo se observa el oncogén *Hras1* (*ras*) bajo la influencia de un promotor específico de epitelios, lo que genera tumores de piel.

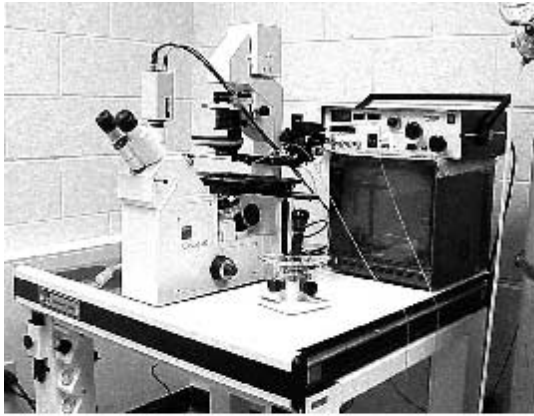
dores (promotores, secuencias activadoras, etc.) son las secuencias de ADN responsables de que nuestro transgén se exprese en un determinado tipo celular y/o momento del desarrollo. Este concepto es importante ya que podemos dirigir la sobreexpresión del transgén hacia los tejidos de nuestro interés. Por ejemplo, si utilizamos el promotor de la **queratina 5** (*K5* o *keratin 5*) tendremos expresión del transgén en la epidermis y en el epitelio del timo, con posibles fenotipos en esos tejidos. También se pueden incorporar promotores que se expresen en forma ubicua, lo que llevará a la expresión del transgén en todos los tejidos, como sucede con el promotor del gen **metalotionina** (inducible ante la exposición de metales pesados) y el promotor de la **actina del pollo**.

Es recomendable incorporar a la construcción transgénica, bajo las órdenes de las mismas secuencias reguladoras, un **gene reportero** (del inglés *reporter gene*) que nos permita analizar fácilmente la expresión. Uno de los más empleados es el gen **lacZ**, que codifica para la enzima bacteriana **β -galactosidasa**, ya que permite la detección rápida y sensible de la expresión del transgén por medio de la coloración de embriones enteros o tejidos. La coloración azul-verdosa obtenida luego del protocolo específico nos indicará cuales son los animales transgénicos (normalmente se corta la punta de la cola y se identifica a los positivos), e inclusive cuales son los tejidos y el momento preciso del desarrollo donde se expresa el transgén.

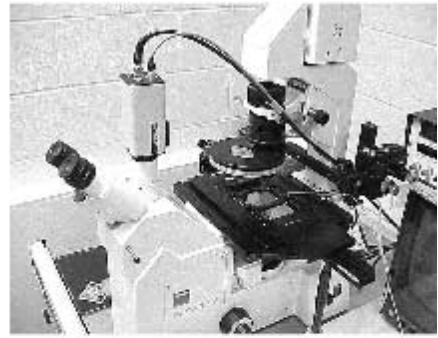
8.2.1.1 La microinyección

La inyección se realiza con costosos equipos de precisión (cotizados entre 50.000 y 100.000 dólares), incluyendo microscopio estereoscópico, microscopio invertido, micromanipulador, pipetas de sujeción de embriones, pipetas de vidrio, aparatos para estirar las pipetas, incubadoras de CO₂, entre muchas otras cosas (**Figura 8.3**). Como hemos visto, la inyección se realiza aproximadamente 24 horas después del servicio del macho, lo que coincide con el momento biológico ideal, que es entre tres y cinco horas antes de que se produzca la fusión de los pronúcleos. El pronúcleo elegido es el masculino debido a que, por su mayor tamaño, es de mejor manipulación. Para la inyección se usan pipetas de sujeción (en inglés, *holding pipettes*) de vidrio, preparadas en el propio laboratorio a partir de capilares de vidrio (de paredes muy delgadas y un diámetro interno entre 15 y 25 μ m) estirados con aparatos *ad hoc* (*pipette puller*). La pipeta de sujeción debe tener el extremo perfectamente romo para no dañar el embrión cuando es sostenido por la pipeta por presión de vacío. La segunda pipeta, de inyección propiamente dicha, debe presentar un diámetro interno menor a 1 mm y tener el extremo afilado. La cantidad de copias del transgén inyectada suele variar entre 20 y 200, en un volumen de solución acuosa no mayor a 2 μ l (el volumen del pronúcleo no debe expandirse más del doble) (**Figura 8.4**).

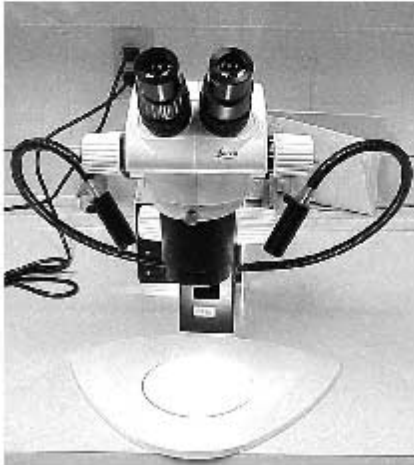
Este procedimiento lleva a la integración estable del ADN foráneo en un 5-50 % de los embriones que sobreviven, siendo el promedio de copias integradas de entre 1 y 50, sin guardar mucha relación con la cantidad de ADN inyectada (se han reportado casos de hasta 1000 copias del transgén). En la mayoría de los casos, dicha integración ocurre en el estadio embrionario de una célula, por lo que el animal transgénico resultante portará el ADN introducido



A



B



C



D

Figura 8.3. Equipamiento para la microinyección de ADN en pronúcleo. La foto A muestra la mesa de trabajo (anti-vibratoria) con el microscopio invertido y el micro-manipulador con su joystick y el monitor. A la derecha (B) un primer plano del microscopio. La foto C corresponde a un microscopio de disección usado para la cirugía de transferencia de embriones. La foto D muestra un aparato para estirar las pipetas de vidrio "a medida" (*pipette puller*). Fotos: F. Benavides. *The University of Texas - M.D. Anderson Cancer Center, Department of Carcinogenesis - Science Park, Texas, Estados Unidos.*

en todas sus células, incluida la línea germinal. Sin embargo, entre 10-20% de los animales transgénicos pueden presentar una integración en estadios posteriores del embrión (embriónes de más de una célula), produciendo animales "mosaico" para el transgén. En este caso, la transmisión del transgén a través de las células germinales no está asegurada, perdiéndose una

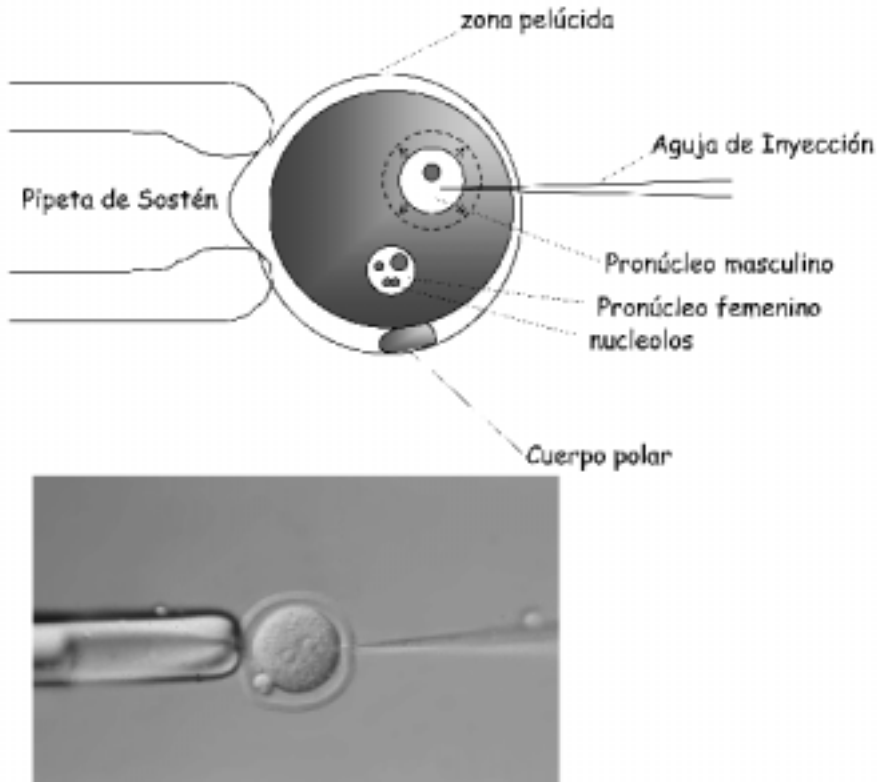


Figura 8.4. Microinyección de ADN en pronúcleo. La aguja de inyección se inserta en el pronúcleo masculino ya que es más grande que el femenino; además puede identificarse porque suele tener sólo un nucleolo. La inyección exitosa resulta en el ensanchamiento del pronúcleo (línea de puntos). La foto muestra una imagen del momento de la microinyección (a la izquierda se observa la pipeta de sostén). Foto cortesía del Dr. Charles Babinet, *Biologie du Développement*, Institut Pasteur, París, Francia.

característica fundamental para la creación de líneas transgénicas. Frecuentemente, la integración del ADN ocurre al azar y en un único sitio del genoma, siendo esta región propensa a extensos rearrreglos (de hecho, las mutaciones no son raras en la descendencia de aquellos animales donde el genoma ha sido manipulado). La eficiencia final de la técnica nos permite la obtención de entre 20 y 30% de ratones transgénicos del total de ratones nacidos vivos. El diagrama de la **Figura 8.5** resume los pasos que involucra la creación de un ratón transgénico.

8.2.1.2 Desarrollo de líneas transgénicas

El animal que obtenemos a partir de un embrión inyectado con ADN se llama “**fundador**”. Es importante entender que aun utilizando el mismo ADN (*cassette* de ADN) para inyectar varios embriones, cada uno de ellos tendrá un sitio de inserción y una cantidad de copias dife-

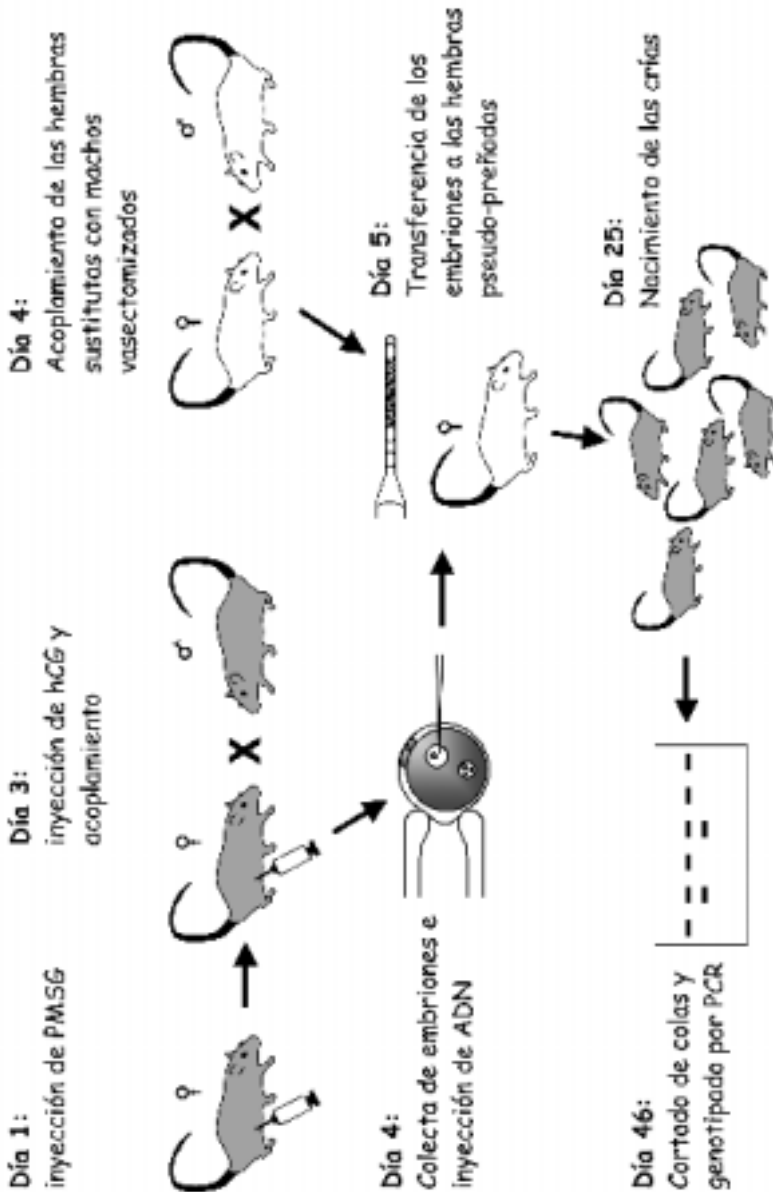


Figura 8.5. Transgénesis por microinyección de ADN en pronúcleo. El diagrama esquematiza los pasos que implica la realización de ratones transgénicos. A la hora de planear el desarrollo de una línea de ratones transgénicos hay que tener presente que el tiempo total del proyecto es de por lo menos seis meses. Para más detalles ver el texto.

rentes, ya que son fenómenos que ocurren al azar. Esto puede motivar diferentes niveles de expresión e, incluso, diferentes fenotipos transgénicos. En cambio, todos los animales transgénicos que desciendan de un mismo fundador compartirán el mismo transgén (o locus transgénico), lo que se denomina una **línea transgénica**.

