

CAPÍTULO IX

Los roedores de laboratorio como modelos de enfermedades humanas

9.1 El ratón como modelo en medicina experimental

Desde que Sir Archibald Garrod descubrió (1902) que la **alcaptonuria** era consecuencia de un desorden metabólico que se heredaba en forma mendeliana simple, muchas otras patologías humanas fueron reconocidas como el resultado de un defecto en la constitución genética de los individuos afectados. En forma paralela a este desarrollo del conocimiento sobre la patología humana, se identificaron (o crearon) modelos animales de distintas enfermedades humanas. Estos modelos ayudan a la comprensión de la patogénesis de muchas enfermedades y pueden ayudar en el desarrollo de terapias que sustituyan la función defectiva de un gen determinado.

Recordemos que, para la medicina experimental, el ratón es un organismo modelo que ofrece muchas ventajas con respecto a otros modelos genéticos como la mosca *Drosophila*, el nematode *Caenorhabditis elegans* e inclusive la rata. Estas ventajas son:

- Al tratarse de un mamífero, una gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre, aunque no hay que perder de vista que no se trata de un humano en miniatura.
- Tienen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los animalarios (bioterios), lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones.
- Comparte con el hombre el privilegio de ser las especies de mamífero mejor estudiadas desde el punto de vista genético.
- Existe una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénicas, además de cientos de mutaciones y un gran número de rearrreglos cromosómicos disponibles.
- Es el único animal que posee sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales (células ES), lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (ratones KO constitutivos y condicionales).
- Finalmente, el trabajo acumulado durante un siglo de investigaciones ha resultado en una inmensa cantidad de documentación sobre los fenotipos mutantes, las características de las líneas, los mapas genéticos y la secuencia completa del genoma.

Los modelos murinos disponibles los podemos clasificar según su origen en: (i) modelos provenientes de mutaciones espontáneas o inducidas, (ii) modelos generados por transgénesis y (iii) modelos generados *in vitro* por manipulación de células ES.

9.1.1 Modelos provenientes de mutaciones espontáneas o inducidas

Los diversos mecanismos que generan las mutaciones espontáneas y los métodos para producirlas experimentalmente ya fueron vistos en el Capítulo VII y VIII, respectivamente. Las mutaciones del ratón se encuentran listadas, con descripción y bibliografía, en el libro *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse* (1996). Estas listas son actualizadas periódicamente y pueden encontrarse en la página de Internet del *Mouse Genome Informatics* (http://www.informatics.jax.org/searches/marker_form.shtml) o puede consultarse revistas especializadas¹. Muchas de estas mutaciones han demostrado ser modelos muy interesantes para el entendimiento de los procesos del desarrollo de los mamíferos y algunas de ellas, alrededor de 100, han sido clasificadas como **modelos homólogos** de enfermedades humanas, lo que significa que la homología se extiende al nivel molecular. Algunos ejemplos de este tipo de mutaciones son: *alkaptonuria* (*Hgd^{aku}*), modelo de la alcaptonuria humana, *hyperphenylalaninemia 1* (*hph1*), modelo de la fenilcetonuria y la mutación *X-linked muscular dystrophy* (*Dmd^{mdx}*), modelo de la distrofia muscular de Duchene/Becker, entre otras.

9.1.2 Modelos generados por transgénesis

9.1.2.1 Modelos producidos a través de la eliminación de un determinado tipo celular

Estos ratones transgénicos son diseñados usando secuencias reguladoras específicas de tejido asociadas a secuencias que codifican para proteínas citotóxicas (o potencialmente citotóxicas) con el fin de programar la ablación de un tipo celular específico. Esta eliminación selectiva nos provee de un método directo para generar animales a los cuales les falta un tipo celular específico e inclusive hasta un linaje celular completo. La estrategia más común hace uso de secuencias que codifican para proteínas tóxicas como la cadena A de la **toxina diftérica** o de la **ricina** (ambas bloquean la síntesis de proteínas por parte de la célula). En este caso, el efecto citotóxico se produce inmediatamente después de la activación del transgén en el tejido blanco (debido a los promotores específicos de tejido). Otra estrategia se basa en la expresión intracelular de la enzima **timidina quinasa** derivada del virus del herpes (*HSV-tk*). Esta enzima no es directamente tóxica para las células pero, a diferencia de la timidina quinasa de los mamíferos, puede fosforilar ciertos análogos de nucleósidos como el **acyclovir** y el **gancyclovir**, convirtiéndolos en sustancias tóxicas para las células. De esta manera, el efecto letal para las células está condicionado al tipo de tejido seleccionado para la expresión de la timidina quinasa viral (debido a un promotor específico de tejido) y al agregado de los análogos de nucleósido. Algunos modelos de enfermedades humanas han sido creados por esta metodología, por ejemplo ratones con inmunodeficiencia de linfocitos B y ratones deficientes en mielina, estos últimos a través de la eliminación selectiva de la población de oligodendrocitos. Actualmente,

¹ Las revistas *Mammalian Genome*, *Nature Genetics*, *Genomics*, *Genome Research*, *Genetics*, *Trends in Genetics*, *Human Molecular Genetics*, *Immunogenetics* y *Comparative Medicine* proveen una excelente cobertura de las novedades sobre la genética del ratón y la rata.

la disponibilidad de recombinasas sitio-específicas (como Cre o Flp) ha provocado un vuelco hacia el uso de la transgénesis condicional (ver Capítulo VIII).

9.1.2.2 Modelos producidos a través de una regulación anormal del gen

Uno de los mejores ejemplos de este tipo de animal transgénico es el clásico ratón gigante producido en 1982 por la sobre expresión de la hormona de crecimiento de la rata. En este caso, la expresión del transgén fue dirigida por el promotor del gen de la **metalotionina**, lo que llevó a la expresión constitutiva de la hormona de crecimiento con el dramático efecto en el tamaño del ratón. Otro ejemplo es la asociación, en la construcción de un animal transgénico, de un oncogén con un promotor ubicuo, lo que lleva al desarrollo de una alta frecuencia de neoplasias. En cambio, cuando el promotor utilizado es específico de tejido, los tumores aparecen sólo en el tejido blanco. Por ejemplo, Heisterkamp y colaboradores (1990) produjeron un modelo de ratón transgénico para la leucemia aguda humana por medio de la introducción de un segmento quimérico de ADN conteniendo un exón del gen *Bcr* con un exón del oncogén *Abl1* (*c-Abelson*). Esta misma fusión se produce en los pacientes leucémicos como resultante de una translocación recíproca 9q34-22q11, denominada **cromosoma Filadelfia**. El modelo transgénico sirvió para comprobar la causa de la leucemia humana pero, lamentablemente, no es demasiado útil para el estudio de la evolución de la enfermedad porque los ratones mueren a una edad muy temprana. (Para más detalles sobre modelos transgénicos del cáncer ver el punto 9.2.2.1.)

9.1.2.3 Modelos producidos por la incorporación de genes humanos

Existen muchos ejemplos de esta clase de transgénicos, entre los más destacados podemos nombrar el ratón transgénico sensible al virus de la polio y los modelos murinos para la **osteogénesis imperfecta tipo II** y la **anemia falciforme** (en inglés, *sickle-cell anemia*). En el primer caso, se produjeron ratones susceptibles para todas las líneas de virus de la **poliomielitis**, incorporando en el genoma murino el gen humano que codifica para el receptor celular del virus. Al ser inoculados con el virus, estos ratones transgénicos reproducen algunos de los síntomas clínicos observados en humanos y primates; por lo tanto representan un modelo excelente para los estudios moleculares de la patogénesis de la poliomielitis, así como para la evaluación de nuevas vacunas. Otros ejemplos de modelos producidos por la incorporación de genes humanos serán tratados en detalle en el punto 9.2.1 y 9.2.2.

9.1.2.4 Modelos transgénicos producidos por la incorporación de grandes fragmentos de ADN

Se han descrito varias técnicas capaces de llevar a cabo la incorporación de grandes segmentos de ADN (hasta 900 kb) a la línea germinal de los ratones utilizando vectores YAC o BAC. Entre esas técnicas, la microinyección directa de estos vectores en el pronúcleo de un ovocito fertilizado aparece como la más utilizada. Este tipo de transgénicos son de gran utilidad cuando el defecto genético resulta de una alteración cuya causa molecular es poco conocida o desconocida. Utilizando este sistema, se han creado modelos originales de enfermedades humanas muy complejas como el **síndrome de Down**.

El síndrome de Down, resultante de la trisomía del cromosoma 21, está asociado a una cantidad de defectos que son consecuencia directa de la dosis anormal de varios genes ubicados en una región particular del cromosoma (21q22.2). Para lograr avances sobre el conocimiento de la relevancia funcional de esta región del cromosoma 21, Smith y colaboradores han construido un panel de ratones transgénicos que portan (cada cual) un vector YAC individual (conteniendo fragmentos de ADN del cromosoma 21 humano). En total, este panel de ratones abarca una región contigua de aproximadamente 2 Mb, comprendiendo toda la región 21q22.2 del cromosoma humano. Es interesante el hallazgo de dos líneas de ratones conteniendo YACs diferentes (no superpuestos) que presentaban fallas en el aprendizaje. Esto estaría indicando que por lo menos dos genes están implicados en el déficit de aprendizaje cuando están presentes en más de dos copias (lo que sucede en la trisomía del cromosoma 21).

Trabajos similares se están llevando a cabo para la **enfermedad de Huntington** (autosómica dominante), causada por la expansión de una secuencia de ADN (tripleto CAG) en el exón 1 del gen que codifica para la **huntingtina** (cuyo tamaño es de 200 kb). Como un primer paso hacia el desarrollo de un modelo murino de esta enfermedad se introdujo un YAC de 600 kb comprendiendo el gen huntingtina (humano), en este caso un alelo "normal" con 18 repeticiones CAG. Estos ratones fueron cruzados con otra línea de ratones cuyo gen endógeno huntingtina había sido anulado por técnicas de mutagénesis dirigida (KO). Es llamativo ver que el gen humano (alelo normal) puede rescatar el fenotipo letal de los embriones nulos para el gen huntingtina, indicando que el gen humano es funcional en el ratón. Es razonable pensar que la introducción de alelos humanos patogénicos pueda llevar a un buen modelo murino de la enfermedad de Huntington. (Para más información sobre los métodos de transgénesis en el ratón remitirse al Capítulo VIII.)

9.1.3 Modelos generados *in vitro* por manipulación de células ES

Como ya hemos visto en el capítulo anterior, la disponibilidad de cultivos de células pluripotenciales ES ha ampliado enormemente el espectro de las posibilidades de manipulación del genoma murino, en particular las mutaciones dirigidas. Con las células ES es posible crear modelos murinos a partir de (i) células ES mutantes seleccionadas *in vitro*, (ii) por "transgénesis *in vitro*" de las células ES (haciendo uso de una batería de técnicas de transfección de ADN) y (iii) por medio de la utilización del fenómeno de recombinación homóloga *in vitro*.

Por ejemplo, existe un modelo del **síndrome de Lesch-Nyhan** (ver sección 9.2.1.8) que fue producido seleccionando *in vitro* células ES mutadas (sin actividad de la enzima HPRT). Los modelos generados por recombinación homóloga *in vitro* son muy numerosos y se encuentran detallados en el punto 9.2. Existen ratones KO que son excelentes modelos para la fibrosis quística, la enfermedad de *Gaucher*, la anemia falciforme y las talasemias, entre muchos otros.

9.1.4 Modelos generados por transgénesis condicional (sistemas Cre/loxP y Flp/frt)

La estrategia de creación de transgénicos “condicionales”, ya sean éstos temporales o espaciales, por medio del uso de recombinasas sitio-específicas ha sido descrita en detalle en el Capítulo VIII. Las posibilidades de crear modelos es inmensa ya que podemos provocar la falta de expresión de un gen, o la expresión de un alelo mutado, en un tejido específico y en un momento del desarrollo determinado. Por lo tanto, esta estrategia es muy eficiente para el estudio de la inactivación de genes que son esenciales para el desarrollo. Una de las tantas posibilidades que ofrecen estos sistemas es la de generar deleciones, inversiones y translocaciones de grandes segmentos cromosómicos. Un ejemplo interesante es la translocación entre el oncogén *Myc* y los genes de cadena pesada de las inmunoglobulinas, en los cromosomas 15 y 12 respectivamente, reportada por Smith y colaboradores en 1995. Esta translocación generada por el sistema Cre/loxP reproduce aquellos rearrreglos que son producidos en los **plasmocitomas**.

9.2 Modelos murinos para el estudio de enfermedades humanas

Como ya hemos visto en el Capítulo VII, el descubrimiento de mutaciones con patologías similares a enfermedades humanas es una situación frecuente en los animalarios que crían roedores. A lo largo de los últimos 90 años se han descrito más de 1.500 mutaciones en el ratón de laboratorio —entre espontáneas e inducidas—, muchas de ellas de gran valor en medicina experimental (ver *Mouse Locus Catalog*, <http://www.informatics.jax.org/searches/marker-form.shtml>, *Mutant Mouse Regional Resource Centers* (MMRRC), <http://www.mmrrc.org/index.html> y *Mouse Knockout and Mutation Database* (MKMD), <http://research.bmn.com/mkmd>). En términos didácticos, podemos decir que los modelos animales en medicina experimental pueden ser útiles fundamentalmente para tres propósitos: (i) identificar la base molecular de la enfermedad, (ii) estudiar la fisiopatología de la enfermedad y, (iii) ensayar nuevas terapias para la misma.

9.2.1 Modelos murinos de enfermedades hereditarias simples (mendelianas)

9.2.1.1 Enfermedades que involucran células derivadas de la cresta neural

Las células que derivan de la cresta neural se diferencian en diversos tipos celulares, entre los cuales encontramos a los melanocitos de la piel y el oído interno, las neuronas y células de la glía del sistema nervioso periférico, células neuroendócrinas de las glándulas adrenales y tiroideas, e inclusive componentes de los huesos cartilagosos y membranosos de la cabeza. En la **Tabla 9.1** podemos observar una lista de genes en los cuales se han identificado mutaciones, tanto en el ratón como en los genes homólogos humanos, y que causan deficiencia de células

derivadas de la cresta neural. Todos estos modelos tienen aspectos comunes entre el fenotipo mutante y la correspondiente enfermedad humana. Nos limitaremos a presentar brevemente tres de esas enfermedades:

Nombre del gen	Símbolo	Modelos disponibles	Enfermedad humana
Endothelin 3	<i>Edn3^{ls}</i>	Mutación espontánea <i>lethal spotting</i> y ratones KO	Síndrome de Waardenburg-Shah
Endothelin receptor	<i>Ednrb^s</i>	Mutación espontánea <i>piebald</i> , mutaciones inducidas y ratones KO	Enfermedad de Hirschsprung; Síndrome de Waardenburg-Shah
Kit oncogen	<i>Kit^w</i>	Mutación espontánea <i>dominant spotting</i> y mutaciones inducidas	Piebaldismo
Microphthalmia-associated transcription factor	<i>Mitf^{mi}</i>	Mutación espontánea <i>microphthalmia</i> y mutaciones inducidas	Síndrome de Waardenburg tipo 2
Pink-eyed dilution	<i>p</i>	Mutación espontánea <i>pink-eyed dilution</i> y mutaciones inducidas	Albinismo oculocutáneo tipo 2
Paired box protein-3	<i>Pax3^{sp}</i>	Mutación espontánea <i>splotch</i> y mutaciones inducidas	Síndrome de Waardenburg tipo 1; Síndrome de Klein-Waardenburg
Tyrosinase	<i>Tyr^c</i>	Mutación espontánea <i>albino</i> y mutaciones inducidas	Albinismo oculocutáneo tipo 1

Tabla 9.1 Desórdenes de células derivadas de la cresta neural.

Enfermedad de Hirschsprung (HSCR)

Las personas afectadas por este desorden tienen deficiencias en los ganglios nerviosos entéricos, lo que resulta en **megacolon**, bloqueos intestinales y constipación crónica. Existen formas dominantes y recesivas de la enfermedad. Diversas mutaciones en el proto-oncogén *RET* son la causa de la forma dominante de esta enfermedad hereditaria humana, mientras que las formas recesivas se deben a mutaciones en la **endotelina 3** (gen *EDN3*) y su receptor tipo B (gen *EDNRB*). Para los tres genes mencionados se han desarrollado ratones KO que han aportado valiosa información respecto a la patogenia de la enfermedad, aunque existen algunas diferencias fenotípicas con la enfermedad humana. Esto demuestra que muchas veces los tejidos murinos y humanos

responden de manera diferente a la falta de función de un determinado gen. Existen dos mutaciones espontáneas en el ratón que resultaron ser alélicas de los genes murinos *Edn3* (cromosoma 2) y *Ednrb* (cromosoma 14), se trata de *lethal spotting* (*ls*) y *piebald* (*s*), respectivamente (alelos *Edn3^{ls}* y *Ednrb^s*). Otra mutación que ha sido propuesta como modelo de HSCR es *dominant megacolon* (*Dom*), una mutación dominante del gen *Sox10* (*SRY-box containing gene 10*) en el cromosoma 15 del ratón. La mutación *Dom* es muy sensible al fondo genético y se observa, por ejemplo, que los ratones C3H/He-*Dom*/+ presentan síntomas severos, mientras que los ratones C57BL/6-*Dom*/+ son aparentemente normales.

Piebaldismo

El **piebaldismo** (en inglés, *piebald trait* o PT), presenta una deficiencia en la migración de los melanocitos hacia la piel y el oído interno, originando defectos en la pigmentación del pelo e hipopigmentación en la piel de la frente, pecho y abdomen. Además, son frecuentes los epiteliomas, las sorderas ocasionales y la heterocromía del iris. Numerosas mutaciones en el oncogén *KIT* son las responsables del piebaldismo en los humanos y del *dominant white spotting* (*W*) en el ratón. La mutación *W* fue descrita en 1908 y ha sido ampliamente estudiada a lo largo del siglo XX, ya que se trata de un locus muy sensible a la aparición de mutaciones. El locus *W* (ahora *Kit^W*) se localiza en el cromosoma 5 del genoma murino y se han identificado alrededor de 100 alelos diferentes. Los ratones heterocigotas exhiben manchas blancas en la cabeza y el vientre, un fenotipo muy similar al del piebaldismo humano. Los ratones homocigotas (*Kit^W/Kit^W*), en su inmensa mayoría, mueren durante el desarrollo embrionario. Sólo algunos alelos, denominados viables, permiten la sobrevivencia de los ratones homocigotas (*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*), aunque éstos son anémicos, estériles y de pelaje blanco; pero, a diferencia de los albinos, tienen ojos negros, ya que no está afectada la migración de los melanocitos hacia la retina. No obstante, también se han descrito algunos alelos que resultan viables y fértiles en estado de homocigosis (alelo *Kit^{W-f}*). Es interesante notar que todas las mutaciones, tanto en el hombre como en el ratón, afectan el dominio tirosina quinasa de la proteína. Por otro lado, el fenotipo que estamos describiendo es idéntico al que muestran los ratones afectados por la mutación *steel* (*Sl*). El locus *Sl* (ahora *Kit^{Sl}*) se localiza en el cromosoma 10 del ratón y codifica para el ligando natural del receptor *Kit* (gen *Kitl*, *kit ligand*). Sorprendentemente, no se han identificado mutaciones en este gen en personas con piebaldismo.

Síndrome de Waardenburg (WS)

El **síndrome de Waardenburg** es una enfermedad dominante y ha sido clasificada por los clínicos en tres tipos: WS1, WS2 y WS3. Este síndrome presenta anomalías en la migración de los melanocitos hacia la piel y el oído interno, llevando a defectos en la pigmentación del pelo y los ojos, además de sordera. Al igual que HSCR, WS es genéticamente heterogénea, comprendiendo mutaciones en dos factores de transcripción, *PAX3* (*paired box gene-3*) y *MITF* (*microphthalmia transcription factor*). A su vez, existen más de 30 mutaciones del gen *PAX3*, afectado virtualmente cada dominio de la proteína. En el ratón, *Pax3* y *Splotch* (*Sp*) son alélicos (cromosoma 1), siendo el último un alelo mutante (su nueva nomenclatura es *Pax3^{Sp}*). *Splotch* es una mutación semi-dominante que presenta varios alelos (*Sp*, *Sp^d*, *Sp^{2H}*, entre otros) que cau-

san manchas blancas en el abdomen, cola y pies en el estado heterocigota. Los ratones homocigotas suelen morir durante la gestación por severos defectos en el tubo neural y los ganglios espinales. Una vez más, existen diferencias entre el modelo de ratón mutante y la enfermedad humana, en este caso los ratones afectados por las mutaciones en el gen *Pax3* nunca presentan sordera ni defectos en el oído interno.

El gen murino *Mitf* resultó ser codificado por un gen previamente conocido por la mutación *microphthalmia* (*mi*), ahora *Mitf^{fmi}* (cromosoma 6). El locus *mi* es particularmente fascinante porque presenta muchos alelos disponibles para el estudio y, además, estos alelos despliegan una plétora de fenotipos y un patrón de herencia complejo. Todos los alelos de *mi* causan anomalías en los melanocitos, lo que produce patologías oculares, defectos en la pigmentación y a veces sordera. En general, los alelos más severos se comportan en forma semi-dominante y los menos severos son recesivos, estando localizadas las mutaciones, para cada clase, en dominios específicos de la proteína.

9.2.1.2 Desórdenes en la visión

El oído y los ojos del ratón son anatómicamente y funcionalmente muy similares a los del hombre (y a los de los mamíferos en general), convirtiendo al ratón en un modelo muy útil para el estudio de estos órganos. Además, existe una provisión de más de 150 loci mutantes que afectan el oído y los ojos del ratón. En la **Tabla 9.2** podemos observar algunos de estos mutantes que han resultado ser excelentes modelos de enfermedades humanas, ya que comparten sorprendentes similitudes en el fenotipo.

Nombre del gen	Símbolo	Modelos disponibles	Enfermedad humana
Myosin VIIA	<i>Myo7a^{sh1}</i>	Mutación espontánea <i>shaker 1</i> y mutaciones inducidas	Síndrome de Ushers tipo 1B
Paired box homeotic gene 2	<i>Pax2</i>	Mutaciones inducidas ratones KO	Coloboma de nervio óptico con enfermedad renal
Paired box homeotic gene 6	<i>Pax6^{sey}</i>	Mutación espontánea <i>small eye</i> y mutaciones inducidas	Aniridia tipo 2
Phosphodiesterase 6B, cGMP, rod	<i>Pde6b^{rd1}</i>	Mutación espontánea <i>retinal degeneration 1</i>	Retinitis pigmentosa
Peripherin 2	<i>Prph2^{rd2}</i>	Mutación espontánea <i>retinal degeneration 2</i>	Degeneración de retina
Rhodopsin	<i>Rho</i>	Ratones transgénicos	Retinitis pigmentosa tipo 4

Tabla 9.2 Desórdenes de la visión y el oído

Dentro de las anomalías hereditarias de la visión podemos diferenciar a aquellas que afectan el desarrollo de la retina y a las que involucran procesos degenerativos de la misma. Dentro del primer grupo se encuentra la **aniridia**, enfermedad que resulta en la hipoplasia del iris. El gen humano para la aniridia es el *PAX6*, un factor de transcripción de la familia *paired box genes*. El homólogo murino es la mutación *small eye* (*Sey*), cuyo locus se encuentra en el cromosoma 2 (*Pax6^{Sey}*). La dosis génica parece ser crítica en la función del gen *Pax6*, tanto en el ratón como en el hombre, ya que el desarrollo del ojo es sensible al aumento, o la disminución, de la expresión del gen.

En el tipo de anomalías degenerativas encontramos la **retinitis pigmentosa** (RP). Se trata en realidad de un grupo de enfermedades que representan una de las causas más comunes de ceguera en individuos de mediana edad. Se han descrito formas autosómicas recesivas, autosómicas dominantes y ligadas al cromosoma X. Una de las mutaciones asociadas a la RP es la del gen de la **rodopsina** (RHO), un fotoreceptor asociado a proteínas G que interviene en los procesos de la visión con baja luz, es por eso que los individuos afectados sufren especialmente de ceguera nocturna. Existen varios modelos de ratones transgénicos que expresan formas mutantes del gen *Rho*, con procesos degenerativos de los fotoreceptores similares a los hallados en la enfermedad humana.

Otro modelo importante para el estudio de RP es la mutación *retinal degeneration-1* (*rd1*), descrita en la década de 1920 y ubicada en el cromosoma 5 del genoma murino. Los animales homocigotas exhiben degeneración de todos los fotoreceptores de la retina al mes de vida. Es interesante decir que muchas de las líneas consanguíneas clásicas (como C3H, CBA, SJL y SWR) son homocigotas para la mutación *rd1*, y por lo tanto los animales son ciegos a edad temprana. El gen mutado en este caso es *phosphodiesterase, cGMP, rod receptor, b-subunit* (*Pdeb^{rd1}*). Un tratamiento potencialmente eficaz para la RP fue evaluado en ratones *Pdeb^{rd1}/Pdeb^{rd1}*; se trata de la introducción de adenovirus recombinantes que llevan copias del alelo normal (*wild type*) del gen *Pdeb*, antes del inicio de los procesos degenerativos. Se ha encontrado que después de este tratamiento hay un retraso muy marcado de la muerte de las células fotoreceptoras.

9.2.1.3 Desórdenes en la audición

Pese a que las sorderas pueden agruparse en varias categorías según el sitio del sistema auditivo que esté fallado, en el humano, la forma más común de sordera es aquella que afecta al **órgano de Corti**, responsable de las transducciones auditivas. Debido a la gran cantidad de genes envueltos en las sorderas hereditarias, los análisis de ligamiento fueron siempre muy difíciles de realizar en humanos. Una vez más, el ratón jugó un papel fundamental para lograr uno de los hitos en el estudio de las sorderas de origen genético: el clonaje del primer gen vinculado a las transducciones auditivas. Hasta el momento, dos genes perteneciente al grupo de las miosinas no convencionales, *Myo7a* (cromosoma 7) y *Myo6* (cromosoma 9), fueron aislados en el ratón. El gen homólogo humano (*MYO7A*) fue identificado posteriormente en pacientes con el **síndrome de Ushers tipo IB**, la forma más común de sordera con ceguera asociada. Las similitudes fenotípicas (ambos comparten la degeneración del órgano de Corti) y los mapeos comparativos dieron los primeros indicios de que la mutación murina *shaker1*

(*sh1*), asociada a sordera, era homóloga al síndrome de Ushers tipo IB. Actualmente se sabe que la mutación *sh1* es un alelo mutado del gen *Myo7a*, por lo tanto su nueva nomenclatura es *Myo7a^{sh1}*. Recientemente, se demostró que el gen *Myo6* es alélico a la mutación recesiva *Snell's waltzer* (ahora *Myo6^{sw}*) y que los ratones homocigotas presentan defectos en el neuroepitelio del oído interno. Gracias a los proyectos conjuntos de mutagénesis química por ENU, se han descrito nuevos mutantes con sordera que serán útiles como modelo animal de sordera, por ejemplo la mutación dominante *Beethoven* (*Bth*), descubierta en Alemania.