Tengamos en cuenta que el ratón fundador es heterocigota para el locus transgénico (más correctamente **hemisigota** $Tg/+$), ya que el ADN fue insertado sólo en el pronúcleo masculino (es como si lo hubiera heredado del padre) y el cromosoma homólogo materno (este pronúcleo no fue inyectado) es *wild type*. Por lo tanto, este animal fundador transmitirá el locus transgénico solamente a la mitad de su descendencia. Con la excepción de aquellos transgénicos cuyo fenotipo sea de fácil detección (en particular los fenotipos dominantes), la presencia del transgén en las líneas que estamos criando no es algo muy evidente y debe hacerse por medio del análisis del ADN, lo que denominamos **genotipado** (del inglés *genotyping*) de los animales.

Como estamos hablando, en la mayoría de los casos, de cientos de crías a ser analizadas, la técnica por excelencia es el PCR a partir de ADN (ver Capítulo I) obtenido de la punta de la cola o del tejido que nos queda después de marcar las orejas de los ratones (en inglés, *ear punch-outs*). Existen otras variantes como el raspaje de mucosa bucal pero las mencionada anteriormente son, por lejos, las más usadas. Los iniciadores (*primers*) de ADN deben estar diseñados para detectar secuencias que se encuentren en forma exclusiva en la construcción transgénica. Por medio de esta técnica sólo podemos evaluar la presencia o ausencia del locus transgénico en el ADN genómico de los animales. La discriminación entre hemisigotas (el locus transgénico sólo en un cromosoma homólogo, $Tg/+$) y homocigotas (ambos cromosomas homólogos portan el locus transgénico, Tg/Tg) debe hacerse utilizando técnicas cuantitativas como el Southern blot y el PCR cuantitativo, o por **cruzas de prueba** con animales $+/+$. Por ejemplo, si el ratón era homocigota tendrá 100% de crías positivas al genotipado por PCR, y si era heterocigota, sólo el 50% será positivo. Esto no será necesario en aquellos raros casos en que existan diferencias fenotípicas entre animales $Tg/+$ y Tg/Tg (tener en cuenta que en el 5-10% de los casos, el transgén es letal al estado homocigota). Un dato imprescindible para tener en cuenta a la hora de planear el desarrollo de una línea de ratones transgénicos es que el tiempo total del proyecto es de por lo menos seis meses.

8.2.1.3 Nomenclatura de los loci y las líneas transgénicas

La creación de un nuevo locus en forma artificial (el locus transgénico) hizo necesaria la estandarización de la nomenclatura para este tipo de loci y las líneas de roedores que los portan. El símbolo oficial de un locus transgénico consta de cinco partes:

- (i) Las letras Tg como designación de transgén.
- (ii) Una letra que indica el tipo de técnica utilizada para la inserción: N , para inserción no homóloga (microinyección), R , para inserciones con vectores retrovirales.

- (iii) La tercera parte de la nomenclatura es para indicar algunas características del transgén, incluyendo el nombre del gen o secuencia, usando hasta seis letras entre paréntesis. Existen algunas abreviaturas estándar para utilizar en caso de ser necesario, como ser: *An*, por *anonymous sequence*; *Nc*, por *non-coding sequence*; *Rp*, por *reporter sequence*; *Sn*, por *synthetic sequence*; etc.
- (iv) La cuarta parte del símbolo es un número (de hasta 5 dígitos) asignado por el investigador a una línea transgénica particular.
- (v) Finalmente, se coloca el código del laboratorio (ver Capítulo IV).

Veamos un ejemplo: un investigador que trabaja en el *Institut Pasteur* de París (código de laboratorio Pas) inyecta embriones con una construcción que contiene el gen de la cathepsina L (símbolo *Ctsl*) con el promotor de la queratina 5 (K5), porque desea evaluar la sobreexpresión de *Ctsl* en los epitelios. La quinta línea de ratones transgénicos que logró este investigador es la que tiene el fenotipo más evidente y desea establecer una colonia. La nomenclatura del transgén será: *TgN (K5Ctsl)5Pas*.

En el caso de la inserción de un transgén dentro de la secuencia de un gen presente normalmente en el genoma, se formará un nuevo alelo mutante (seguramente nulo) de ese gen, por lo tanto debe aclararse en la nomenclatura. Supongamos que una de las líneas (la número 2) generadas por el mismo investigador generó una mutación por inserción del transgén en el gigantesco gen de la distrofina (*Dmd*). En este caso la nomenclatura debe ser *Dmd^{TgN (K5Ctsl)2Pas}*.

El fondo genético de la línea debe indicarse de la siguiente manera:

- (i) Si el transgén ha sido incorporado a otro fondo genético por medio de la creación de una línea congénica, la nomenclatura es como se vio en el Capítulo IV. Por ejemplo, B6.FVB-TgN (*Trp53*), es una línea congénica de fondo C57BL/6 a la cual se le incorporó el transgén *Trp53* más un segmento de ADN perteneciente a la línea donde se realizó la microinyección, en este caso FVB.
- (ii) Si el origen de la línea que porta el transgén es desconocido puede indicarse: B6.Cg-TgN (*Trp53*), en donde "Cg" indica línea congénica.
- (iii) Si los animales tienen un fondo genético mezclado y no se ha desarrollado una verdadera línea congénica (*full congenic strain*), se debe colocar ambos fondos genéticos separados por punto y coma: B6;FVB-TgN (*Trp53*).

8.2.2 Creación de ratones transgénicos a partir de BACs y YACs

La técnica utilizada para la creación de transgénicos a partir de YAC's y BAC's (vectores que soportan grandes fragmentos de ADN) es esencialmente la misma que la usada en los protocolos clásicos. La gran ventaja del uso de estos vectores de clonación (ver Capítulo I) es la posibilidad de integrar en forma permanente en el genoma secuencias de ADN de hasta 350 kb para los BAC's y hasta 1 Mb para los YAC's. Aunque el tamaño máximo posible del inserto en los YAC's es de hasta 2 Mb, no se ha logrado crear ratones transgénicos con moléculas tan grandes, las cuales serían ideales para el estudio de genes gigantes como la distrofina o la titina (*titin*, símbolo *Tnt*). En cambio, utilizando los vectores de clonación clásicos como los plásmidos, fagos o cósmidos, el tamaño máximo de la molécula de ADN que podemos introducir (sin dañarla) es de aproximadamente 50 kb.

Los métodos de transferencia de los YAC's son variados, pero fundamentalmente son tres: (i) fusión de los YAC's con las células ES por medio del uso del polietilenglicol, (ii) transfección de células ES utilizando lípidos (técnica conocida como **lipofección**) y (iii) microinyección directa en pronúcleo. Esta última técnica, requiere de moléculas de ADN extremadamente purificadas y del uso de agentes protectores, como las poliaminas, que eviten su ruptura. La eficiencia de estas microinyecciones es similar a la de la técnica clásica. Por ejemplo, la eficiencia que obtuvieron en la creación de ratones transgénicos de la β -globina humana (inserto de 248 kb) fue de 10-14% y de 17% en el caso de la tirosinasa murina (inserto de 250 kb).

El uso de YAC's como vectores permite el análisis de la función y regulación de genes grandes en su forma genómica (intrones incluidos), lo que mejora notablemente el nivel de expresión. Por ejemplo, este sistema ha sido usado para el estudio de la regulación de la β -globina humana durante el desarrollo. Además, la incorporación de las secuencias regulatorias propias del gen –sus propios promotores– es fundamental en los ensayos de complementación de un gen, donde buscamos comprobar la identidad de una mutación por medio de la recuperación del fenotipo mutante (al integrar una copia normal del gen, el embrión mutante deja de expresar el fenotipo anormal).

Otra ventaja de los YAC's y los BAC's es la posibilidad de introducir mutaciones (realizar mutagénesis) en las secuencias clonadas por medio de la recombinación homóloga. Como veremos en el próximo capítulo, este tipo de transgénicos son de gran utilidad cuando el defecto genético resulta de una alteración cuya causa molecular es desconocida o poco estudiada. Utilizando estos sistemas se han creado modelos de enfermedades humanas muy complejas, como son la enfermedad de Huntington y el síndrome de Down. Además, se pueden diseñar ratones que expresan proteínas de interés farmacológico, como ser inmunoglobulinas humanas.

En el caso de los plásmidos, se inoculan fragmentos de entre 10 y 20 kb. La secuencia clonada en estos vectores debe separarse por restricción enzimática y electroforesis, y ser luego eluída directamente de los geles de agarosa. En cambio, el uso de BAC's nos permite clonar fragmentos de hasta 300 kb, los cuales son amplificados en los mismos sistemas de bacterias (normalmente *Escherichia coli*) utilizados para los plásmidos y aislados por **electroforesis de**

campo de pulsos (PFGE) o bien columnas de sefarosa. Al igual que los plásmidos, el ADN de los BAC's es circular y es preferible hacerlo lineal antes de la microinyección, para evitar posibles roturas del transgén. El ADN de los YAC's también se separa por medio de la técnica PFGE pero, debido al gran tamaño de estos vectores, debe tenerse mucho cuidado en el aislamiento del ADN porque es muy susceptible a romperse.

Los protocolos detallados sobre todas estas técnicas pueden encontrarse en Internet (ver Anexo III), en el manual de Hogan y colaboradores (1994), el libro de Jackson y Abbott (2000) y el manual de Nagy y colaboradores (2003).

8.3 Otras técnicas de producción de animales transgénicos

8.3.1 Infección por retrovirus

A diferencia de la microinyección de ADN, los **retrovirus** (por ejemplo el virus MoMLV, *Moloney murine leukemia virus*) se integran en el genoma de las células infectadas por un mecanismo preciso. Este mecanismo produce la inserción de una copia única del **provirus** en un cromosoma dado, sin observarse grandes rearrreglos del genoma excepto algunos (bien conocidos y específicos) en el sitio de integración (el estadio utilizado para las infecciones suele ser el de blastocito). A pesar de ser una técnica más sencilla que la microinyección en pronúcleo, posee la desventaja de presentar bajos niveles de expresión en los animales producidos, así como la formación de animales mosaico, debido a una integración no uniforme del transgén en el embrión, lo que produce un menor porcentaje de incorporación a la línea germinal. Por otro lado, esta técnica está limitada en cuanto al tamaño de los fragmentos de ADN a incorporar (sólo 10 kb). El sistema es relativamente simple y requiere de la exposición de embriones unicelulares (a los cuales se les quitó la zona pelúcida) frente a un medio de cultivo que contiene los **retrovirus recombinantes**. Para su manipulación, estos retrovirus tienen una replicación defectiva y carecen de los genes potencialmente oncogénicos, aunque existe preocupación por la posibilidad de que se generen partículas virales infectivas (**viriones**) por recombinación del ADN viral con el ADN del huésped.

Una variante reciente y muy prometedora de esta técnica es la utilización de **vectores lentivirales** para generar ratas y ratones transgénicos. Los **lentivirus** también pertenecen a la familia de los retrovirus, pero a diferencia del MoMLV, pueden infectar células en división y células en reposo, lo que es muy útil para la transgénesis. La inyección del vector viral se realiza en el espacio perivitelino de un embrión unicelular y por lo tanto ofrece la ventaja de no tener que visualizar el pronúcleo para la inyección. Esta ventaja podría ser utilizada para aquellas especies donde la inyección pronuclear no es factible.