9.2.1.4 Enfermedades de los huesos y cartílagos

Dentro de los mecanismos implicados en los desórdenes esqueléticos podemos encontrar: (i) las alteraciones que afectan la composición bioquímica del hueso, (ii) las fallas en el patrón de desarrollo óseo durante la embriogénesis y (iii) la imposibilidad de establecer las proporciones correctas en el crecimiento de los huesos. En el ratón se han descrito más de 100 loci y modelos transgénicos que afectan el desarrollo del esqueleto. En la **Tabla 9.3** se muestra una lista de genes murinos involucrados en diversos trastornos óseos y sus respectivas enfermedades homólogas humanas.

Nombre del gen	Símbolo	Modelos disponibles	Enfermedad humana
Procollagen type 1, alpha 1	<i>Col1a1^{Mov13}</i>	Mutación <i>Moloney leukemia virus 13</i> , y ratones KO	Osteogénesis imperfecta; Ehlers-Danlos tipo VII
Procollagen type 1, alpha 2	<i>Col1a2^{oim}</i>	Mutación espontánea <i>osteogenesis imperfecta</i>	Osteogénesis imperfecta; Ehlers-Danlos tipo VII
Procollagen type 2, alpha 1	<i>Col2a1</i>	Ratones transgénicos y KO	Acondrogénesis tipo 2; Displasia metafisaria
Procollagen type 5, alpha 2	<i>Col5a2</i>	Ratones KO	Enfermedad de Ehlers-Danlos
Procollagen type 9, alpha 1	<i>Col9a1</i>	Ratones transgénicos y KO	Displasia epifisaria múltiple
Procollagen type 11, alpha 1	<i>Col11a1^{cho}</i>	Mutación espontánea <i>chondrodysplasia</i>	Síndrome de Stickler tipo II
Fibroblast growth factor receptor 1	<i>Fgfr1</i>	Ratones KO	Síndrome de acrocefalosindactilia tipo V
Fibroblast growth factor receptor 3	<i>Fgfr3</i>	Ratones KO	Acondroplasia; Enanismo tanatofórico
GLI-Kruppel family member	<i>Gli3^{Kt}</i>	Mutación espontánea <i>extra toes</i> y mutaciones inducidas	Síndrome de Greig
Homeo box D13	<i>Hoxd13</i>	Ratones KO	Sindactilia tipo II

Tabla 9.3. Enfermedades de los huesos y el tejido conectivo.

Las mutaciones dirigidas (KO) de los genes *Hoxd13* y *Gli3*, miembros de las familias de factores de transcripción *homeodomain* y *zinc-finger*, respectivamente, causan anomalías esqueléticas, fusiones óseas y pérdida de falanges en los ratones homocigotas. En el ser humano, gracias a la técnica del gen candidato, se logró identificar el gen *HOXD13*, y se sabe que el mismo se encuentra mutado en pacientes con **sindactilia** tipo II. A diferencia del modelo murino transgénico, la enfermedad hereditaria humana es autosómica dominante y está caracterizada por la presencia de dedos fusionados y membranas interdigitales.

Recientemente se ha demostrado que las señales intercelulares mediadas por el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) juega un papel importante en la coordinación del crecimiento del hueso endocondral y membranoso. La pérdida del crecimiento proporcional entre los ejes longitudinal y radial de los huesos resulta frecuentemente en displasias del esqueleto. Gracias a estudios realizados en familias con síndromes autosómicos dominantes asociados a problemas óseos, ha sido posible identificar mutaciones puntuales en los genes que codifican para los receptores de FGF (genes *FGFR1* y *FGFR2*). Estos dos genes afectan el crecimiento del hueso intramembranoso, mientras que el *FGFR3* generalmente afecta el hueso endocondral. Se conocen tres enfermedades dominantes asociadas a mutaciones en el gen *FGFR3*. Una de las más severas es la **displasia tanatofórica**, la cual causa enanismo y mortalidad perinatal en los heterocigotas. Es notable que, por otro lado, los ratones heterocigotas para una mutación nula del gen *Fgfr3* son fenotípicamente normales y que los homocigotas presentan un fenotipo casi opuesto al humano, con crecimiento exagerado de los huesos largos y sordera.

Finalmente, hablaremos brevemente de los colágenos, los cuales constituyen las principales fibras del tejido conectivo y son las proteínas más abundantes de la matriz extracelular. Existen, por lo menos, 19 genes de colágeno, cuyos productos interactúan (en forma de hélices triples) para formar las distintas fibras de colágeno. Por lo tanto, las mutaciones en diferentes genes del colágeno pueden afectar la misma fibra de colágeno. En humanos, se han identificado mutaciones en 13 genes de colágeno, y las mismas han sido siempre relacionadas a fenotipos patológicos. Es más, se sabe que distintas mutaciones del mismo gen de colágeno pueden resultar en enfermedades diferentes. Por ejemplo, se conocen por lo menos cinco formas diferentes de **condrodisplasia** y degeneración de cartílagos, todas resultantes de mutaciones en el mismo gen (*COL2A1*). En el ratón, la mutación *chondrodysplasia* (*cho*) ha permitido el aislamiento, por la técnica del gen candidato, del gen *Coll1a1* y su respectivo gen homólogo humano (*COL11A1*), responsable de una forma de condrodisplasia presente en el **síndrome de Stickler**. Además del ratón *cho*, existen otras mutaciones del ratón que afectan los genes del colágeno, algunas de ellas espontáneas [*osteogenesis imperfecta* (*Colla2^{oim}*)], y otras transgénicas y/o KO (*Colla1*, *Col2a1*, *Col5a2*, *Col9a1* y *Coll0a1*).

9.2.1.5 Desórdenes neurológicos y neuromusculares

Existen alrededor de 150 mutaciones en el ratón que causan defectos neurológicos, neuromusculares o comportamentales. Entre ellas, hay unas 20 que pueden ser consideradas como modelos de enfermedades humanas, fundamentalmente aquellas que comparten un fenotipo neuromuscular o neurológico con el correspondiente desorden humano (**Tabla 9.4**).

Nombre del gen	Símbolo	Modelos disponibles	Enfermedad humana
Apolipoprotein E	<i>ApoE</i>	Ratones KO	Alzheimer tipo 2
Amyloid beta precursor protein	<i>App</i>	Ratones transgénicos y KO	Alzheimer
Ataxia telangiectasia	<i>Atm</i>	Ratones KO	Ataxia-telangiectasia
Dystrophin myotonic kinase, B15	<i>Dm15</i>	Ratones transgénicos y KO	Distrofia miotónica
Dystrophia, muscular dystrophy	<i>Dmd^{mdx}</i>	Mutación espontánea <i>X-linked muscular dystrophy</i> y ratones KO	Distrofia muscular de Duchenne y Becker
Fragile X mental retardation syndrome I	<i>Fmr1</i>	Ratones KO	Síndrome X Frágil
Huntington disease gene homolog	<i>Hdh</i>	Ratones KO	Enfermedad de Huntington
Laminin, alpha 2	<i>Lama2^{dy}</i>	Mutación espontánea <i>dystrophia muscularis</i> y ratones KO	Distrofia muscular congénita
Spinocerebellar ataxia I	<i>Sca1</i>	Ratones transgénicos	Ataxia espinocerebelosa tipo I
Superoxide dismutase-I, soluble	<i>Sod1</i>	Ratones Transgénicos y KO	Esclerosis lateral amiotrófica

Tabla 9. 4. Desórdenes neurológicos y neuromusculares

Enfermedad de Alzheimer (EA)

Este desorden neurodegenerativo es la cuarta causa de muerte en los países desarrollados. Se trata de una demencia progresiva en la que ciertas zonas específicas del cerebro sufren degeneración neuronal, lo que lleva a la pérdida de la memoria y de las capacidades cognitivas. En los últimos años, diversos laboratorios han producido ratones transgénicos que exhiben algunos de los cambios patológicos asociados a EA. Esto ha ocurrido, por ejemplo, con los transgénicos que expresan niveles muy altos de la proteína **amiloide β** humana (gen *APP*, *amyloid precursor protein*) en su forma *wildtype* o una forma mutante (particularmente una mutación puntual encontrada en pacientes con EA). Ambos modelos comparten grandes similitudes con los casos humanos; sin embargo, las **placas seniles** (uno de los rasgos histopatológicos característicos de EA) se encuentran sólo en los ratones transgénicos para el gen mutado. Ninguno de los dos tipos de transgénicos para el gen *APP* desarrolla **ovillos neurofibrilares** (en inglés, *tangles*), la otra lesión histopatológica característica de EA. Cabe destacar que estos ra-

tones transgénicos exhiben defectos en el aprendizaje, así como alteraciones cerebrales al envejecer. Además, se ha demostrado que el fondo genético de los ratones tiene un efecto muy fuerte sobre el fenotipo. Siendo que la función del gen *APP* es muy poco conocida (más allá de ser requerida para el funcionamiento neuronal), estos ratones son un modelo muy útil para comprender el papel del gen *APP* en pacientes con EA.

Otro gen involucrado en EA es el gen de la **apolipoproteína E (APOE)**. Pese a que, originalmente, los ratones homocigotas para formas mutadas del gen *Apoe* fueron reportados como neurológicamente normales, estudios más recientes demostraron que existen alteraciones de la sinapsis y cierto nivel de neurodegeneración del SNC en ratones nulos para el gen *Apoe* (*Apoe* $-/-$). También existen ratones transgénicos que sobreexpresan formas *wildtype* o mutadas de los genes humanos *PS1* y *PS2* (*presenilin-1* y *presenilin-2*). Si bien ninguno de los modelos transgénicos de EA recapitula todos los rasgos de la enfermedad humana, estos modelos han aportado datos valiosos para entender la patogénesis de la enfermedad y pensar en el desarrollo de terapias.

Desórdenes neuromusculares

Básicamente, las anomalías neuromusculares pueden resultar de (i) fallas en la excitación-contracción del músculo esquelético, (ii) defectos en el metabolismo muscular y (iii) degeneración y/o debilidad muscular. Como ejemplos de modelos pertenecientes a la primera categoría tenemos la mutación *Cch11a3* y los ratones KO para el gen *Ryr1*; un ejemplo del segundo tipo de defecto es la mutación *Phk*. Existen modelos murinos muy interesantes para la última categoría de enfermedad neuromuscular, los cuales describiremos más detalladamente. En el hombre, se han descrito dos enfermedades neuromusculares ligadas al cromosoma X: la **distrofia muscular de Duchene (DMD)** y la **distrofia muscular de Becker (DMB)**. Ambas enfermedades han sido atribuidas a mutaciones en el enorme gen de la **distrofina**, una gran proteína citoesquelética localizada en el sarcolema del músculo esquelético. El gen responsable de la DMD fue el primer gen relacionado a una enfermedad humana de gran importancia que fuera descubierto a través de un clonaje posicional. Los mapeos comparativos y las similitudes en el fenotipo llevaron a descubrir que el homólogo de DMD en el ratón era la mutación *mdx* (*X-linked muscular dystrophy*). En el año 1989, Sicinski y colaboradores informaron de la presencia de una mutación puntual del gen *Dmd* en los ratones mutantes *mdx* (ahora *Dmd*^{*mdx*}). Varias formas alélicas de este gen fueron generadas por Verne Chapman y colaboradores utilizando mutagénesis química (ver Capítulo VII). Fundamentalmente, los pacientes con DMD y los ratones *mdx/mdx* presentan una necrosis extensiva de las fibras musculares esqueléticas, siendo este tejido muchas veces reemplazado por tejido fibrótico y adipocitos. Sin embargo, en los ratones *mdx* existe un alto grado de regeneración muscular lo que permite a los animales permanecer casi sin síntomas hasta el año de vida. A pesar de esta diferencia, varios laboratorios han usado esta mutación como modelo de DMD y DMB, en especial para el estudio de posibles terapias génicas. Recientemente (1996), se ha creado un modelo murino que se acerca más a la patología muscular presente en DMD, especialmente por la falta de regeneración muscular. Se trata de un doble mutante que porta mutaciones en los genes *mdx* y *Myod* (gen que codifica para un factor de transcripción miogénico).

Existe otra distrofia muscular en humanos, en este caso autosómica, denominada distrofia miotónica (DM), la cual se caracteriza por disturbios neuromusculares que afectan el músculo esquelético, el músculo liso en varios órganos y otros rasgos extra musculares. Luego de varios años de mapeos y clonaje posicional, en el año 1992 se descubrió que el gen responsable de DM codificaba para una quinasa de proteínas llamada *DM15*. La causa del fenotipo mutante en los humanos está dada por la inestabilidad de un microsátélite de ADN (motivo trinucleótido) presente en una región del gen no traducida a proteína. Recientemente se han creado ratones KO para el gen *Dm15* y los mismos manifiestan una miopatía esquelética progresiva. Además de los modelos mencionados, existen por lo menos 10 mutaciones murinas que inducen degeneración de neuronas motoras, entre ellas, *wobbler* (*wr*, cromosoma 11), *motor neuron degeneration* (*mnd*, cromosoma 8), *wasted* (*wst*, cromosoma 2) y *progressive motor neuropathy* (*pmn*, cromosoma 13).

9.2.1.6 Enfermedades de la piel y el pelo

En la mayoría de las enfermedades no infecciosas que afectan la piel y el pelo se desconoce aún su fisiopatología, y en este sentido, los modelos animales podrían proveer de buenos indicios sobre las causas de dichas enfermedades. El objetivo último de la investigación dermatológica es entender los fundamentos moleculares de estos procesos para diseñar nuevos métodos de diagnóstico, prevención y terapia. En particular, las anomalías de la piel y el pelo son rasgos anatómicos muy evidentes, por lo que los animales mutantes son descubiertos rápidamente por los técnicos del animalario². Como resultado, existen en la actualidad más de 100 mutaciones en el ratón que causan anomalías morfológicas en la piel y el pelo, de las cuales sólo unas pocas tienen una base molecular definida.

Existen varias mutaciones que presentan defectos en el crecimiento del pelo de las cuales se conocen las fallas bioquímicas específicas que las producen. Cuando esas fallas afectan a alguna citoquina de importancia en la biología de la piel, el modelo toma aún más relevancia para la biomedicina. Ejemplos de esto son las mutaciones *tabby* (*Eda^{Ta}*), *crinkled* (*Edaradd^{Cr}*) y *downless* (*Edar^{dl}*) las cuales carecen de células productoras del factor de crecimiento EGF (*epithelial growth factor*). Estos mutantes carecen de pelos en la piel de la cola y la zona posterior de las orejas, además de la ausencia de algunas glándulas dérmicas.

Los defectos evidentes en los ciclos del crecimiento del pelo son potencialmente útiles para el estudio del control molecular y bioquímico de los mismos, tanto en el hombre como en los animales. Por otro lado, las enfermedades inflamatorias de la piel y los folículos pilosos, como las evidenciadas por las mutaciones *flaky skin* (*fsn*) y *alopecia areata* (poligénica), nos proveen de nuevas herramientas para poder identificar proteínas específicas de importancia en el ciclo del pelo. La mutación *waved 1* (*wal1*), imitada por el ratón KO para el gen *Tgfa* (*transforming growth factor alpha*), es un buen ejemplo de una mutación que pudo ser asocia-

² El primer informe de un ratón mutante sin pelo y con piel arrugada (llamado "ratón rinoceronte") data del año 1820 en la ciudad de Londres.

da con un defecto específico en el pelo. Los experimentos de mapeos genéticos y las cruces de prueba determinaron que los genes mutados en ambos tipos de ratones eran en realidad un mismo locus (*Tgfa^{mal}*).

Las mutaciones recesivas espontáneas *hairless* (*hr*) y *hairless rhino* (*hr^{rh}*) son alélicas y fueron localizadas en el cromosoma 14. Los ratones homocigotas tienen un primer ciclo de crecimiento de pelo normal pero, alrededor del día 10 de vida, empiezan a perder definitivamente el pelo. El fenotipo de *rhino* es una manifestación más severa del fenotipo *hairless*. En el caso de *hr* se trata de un defecto molecular causado por la inserción de un retrovirus (un provirus endógeno de la leucemia murina) en un intrón del gen *hr* (un factor de transcripción de la familia *zinc finger*), lo que provoca un *splicing* aberrante del ARN mensajero. En el caso de *rhino* se trata de una sustitución de 2 pb en el exón 4 del gen, lo que resulta en un KO funcional del gen *hr*. Junto con la mutación *nude*, la mutación *hairless* es la mutación más estudiada dentro del grupo de mutaciones que causan pérdida del pelo o alopecia y ha sido indicada como modelo de la enfermedad hereditaria humana **alopecia universalis**. Esta enfermedad dermatológica que afecta a más de dos millones de personas sólo en los Estados Unidos fue asociada a una mutación en el gen homólogo *hairless*. Existen muchas mutaciones que causan alopecia parcial entre las que podemos mencionar la mutación *balding*, en el cromosoma 18, que afecta el gen *Dsg3* (*desmoglein 3*) y la mutación espontánea recesiva *nackt* (cromosoma 13), un alelo nulo del gen *Ctsl* (catepsina L). Esta última presenta, además de una marcada deficiencia de linfocitos T CD4⁺, alopecia parcial asociada a defectos en la diferenciación de la epidermis y la morfogénesis de los folículos pilosos. Utilizando estos modelos murinos, se podría estudiar la efectividad de nuevos tratamientos, aún desconociendo los defectos bioquímicos exactos en el ratón.

9.2.1.7 Enfermedades hematológicas e inmunodeficiencias

Los desórdenes sanguíneos forman parte de las enfermedades hereditarias humanas que primero se descubrieron, como ser la hemofilia ligada al X, las anemias por defectos en los genes de las globinas y algunas inmunodeficiencias. Para todas ellas existen modelos experimentales en el ratón, con grandes similitudes fenotípicas con la contraparte humana. Algunos de estos modelos, transgénicos o espontáneos, se encuentran listados en la **Tabla 9.5**. Teniendo en cuenta que los tejidos hematopoyéticos son de fácil acceso (aptos para aislar células primordiales) y sabiendo de la disponibilidad de líneas consanguíneas (isogénicas) de ratones, muchos laboratorios han redoblado sus esfuerzos en realizar trabajos en el área de la terapia génica.

Nombre del gen	Símbolo	Modelos disponibles	Enfermedad humana
Adenosine deaminase	<i>Ada</i>	Ratones KO	Inmunodeficiencia combinada severa (SCID)
CD40 ligand	<i>Cd40l</i>	Ratones KO	Inmunodeficiencia con altos niveles de IgM
Coagulation factor VIII	<i>F8</i>	Ratones KO	Hemofilia A
Cytochrome b-245, beta polypeptide	<i>Cybb</i>	Ratones KO	Enfermedad crónica granulomatosa
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	<i>Tnfrsf6^{pr}</i>	Mutación espontánea <i>lymphoproliferation</i> y ratones KO	Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune
Hemoglobin alpha gene cluster	<i>Hba</i>	Mutaciones inducidas y ratones KO	Alfa Talasemia
Hemoglobin beta gene cluster	<i>Hbb</i>	Mutaciones inducida y ratones KO	Beta Talasemia
Hemoglobin beta gene cluster	<i>Hbb</i>	Mutaciones inducidas y ratones transgénicos	Anemia Falciforme
Lysosomal trafficking regulator	<i>Lyst^{tg}</i>	Mutación espontánea <i>beige</i>	Síndrome Chediak-Higashi
Recombination activating gene-1	<i>Rag1</i>	Ratones KO	Inmunodeficiencia combinada severa (SCID)

Tabla 9.5 Enfermedades inmunológicas y hematológicas

Anemias

La **anemia falciforme**, enfermedad crónica que afecta principalmente a individuos con antepasados provenientes de África y de la cuenca del mediterráneo, fue una de las primeras enfermedades en asociarse con un defecto molecular al comprobarse que su herencia estaba ligada a una mutación en el gen de la β globina. Es interesante describir como se creó un modelo murino para esta enfermedad. Durante el desarrollo del modelo, se encontró que el ratón transgénico que co-expresaba los genes humanos de la γ globina y un gen mutado de la β globina tenía el inconveniente de no desarrollar el fenotipo anémico porque la β globina endógena (murina) interfería con la polimerización de las dos cadenas humanas. Este problema fue resuelto introduciendo los transgenes γ y β globina humanos en ratones que portan una mutación (inducida químicamente) en el gen de la β globina murino. De esta manera, y con el agregado de otros transgenes humanos responsables de la anemia falciforme, se cuenta actualmente con varios modelos experimentales en el ratón, exhibiendo una gama de fenotipos que abarca desde los más suaves a los más severos.

Inmunodeficiencias

Los modelos murinos de inmunodeficiencia son variados y en general muestran una buena correlación con la enfermedad humana que se quiere estudiar. Además, estos modelos han sido muy útiles para los estudios de muchos procesos fundamentales de la respuesta inmune como ser la adhesión celular, la comunicación entre linfocitos T y B, la presentación de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), la transducción de señales por tirosina quinasa etc. En muchos casos, la identificación de un gen mutado en una enfermedad humana fue seguida de la creación de un ratón KO para ese gen. La cantidad de ratones transgénicos y KO generados a partir de genes relacionados al sistema inmune es enorme y presentarlos excede el propósito de este capítulo, por lo tanto sólo comentaremos algunas mutaciones clásicas.

Muchas mutaciones clásicas (espontáneas) sirvieron como punto de partida para el descubrimiento de genes implicados en enfermedades humanas. Este es el caso de *beige* (*bg*), una mutación espontánea localizada en el cromosoma 13 del ratón que fue descrita en el año 1963 como una alteración del color del pelaje. Los animales homocigotas *bg/bg* poseen un pelaje más claro y una inmunodeficiencia homóloga al síndrome de *Chédiak-Higashi* (CHS) en humanos. Fundamentalmente, ambos presentan una actividad reducida de las células NK (asociada a defectos en el funcionamiento de los lisosomas), sangrados anormales e inmunodeficiencia. El gen responsable ya fue aislado por clonaje posicional en los ratones *beige* y se llama *Lyst* (*lysosomal trafficking regulator*). Posteriormente, se comprobó que el gen homólogo *LYST* se encuentra mutado en los pacientes afectados de CHS.

Otra mutación clásica del ratón de laboratorio con fenotipo inmunodeficiente es la mutación *nude* (*nu*). La misma mutación surgió en dos eventos aislados, la primera vez en 1966 en una colonia exocriada y la segunda en la línea AKR/J en 1976 (*streaker*), ambas son alélicas y mapean en el cromosoma 11. También encontramos la misma mutación en la rata: se trata de las mutaciones *Rowett nude* (*rmuN*) y *New Zealand nude* (*nznu*). En el ratón, es una de las mutaciones recesivas más difundida comercialmente y se encuentra disponible en varios fondos consanguíneos y no consanguíneos, siendo también conocidos como "ratones atómicos". Debido a la ausencia de rechazo de injertos, estos animales han sido de gran utilidad en los trasplantes de tumores xenogéneos (especialmente de origen humano) y alogéneos. Los dos defectos más notorios en los ratones homocigotas son la falla en el crecimiento del pelo y la disgénesis del epitelio tímico debido a una mutación puntual en el gen *winged helix*, una proteína de pegado (del inglés *binding*) al ADN, cuyos transcritos se expresan solamente en la piel y en el timo. Los ratones *nu/nu* poseen un timo rudimentario que permanece pequeño y quístico durante toda la vida, lo que lleva a una reducción severa en el número de células T funcionales por fallas en la maduración. Su uso como modelo de enfermedad humana está muy limitado y sólo se encontraron semejanzas con un grupo de enfermedades asociadas a defectos en el compartimento epitelial del timo (**displasia tímica**). La nueva nomenclatura para esta familia de factores de transcripción establece que el nombre correcto del gen es *Foxn1*, por lo tanto la mutación *nude* debe anotarse como *Foxn1^{nu}*.

La mutación *scid* (*severe combined immunodeficiency*) es autosómica recesiva y apareció espontáneamente en el año 1980 en el *Fox Chase Cancer Center* de Filadelfia (Estados Unidos) en una línea congénica de BALB/c. El locus *scid* pudo ser mapeado en el año 1989 en el cromosoma 16 y actualmente se ha identificado al gen responsable. Se trata de un gen de reparación del ADN llamado *Prkdc* (*protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*) cuya disfunción produce la falta de recombinación somática en los genes V(D)J de las inmunoglobulinas y los receptores TCR de los linfocitos T, lo que bloquea la diferenciación temprana de los linfocitos B y T. Los ratones homocigotas *scid/scid* (ratones SCID), cuya apariencia externa es normal, poseen niveles muy bajos, o directamente carecen de inmunoglobulinas en suero. Los ganglios linfáticos, el bazo y el timo son anormalmente pequeños, presentando este último una médula rudimentaria y ausencia de corteza. Todos estos órganos carecen además de linfocitos y células plasmáticas. La ausencia de células T y B maduras explica la incapacidad de estos animales de generar una respuesta inmune, tanto humoral como celular. No obstante, la mutación parece no afectar las líneas mieloides y eritroides y los ratones presentan niveles de actividad NK normales. Al igual que en otras inmunodeficiencias, los animales afectados pueden recuperarse con trasplantes de médula ósea singénea o con repoblación celular. De estos ensayos surgió el modelo más interesante de esta mutación: la repoblación de los ratones SCID con células inmunes humanas. A partir de células hematopoyéticas fetales de hígado, timo y ganglio en un caso y de células de sangre periférica adulta en otro, en el año 1988 se logró reconstruir un sistema inmunológico humano en el ratón, creándose el denominado ratón SCID-hu. Este modelo presenta, entre otras características, linfocitos humanos CD4+ y CD8+ e inclusive inmunoglobulinas humanas (Ig G) en sangre periférica. El hecho de que estos ratones fueran muy susceptibles a la infección por HIV-1 posibilitó múltiples estudios sobre SIDA experimental. Otros campos de aplicación de los ratones SCID son los trasplantes de tumores humanos (con un porcentaje de éxito superior al ratón *nude*) y los estudios referentes a la inmunodeficiencia combinada severa en niños.

La mutación *xid* (*X linked immune deficiency*) está ligada al cromosoma X y apareció en la línea CBA en 1972. Las hembras homocigotas y los machos hemicigotas se ven impedidos de generar respuestas a antígenos timo-independientes como los lipopolisacáridos y el dextrán. Estos animales presentan también bajos niveles de inmunoglobulinas circulantes junto a un número de células B reducido a menos de la mitad de los valores normales. Como la función T es normal, también lo son la citotoxicidad, el rechazo de injertos y la hipersensibilidad retardada. El gen afectado se denomina *Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase* (*Btk*), una enzima esencial para el desarrollo de los linfocitos B, por lo tanto la nomenclatura correcta de la mutación es *Btk^{xid}*. Muchas de estas mutaciones con fenotipo inmunológico han sido puestas juntas en un mismo fondo genético formando dobles y hasta triples mutantes. Algunos ejemplos son las líneas especiales desarrolladas por el *Veterinary Resources Program* de los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos (NIH). Entre ellas podemos citar los ratones N:NIH-*bg-xid*, con defectos en células NK y linfocitos B; los ratones N:NIH-*nu-xid*, los cuales carecen de linfocitos T y B; y el triple mutante N:NIH-*bg-nu-xid* (ratón BNX), que carece de células NK, linfocitos T y B.