8.3.2 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides y ADN

La posibilidad de realizar transgénesis por medio de la inyección citoplasmática de células espermáticas junto con ADN –técnica relacionada al ICSI (ver Capítulo II)– fue dada a conocer en el año 1999 por el mismo grupo que logró la primera clonación de ratones (ver más adelante). La co-inyección de cabezas de espermatozoides en ovocitos maduros, conjuntamente con secuencias de ADN codificando para la **proteína fluorescente verde GFP** (del inglés *green fluorescent protein*) o β -galactosidasa (*lacZ*), produjo embriones que expresaban en forma constitutiva estos transgenes. Esto significa que la cabezas de espermatozoides y el ADN exógeno lograron asociarse antes de la co-inyección, facilitando la inserción del transgén. En el caso de los experimentos con GFP, la eficiencia de la técnica llegó a un nivel aceptable de 20% de crías expresando el transgén. Gracias al uso de micropipetas con aperturas hasta 100 veces más grandes que las de microinyección pronuclear, este método de transgénesis por ICSI permitiría la microinyección de grandes construcciones de ADN, del tipo de los YAC's y BAC's. Si bien falta saber si estos resultados pueden ser reproducidos en forma eficiente, esta técnica sería de gran utilidad en aquellas especies de laboratorio (y domésticas) en las cuales la microinyección pronuclear de ADN no es aplicable. Otras técnicas alternativas de transgénesis fueron publicadas recientemente, pero se desconoce si pueden ser repetidas en forma eficiente¹.

8.4 La mutagénesis dirigida en el ratón

Como ya hemos visto, la tecnología de inyección de ADN nos permite analizar la función de los genes en el organismo (por sobre expresión), pero tiene la gran desventaja de no poder generar **genes nulos** (alelos recesivos en general) como los presentes en muchas de las enfermedades hereditarias humanas y animales. Esta limitación fue superada con el advenimiento de la denominada **mutagénesis dirigida** (en inglés, *gene targeting* o *targeting mutagenesis*), la cual fue posible gracias a la combinación de técnicas que se fueron desarrollando en forma independiente, como el cultivo de células embrionarias, la manipulación de quimeras y la recombinación homóloga del ADN. Hasta el día de hoy, este proceso está disponible solamente para el ratón. Esta limitación se debe a que el ratón es la única especie en la cual se pueden derivar células embrionarias pluripotenciales (células ES) y generar mutaciones heredables.

¹ Se ha publicado recientemente una técnica sencilla para generar ratones transgénicos. La misma podría llegar a ser interesante para aquellos países en vías de desarrollo que no cuentan con estructuras ni presupuestos apropiados para la técnica clásica de microinyección. Se trata de la posibilidad de inyectar ADN directamente en el tracto reproductivo del macho antes de la cópula. Esta técnica fue presentada por E. Huguet y P. Esponda del centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, España. En sus trabajos, los investigadores inyectaron un plásmido con la secuencia de la GFP dentro de los vasos deferentes y los machos fueron puestos con hembras en estro con fines de fecundarlas en forma natural. De los 53 ratones nacidos de esas hembras, 4 fueron hallados positivos al genotipado por PCR para secuencias específicas de la GFP. Estos animales positivos al PCR mostraron además expresión de la proteína GFP en varios tejidos, evidenciada por la presencia de fluorescencia en los citoplasmas.

Esta tecnología relativamente nueva permite a los investigadores crear mutaciones específicas (ya sean nulas o no) en cualquier gen que esté clonado. De la misma manera que en los animales transgénicos, estas mutaciones generadas *in vitro* serán incorporadas a la línea germinal para obtener líneas de ratones mutantes [generalmente animales **knock outs** (KO) que no expresan el gen en cuestión] que serán estudiados para encontrar pistas de la función del gen. Por todo lo dicho, es fácil entender por qué, en los comienzos del nuevo milenio, los investigadores y encargados de animalarios se enfrentan al problema (fundamentalmente de espacio y manejo) de la gran expansión en la producción de ratones KO. Existen varias bases de datos donde se puede consultar las líneas desarrolladas en todo el mundo y sus usos potenciales (ver Anexo III). Algunos de los principales modelos murinos generados por transgénesis dirigida serán vistos en más detalle en el Capítulo IX.

8.4.1 Cultivo de células primordiales embrionarias –células ES–

Existe hoy en día un gran interés en estos cultivos debido a las ventajas que presenta la creación de animales genéticamente manipulados utilizando células transformadas previamente *in vitro*. Las células ES se mantienen en cultivos permanentes, conservando su característica de pluripotenciales, siendo blanco para la introducción –o modificación– de genes por métodos de **transfección**. De esta manera se pueden seleccionar y clonar aquellas células que expresen las características requeridas, previamente a la inoculación del embrión. Este sistema es potencialmente el más adecuado para la creación de animales KO, pero es técnicamente más difícil que la microinyección de ADN en el pronúcleo. Una de las dificultades de esta técnica es que, como consecuencia de la introducción de las células ES en estadios multicelulares del embrión (blastocito), se debe trabajar con “**quimeras**” en las cuales sólo una parte de sus células (las provenientes del cultivo ES) portará el gen mutado y, por lo tanto, no siempre tendrán el gen en cuestión incorporado a la línea germinal. Posteriormente, los animales que portan el gen modificado en la línea germinal son cruzados en busca de una progenie derivada enteramente del genotipo de las células ES transfectadas.

Los cultivos de células ES fueron aislados en la década de 1980 a partir de embriones en estado de blastocito (4-5 días de gestación). Sin embargo, y a pesar del extenso uso, es poco lo que se sabe acerca de su origen y biología. Hoy en día, las células ES se pueden obtener de tres formas: (i) a partir de blastocitos intactos, (ii) utilizando sólo la masa celular interna (en inglés, *inner-cell mass*, ICM) y (iii) de la disociación de una mórula (embrión de 3 días). Estudios recientes han permitido establecer que las células ES se originan particularmente del ectodermo primitivo (**epiblasto**). Con este conocimiento, algunos investigadores obtienen un mayor rendimiento de células ES realizando microcirugía a los blastocitos para separar el epiblasto. Es imprescindible destacar que las células ES deben tener la capacidad de colonizar la línea germinal de los blastocitos en los cuales serán reimplantados (futura quimera). Otro detalle importante a tener en cuenta antes de realizar la manipulación *in vitro* de las células ES, es asegurarse de que la capacidad pluripotencial de estos cultivos está intacta. Luego de varios pasajes *in vitro*, estas células pueden perder esta capacidad esencial (lo ideal es trabajar con cultivos de células ES que tengan entre 10 y 20 pasajes).

Lamentablemente, el nivel de eficiencia de producción de cultivos de células ES a partir de embriones es bastante bajo (un 30% de eficiencia es considerado como bueno) y además se encuentra restringido a sólo algunas líneas de ratones: en primer lugar, la línea 129 y, en segundo lugar, la línea C57BL/6. El conjunto de sublíneas agrupadas bajo el nombre genérico de 129 merece un párrafo aparte ya que se trata de la fuente de la mayoría de las células ES. Tienen la particularidad de formar un grupo muy heterogéneo de sublíneas que incluye hasta diferentes colores del pelaje. La sublínea 129X1/SvJ es albina (o chinchilla) al igual que 129P3. Otras sublíneas, también utilizada para la obtención de células ES, son de color agutí, en particular las que pertenecen al denominado grupo *steel* (129S1, 129S2, 129S3, 129S4, 129S5, 129S6, 129S7 y 129S8). Debido a estas variantes y problemas de contaminación genética es que se ha revisado –y modificado– toda la nomenclatura de este grupo de sublíneas, la información detallada puede encontrarse en Internet (http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strain_129.shtml). Algunos ejemplos de líneas celulares ES derivadas de ratones 129 son: HM-1, mEMS32, D3, J1 y AB1.

Hace ya más de una década que los científicos están buscando la manera de producir células ES de otras especies (de laboratorio y de producción), y si bien se han aislado algunas líneas ES, ninguna ha pasado la etapa crítica de llevar la mutación generada *in vitro* a la línea germinal de un animal vivo.

8.4.2 La recombinación homóloga

La recombinación de secuencias homólogas de ADN dentro de las células es un fenómeno muy estudiado en biología (especialmente en levaduras) y está asociado, en particular, al intercambio recíproco de segmentos de ADN entre cromosomas homólogos durante la meiosis. Se trata del intercambio de segmentos –por un sistema de corte y pegado– que se puede producir entre dos cadenas de ADN con secuencias homólogas. Durante mucho tiempo se pensó que este fenómeno natural podría servir para crear líneas celulares o animales de laboratorio que conlleven modificaciones en un gen predeterminado (mutagénesis dirigida).

Para lograr transferir un gen clonado (modificado) al genoma de una célula es necesaria la **recombinación homóloga** entre las secuencias de ADN presentes en los cromosomas y el ADN clonado introducido en dichas células. Por lo tanto, debe quedar claro que uno de los requisitos indispensables de este proceso es el conocimiento de la secuencia del gen que se desea modificar, en otras palabras, sólo podremos realizar ratones KO para aquellos genes que se encuentren clonados. La primera descripción del uso de la recombinación homóloga en células ES se remonta al año 1987. En dicha oportunidad, Mario Capecchi y sus colegas lograron inactivar (mutar) el gen *Hprt* en células ES de ratón.

Básicamente, la recombinación homóloga entre una molécula lineal de ADN (diseñada en el laboratorio) y el ADN cromosómico puede ocurrir en dos formas alternativas: (i) **reemplazo**

de la secuencia genómica por la secuencia artificial (acareada por un vector) —sin duplicación— o (ii) **inserción** del vector dentro del gen diana con la consiguiente duplicación de la región de homología (Figura 8.6). Como veremos más adelante, el primer camino es el más empleado para la generación de ratones KO. Para ello se utiliza una “construcción” que tiene un gen marcador (normalmente el denominado *cassette neo*) flanqueado por dos zonas de

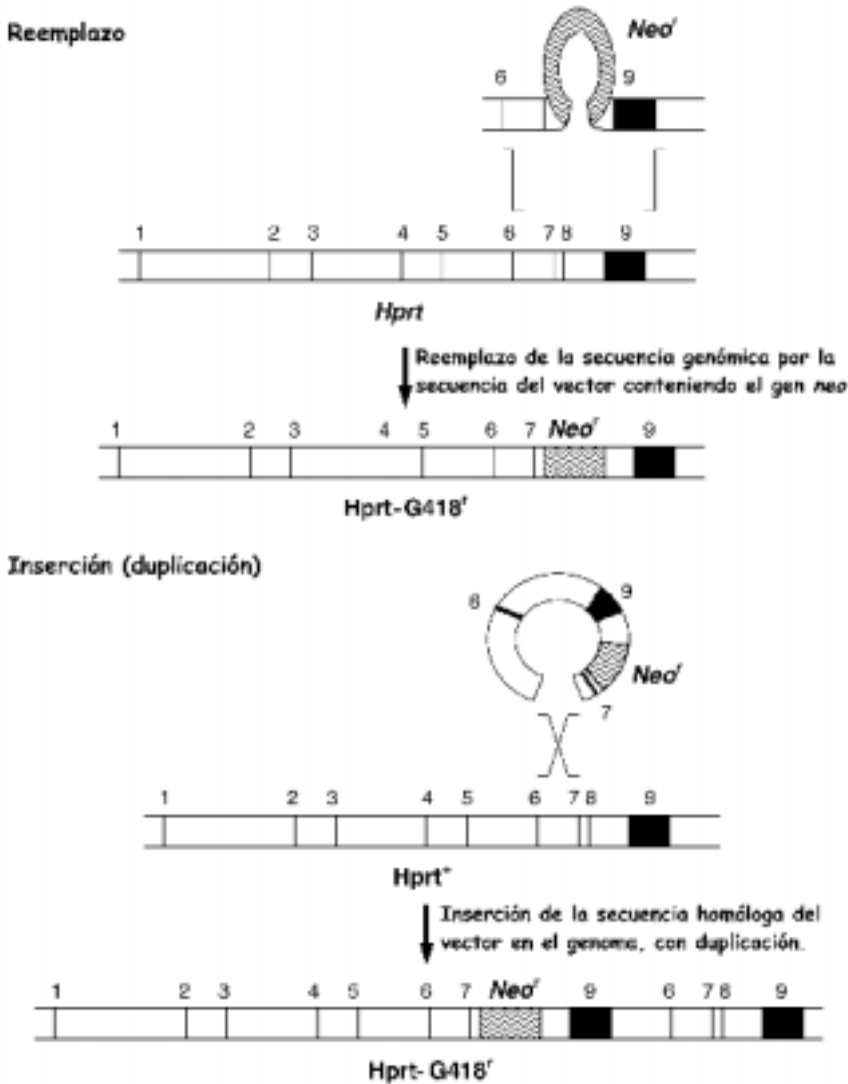


Figura 8.6. La recombinación homóloga. El diagrama muestra un ejemplo de los dos tipos de fenómenos que se dan en la recombinación homóloga (reemplazo e inserción). En este caso, el gen diana es el *Hprt* (Capecchi, 1989). Los dos vectores contienen secuencias *Hprt* interrumpidas por el gen *neo* en el exón 8. Para más detalles ver el texto.

homología. En cambio, el segundo tipo de evento es utilizado en el método “*hit and run*”, diseñado para incorporar cambios sutiles en el gen diana. Finalmente, es esencial subrayar que la longitud de la región de homología en la secuencia experimental (dentro del vector) es un factor muy importante a la hora de evaluar la frecuencia de inserciones o reemplazos exitosos (entre 5 y 10 kb de homología es una buena medida).