Fenómenos autoinmunes y linfoproliferativos

Muchas enfermedades humanas, como la diabetes, el lupus, la artritis y la glomerulonefritis poseen un componente autoinmune. Existen dos mutaciones espontáneas del ratón que han sido esenciales en el descubrimiento del rol de la apoptosis en el mantenimiento de la auto-tolerancia dentro del sistema inmune. Estas son las mutaciones *lymphoproliferation (lpr)* y *generalized lymphadenopathy (gld)*. Son dos mutaciones autosómicas recesivas surgidas independientemente en las líneas MRL/Mp y C3H/HeJ, respectivamente, y ambas coinciden en su fenotipo semejante a procesos autoinmunes en humanos. En su corta vida, estos ratones desarrollan agrandamiento masivo de ganglios linfáticos, esplenomegalia pronunciada, desarrollo de glomerulonefritis por complejos inmunes, poliarteritis degenerativa y lesiones articulares que se asemejan a la **artritis reumatoidea**. A nivel serológico, en los animales *lpr/lpr* se detecta un nivel de γ globulinas cinco veces mayor al normal con presencia de anticuerpos antinucleares. La causa molecular de la mutación *lpr* es un defecto en el gen *Fas*, ahora llamado *Tnfrsf6* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6*), gen que codifica para un antígeno perteneciente a la familia de los receptores de TNF (del inglés *tumor necrosis factor*), mediador de la apoptosis. Recientemente se identificaron mutaciones en el gen homólogo humano *FAS* en pacientes con **síndrome linfoproliferativo autoinmune**. Por otro lado, se comprobó que la mutación *gld* involucra al gen *Fasl*, que codifica para el ligando del antígeno Fas. Como sucede con muchas enfermedades hereditarias y mutaciones murinas, los genes modificadores (según el fondo genético) juegan un papel muy importante en el desarrollo de los fenotipos descriptos.

El grupo de ratones NZM (*New Zealand mixed*) ha sido propuesto como modelo de Lupus Eritematoso Sistémico (LES), enfermedad autoinmune que cursa con producción de auto-anticuerpos contra el ADN de doble cadena y depósito de complejos inmunes en tejidos blanco como el riñón, la piel, y el cerebro. Se sabe que la genética de esta enfermedad es compleja y que además los factores ambientales influyen en su inducción y agravamiento. Los ratones NZM fueron derivados de cruza entre las líneas consanguíneas NZB y NZW, las líneas progenitoras del modelo clásico de LES que usaba hembras (NZB x NZW)F1. Estas líneas recombinantes consanguíneas son llamadas en su conjunto líneas NZM y fueron usadas para localizar varios loci de susceptibilidad al desarrollo de LES.

9.2.1.8 Enfermedades metabólicas

En la **Tabla 9.6** se describen mutaciones en varios genes murinos que sirven como modelo experimental en enfermedades metabólicas y hormonales. Entre ellos, hay tres modelos (*HexA*, *Hprt* y *Uox*) que ilustran muy bien el hecho de que el ratón y el hombre, si bien son muy parecidos para muchas vías metabólicas, presentan a veces diferencias importantes.

Nombre del gen	Símbolo	Modelos disponibles	Enfermedad humana
Apolipoprotein B	<i>Apob</i>	Ratones transgénicos y KO	Hipolipoproteinemia
Apolipoprotein E	<i>ApoE</i>	Ratones transgénicos y KO	Hiperlipoproteinemia tipo III
Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator homolog	<i>Cftr</i>	Ratones KO	Fibrosis Quística
Ferrochelataza	<i>Fch^{miPas}</i>	Mutación inducida <i>ferrochelataza deficiency, mutation 1</i>	Porfiria Eritropoyética
Hexokinase A	<i>Hexa</i>	Ratones KO	Enfermedad de Tay-Sachs
Hexokinase B	<i>Hexb</i>	Ratones KO	Enfermedad de Sandhoff
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	<i>Hprt</i>	Ratones KO	Síndrome de Lesch-Nyhan

Tabla 9.6 Enfermedades metabólicas y hormonales

Desórdenes en el metabolismo de la purina

Los nucleótidos púricos (purinas) son reciclados a partir de las bases púricas por la acción de dos enzimas: APRT (*adenine phosphoribosyl transferase*) y HPRT (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*). Ante la ausencia de APRT la adenina es convertida en un producto insoluble que se deposita en los riñones formando cálculos y, a la larga, generando deficiencia renal. La deficiencia de HPRT en humanos causa el síndrome de *Lesch-Nyhan*, una enfermedad ligada al cromosoma X caracterizada por retardo mental y automutilación compulsiva. Recientemente, se crearon ratones KO para estos genes. El ratón KO del gen *Appt* exhibe un fenotipo idéntico al de la deficiencia humana pero, contrariamente, los ratones KO para el gen *Hprt* no ostentan ninguna patología. Existen dos explicaciones para este fenómeno: una es que en el ratón, a diferencia del hombre, el gen *Appt* es más importante que el *Hprt* para el reciclado de las purinas, la otra explicación es que el ácido úrico no se acumularía gracias a la actividad de la enzima urato oxidasa (UOX), enzima no funcional en los humanos. Coincidiendo con esta teoría, los ratones KO para el gen *Uox* presentan nefropatías que se asemejan al desorden humano.

Fibrosis Quística (FQ)

La **fibrosis quística** es la enfermedad hereditaria letal más común entre la gente de raza caucásica y se caracteriza por un transporte defectuoso de los iones de cloro a través de las membranas y por una producción excesiva de moco por parte de las células epiteliales. A pesar de que la causa de mortalidad de los pacientes con FQ es, fundamentalmente, la presencia de infecciones pulmonares, otras afecciones como las obstrucciones pulmonares, la infla-

mación del páncreas, del conducto biliar y los vasos deferentes son también parte de la sintomatología. El gen responsable de esta enfermedad (*CFTR*, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) se aisló en 1989 y desde ese momento han sido descritas una gran cantidad de mutaciones en los pacientes afectados. El primer modelo de FQ fue creado apenas tres años después de la identificación del gen humano. Hoy en día existen 11 modelos diferentes en el ratón, algunos con la disrupción total del gen (alelos nulos) y otros con cambios específicos que imitan las mutaciones halladas en la clínica humana. En algunos casos, los ratones mantienen bajos niveles del ARNm normal para el gen *Cftr*, concomitantemente con las formas mutadas. Las variaciones fenotípicas descritas debido a los distintos fondos genéticos, las diferentes mutaciones del gen *Cftr* y las influencias ambientales serán muy importantes a la hora de definir las bases de la enfermedad. Los ratones homocigotas nulos (KO) para el gen *Cftr* tienen una alta mortalidad neonatal como resultado de obstrucciones intestinales, síntoma que ocurre sólo en una minoría de los pacientes con FQ. Aparentemente, los defectos intestinales hacen que estos ratones vivan poco tiempo y por lo tanto la enfermedad pulmonar no llega a manifestarse (seguramente debido a la presencia de genes modificadores). Por otro lado, una variante de ratón transgénico en el cual se permite una expresión residual del gen *Cftr* ha permitido alargar la vida de los ratones y lograr un modelo experimental que se acerca más al humano, incluida la enfermedad pulmonar.

Arteriosclerosis

Las enfermedades cardiovasculares que genera la **arteriosclerosis** son una de las principales causa de muerte en todo el mundo. La patogénesis de la arteriosclerosis es compleja e incluye una combinación de factores ambientales y genéticos. Entre los primeros se encuentran la dieta y el nivel de lípidos en la sangre. La hipercolesterolemia familiar fue una de las primeras enfermedades genéticas relacionadas al metabolismo del colesterol y comprende mutaciones en el receptor de la **lipoproteína de baja densidad (LDLR)**. Otro factor de riesgo para la arteriosclerosis es la **hiperlipoproteinemia tipo III** asociada a diferentes formas alélicas del gen *APOE*. Entre los modelos murinos de esta enfermedad encontramos los ratones KO para los genes *ApoE* y *Ldlr*. El primero desarrolla hipercolesterolemia y lesiones arterioscleróticas a temprana edad, inclusive si se los alimenta con dietas de bajo contenido graso; los ratones *Ldlr* $-/-$ presentan un fenotipo similar pero bastante más atenuado. Estos dos modelos murinos son muy útiles para el estudio de los mecanismos del desarrollo de las lesiones arterioscleróticas y también para el ensayo de posibles terapias génicas. De todas formas, se sugirió que la arteriosclerosis en el ratón estaría afectada por otros genes involucrados en el metabolismo de los lípidos.

9.2.2 Modelos murinos de enfermedades hereditarias complejas (multigénicas)

9.2.2.1 Cáncer

A principios del siglo XX, cuando se comenzó a experimentar con las primeras líneas consanguíneas de ratones, se demostró claramente que la susceptibilidad a ciertos tipos de cáncer se

comportaba como un rasgo hereditario y que tenía una gran influencia de parte del fondo genético de los ratones estudiados. Posteriormente se descubrió que, efectivamente, la susceptibilidad al cáncer era también un rasgo hereditario en los humanos y que existían “cánceres familiares” en los cuales los individuos afectados desarrollaban un espectro definido de tumores. Hoy sabemos que muchos de esos cánceres familiares están representados por mutaciones germinales en genes **supresores de tumores**, genes de **reparación del ADN** y **oncogenes**, muchas veces acompañado por fenómenos de **inestabilidad genómica**. Es importante aclarar que el cáncer familiar es sólo una parte mínima de los casos de cáncer en humanos, siendo la mayoría espontáneos o no hereditarios. En este último caso las causas genéticas son muy diversas, incluyendo interacciones complejas entre muchos genes, y los fenómenos de carcinogénesis se presentan en pasos múltiples. Existe un abanico enorme de modelos murinos para el estudio experimental del cáncer, abarcando distintas líneas consanguíneas, mutaciones espontáneas, ratones transgénicos y KO. Las ventajas más importantes que ofrecen estos modelos, en contraposición a las líneas celulares tumorales (humanas), son (i) la posibilidad de estudiar el efecto de las mutaciones que predisponen al cáncer en un fondo genético uniforme y (ii) la posibilidad de llevar a cabo todo tipo de estudios básicos y ensayos terapéuticos *in vivo*.

La tecnología transgénica ha sido de particular importancia para el estudio de la expresión de oncogenes en animales, especialmente para evaluar aquellos procesos que no pueden ser abordados desde los cultivos celulares, como ser el espectro de tejidos susceptible a la actividad transformante del oncogén o sus efectos sobre el crecimiento y la diferenciación de tejidos. Por ejemplo, cuando se usan diferentes promotores para dirigir la expresión de los oncogenes *Myc* o *Hras1* en diversos tejidos, en la mayoría de los casos el resultado es el crecimiento tumoral. Sin embargo, muchos tejidos que expresan el oncogén nunca desarrollan tumores. Diversos laboratorios han demostrado que la expresión alterada del oncogén *Myc* predispone fuertemente a las células a la transformación maligna. Cuando *Myc* es ligado al promotor del virus de tumor mamario murino (MMTV) causa cáncer de mama, pero cuando es unido a la región estimuladora (*enhancer*) de la cadena pesada de inmunoglobulinas, la malignidad observada es de origen linfóide. Por lo tanto, la regulación alterada del *Myc* aumenta notablemente la posibilidad de crecimiento tumoral sin ser necesaria la mutación del gen. Muchos de los ratones transgénicos que portan oncogenes han sido centro de grandes controversias en la comunidad científica. Este es el caso del *OncoMouse*TM (o ratón TG.AC, que porta el gen *v-Ha-ras*), quien fuera la primera patente autorizada sobre un animal transgénico dada a la Universidad de Harvard en 1988. La licencia sobre su comercialización fue otorgada a la empresa *DuPont* pero, a partir del año 2000, los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos (NIH) lograron un acuerdo para que puedan acceder a estos ratones (sin pagar los derechos de autor) todos los investigadores que trabajan en organismos académicos sin fines de lucro.

Otra posibilidad es la creación de ratones nulos para genes supresores de tumores como *Trp53* (p53), *Nf1* y *Rb*. En el último caso, la delección de las dos copias del gen no lleva a la aparición de **retinoblastomas** (como ocurre en los humanos). Esto sólo sucede si se anula otro gen llamado *Rb11* (*p107*); lo que demuestra una vez más las diferencias entre los mecanismos oncogénicos entre ratones y humanos. Una alternativa interesante a los ratones KO

para genes supresores de tumores es el uso de las técnicas de *knock in* para introducir formas mutantes de estos genes, como ha sido realizado con una serie de alelos del gen supresor de tumores *Brca1*. Como los ratones homocigotas KO (*Brca1*-/-) mueren *in utero* (entre los días embrionarios 9 y 14), la utilización del sistema *Cre/loxP* fue esencial para crear un modelo específico de tumorigenesis mamaria.

Finalmente, la introducción de genes virales en ratones transgénicos es un modelo ideal para el estudio del poder oncogénico de estos virus. Quizás el ejemplo más notable sea el experimento en el cual se introdujeron en un ratón genes del HTLV-1 (del inglés *human T-lymphotrophic virus*) cuyas infecciones son asociadas con leucemias de células T. Cuando el gen *tat* del HTLV-1 fue introducido en el ratón, su poder oncogénico quedó demostrado por la formación de múltiples tumores mesenquimatosos.

En la **Tabla 9.7** podemos observar las mutaciones y los ratones transgénicos más importantes para el estudio del cáncer familiar.

Nombre del gen	Símbolo	Modelos disponibles	Enfermedad humana
Adenomatosis polyposis coli	<i>Apc^{Min}</i>	Mutación inducida <i>multiple intestinal neoplasia</i> y ratones KO	Poliposis familiar
Breast cancer 1	<i>Brca1</i>	Ratones KO (incluido condicionales)	Cáncer de mama tipo 1
MutL (<i>E. coli</i>) homolog 1	<i>Mlh1</i>	Ratones KO	Cáncer del colon no relacionado con poliposis (HNPCC) tipo 2
MutS (<i>E. coli</i>) homolog 2	<i>Msh2</i>	Ratones KO	Cáncer del colon no relacionado con poliposis (HNPCC) tipo 1
Neurofibromatosis	<i>Nf1</i>	Ratones KO	Neurofibromatosis tipo 1
Retinoblastoma 1	<i>Rb1</i>	Ratones KO	Retinoblastoma familiar
Transformation-related protein 53	<i>Trp53</i>	Ratones transgénicos y KO (incluido condicionales)	Síndrome de Li-Fraumeni
Wilm's tumor homolog	<i>Wt1</i>	Ratones KO	Tumor de Wilm; Síndrome de Denys-Drash

Tabla 9.7 Cáncer hereditario

Cáncer colorectal

En el año 1993 se publicaron una serie de artículos que revolucionaron la visión que se tenía sobre el cáncer hereditario. Estos estudios demostraron, por primera vez, que los genes de reparación del ADN (aislados originalmente de levaduras) jugaban un papel crucial en el cáncer de colon familiar. Brevemente, la predisposición genética a desarrollar este tipo de cáncer resulta de mutaciones germinales en los genes de reparación del ADN. Por ejemplo, los individuos heterocigotas para una mutación en el gen *MSH2* (*MutS homolog 2*—homólogo del gen de la levadura *MutS*) desarrollan cáncer de colon familiar no relacionado con poliposis tipo 1. Se ha comprobado que este tipo de mutaciones provoca inestabilidad genómica generalizada y que la misma puede medirse por la presencia de cambios en el tamaño de los microsatélites de ADN (ver Capítulo VI), fenómeno denominado “**inestabilidad de los microsatélites**”—MSI (*microsatellite instability*). De la misma forma, otras mutaciones de genes de reparación del ADN, el *MLH1* (*MutL homolog 1*—homólogo del gen de la levadura *MutL*) y el *PMS2* (*postmeiotic segregation increased 2*), son responsables del cáncer de colon familiar no-poliposo tipo 2 y 3, respectivamente. Efectivamente, los ratones deficientes para los genes *Msh2* y *Pms2* son viables y fértiles, pero, a partir de los dos meses de vida, empiezan a desarrollar linfomas y sarcomas que muestran MSI como indicio de que existen fallas en el sistema de reparación del ADN.

Otro ejemplo de cáncer intestinal hereditario es la **adenomatosis poliposa** del colon, en el cual el gen mutado es un gen supresor de tumores denominado *APC* (*adenomatous polyposis coli*). En el ratón, existe una mutación, que fue inducida químicamente con ENU, que afecta al gen homólogo murino *Apc*. Se trata de la mutación dominante *multiple intestinal neoplasia* (*Min*), ahora *Apc^{Min}*, cuyos portadores desarrollan adenomas y adenocarcinomas intestinales. También se han desarrollado ratones KO para el gen *Apc*, algunos muy interesantes por ser viables al estado homocigota, como la mutación *Apc^{Tm1638T}*. El número de adenomas intestinales depende enormemente de un gen modificador denominado *Mom1* (*modifier of Min*) presente en varias líneas consanguíneas. Todas las líneas con alto número de tumores (por ejemplo C57BL/6j) expresan bajos niveles del alelo resistente. Una mutación de marco del gen *Pla2g2a* (*phospholipase A2, group IIA*) es el alelo responsable de la resistencia, ahora *Pla2g2a^{Mom1-r}*. También se identificó un alelo del mismo gen que confiere susceptibilidad (*Pla2g2a^{Mom1-s}*).

Síndrome de Li-Fraumeni

Esta rara enfermedad, del tipo autosómica recesiva, es uno de los cánceres familiares mejor estudiados. Los pacientes afectados desarrollan una serie de tumores, entre los que se encuentran carcinomas de mama y de cerebro, osteosarcomas y leucemias, entre otros. La mutación germinal asociada a este síndrome afecta al gen supresor de tumores *TRP53* (cromosoma 17q), más conocido como p53. Este gen supresor de tumores es además uno de los genes más afectados en las formas esporádicas (no familiares) de muchos tipos de cáncer, hallándose mutaciones espontáneas en la mitad de todos los tumores primarios. Como en el caso de los pacientes afectados por el **síndrome de Li-Fraumeni**, los ratones heterocigotas para un alelo nulo del gen *Trp53* (cromosoma 11) desarrollan tumores, pero con un período de latencia mucho más largo que los ratones homocigotas. Es interesante resaltar que, dependiendo del

fondo genético de la línea, se desarrollan distintos tipos de tumores. Esta característica es muy útil para poder aislar posibles genes modificadores de la incidencia tumoral.

9.2.2.2 Obesidad y diabetes

La mutación espontánea *obese* (*ob*, cromosoma 6) fue descrita en *The Jackson Laboratory* en el año 1949 en la línea C57BL/6. La identificación del gen responsable, *Lep* (*leptin*), una hormona que regula el control del peso, fue lograda hace algunos años y es un ejemplo clásico de clonaje posicional. La presencia del gen mutado produce una marcada obesidad asociada con hiperfagia e hiperinsulinemia. La ganancia de peso en los ratones *Lep^{ob}/Lep^{ob}* puede alcanzar dos a tres veces los valores de un ratón normal y muchas de las perturbaciones inmunológicas presentes podrían ser secundarias al desbalance metabólico de estos animales. Las anomalías observadas son una reducción en la masa de los órganos linfáticos y una disminución en el número de linfocitos y monocitos circulantes con respecto a los valores normales. La inmunidad mediada por células T se ve comprometida con la edad, lo que se refleja en la dificultad de generar respuestas de hipersensibilidad retardada y en rechazar aloinjertos.

Los estudios sobre obesidad en los ratones *ob* fueron complementados con estudios similares en otra mutación clásica del ratón de laboratorio que imita el fenotipo de los ratones obesos: la mutación *diabetes* (*db*) en el cromosoma 4. Existen varias mutaciones independientes de esta mutación, aparecidas espontáneamente en *The Jackson Laboratory* y en el *Institut Pasteur* en París. Finalmente se descubrió que se trataba del gen que codificaba para el receptor de la leptina (*Lep^{r^{db}}*). Vale la pena mencionar que estas dos mutaciones son otro ejemplo del efecto del fondo genético sobre el fenotipo. Ambas mutaciones causan obesidad y diabetes leve en fondo C57BL/6J pero la diabetes es muy severa cuando el fondo es C57BLKS/J. Las mutaciones *obese* y *diabetes* son modelos de la **diabetes tipo II** (no dependiente de insulina). Otros modelos de obesidad y diabetes tipo II lo constituyen las líneas consanguíneas KK (algunas sublíneas portan el gen de obesidad *yellow*, *A^y*), PBB y NZO.

La diabetes mellitus dependiente de la insulina (**diabetes tipo I**), cuya sigla en inglés es IDDM, se desarrolla en un escenario en el cual el ambiente y los factores genéticos juegan un papel preponderante. En esta afección autoinmune, el sistema inmune del individuo infiltra el páncreas y destruye las células productoras de la insulina (célula β de los islotes de Langerhans). Existe una línea consanguínea de ratones llamada NOD (*non obese diabetes*) que desarrolla en forma espontánea una patología muy similar a la diabetes tipo I humana. Uno de los loci involucrados en esta susceptibilidad es el locus *Idd1*, ubicado en el CMH. Por intermedio del uso de cruza experimentales con líneas resistentes a la diabetes (como C57BL/6 y NON), se pudo identificar otros loci de susceptibilidad a la diabetes (no ligados al CMH), llamados *Idd2-Idd5*. Para que se desarrollen los síntomas diabéticos, deben estar presentes varios alelos susceptibles de los loci mencionados, ya que estos alelos se comportan en forma aditiva. Actualmente, gracias al desarrollo de líneas congénicas portando regiones cromosómicas de líneas susceptibles, se está trabajando en la identificación de los genes de susceptibilidad. Para más información sobre modelos de diabetes tipo I, consultar el *Type 1 Diabetes Repository* (<http://www.jax.org/t1dr/>).

9.3 Otros roedores utilizados como modelo experimental

Si bien las mutaciones del ratón de laboratorio son las más utilizadas como modelo de enfermedades humanas, consideramos importante mencionar brevemente otros roedores usados como modelo en medicina experimental.

La rata es utilizada como animal de experimentación en la investigación biomédica especialmente en cuatro áreas: inmunogenética de trasplantes, enfermedades cardiovasculares, comportamiento y carcinogénesis. En este último caso, existen dos líneas consanguíneas de rata que han sido muy importantes en los estudios genéticos en cáncer mamario. Las líneas WKY (Wistar Kyoto) y COP (Copenhague) son resistentes al desarrollo de neoplasias mamarias luego de la administración experimental del carcinógeno químico **DMBA** (7-12 Dimetil Benzotraceno). Contrariamente, la línea WF (Wistar Furth) es susceptible al DMBA y desarrolla carcinoma de mama. Utilizando retrocruzadas entre estas líneas consanguíneas, se pudo identificar varios loci de resistencia y susceptibilidad al cáncer de mama inducido por DMBA. Otro modelo genético de rata usado en cáncer experimental es la **rata Eker**. Este modelo presenta un carcinoma renal hereditario que está ligado a una mutación dominante en el gen *Tsc2* (*tuberous sclerosis 2*) y es por lo tanto un modelo importante de cáncer hereditario.

El descubrimiento de mutaciones espontáneas con patologías similares a enfermedades humanas es también una situación frecuente en los animalarios que crían ratas. Se han descrito por lo menos 100 mutaciones espontáneas entre las cuales existen varias con fenotipos homólogos a las mutaciones murinas. La rata *nude* constituye un ejemplo de rata inmunodeficiente que goza de una popularidad medianamente extendida. La primera mutación recesiva, *Rowett nude* (*mu*), apareció en forma espontánea en el *Rowett Research Institute, Aberdeen, Escocia*, en 1953. Años más tarde, en *Victoria University, Wellington, Nueva Zelandia*, ocurrió, en forma independiente, la mutación *mu^{nz}* (o *mu^N*). Ambas mutaciones son alélicas y afectan el gen homólogo de la mutación *nude* del ratón (factor de transcripción *Foxn1*). El fenotipo también es similar, con defectos en el crecimiento del pelo y ausencia de timo; esto último es la causa de la falta de linfocitos T maduros y la consiguiente inmunodeficiencia. Actualmente, la mutación *mu* se encuentra en varias líneas congénicas, entre ellas *CBH-mu*; *DA-mu*; *F344-mu*; *LEW-mu*; *LOU-mu*; y *WAG-mu*. Dentro de los modelos inmunológicos, existen varios modelos de autoinmunidad en la rata que se encuentran disponibles en el *NIH Autoimmune Rat Model Repository and Development Center* (http://www.ors.od.nih.gov/dirs/vrp/ratcenter/f_project.html).

La realización de ratas KO por medio de mutagénesis dirigida no es posible aún debido a que, como se vio, las técnicas de cultivos de células ES son, por el momento, sólo factibles en el ratón. En cambio, la técnica de microinyección directa de ADN en el pronúcleo de huevos fertilizados es también utilizada en la rata y ha permitido el desarrollo de líneas transgénicas que son usadas en diversas áreas de la biomedicina experimental. Gracias a la disponibilidad de líneas consanguíneas, mutantes, y en menor medida, transgénicas, las ratas de laboratorio representan también una fuente interesante de modelos de enfermedades humanas, en particular las conocidas como enfermedades complejas o multigénicas (ver *Rat Resource and Rese-*

arch Center <http://www.radil.missouri.edu/mrc/>). Las ratas han contribuido históricamente al entendimiento de tres de estas enfermedades (en forma asociada): la obesidad, la diabetes y la hipertensión.

9.3.1 La rata como modelo de diabetes dependiente de insulina (diabetes tipo I).

La línea BB (*Bio-Breeding*) fue desarrollada a partir de una colonia de ratas Wistar que presentaba diabetes mellitus espontánea en los laboratorios *Bio-Breeding*, Ontario, Canadá (1974). A partir de este grupo de ratas exocriadas se desarrollaron dos líneas consanguíneas, una propensa a la diabetes (BBDP, *diabetes-prone*) y la otra resistente (BBDR, *diabetes-resistant*). La línea diabética presenta síntomas de diabetes dependiente de insulina y cetosis entre los 60 y 120 días de edad, con fenómenos autoinmunes que destruyen las células β del páncreas. En forma paralela, estas ratas muestran linfopenia, tiroiditis linfocítica y, en algunos casos, úlceras gástricas y falla renal. La diabetes autoinmune presente en la línea BBDP es un rasgo poligénico y hasta el momento se han identificado algunos loci ligados al CMH y otros fuera del mismo.