8.4.3 Creación de ratones knock-out (KO)

Para crear líneas de ratones que porten una mutación nula se debe seguir una serie de pasos (Figura 8.7):

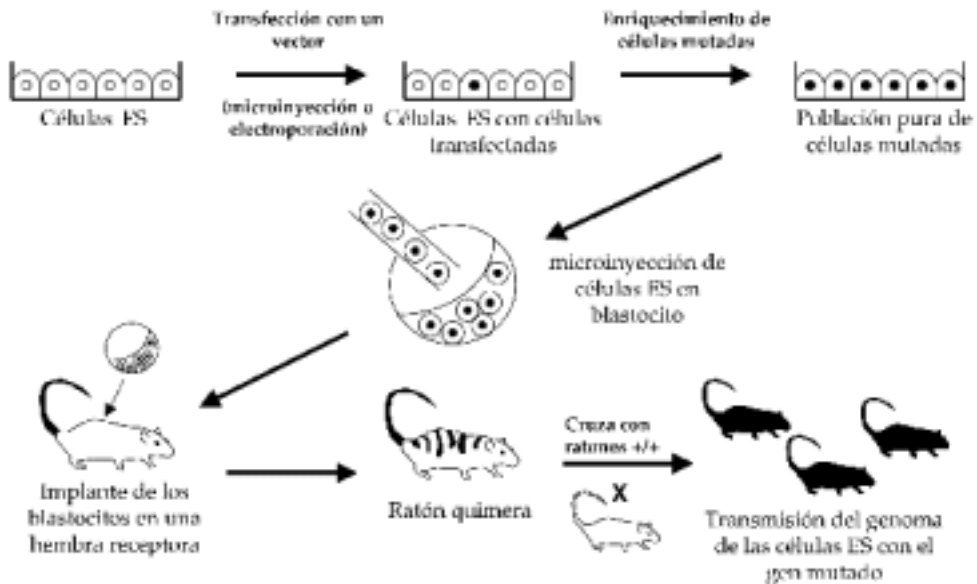


Figura 8.7. Mutagénesis dirigida. El diagrama esquematiza los pasos involucrados en la realización de una línea de ratones KO. Se debe calcular que el tiempo requerido para un proyecto de esta naturaleza es de entre nueve meses y un año. Para más detalles ver el texto.

Primero, se debe diseñar un vector que contenga al gen de interés cuya secuencia haya sido interrumpida por un marcador de **selección positiva**. Normalmente se utiliza al gen de origen bacteriano *neo*, el cual ofrece resistencia contra el antibiótico Neomicina (G418^r) a las células que lo expresan. Además, es muy común el uso de un segundo marcador de selección, en este caso negativo, flanqueando la secuencia del gen con el fin de enriquecer la reacción con eventos de mutagénesis dirigida. Uno de los marcadores de **selección negativa** más utilizados es el gen timidina quinasa del virus herpes (*HSV-tk*). La razón del uso de estos marcadores ne-

gativos es que aquellos eventos de integración al azar (no por secuencias homólogas) incorporarán toda la construcción de ADN (incluido el marcador de selección negativo) y la expresión de la timidina quinasa eliminará esa colonia de células.

Todo este proceso de selección positiva/selección negativa puede aumentar hasta 20 veces la eficiencia del sistema y de hecho es empleado de rutina por los laboratorios. Como hemos visto en la sección de transgénicos, aquí también se pueden usar genes reporteros (como *lacZ* o la proteína fluorescente verde GFP) para rastrear el destino de las células ES en las quimeras o para localizar los lugares de expresión del gen mutado. Con respecto al origen del gen clonado se recomienda especialmente usar ADN proveniente de la misma línea que generó las células ES. En otras palabras, los porcentajes más altos de reemplazo por recombinación homóloga se obtienen cuando el ADN a incorporar es isogénico al ADN blanco de la integración (en este caso el de las células ES). Como muestra de este fenómeno podemos señalar que los ensayos de mutagénesis dirigida con el gen *Rb* (en células ES 129) fueron 20 veces más eficientes al usar construcciones de ADN de origen 129 que de BALB/c. Esta observación dio lugar a la idea de utilizar células ES derivadas de C57BL/6 que son luego inyectadas en blastocitos de ratones C57BL/6-*Tyr^c* (una línea congénica de C57BL/6 que porta el alelo albino y por lo tanto es de color blanco). De esta manera, los ratones quimera son fácilmente reconocibles y la eficiencia de reemplazo por recombinación homóloga se ve mejorada por tratarse de ADN isogénico.

El segundo paso es la introducción del vector en un cultivo de células ES por medio de técnicas de transfección. Seguido, se debe realizar la selección de aquellas células en las cuales el marcador de selección positivo haya quedado integrado en el genoma, pero sin incluir al marcador negativo que flanqueaba la secuencia del gen.

El tercer paso es la identificación de aquellas células ES que hayan integrado el vector por medio de recombinación homóloga. Esto es para asegurarse que el vector se insertó (o reemplazó) en el gen de interés y no en cualquier sitio del genoma (al azar) por eventos muy comunes que no involucran recombinación homóloga.

Una vez identificados los clones que portan la mutagénesis dirigida, el cuarto paso es la producción de embriones quiméricos por medio de la inyección de las células ES seleccionadas (entre 10 y 20 células) en la cavidad de un blastocito (**Figura 8.8**). La elección de la línea dominante del blastocito (normalmente C57BL/6) es importante, ya que debe favorecer el crecimiento de las células ES inyectadas (las líneas consanguíneas son la mejor opción) y debe permitir la visualización de dos colores en el pelaje de las quimeras [por ejemplo: 129S (aguti); C57BL/6 (negro)]. Como en el caso de los transgénicos, aquí también se necesita un laboratorio equipado con pipetas de sujeción de embriones, micromanipuladores y microscopio invertido. Existen otras alternativas como ser la inyección de mórulas (embriones en estadio de 8 células), e inclusive la agregación directa de las células ES con células de una mórula (en este último caso, luego de haber removido la zona pelúcida). Estos embriones –luego de un corto período de incubación de 2 ó 3 horas– serán transplantados en una hembra receptora pseudopreñada para obtener ratones quiméricos (**Figura 8.9**).

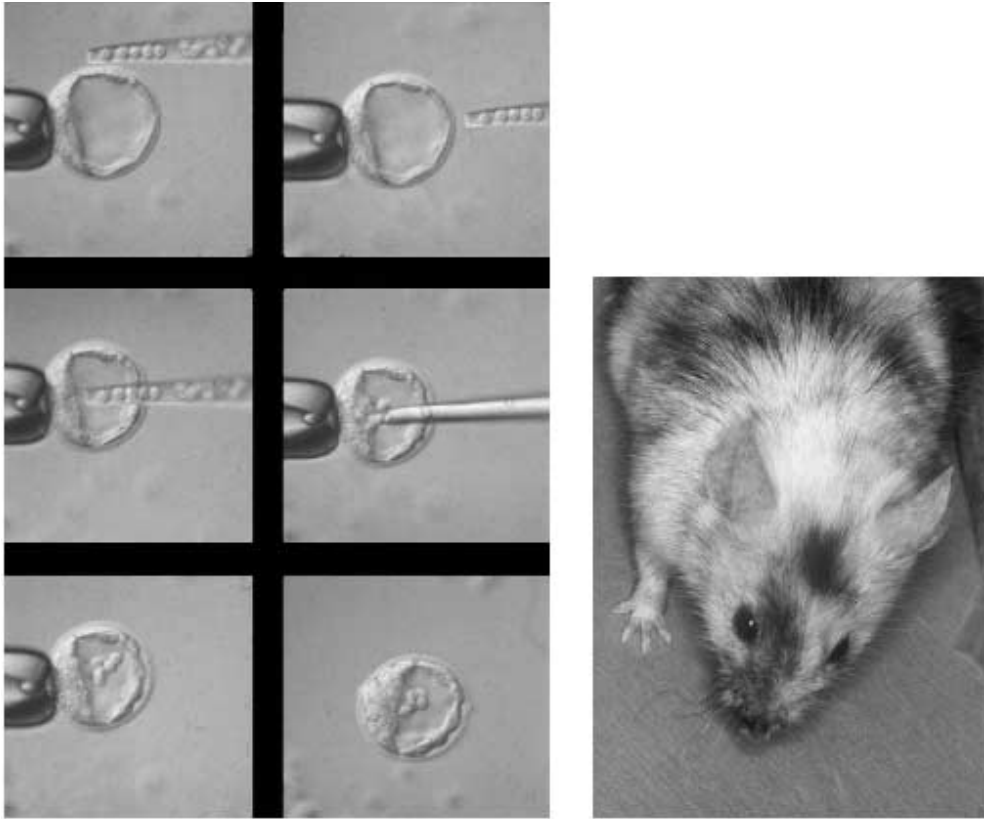


Figura 8.8. Mutagénesis dirigida. La secuencia fotográfica de la izquierda muestra la inoculación de células ES (manipuladas *in vitro*) dentro de la cavidad de un blastocito receptor (observar a la izquierda la pipeta de sujeción por vacío) con el fin de generar ratones quiméricos portando una mutación dirigida. A la derecha se muestra un ratón quimera. El "marmolado" en el color del pelaje se debe a que este animal está formado por un agregado de células originadas de líneas con diferente color de pelaje. Fotos cortesía del Dr. Charles Babinet, Biologie du Développement, Institut Pasteur, París, Francia.