La línea consanguínea LETL (*Long Evans Tokushima Lean*) fue desarrollada en Japón a partir de ratas exocriadas *Long Evans* y alcanzó las 20 generaciones de endocría en 1989. Estas ratas comienzan a mostrar síntomas de diabetes (con niveles muy elevados de glucemia) a las 15 semanas de vida y, si no se les administra insulina, mueren en muy corto plazo (alrededor de 30 días). Por lo tanto, son un buen modelo de diabetes tipo I, con la ventaja sobre otras líneas de rata (como la BBDP), de no presentar linfopenia asociada. Los mismos investigadores desarrollaron una sublínea de LETL con alta tendencia a presentar diabetes, denominada *Komeda Diabetes Prone* (KDP). El 100% de las ratas pertenecientes a esta sublínea desarrolla **insulinitis** (reacción inflamatoria alrededor de la células β del páncreas) en forma espontánea antes de los 220 días de edad. La línea LETO (*Long Evans Tokushima Otsuka*) fue desarrollada paralelamente a partir del mismo grupo parental (*Long Evans*) para ser utilizada como control (ratas no diabéticas).

9.3.2 La rata como modelo de obesidad y diabetes tipo II

En la rata, las dos mutaciones recesivas más populares que causan obesidad asociada con diabetes son *fatty* (*fa*) y *corpulent* (*cp*), esta última luego conocida como *fa^k*, ya que se descubrió que era un alelo de *fa*. Ambas son espontáneas, aparecieron en grupos de ratas exocriadas, y fueron introducidas en fondos consanguíneos por retrocruza. La mutación *fa* fue descubierta por L.M. Zucker y T.F. Zucker a principios de la década de 1960 y fue mantenida en un grupo de ratas exocriadas bautizadas como **ratas Zucker**. La línea consanguínea ZDF fue establecida en 1985 a partir de esas ratas **Zucker fatty** (*falfa*). La obesidad comienza a manifestarse a las tres a cinco semanas de vida y cursa con hipertrofia e hiperplasia de adipocitos, hiperlipemia,

hipercolesterolemia e hiperinsulinemia. Las ratas corpulentas, o ratas Koletsky (fa^k/fa^k), aparecieron a fines de 1960 en el laboratorio del Dr. Simon Koletsky en Estados Unidos. La mutación fa^k tiene un fenotipo variable según el fondo genético en la que se encuentre. Por ejemplo, la línea congénica LA- fa^k no desarrolla diabetes, pero sí obesidad; la línea congénica SHR/N- fa^k (con hipertensión espontánea) es un buen modelo para el estudio de las complicaciones de la obesidad asociada con diabetes tipo II. Hoy en día se sabe que las mutaciones fa y fa^k son alelos nulos (*knock-out* naturales) del gen *Lepr* (*leptin receptor*); el mismo gen (homólogo) que se encuentra afectado en la mutación murina *diabetes* (*Lepr^{db}*). Estas ratas son fundamentalmente un modelo de la obesidad genética (en particular, la obesidad hipertrófica temprana) y en segundo lugar de la diabetes tipo II (al igual que las mutaciones murinas *ob* y *db*). Este tipo de diabetes asociado a obesidad e hipertensión constituye más del 80% de los casos de diabetes en los humanos.

La línea consanguínea OLETF (*Otsuka Long Evans Tokushima Fatty*) constituye otro modelo de diabetes tipo II asociada a obesidad en la rata de laboratorio. Esta línea fue desarrollada por cruza con selección a partir de un grupo de ratas exocriadas Long-Evans por Kazuya Kawano y colaboradores (1992) y se mantiene actualmente en el *Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japón* (<http://ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/>). Los principales rasgos fenotípicos de la línea son hiperinsulinemia, hiperglucemia, resistencia a la insulina, hipertriglicemia y obesidad moderada. Estos síntomas se presentan en forma tardía y principalmente en machos, con una incidencia del 100% a las 25 semanas de vida. Una vez más, la diabetes en esta línea es un carácter poligénico y ya se han identificado varios loci (QTL's) implicados en el desarrollo de la enfermedad.

9.3.3 La rata como modelo de hipertensión y obesidad

La línea consanguínea de ratas SHR (*spontaneous hypertensive rat*) es sin dudas la más popular como modelo de hipertensión espontánea y enfermedad cardiovascular. La línea SHR fue desarrollada en la década de 1960 en Japón (*Kyoto University*) a partir de un grupo de ratas exocriadas Wistar, aplicando selección para animales de alta presión (presión sistólica mayor a 150 mm Hg.). En forma similar a lo que se observa en los humanos, los machos de la línea SHR desarrollan la enfermedad en forma más severa y prematura y por lo tanto son el modelo de elección. Además de ser utilizada como modelo experimental, la línea SHR ha sido utilizada por más de 30 años para probar nuevos medicamentos que bajen la presión sanguínea. La línea WKY es comúnmente usada como control normal (presión normal) de SHR, aunque su uso está cuestionado por las diferencias genéticas entre estas líneas. La línea consanguínea SHRSP (*SHR stroke prone*) fue desarrollada como una sublínea de la línea SHR con presión sanguínea muy alta (más de 250 mm Hg.) y tendencia a los accidentes cerebro vasculares. Las ratas SHRSP viven apenas un año, mientras que los animales de la línea SHR viven dos años y las ratas WKY llegan a los tres años de vida. Si bien estas líneas consanguíneas de rata son modelos extendidos para la hipertensión, las mismas tienen algunas diferencias con la enfermedad en los humanos. Por ejemplo, la arteriosclerosis es muy común entre los pacientes hi-

pertensos pero no se observa en estas líneas de ratas; además, la edad relativa de aparición de la hipertensión es mucho más temprana en las ratas SHR.

La línea SHROB es un interesante modelo de hipertensión espontánea asociada a obesidad. La línea es el resultado de la cruce de hembras obesas (ratas Koletsky mutantes fa^k/fa^k), con ratas hipertensas de la línea SHR. Estas ratas presentan hipertensión, hiperlipemia, hiperinsulinemia y fallas renales; por estos síntomas, son un buen modelo de la afección humana conocida como **síndrome X** (o **síndrome metabólico**). En forma paralela, se realizó la retrocruza de ratas Koletsky con ratas SHR/N, seguido de endocría con selección para la mutación fa^k , lo que generó la nueva línea consanguínea SHHF (parcialmente congénica). Estas ratas son modelo de hipertensión, obesidad, diabetes tipo II (en los machos obesos) y falla cardíaca congestiva. La gran ventaja de esta línea es que el desarrollo de la afección cardíaca procede en forma lenta, acercándose más a lo que se observa en las personas. Las líneas consanguíneas ZDF, SHROB y SHHF son comercializada por *Charles River Laboratories*.

Otro modelo de hipertensión no asociado a obesidad lo constituyen las ratas Dahl SS (*salt-sensitive*) y SR (*salt-resistant*), seleccionadas por L. K. Dahl a partir de ratas Sprague-Dawley en *Brookhaven National Laboratories, New York*, Estados Unidos. En las ratas SR (normotensas), el elevado consumo de sal (dietas con 8% de ClNa) durante 3-4 semanas no provoca cambios significativos en la presión arterial; en cambio, las ratas sensibles a la sal (SS) muestran un incremento significativo de la presión arterial con lesiones renales y vasculares asociadas, lo que les provoca la muerte dentro de las ocho semanas de empezada la dieta. No obstante, las ratas SS mantenidas con dietas bajas en sal (0,3% ClNa) sobreviven por mucho más tiempo, aunque evidencian hipertensión. Se sospecha que una de las causas de esta diferencia estaría localizada en los riñones, ya que las ratas SS tienen menos glomérulos (alrededor de 15%) que las ratas SR.

Finalmente, un ejemplo de rata transgénica usado en estudios de hipertensión es la línea que sobre expresa el gen *Ren2* (*renin 2*), aunque su valor como modelo de la hipertensión humana se ve limitado por el hecho de ser un fenotipo monogénico, y no poligénico como en los humanos.

9.3.4 La rata como modelo de Epilepsia

En la década de 1980, el investigador japonés Tadao Serikawa y sus colaboradores propusieron a la rata SER (*spontaneously epileptic rat*) como un posible modelo de **epilepsia** humana. Esta línea de ratas es homocigota para dos mutaciones recesivas llamadas *zitter* (*zi*) y *tremor* (*tm*), lo que causa (además de vibras enruladas) convulsiones epileptiformes (tremor) que ocurren en forma espontánea a partir de los dos meses de edad. Los hallazgos patológicos evidenciaron una encefalopatía espongiiforme (debido a la presencia de vacuolas en el sistema nervioso central) e hipomielinización. Por medio de estudios de ligamiento genético, se pudo determinar que las mutaciones *tm* y *zi* se localizaban en el cromosoma 10 y 3 de la rata, respectivamente.

Recientemente, el mismo laboratorio identificó a la mutación *zi* como una deleción de 8 pb en el sitio de *splicing* del gen *attractin* (*Atm*), un gen involucrado en la interacción entre células inmunes y el control de la homeostasis de la energía corporal. El mismo gen se encuentra afectado en la mutación espontánea (recesiva) del ratón llamada *mahogany* (*Atm^{mg}*) y en la mutación recesiva del hámster Sirio *black tremor* (*bt*). Siendo que este gen también interviene en ciertos procesos de la pigmentación del pelo en los animales de color agutí, cuando la mutación *zi* es introducida en ratas agutí, se obtiene un oscurecimiento del pelaje, como ya fuera descrito en los ratones *mg/mg*. Experimentos de rescate de fenotipo por medio de ratas transgénicas demostraron que la forma de membrana del gen *attractin* complementa los fenotipos neurológicos y de pigmentación, y no así la forma secretada.

9.3.5 El hámster como modelo experimental

Si bien tienen muy baja distribución, o a veces nula, se han descrito alrededor de 50 mutaciones en el hámster Sirio (*Mesocricetus auratus*), la mayoría con efecto sobre el pelaje. Entre ellas, se destacan *piebald* (*s*), *cardiomyopathy* (*cm*), *Lethal grey* (*Lg*), *hairless* (*hr*), *anophthalmic white* (*Wh*), y *seizure* (*sz*). La mutación recesiva *cm* se encuentra mantenida en homocigosis en la línea consanguínea BIO14.6 (conocidos como hámsters CM) y es muy usada en cardiología experimental, ya que su fenotipo se asemeja a ciertas formas de **cardiomiopatías** humanas con falla cardíaca progresiva. Recientemente, se supo que los hámster CM portan una mutación nula en el gen δ **sarcoglicano** (del inglés *sarcoglycan*). Además de las mutaciones mencionadas, el hámster Sirio es usado como modelo de enfermedades infecciosas, trombo-sis, amiloidosis y caries dentales.

Por su lado, el hámster Chino (*Cricetulus griseus*), originalmente criado para ser usado en estudios del protozoo *Leishmania donovani*, ha sido propuesto como modelo de diabetes tipo I, debido a su predisposición genética; lo que se ve favorecido por la existencia de líneas consanguíneas no diabéticas. Además, el bajo número de cromosomas (11 pares de cromosomas grandes y bien distinguibles) ha impulsado el uso del hámster Chino en ensayos de genotoxicidad, particularmente frente a radiación, contaminantes ambientales y drogas terapéuticas.

9.4 El valor y las limitaciones de las mutaciones como modelo de enfermedades humanas

Cuanto más modelos homólogos son identificados, más obvia se hace la existencia de diferencias en la severidad de la enfermedad entre los humanos y el ratón. Por ejemplo, la severidad de la distrofia muscular que afecta a miles de niños contrasta con la relativa suavidad de los síntomas en el ratón. Para explicar estas discrepancias podemos mencionar que las dife-

rencias observadas entre el ratón y el hombre no deberían sorprendernos tanto, ya que las variaciones de severidad intra-especie son relativamente comunes. Un buen ejemplo de esto lo constituye la mutación ferroquelatasa deficiente *Fech^{m1Pas}*, inducida por mutagénesis química (ENU) en la línea BALB/c. Se trata, además, de un excelente modelo de la **porfiria eritropoyética humana**. Esta mutación fue localizada en el cromosoma 18 e identificada como una mutación puntual en el gen que codifica para la enzima **ferroquelatasa**, cuya función es insertar una molécula de hierro dentro de la molécula hemo. Cuando la mutación se encuentra en fondo genético BALB/c, los ratones homocigotas *Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}* muestran ictericia, son sensibles a la luz y desarrollan una cirrosis muy severa (a veces fatal). Sin embargo, cuando la misma mutación se encuentra en otro fondo genético (por ej.: C57BL/6J), exhibe un fenotipo mucho menos severo. Ejemplos como estos son muy comunes entre los ratones, llegando al extremo de que algunos alelos mutantes pueden ser dominantes en una línea particular y recesivo en otra.

Más allá del rol de estas interacciones no epistáticas en la expresividad de un determinado fenotipo, es muy probable que la naturaleza misma de la mutación, considerada en términos moleculares, sea también un factor muy importante. En el hombre, por ejemplo, se han identificado por lo menos 230 mutaciones puntuales en el gen *CFTR*. Muchas de esas mutaciones producen el clásico síndrome de fibrosis quística mientras que otras han sido identificadas accidentalmente y producen sólo azoospermia. De hecho, es lógico pensar que cuando una mutación ocurre en un gen particular, la severidad del fenotipo depende de cuánto permanece de la actividad enzimática. Un alelo nulo puede generar un síndrome muy severo (inclusive letal) mientras que tan sólo un mínimo de porcentaje de actividad enzimática puede ser suficiente para la supervivencia del individuo. Además, una mutación que resulte en una proteína anormal (mutaciones de sentido erróneo) puede tener un efecto dominante debido a que el producto anormal en cuestión interactúa con el producto del gen normal produciendo una proteína anormal (efecto **dominante negativo**).