Finalmente, el éxito del proceso estará dado por la incorporación del gen mutado a la línea germinal de un ratón, lo que permitirá desarrollar líneas de ratones KO, tanto heterocigotas como homocigotas. Recordar que las líneas de células ES son, en su mayoría, XY, por lo tanto se cruzarán sólo los machos quiméricos. Este proceso, o parte del mismo, es ofrecido por muchas compañías de perfil comercial (ver Anexo III) y además existen varios manuales con los protocolos detallados (ver Bibliografía General). Es fundamental entender que este sistema no es infalible y que existe la posibilidad de que durante el proceso se generen alelos que tengan una expresión residual (en vez de nula) o que el gen mutado haya ganado una función nueva. Además de la posibilidad de generar ratones KO o nulos (lo que en la jerga se dice: noquear al gen), existen variantes de la técnica de recombinación homóloga (*hit and run*) que sirven para incorporar cambios sutiles en un gen de interés (en inglés, *knocking in*). Por ejem-

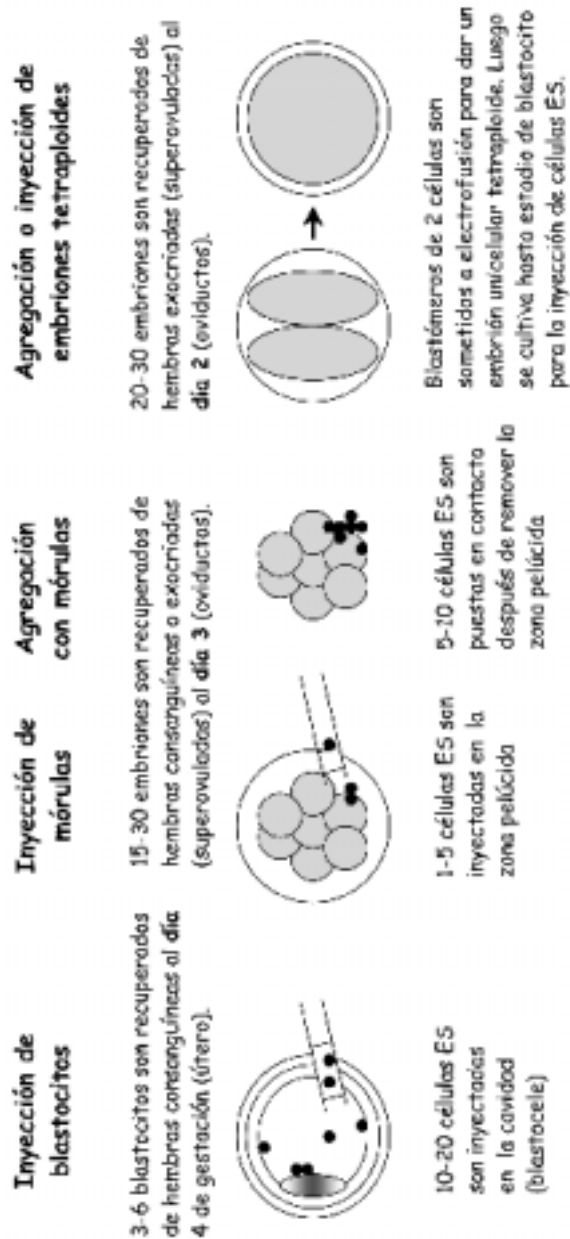


Figura 8.9. Generación de ratones quimera. Métodos usados para generar quimeras utilizando células ES y embriones receptores. Las células ES pueden ser inyectadas en blastocitos (o mórulas) o simplemente agregadas a las células de una mórula una vez removida la zona pelúcida. Los embriones tetraploides pueden ser usados también para la inyección –o agregación– de células ES, con una mayor proporción de embriones derivados totalmente de las células ES. Para más detalles ver el texto.

plo, podemos crear mutaciones puntuales en la secuencia del gen blanco seleccionando eventos de recombinación entre cromosomas homólogos que hayan eliminado el marcador de selección pero hayan dejado atrás la forma mutada del gen. En este caso, se reemplaza el gen original por la copia modificada del gen, pudiéndose diseccionar la función que desempeñan distintas partes (o dominios) de la proteína codificada por ese gen.

Nomenclatura de los KO

Básicamente, la nomenclatura del alelo nulo (KO) consiste en el nombre del gen (recordar que en el ratón y la rata va siempre en *cursiva*) más el agregado (en superíndice) de las letras *tm* (*targeted mutation*), seguido del número de la línea de ratones y del código del laboratorio o investigador (ver Capítulo IV). Por ejemplo, *Tcrb^{tm1Mom}* es la primera línea de ratones KO para el gen del receptor de linfocitos T (TCR) cadena β desarrollada por el laboratorio del Dr. Peter Mombaerts (código: Mom) en *Rockefeller University, New York*. El fondo genético de la línea debe indicarse como lo hemos visto para los transgénicos:

- (i) Si el KO ha sido incorporado a otro fondo genético por medio de la creación de una línea congénica, la nomenclatura será por ejemplo B6.129P-*Tcrb^{tm1Mom}*, o sea una línea congénica de fondo C57BL/6 a la cual se le incorporó la mutación nula del gen *Tcrb* más un segmento de ADN perteneciente a la línea (cultivo ES) donde se realizó la recombinación homóloga, en este caso 129P.
- (i) Si los animales tienen un fondo genético mezclado y no se ha desarrollado una verdadera línea congénica se deben colocar ambos fondos genéticos separados por punto y coma: B6;129P-*Tcrb^{tm1Mom}*.

8.4.4 El uso de recombinasas sitio-específicas para generar ratones KO condicionales

La llegada de las **recombinasas sitio-específicas** ha dado un giro drástico en la manipulación experimental del genoma del ratón gracias a la posibilidad de crear ratones KO en forma condicionada a un tejido (**KO condicional-tisular**), o a un momento del desarrollo específico (**KO condicional-temporal**). Los trabajos de B. Sauer y S. O’Gorman a fines de la década de 1980 y principios de 1990, fueron cardinales para el desarrollo de este sistema. En particular, estamos hablando de las enzimas **Cre** (del virus bacteriófago P1) y **Flp** (obtenida de un plásmido de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*). Ambas reconocen una secuencia específica de 34 pb, conocida como **loxP** (en el caso de Cre) y **fRT** (en el caso de la enzima Flp). Estas recombinasas realizan un trabajo de “corte y pegado” siempre que se encuentren con estas secuencias específicas. Es por eso que se pensó en incorporarlas a las construcciones de ratones KO como “tijeras moleculares” específicas de tejido y con la posibilidad de activarlas a voluntad (el sistema Cre-*loxP* se encuentra patentado por la empresa DuPont).

Básicamente, el tipo de recombinación dependerá de la orientación y localización de los sitios *loxP* o *frt*: (i) Cuando ambas secuencias se encuentran en la misma molécula lineal de ADN y con la misma orientación, el segmento de ADN entre los sitios será eliminado. (ii) Si los sitios específicos de corte están en la misma molécula pero con orientación invertida, se produce una inversión del segmento intermedio. (iii) Cuando las secuencias se encuentran en moléculas de ADN separadas el resultado es una translocación (**Figura 8.10**). Todas estas reacciones enzimáticas son reversibles y las recombinasas funcionan tanto *in vitro* como *in vivo* (y no requieren de ningún co-factor para activarse).

La estrategia para crear KO condicionales está fundada en el control espacial y/o temporal de las recombinasas sitio-específicas. Esto es posible gracias a la inserción de la secuencia específica (generalmente *loxP*) en las regiones flanqueantes –o en los intrones– del gen que queremos noquear. De este modo, la función del gen blanco no se ve alterada, o sea que el gen se expresa normalmente a pesar de la integración de la secuencia *loxP*, mientras no interaccione con la recombinasa Cre. A este nuevo alelo artificial del gen diana (generado *in vitro* por recombinación homóloga en células ES) se lo llama, en la jerga del laboratorio, alelo “floreado”.

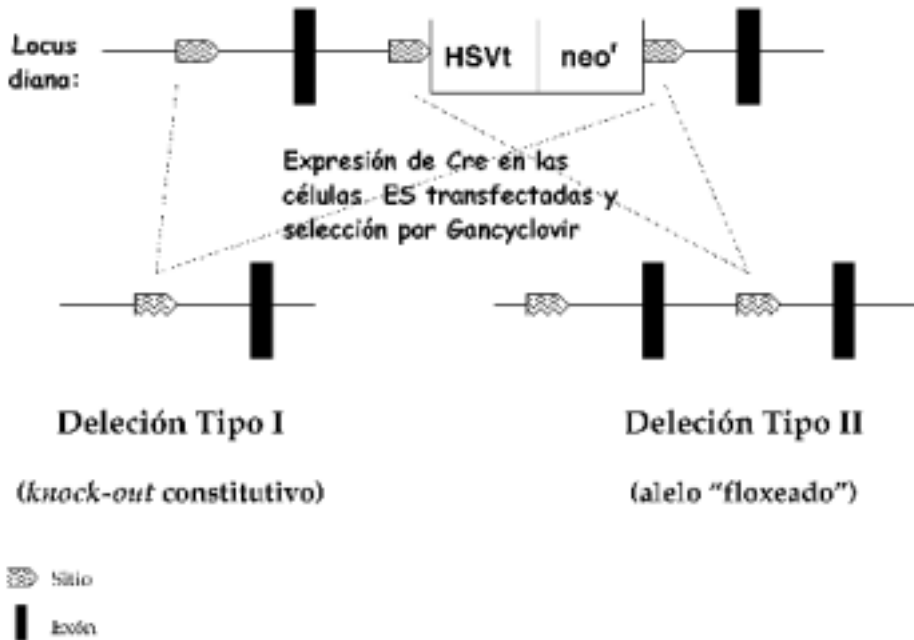


Figura 8.10. Sistemas Cre-*loxP*. Generación de un alelo “floreado” *in vitro* utilizando marcadores de selección. Por medio del uso de la recombinación homóloga (RH) se introducen marcadores positivos (*neo^r*) y negativos (*HSV-tk*) flanqueados por sitios *loxP* dentro de un intrón del gen diana. Se coloca además otro sitio *loxP* “*upstream*” o “*downstream*” de los exones. Luego de seleccionar para los marcadores positivos (hubo RH) las células ES son transfectadas para que expresen (en forma temporaria) la enzima Cre. La eliminación de los marcadores de selección por recombinación entre los sitios *loxP* da como resultado los dos tipos de deleción mostrados, siendo el tipo II el que nos interesa para crear un KO condicional. Adaptado de I. Jackson and C. Abbott, 2000.

El eje de la técnica se encuentra en poder manipular el lugar (tejido) y el tiempo (momento del desarrollo) para la expresión de la enzima Cre. En el primer caso, se producen ratones transgénicos (por la técnica clásica de microinyección pronuclear) que expresan la enzima Cre sólo en un tejido predeterminado (por medio del uso de promotores específicos de tejido). El paso final consiste en cruzar estos ratones transgénicos Cre (referidos en inglés como ratones “*deleters*”) con las líneas de ratones que acarrean los sitios *loxP* en el gen blanco (**Figura 8.11**). Luego de esta cruce, obtendremos una determinada proporción de ratones **bigénicos** (del inglés, *bigenic*) o **dobles mutantes** (Cre más gen floxeado), dependiendo del genotipo de las líneas parentales (si son ambas hemicigotas, *Cre/+* y *loxP/+*, obtendremos un 25% de ratones KO condicionales). La expresión de la enzima Cre en el tejido específico (determinado por el promotor elegido) hará que los sitios *loxP* realicen una recombinación dejando atrás una deleción, y por lo tanto un alelo nulo (KO) del gen en cuestión.

En el caso del KO condicional-temporal, se recurre al empleo de promotores “inducibles”. Entre los más destacados se encuentran los promotores inducibles por antibióticos (por ejemplo **tetraciclina** o su derivado **doxiciclina**) y aquellos inducidos por hormonas. En el primer caso, el sistema de expresión controlada por tetraciclina se conoce como *TET-system* y su uso se encuentra regulado por patentes comerciales. En el segundo caso, se trabaja con proteínas de fusión entre la enzima Cre y un receptor incompleto de estrógenos (sólo la porción EBD, *estrogen binding domain*). Esta proteína de fusión es inactiva, pero la administración de la droga **tamoxifeno** (por vía intraperitoneal) la libera y activa el sistema Cre. Por lo tanto, tendrá como resultado la acción de la recombinasa sobre los sitios específicos y la consiguiente recombinación de ADN con alteración del gen diana en los ratones *Cre/loxP* positivos. Es lógico pensar que la combinación de estas dos técnicas de KO condicionales (tisular-temporal) puede ser de gran provecho, como lo han demostrado usando promotores específicos de linfocitos B. En este caso, cruzaron ratones con un alelo floxeado de la polimerasa β con una línea de ratones transgénicos para la construcción Cre-EBD con un promotor específico de linfocitos B. El resultado es la expresión de la proteína de fusión sólo en este linaje celular. El agregado de la droga tamoxifeno libera la enzima Cre y produce la consiguiente deleción del gen de la polimerasa β en los linfocitos B.

Otro ejemplo reciente de estos métodos inducibles es el diseñado por Dennis Roop y colaboradores en el *Baylor College of Medicine, Houston*, Estados Unidos. Este sistema fue pensado para generar ratones KO específicos de la epidermis y utiliza una proteína de fusión Cre/receptor truncado de progesterona (PR1). Esta proteína de fusión CrePR1 es paradójicamente activada por los antagonistas de la progesterona como RU486 o su análogo ZK98.734. Para dirigir la expresión de esta proteína a la epidermis, la proteína CrePR1 se une a un promotor específico de queratinocitos del estrato basal y los folículos pilosos (por ejemplo K14). Una vez que los ratones transgénicos K14CrePR1 son cruzados con la línea de ratones que porta el gen floxeado (para generar ratones doble transgénicos), basta una aplicación tópica del antagonista RU486 para generar un ratón KO específico de la epidermis.

Las posibilidades de crear modelos con el sistema *Cre/loxP* son enormes y no se limitan a los ratones KO condicionales; por ejemplo, se pueden introducir secuencias modificadas y origi-

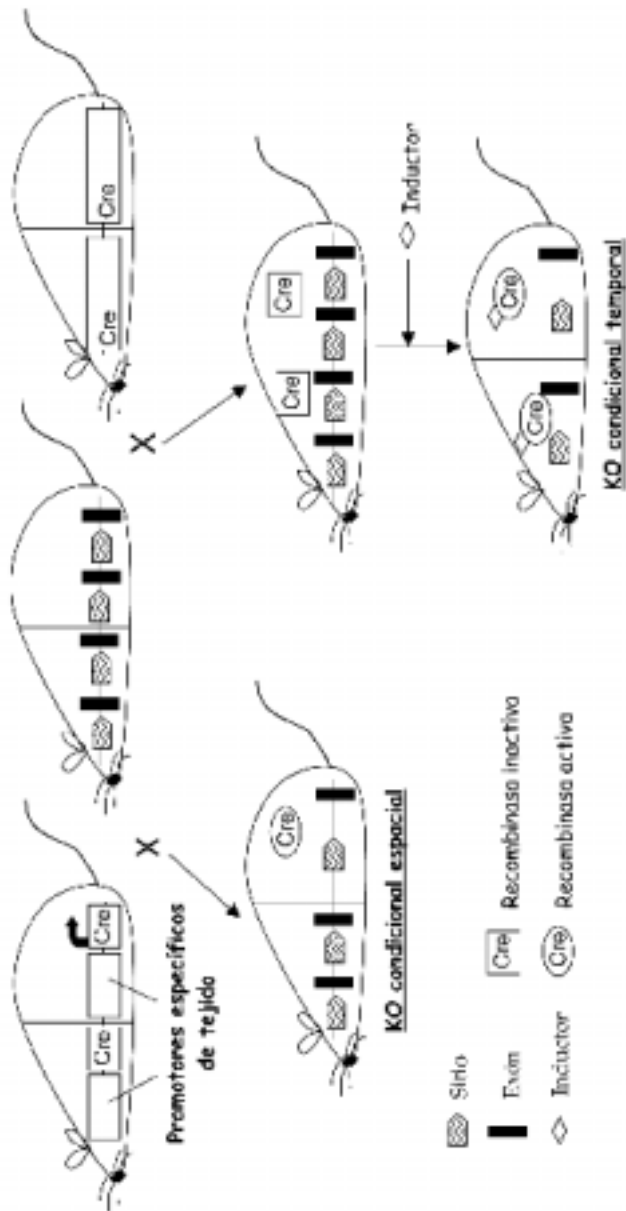


Figura 8.11. Ratones knock-out condicionales (espaciales o temporales). Un ratón que porta un gen “floxeado” (ratón del medio) es cruzado con un ratón transgénico para la recombinasa Cre con una expresión limitada a un tejido específico (izquierda). Las crías de esta cruce presentarán la delección del gen en el tejido predeterminado. Alternativamente, el ratón con el gen “floxeado” (medio) puede cruzarse con un transgénico de Cre (promotor ubicuo) que se expresará sólo ante la inoculación de un inductor químico. Adaptado de *I. Jackson and C. Abbott, 2000*.

nar la expresión de alelos mutados (*knock-in*). También es factible realizar ratones KO “clásicos”, es decir no condicionales, que lleven mutaciones “limpias”, de las cuales fueron eliminados los marcadores de selección. Otra virtud del sistema es poder producir deleciones, inversiones y translocaciones de grandes segmentos cromosómicos. Como veremos en el Capítulo IX, un ejemplo atrayente es la translocación entre el oncogén *Myc* y los genes de cadena pesada de las inmunoglobinas, realizada en 1995. Esta translocación generada por el sistema *Cre/loxP* reproduce aquellas que son producidas en los plasmocitomas humanos.

8.4.5 Influencia del fondo genético en los animales genéticamente modificados

Teniendo en cuenta que las metas fundamentales de la transgénesis y la mutagénesis dirigida son el análisis de la función de los genes y la creación de modelos animales, es esencial saber que el fondo genético de los animales manipulados puede hacer variar drásticamente el fenotipo. Como hemos visto, en la mutagénesis dirigida las quimeras son ratones con dos fondos genéticos (normalmente 129 y C57BL/6, en distinta proporción); lo mismo ocurre cuando se utilizan embriones híbridos F1 para la microinyección de ADN en pronúcleo. A estos ratones se los intercrusa con el propósito de obtener animales homocigotas KO o transgénicos. Esta nueva generación de ratones tendrá un fondo genético heterogéneo, lo que puede llevar a variaciones en el fenotipo, dependiendo del gen. Esto genera un problema a la hora de describir el fenotipo y también para elegir el control adecuado. Fueron los investigadores del área de la neurología y el comportamiento animal quienes primero percibieron la necesidad de atender este problema y de proponer soluciones. La manera de evitar esas variaciones fenotípicas es creando líneas de ratones congénicas para el transgén (o alelo nulo) en por lo menos dos fondos genéticos (líneas consanguíneas) distintos.

En el caso de las líneas transgénicas, una propuesta interesante es la retrocrusa sistemática contra los dos fondos genéticos involucrados en el embrión inyectado; es decir, la línea que donó los ovocitos, y aquella que donó los espermatozoides (si es que son distintas). Este último procedimiento permite obtener una línea coisogénica, ya que el fondo genético del macho es el mismo que aquel en el que se insertó el transgén (pronúcleo masculino). Por el otro lado, la línea congénica sobre fondo genético materno (con un segmento de la línea paterna portando el transgén) facilitaría la localización del transgén. El desarrollo de las líneas congénicas en sus versiones clásica y moderna –con la ayuda de marcadores moleculares (*speed congenic*)– fue visto en el Capítulo IV.

Como conclusión, podemos asegurar que el hecho de poder transferir genes clonados a las líneas germinales de animales de laboratorio ha afectado profundamente los estudios genéticos, abriendo nuevas oportunidades para la investigación básica y aplicada. La posibilidad de expresar los genes elegidos, así como la de generar mutaciones en genes preseleccionados (inclusive el tejido y el momento deseados), no sólo permite la derivación de modelos para enfermedades humanas sino que ha marcado el comienzo de una “disección genética” sistemática de los procesos del desarrollo que cambió el futuro de la genética experimental.

8.5 La clonación

El término clonar proviene del griego *klon* que significa brote o retoño. Por extensión, hoy se entiende por clon al grupo de individuos que derivan de un mismo ancestro, a través de una reproducción asexual.

8.5.1 Historia de la clonación

La **clonación**, entendida como reproducción asexual, se viene practicando en la agricultura desde hace siglos, como un método de propagación de plantas (multiplicación vegetativa). En cuanto a lo que nos interesa discutir en este capítulo, clonar significa obtener uno o varios individuos a partir de una célula somática (núcleo) de otro individuo, de modo que los individuos clonados sean idénticos al original. Como observación anecdótica, se sabe de la existencia de un mecanismo de clonación natural (llamado **poliembrionía**) en algunos mamíferos desdentados (orden Edentata) como los armadillos. En estas especies, las hembras obtienen de 4 a 8 crías derivadas todas de un único embrión original, por lo tanto son todas del mismo sexo, homocigotas o heterocigotas en los mismos loci y para los mismos alelos, además de ser histocompatibles (se trata de gemelos múltiples univitelinos). En una forma semejante, la producción experimental de gemelos univitelinos en bovinos, ovinos, conejos y macacos es conocida desde hace varias décadas, fundamentalmente por medio de la separación de células embrionarias en un estadio precoz del desarrollo (normalmente embriones de 2 a 4 células) y la reimplantación uterina de las mismas en hembras portadoras. En estas mismas especies, se produjeron también gemelos transplantando el núcleo de células embrionarias (tomados en estadios más avanzados) en **ovocitos enucleados**.

Los primeros trabajos experimentales de clonación fueron realizados por Robert Briggs y Thomas King (Estados Unidos) a principios de la década de 1950, utilizando ranas leopardo (*Rana pipiens*), seguidos por los trabajos de John Gurdon y colaboradores (1962) con la rana *Xenopus laevis*. Estas experiencias preliminares fueron todas realizadas con núcleos de células somáticas obtenidas de embriones (blastocitos) transplantados en el citoplasma de un ovocito maduro. De estas experiencias se concluyó que era efectivamente posible re-programar el núcleo de una célula somática y que las modificaciones sufridas por el ADN durante la diferenciación celular no eran irreversibles. No obstante, las células somáticas no podían proveer de núcleos capaces de dirigir el desarrollo embrionario completo hasta el estado adulto.

En el año 1996 fue publicado el primer reporte del nacimiento de crías viables de un mamífero (oveja) a partir de **transplante de núcleos** provenientes de una célula diferenciada. El grupo dirigido por Ian Wilmut en el *Roslin Institute* (Edimburgo, Escocia) usó una técnica en la cual las células epiteliales donantes de los núcleos (derivadas de una línea celular de origen embrionario) fueron llevadas al estado quiescente (en cultivos con sólo 0,5% de suero fetal bovino) antes de ser transplantadas a ovocitos enucleados. El mismo grupo logró, al año siguiente, el primer ma-

mífero clonado a partir de una célula somática adulta: la hoy internacionalmente famosa oveja *Dolly*. Esta vez, el grupo obtuvo corderos vivos a partir de células obtenidas de la glándula mamaria de una hembra adulta, además de células diferenciadas obtenidas de embriones (día 9) y fetos (día 26). Para lograr esto, las células donantes de los núcleos fueron previamente inducidas a abandonar el ciclo celular y entrar en el estadio G0 en un cultivo privado de suero. Luego, los núcleos de estas células fueron inoculados en ovocito de oveja (previamente enucleados), los cuales son activados por un impulso eléctrico e implantados en una tercera oveja (madre sustituta) para llevar la preñez a término. Así pues, *Dolly* carece de padre y es el producto de tres "madres": la donante del óvulo (citoplasma conteniendo el ADN mitocondrial), la donante del núcleo (ADN cromosómico), y la madre sustituta (no aporta material genético alguno). Sin embargo, la eficiencia del sistema es extremadamente baja, ya que *Dolly* fue el único nacimiento de los 277 embriones obtenidos por trasplante nuclear.

De estos resultados quedó claro que el ovocito posee un ambiente privilegiado que permite re-programar un núcleo transplantado que se encuentra en vías de diferenciación. Hasta el nacimiento de la oveja *Dolly*, sólo se conocía el desarrollo parcial (hasta el estadio de renacuajo) por trasplante de núcleos de **queratinocitos** en cultivo obtenidos de la piel de sapos adultos. Actualmente, el clonado de crías viables a partir de células somáticas diferenciadas (por métodos de trasplante nuclear) ha sido logrado en ovinos (1996), bovinos (1998), ratón (1998), cabra (1999), cerdo (2000), gato (2002), conejo (2002) caballo (2003) y mula (2003), incluyendo clones de ovejas transgénicas obtenidas a través de mutagénesis dirigida realizada sobre fibroblastos fetales. Muchos de estos animales clonados han manifestado anomalías en la placenta, crecimiento excesivo de los fetos y fallas respiratorias al nacer.

8.5.2 Métodos de clonación en el ratón

La primera experiencia de clonación en el ratón fue realizada en 1981 por Karl Illmensee y Peter Hoppe (*Bar Harbor*, Estados Unidos), inyectando núcleos provenientes de células de la masa celular interna (blastocito) dentro de ovocitos previamente enucleados (sin estimulación), lo que se conoce como **trasplante nuclear simple**. Estas experiencias permanecieron mucho tiempo sin poder ser reproducidas hasta que Y. Tsunoda y Y. Kato (1993) lograron repetirla, pero con un rendimiento de dos embriones vivos sobre 139 ovocitos tratados. Estos resultados demostraron que la clonación es posible en el ratón, siempre que los núcleos sean extraídos de embriones de 2 ó 4 células; ya que desde el estadio de 8 células en adelante, es prácticamente imposible obtener embriones viables. Esta observación no fue inesperada, ya que se sabe desde hace mucho tiempo que el genoma de los embriones de ratón empieza a expresarse en forma muy temprana (estadio de 2 células).

En el año 1998, el laboratorio liderado por Ryuzo Yanagimachi (*Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu*, Estados Unidos) obtuvo los primeros ratones vivos clonados a partir de un núcleo de célula somática adulta. La técnica de clonación de estos ratones difiere de los métodos usados para la oveja *Dolly*, donde las células donantes eran llevadas al estadio G0

por un cultivo deficiente en suero (lo que se creía era la llave del éxito). Estos experimentos incluyeron el trasplante de núcleos, provenientes de células de Sértoli, neuronas y células del cúmulo (*cumulus oophorus* del ovocito) de ratones híbridos B6D2F1 y B6C3F1, en ovocitos de ratón previamente enucleados. En este caso, las células no provenían de cultivos celulares, sino que fueron usadas inmediatamente después de haber obtenido el tejido de un ratón recién sacrificado y los núcleos fueron insertados en los ovocitos por microinyección, en lugar de electrofusión. Las células elegidas como donantes se encuentran normalmente en estadio G0, en el caso de las células de Sértoli y las neuronas, o en G0/G1, en el caso de las células del cúmulo. Los ovocitos transplantados fueron dejados entre 1 y 6 horas en cultivo (para permitir la condensación de los cromosomas) antes de ser activados en un medio con estroncio (Sr^{2+}) y citocalasina B. Este procedimiento se lo conoce, en conjunto, como **técnica Honolulu** y se cree que su éxito estaría asociado al paso de condensación de los cromosomas antes de la activación, un factor crítico en la re-programación del genoma dador luego del trasplante nuclear (**Figura 8.12**). Los ovocitos transplantados con núcleos de células de Sértoli y neuronas no llegaron a término (sólo lograron avanzar hasta el día embrionario 8,5), lo que demuestra que el estado G0 en la célula donante del núcleo no es suficiente *per se* para asegurar el desarrollo embrionario. Sólo los embriones generados a partir de núcleos provenientes de las células del cúmulo llegaron a término.

El primer ratón clonado nacido de estos experimentos fue una hembra (obviamente, como la dadora de los ovarios de donde se sacaron las células del cúmulo) que fue bautizada con el nombre de "Cumulina". Una vez más, la eficiencia del método es muy baja (alrededor del 2%), con una producción de 10 ratones viables a partir de 800 embriones transplantados. Cuando estas 10 hembras llegaron a la madurez sexual fueron acopladas con éxito con machos CD-1, demostrando ser fértiles. El mismo laboratorio ha intentado una serie de clonaciones sucesivas (clonar a partir de un ratón clon) con la misma técnica, obteniendo resultados interesantes con respecto a la eficiencia de la clonación y a la longitud de los telómeros. La clonación sucesiva fue posible pero la eficiencia (de por sí baja) cayó aún más en las sucesivas generaciones, llegando a ser casi imposible a partir de la generación 6 (G6), en la cual ningún ratón vivo fue obtenido de 724 ovocitos reconstituidos. Los ratones clonados no mostraron signos de envejecimiento prematuro ni acortamiento de los telómeros, evento normalmente asociado con el envejecimiento celular.

En un experimento posterior, los mismos investigadores de *University of Hawaii* clonaron ratones machos a partir de núcleos obtenidos de células de una punta de cola (fibroblastos) obtenida de un ratón B6C3F1. En este caso, sólo tres animales de 274 ovocitos reconstituidos (1%) llegaron a término, aunque uno sólo sobrevivió hasta ser un adulto fértil. De esta manera demostraron que la clonación no estaba limitada a células obtenidas de hembras. En el año 2002, estos investigadores publicaron hallazgos muy interesantes relacionados a la longevidad y la salud de los ratones clonados. Los mismos presentaron una longitud de vida acortada, en comparación con los animales control del mismo sexo y genotipo (las muertes empezaron desde los 10 meses de edad), particularmente debido a fallas hepáticas y neumonía; además de mostrar características de obesidad (porcentajes altos de grasa corporal y altos niveles de insulina y leptina).

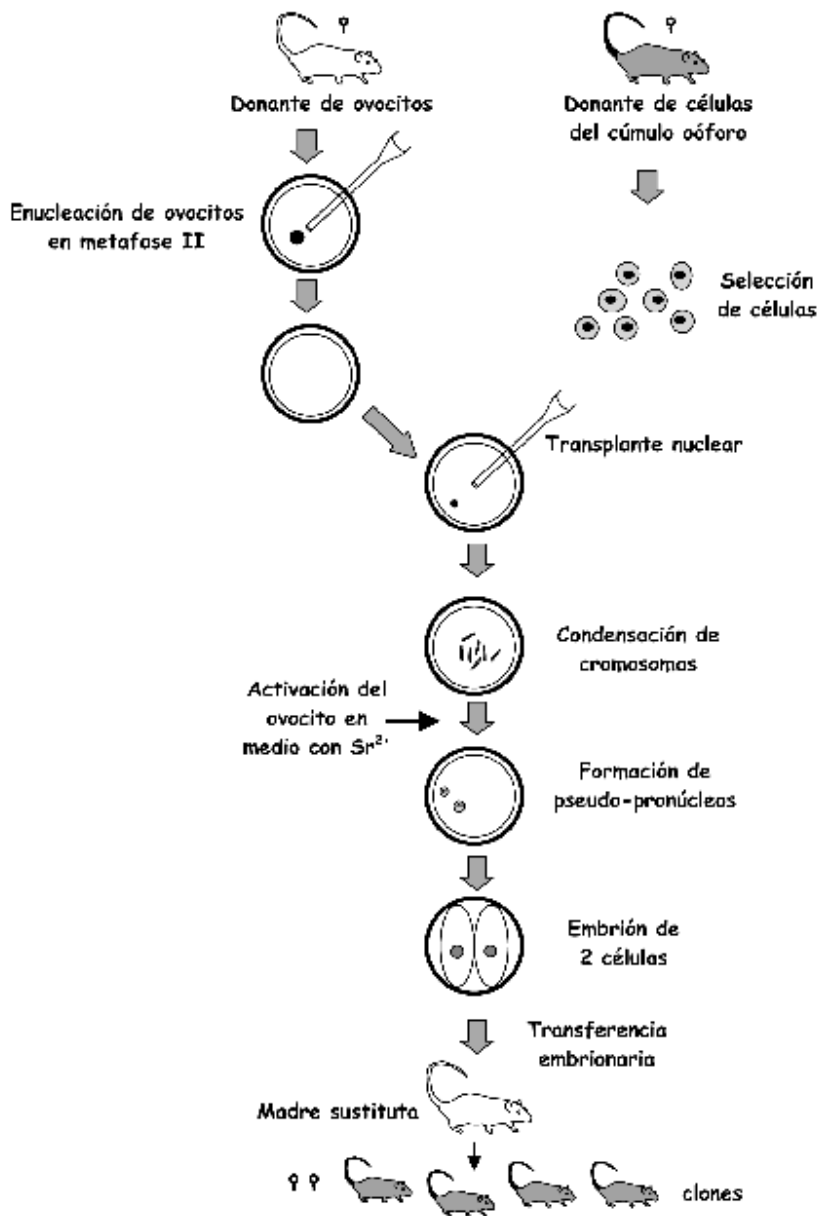


Figura 8.12. La clonación de células somáticas. Método de clonación por trasplante de núcleos usado por R. Yanagimachi y colaboradores (técnica Honolulu). La primera clonación de ratones, lograda en 1998 por este grupo, fue realizada a partir de núcleos de células somáticas del *cumulus oophorus* de un ovocito. Para más detalles ver el texto.

En el ratón, una de las variantes más prometedoras es la clonación a partir de núcleos obtenidos de células ES en cultivo. En el año 1999, el equipo del Ryuzo Yanagimachi pudo clonar ratones viables a partir de células ES, a pesar de ser células que no pueden ser inducidas a entrar en la fase G0/G1. También observaron diferencias en la eficiencia de la técnica según la línea utilizada como dadora de núcleos. Rudolf Jaenisch (*Cambridge, Massachusetts*, Estados Unidos) y colaboradores compararon la eficiencia (como dadoras de núcleos para la clonación) de líneas ES derivadas de híbridos (129B6F1) y de la línea consanguínea 129. Las líneas de origen híbrido demostraron una mejor eficiencia que aquellas de origen 129, y a su vez, ambas mostraron una eficiencia muy superior a la clonación con células somáticas (debido quizás a la conocida pluripotencia de las células ES). El mismo laboratorio logró clonar células ES manipuladas genéticamente, observación que abrió las puertas a la posibilidad de clonar ratones genéticamente modificados.

El mismo laboratorio dirigido por R. Jaenisch está actualmente trabajando en la posibilidad de usar una técnica para derivar ratones a partir de células ES que no usa trasplante nuclear. Se trata de la obtención de ratones por medio de la **complementación de embriones tetraploides**. Estos embriones tetraploides se obtienen por electrofusión de dos embriones (en el estadio de dos células), lo que genera un nuevo embrión unicelular con doble grupo cromosómico ($4n$, o tetraploide). Los blastocitos de estos embriones tetraploides son incapaces de completar un desarrollo completo en forma independiente, pero cuando son inoculados con células ES normales ($2n$, diploides), apoyan el desarrollo de un ratón derivado enteramente de las células ES (**Figura 8.9**). Como se puede ver, esto permitiría generar ratones manipulados genéticamente (por ejemplo, mutagénesis dirigida), sin la necesidad de pasar por el uso de ratones quimera. Hasta el momento la eficiencia es muy superior cuando se utilizan embriones tetraploides y células ES derivadas de ratones híbridos F1.

8.5.3 Relevancia de la clonación para los roedores de laboratorio

Siendo que las líneas consanguíneas de ratones (ver Capítulo IV) existen desde hace más de 80 años, la producción de clones de ratón no presenta ninguna ventaja adicional, menos aún siendo una técnica todavía muy ineficiente. El interés principal estaría en estudiar la evolución del potencial de las células embrionarias durante el desarrollo. Básicamente, la clonación de un organismo mamífero presenta tres áreas de interés:

- (i) Es una experiencia biológica que permite responder preguntas relativas a los mecanismos genéticos implicados en la diferenciación celular. Fundamentalmente, nos preguntamos si los núcleos de las células somáticas poseen aún toda la información genética propia de la especie y si son capaces de reprogramarse. Efectivamente, las experiencias de clonado han demostrado las cualidades excepcionales que posee el citoplasma de los ovocitos que permite, bajo ciertas circunstancias, el desarrollo de un embrión completo a partir del núcleo de una célula diferenciada. En segundo lugar, quedó comprobado que la impronta (del inglés *imprinting*) genómica no es un obstáculo para este tipo de experiencias.

- (ii) Permite aumentar en forma rápida la producción de animales de una constitución genética interesante. Al día de hoy, siendo el rendimiento de la clonación muy pobre y sus costos prohibitivos, no se justifica su utilización para la producción de animales de experimentación ni de producción. En la mayoría de los casos, los métodos de reproducción asistida (ver Capítulo II) son una mejor opción. Además, para que una característica genética sea explotada, es necesario que se encuentre fijada en una línea de laboratorio (o raza, en el caso de animales de producción). En el caso de los animales de interés zootécnico, la única implementación valiosa de la clonación está en la producción de grandes cantidades de animales transgénicos.
- (iii) Permite reconstituir un embrión a partir del núcleo de células ES manipuladas in vitro. Uno de los mejores argumentos para continuar las experiencias de clonado en el ratón es sin dudas la clonación de células ES.

Bibliografía General

- ANDERSEN JK. *Genetically engineered mice and their use in aging research*. Molecular Biotechnology 19: 45-57, 2001.
- BABINET C. *Transgenic mice: an irreplaceable tool for the study of mammalian development and biology*. Journal of the American Society of Nephrology 11 (supplement 16): 88-94, 2000.
- BABINET C, COHEN-TANNOUDI M. *Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology*. Anais da Academia Brasileira de Ciências 73: 365-383, 2001.
- BERTON TR, WANG XJ, ZHOU Z, KELLENDONK C, SCHUTZ G, TSAI S, ROOP DR. *Characterization of an inducible, epidermal-specific knockout system: differential expression of lacZ in different Cre reporter mouse strains*. Genesis 26: 160-161, 2000.
- BISHOP JO, P SMITH. *Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA*. Molecular Biology and Medicine 6: 283-298, 1989.
- BRADLEY A, EVANS M, KAUFMAN MH, ROBERTSON E. *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. Nature 309: 255-256, 1984.
- BRINSTER RL, CHEN HY, TRUMBAUER M, SENEAR AW, WARREN R, PALMITER RD. *Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs*. Cell 27: 223-231, 1981.
- BRINSTER RL, CHEN HY, TRUMBAUER ME, YAGLE MK, PALMITER RD. *Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs*. Proceedings of the National Academy of Science USA 83: 4438-4442, 1985.
- BRINSTER RL, ALLEN JM, BEHRINGER RR, GELINAS RE, PALMITER RD. *Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice*. Proceedings of the National Academy of Science USA 85: 836-840, 1988.
- CAPECCHI MR. *Altering the genome by homologous recombination*. Science 244: 1288-1292, 1989.
- CAPECCHI MR. *The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting*. Trends in Genetics 5: 70-76, 1989.
- COHEN-TANNOUDI M, BABINET C. *Beyond 'knock-out' mice: new perspectives for the programmed modification of the mammalian genome*. Molecular Human Reproduction 4: 929-938, 1998.
- COSTANTINI F, LACY E. *Introduction of a rabbit beta-glo-*

- bin gene into the mouse germ line.* Nature 294: 92-94, 1981.
- DOETSCHMAN T, GREGG RG, MAEDA N, HOOPER ML, MELTON DW, THOMPSON S, SMITHIES O. *Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells.* Nature 330: 576-578, 1987.
- EGGAN K, AKUTSU H, HOCHEDLINGER K, RIDEOUT W 3RD, YANAGIMACHI R, JAENISCH R. *X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos.* Science 290: 1578-1581, 2000.
- EGGAN K, AKUTSU H, LORING J, JACKSON-GRUSBY L, KLEMM M, RIDEOUT WM 3RD, YANAGIMACHI R, JAENISCH R. *Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation.* Proceedings of the National Academy of Science USA 98: 6209-6214, 2001.
- EGGAN K, RODE A, JENTSCH I, SAMUEL C, HENNEK T, TINTRUP H, ZEVNIK B, ERWIN J, LORING J, JACKSON-GRUSBY L, SPEICHER MR, KUEHN R, JAENISCH R. *Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation.* Nature Biotechnology 20: 455-459, 2002.
- GORDON JW, SCANGOS GA, PLOTKIN DJ, BARBOSA JA, RUDDLE FH. *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA.* Proceedings of the National Academy of Science USA 77: 7380-7384, 1980.
- GOSSLER A, DOETSCHMAN T, KORN R, SERFLING E, KEMLER R. *Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines.* Proceedings of the National Academy of Science USA 83: 9065-9069, 1986.
- HAMMER RE, MAIKA SD, RICHARDSON JA, TANG JP, TAURROG JD. *Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human b2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders.* Cell 63: 1099-1112, 1990.
- HANAHAH D. *Transgenic mice as probes into complex systems.* Science 246: 1265-1275, 1989.
- HOGAN B, BEDDINGTON R, COSTANTINI F, LACEY E (Eds). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (2nd Edition).* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994.
- HUGUET E, ESPONDA P. *Generation of genetically modified mice by spermatozoa transfection in vivo: Preliminary results.* Molecular Reproduction and Development 56: 243-247, 2000.
- HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, HOCHEDLINGER K, RIDEOUT WM 3RD, BINISZKIEWICZ D, YANAGIMACHI R, JAENISCH R. *Epigenetic instability in ES cells and cloned mice.* Science 293: 95-97, 2001.
- HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, FRIEDMAN A, HOCHEDLINGER K, YANAGIMACHI R, LANDER ES, GOLUB TR, JAENISCH R. *Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei.* Proceedings of the National Academy of Science USA 99: 12889-12894, 2002.
- JACKSON, I AND ABBOTT C (Eds). *Mouse Genetics and Transgenics. A Practical Approach.* Oxford University Press, New York, 2000.
- JAENISCH R. *Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus.* Proceedings of the National Academy of Science USA 73: 1260-1264, 1976.
- JAENISCH R, MINTZ B. *Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA.* Proceedings of the National Academy of Science USA 71: 1250-1254, 1974.
- JAENISCH R. *Transgenic Animals.* Science 240: 1468-1473, 1988.
- JOYNER A (Ed.). *Gene Targeting. A Practical Approach, 2nd Edition.* Oxford University Press, New York, 1999.
- KAWASE Y, IWATA T, WATANABE M, KAMADA N, UEDA O, SUZUKI H. *Application of the piezo-micromanipulator for injection of embryonic stem cells into mouse blastocysts.* Contemporary Topics of Laboratory Animal Science 40: 31-34, 2001.
- KILBY NJ, SNAITH MR, MURRAY JA. *Site-specific recombinases: tools for genome engineering.* Trends in Genetics 9: 413-421, 1993.
- LAVITRANO M, CAMAIONI A, FAZIO VM, DOLCI S, FARACE MG, SPADAFORA C. *Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice.* Cell 57: 717-723, 1989.
- LOIS C, HONG EJ, PEASE S, BROWN EJ, BALTIMORE D. *Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors.* Science 295: 868-872, 2002.
- MAK TW, PENNINGER JM, OHASHI PS. *Knockout mice: a paradigm shift in modern immunology.* Nature Reviews Immunology 1: 11-19, 2001.

- McGRATH J, D SOLTER. *Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion*. Science 220: 1300-1302, 1983.
- NAGY A. *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. Genesis 26: 99-109, 2000.
- NAGY A, GERTSENSTEN M, VINTERSTEN K, BEHRINGER R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (3rd edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2003.
- OGONUKI N, INOUE K, YAMAMOTO Y, NOGUCHI Y, TANEMURA K, SUZUKI O, NAKAYAMA H, DOI K, OHTOMO Y, SATOH M, NISHIDA A, OGURA A. *Early death of mice cloned from somatic cells*. Nature Genetics 30: 253-254, 2002.
- OGURA A, INOUE K, TAKANO K, WAKAYAMA T, YANAGIMACHI R. *Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells*. Molecular Reproduction and Development 57: 55-59, 2000.
- OGURA A, OGONUKI N, TAKANO K, INOUE K. *Microinsemination, nuclear transfer, and cytoplasmic transfer: the application of new reproductive engineering techniques to mouse genetics*. Mammalian Genome 12: 803-812, 2001.
- PALMITER RD, BRINSTER RL, HAMMER RE, TRUMBBAUER ME, ROSENFELD MG, BIRNBERG NC, EVANS RM. *Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes*. Nature 300: 611-615, 1982.
- PALMITER RD, SANDGREN EP, AVARBOCK MR, ALLEN DD, BRINSTER RL. *Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice*. Proceedings of the National Academy of Science USA 88: 478-482, 1991.
- PERRY AC, WAKAYAMA T, KISHIKAWA H, KASAI T, OKABE M, TOYODA Y, YANAGIMACHI R. *Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection*. Science 284: 1180-1183, 1999.
- PERRY AC, WAKAYAMA T. *Untimely ends and new beginnings in mouse cloning*. Nature Genetics 30: 243-244, 2002.
- PETERSON K, CLEGG C, LI Q, STAMATOYANNOPOULOS G. *Production of transgenic mice with yeast artificial chromosomes*. Trends in Genetics 13: 61-66, 1997.
- RIDEOUT WM 3RD, WAKAYAMA T, WUTZ A, EGGAN K, JACKSON-GRUSBY L, DAUSMAN J, YANAGIMACHI R, JAENISCH R. *Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning*. Nature Genetics 24: 109-110, 2000.
- RODRIGUEZ CI, BUCHHOLZ F, GALLOWAY J, SEQUERRA R, KASPER J, AYALA R, STEWART AF, DYMECKI SM. *High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP*. Nature Genetics 25: 139-140, 2000.
- RYAN TM, TOWNES TM, REILLY MP, ASAKURA T, PALMITER RD, BRINSTER RL, BEHRINGER RR. *Human sickle hemoglobin in transgenic mice*. Science 247: 566-568, 1990.
- SCHUSTER-GOSSLER K, LEE AW, LERNER CP, PARKER HJ, DYER VW, SCOTT VE, GOSSLER A, CONOVER JC. *Use of coisogenic host blastocysts for efficient establishment of germline chimeras with C57BL/6J ES cell lines*. Biotechniques 31: 1022-1026, 2001.
- SCHWARTZBERG PL, GOFF SP, ROBERTSON EJ. *Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells*. Science 246: 799-803, 1989.
- SCHWENK F, KUHN R, ANGRAND PO, RAJEWSKY K, STEWART AF. *Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice*. Nucleic Acids Research 26: 1427-1432, 1998.
- SEONG E, SEASHOLTZ AF, BURMEISTER M. *Mouse models for psychiatric disorders*. Trends in Genetics 18: 643-650, 2002.
- SHIELS PG, KIND AJ, CAMPBELL KH, WADDINGTON D, WILMUT I, COLMAN A, SCHNEIKE AE. *Analysis of telomere lengths in cloned sheep*. Nature 399: 316-317, 1999.
- SILVER LM (Ed). *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. Oxford University Press, Oxford, 1995. (Versión online disponible en <http://www.informatics.jax.org/silver/>)
- SINN E. *Coexpression of MMTV/*l*-Ha-ras and MMTV/*l*-myc in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo*. Cell 49: 465-475, 1987.
- SMITH AJ, DE SOUSA MA, KWABI-ADDO B, HEPELLE-PARTON A, IMPEY H, RABBITS P. *A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination*. Nature Genetics 9: 376-385, 1995.
- STUHLMANN H, CONE R, MULLIGAN RC, JAENISCH R. *Introduction of a selectable gene into different animal tissues by a retrovirus recombinant vector*. Proceedings of the National Academy of Science USA 81: 7151-7155, 1984.
- THOMAS KR, CAPECCHI MR. *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. Cell 51: 503-512, 1987.

- THOMPSON S, CLARKE AR, POW AM, HOOPER ML, MELTON DW. *Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells.* Cell 56: 313-321, 1989.
- THREADGILL DW, DLUGOSZ AA, HANSEN LA, TENNENBAUM T, LICHTI U, YEE D, LAMANTIA C, MOURTON T, HERRUP K, HARRIS RC, et al. *Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype.* Science 269: 230-234, 1995.
- TSUNODA Y, KATO Y. *Nuclear transplantation of embryonic stem cells in mice.* Journal of Reproduction and Fertility 98: 537-540, 1993.
- TUVESON DA, JACKS T. *Technologically advanced cancer modeling in mice.* Current Opinion in Genetics and Development 12: 105-110, 2002.
- VAN DER WEYDEN L, ADAMS DJ, BRADLEY A. *Tools for targeted manipulation of the mouse genome.* Physiological Genomics 11: 133-164, 2002.
- WAKAYAMA T, PERRY AC, ZUCCOTTI M, JOHNSON KR, YANAGIMACHI R. *Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei.* Nature 394: 369-374, 1998.
- WAKAYAMA T, RODRIGUEZ I, PERRY AC, YANAGIMACHI R, MOMBAERTS P. *Mice cloned from embryonic stem cells.* Proceedings of the National Academy of Science USA 96: 14984-14989, 1999.
- WAKAYAMA T, YANAGIMACHI R. *Cloning of male mice from adult tail-tip cells.* Nature Genetics 22: 127-128, 1999.
- WAKAYAMA T, SHINKAI Y, TAMASHIRO KL, NIIDA H, BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, OGURA A, TANEMURA K, TACHIBANA M, PERRY AC, COLGAN DF, MOMBAERTS P, YANAGIMACHI R. *Cloning of mice to six generations.* Nature 407: 318-319, 2000.
- WAKAYAMA T, TATENO H, MOMBAERTS P, YANAGIMACHI R. *Nuclear transfer into mouse zygotes.* Nature Genetics 24: 108-109, 2000.
- WAKAYAMA T, TABAR V, RODRIGUEZ I, PERRY AC, STUDER L, MOMBAERTS P. *Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer.* Science 292: 740-743, 2001.
- WILMUT I, SCHNIEKE AE, MCWHIR J, KIND AJ, CAMPBELL KH. *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.* Nature 385: 810-813, 1997.
- WOYCHIK RP, STEWART TA, DAVIS LG, D'EUSTACHIO P, LEDER P. *An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse.* Nature 318: 36-41, 1985.