Además de los puntos mencionados, R. P. Erickson sugirió otros tres mecanismos para explicar las discrepancias entre los síndromes humanos y murinos para desórdenes genéticos homólogos: (i) variaciones en las vías metabólicas (bioquímicas) entre el ratón y el hombre, (ii) variaciones en los procesos del desarrollo y (iii) tiempo absoluto versus tiempo fisiológico para el desarrollo de un proceso patológico. Es muy probable que las razones que hacen que una mutación murina sea diferente de su contraparte humana sean numerosas y todavía no sabemos mucho sobre ellas.

Las críticas de muchos científicos hacia los modelos animales que no han respondido a sus expectativas se deben, en general, a la idea de que el modelo debe imitar exactamente los procesos de la enfermedad en estudio, sea humana o animal. En realidad, éste es sólo uno de los criterios a tener en cuenta para determinar el valor de un modelo experimental. Las fallas de un modelo animal a la hora de cumplir con los requisitos para ser modelo de una determinada enfermedad pueden clasificarse en tres categorías: (i) el sistema animal en cuestión está descrito en forma incompleta o inadecuada, (ii) la enfermedad que se desea estudiar está descrita en forma incompleta o mal definida y (iii), la existencia de respuestas biológicas es-

pecíficas de la especie (a la que pertenece el modelo animal), diferentes de las del humano o animal portador de la enfermedad. Hay que tener en cuenta, que la falta de correlación entre una nueva patología en los ratones y alguna enfermedad de importancia clínica en el hombre puede resultar en el abandono prematuro de esta mutación como modelo experimental. Un ejemplo de esto último es lo que sucedió con la mutación *ichthyosis (ic)* descrita en 1950 (con similitudes con la **ictiosis** y la **psoriasis** humanas), la misma fue valorada recientemente al conocerse más detalles de la patología molecular.

Como conclusión podemos decir que la colección de mutaciones acumuladas en las décadas pasadas representa una fuente valiosa de modelos animales para el estudio de los desórdenes genéticos humanos. En el futuro próximo, este número se verá aumentado por la gran cantidad de técnicas disponibles para el diseño de alteraciones en el genoma murino y los proyectos conjuntos de mutagénesis química por ENU (ver Capítulo VII).

Bibliografía General

- AHMAD W, FAIYAZ UL HAQUE M, BRANCOLINI V, TSOU HC, UL HAQUE S, LAM H, AITA VM, OWEN J, DE-BLAQUIERE M, FRANK J, CSERHALMI-FRIEDMAN PB, LEASK A, MCGRATH JA, PEACOCKE M, AHMAD M, OTT J, CHRISTIANO AM. *Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene*. *Science* 279: 720-4, 1998.
- AMANO H, AMANO T, MATSUBAYASHI H, ISHIHARA K, SERIKAWA T, SASA M. *Enhanced calcium influx in hippocampal CA3 neurons of spontaneously epileptic rats*. *Epilepsia* 42: 345-350, 2001.
- ANAGNOSTOPOULOS A. *A compendium of mouse knockouts with inner ear defects*. *Trends in Genetics* 18: S21-S38, 2002.
- BAKER HJ, RUSSELL LINDSEY J, WEISBROTH SH. *The Laboratory Rat, Vol 1*. New York, Academic Press, Inc., 1980.
- BEDDELL MA, JENKINS NA, COPELAND NG. *Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice*. *Genes & Development* 11: 1-10, 1997.
- BEDDELL MA, LARGAESPADA DA, JENKINS NA, COPELAND N. *Mouse models of human disease. Part II: Recent progress and future directions*. *Genes & Development* 11: 11-43, 1997.
- BENAVIDES F, GIORDANO M, FIETTE L, BUENO BRUNI ALTI A, MARTIN PALENZUELA N, VANZULLI S, BALDI P, REINER S, DOSNE PASQUALINI C, GUÉNET J-L. *Nackt (nkt): a new hair loss mutation of the mouse with associated CD4 deficiency*. *Immunogenetics* 49: 413-419, 1999.
- BENAVIDES F, STAROST M, FLORES M, GIMENEZ-CONTI IB, GUÉNET J-L, CONTI CJ. *Impaired hair follicle morphogenesis and cycling with abnormal epidermal differentiation in nackt mice, a cathepsin L deficient mutation*. *American Journal of Pathology* 161: 693-703, 2002.
- BRANDON EP, IDZERDA RL, MCKNIGHT GS. *Targeting the mouse genome: a compendium of KOs (part 1)*. *Current Biology* 5: 758-765, 1995.
- BRANDON EP, IDZERDA RL, MCKNIGHT GS. *Targeting the mouse genome: a compendium of KOs (part 2)*. *Current Biology* 5: 625-634, 1995.
- BREITMAN, ML, BERNSTEIN, A. *Engineering cellular deficits in transgenic mice by genetic ablation*. En: *Transgenic animals*. Grosfeld, F, Kollias G, Eds. Academic Press, London, 1992.
- BROCKMANN GA, BEVOVA MR. *Using mouse models to dissect the genetics of obesity*. *Trends in Genetics* 18: 367-376, 2002.

- BRODIE SG, DENG CX. *BRCA1-associated tumorigenesis: what have we learned from knockout mice?* Trends in Genetics 17: S18-S22, 2001.
- CARRASQUILLO MM, MCCALLION AS, PUFFENBERGER EG, KASHUK CS, NOURI N, CHAKRAVARTI A. *Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease.* Nature Genetics 32: 237-244, 2002.
- CHAPPEL CI, CHAPPEL WR. *The discovery and development of the BB rat colony: An animal model of spontaneous diabetes mellitus.* Metabolism 32: S8-S10, 1983.
- CLARK JB, PALMER CJ, SHAW WN. *The diabetic Zucker fatty rat.* Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 173: 68-75, 1983.
- CUNLIFFE VT, FURLEY AJ, KEENAN D. *Complete rescue of the nude mutant phenotype by a wild-type Foxn1 transgene.* Mammalian Genome 13: 245-252, 2002.
- DAVIDSON DJ, ROLFE M. *Mouse models of cystic fibrosis.* Trends in Genetics. 17: S29-S37, 2001.
- DIETRICH WF, LANDER ES, SMITH JS, MOSER AR, GOULD KA, LUONGO C, BORENSTEIN N, DOVE W. *Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse.* Cell 75: 631-639, 1993.
- DOGGRELL SA, BROWN L. *Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.* Cardiovascular Research 39: 89-105, 1998.
- DORIN JR, DICKINSON P, ALTON EW, SMITH SN, GEDDES DM, STEVENSON BJ, KIMBER WL, FLEMING S, CLARKE AR, HOOPER ML, et al. *Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis.* Nature 359: 211-215, 1992.
- ERICKSON RP. *Why isn't a mouse more like a man?* Trends in Genetics 5: 13, 1989.
- ERICKSON RP. *Mouse models of human genetic disease: which mouse is more like a man?* Bio-Essays 18: 993, 1996.
- ERNSBERGER P, KOLETSKY RJ, FRIEDMAN JE. *Molecular pathology in the obese spontaneous hypertensive Koletsky rat: a model of syndrome X.* Annals of the New York Academy of Science 892: 272-288, 1999.
- FLEISCHMAN RA. *From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development.* Trends in Genetics 9: 285-290, 1993.
- GIBSON F, WALSH J, MBURU P, VARELA A, BROWN KA, ANTONIO M, BEISEL KW, STEEL KP, BROWN SD. *A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1.* Nature 374: 62-64, 1995.
- GUÉNET JL, MARCHAL G, MILON G, TAMBOURIN P, WENDLING F. *Fertile dominant spotting in the house mouse.* Journal of Heredity 70: 9-12, 1979.
- GUÉNET J-L. *Animal models of human genetic diseases.* En: "Gene Targeting", Manuel A. Vega, editor. CRC Press, pp 149-166, 1995.
- HAHN WC, WEINBERG RA. *Modelling the molecular circuitry of cancer.* Nature Reviews Cancer 2: 331-441, 2002.
- HANN B, BALMAIN A. *Building 'validated' mouse models of human cancer.* Current Opinion in Cell Biology 13: 778-784, 2001.
- HEISTERKAMP N, JENSTER G, TEN HOEVE J, ZOVICH D, PAT-
TENGALE PK, GROFFEN J. *Acute leukemia in bcr/abl transgenic mice.* Nature 344: 251-253, 1990.
- HENDRICKSON EA. *The SCID mouse: relevance as an animal model system for studying human disease.* American Journal of Pathology 143: 1511-2152, 1993.
- HOCK BJ JR, LAMB BT. *Transgenic mouse models of Alzheimer's Disease.* Trends in Genetics. 17: S7-S12, 2001.
- HOOPER M, HARDY K, HANDYSIDE A, HUNTER S, MONK M. *HPRT deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells.* Nature 326: 292-295, 1987.
- HOOSIER GLV, MCPHERSON C. *The Laboratory Hamster.* Academic Press, New York, 1987.
- HOSODA K, HAMMER RE, RICHARDSON JA, BAYNASH AG, CHEUNG JC, GIAID A, YANAGISAWA M. *Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice.* Cell 79: 1267-1276, 1994.
- JACKS T. *Lessons from the p53 mutant mouse.* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 122: 319-27, 1996.
- JACOB HJ, PETTERSSON A, WILSON D, MAO Y, LERNMARK A, LANDER ES. *Genetic dissection of autoimmune type I diabetes in the BB rat.* Nature Genetics 2: 56-60, 1992.
- JAKOBOVITS A, MOORE AL, GREEN LL, VERGARA GJ, MAY-
NARD-CURRIE CE, AUSTIN HA, KLAPHOLZ S. *Germline transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome.* Nature 362: 255-258, 1993.

- JOLIAT MJ, SHULTZ LD. *The molecular bases of spontaneous immunological mutations in the mouse and their homologous human diseases*. *Clinical Immunology* 101: 113-129, 2001.
- KATO N. *Genetic analysis in Dahl salt-sensitive rats*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 26: 539-540, 1999.
- KAWANO K, HIRASHIMA T, MORI S, NATORI T. *OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain*. *Diabetes Research and Clinical Practice* 24: S317-S320, 1994.
- KIKUTANI H, MAKINO S. *The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains*. *Advances in Immunology* 51: 285-322, 1992.
- KIM JH, NISHINA PM, NAGGERT JK. *Genetic models for non insulin dependent diabetes mellitus in rodents*. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 9: 325-345, 1998.
- KOLETSKY S. *Animal model: obese hypertensive rat*. *American Journal of Pathology* 81: 463-466, 1975.
- KUCHERLAPATI R, LIN DP, EDELMANN W. *Mouse models for human familial adenomatous polyposis*. *Seminars in Cancer Biology* 11: 219-225, 2001.
- KUEHN MR, BRADLEY A, ROBERTSON EJ, EVANS MJ. *A potential animal model for Lesch-Nyhan Syndrome through introduction of HPRT mutations into mice*. *Nature* 326: 295-298, 1987.
- KURAMOTO T, MORI M, YAMADA J, SERIKAWA T. *Tremor and zitter, causative mutant genes for epilepsy with spongiform encephalopathy in spontaneously epileptic rat (SER), are tightly linked to synaptobrevin-2 and prion protein genes, respectively*. *Biochemical and Biophysics Research Communications* 200: 1161-1168, 1994.
- KURAMOTO T, NOMOTO T, FUJIWARA A, MIZUTANI M, SUGIMURA T, USHIJIMA T. *Insertional mutation of the Attractin gene in the black tremor hamster*. *Mammalian Genome* 13: 36-40, 2002.
- MACMURRAY AJ, MORALEJO DH, KWITEK AE, RUTLEDGE EA, VAN YSERLOO B, GOHLKE P, SPEROS SJ, SNYDER B, SCHAEFER J, BIEG S, JIANG J, ETTINGER RA, FULLER J, DANIELS TL, PETTERSSON A, ORLEBEKE K, BIRREN B, JACOB HJ, LANDER ES, LERNMARK A. *Lymphopenia in the BB rat model of type 1 diabetes is due to a mutation in a novel immune-associated nucleotide (lan)-related gene*. *Genome Research* 12: 1029-1039, 2002.
- MARTIN N, JAUBERT J, GOUNON P, SALIDO E, HAASE G, SZATANIK M, GUÉNET JL. *A missense mutation in Tbcce causes progressive motor neuropathy in mice*. *Nature Genetics* 32: 443-447, 2002.
- MORALEJO DH, WEI S, WEI K, WEKSLER-ZANGEN S, KOIKE G, JACOB HJ, HIRASHIMA T, KAWANO K, SUGIURA K, SASAKI Y, OGINO T, YAMADA T, MATSUMOTO K. *Identification of quantitative trait loci for non-insulin-dependent diabetes mellitus that interact with body weight in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat*. *Proceedings of the Association of American Physicians* 110: 545-558, 1998.
- MORALEJO DH, OGINO T, ZHU M, TOIDE K, WEI S, WEI K, YAMADA T, MIZUNO A, MATSUMOTO K, SHIMA K. *A major quantitative trait locus co-localizing with cholecystokinin type A receptor gene influences poor pancreatic proliferation in a spontaneously diabetogenic rat*. *Mammalian Genome* 9: 794-798, 1998.
- NADEAU JH. *Modifier genes in mice and humans*. *Nature Reviews Genetics* 2: 165-174, 2001.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Mouse Models of Human Disease*. *ILAR Journal* 43 (2), 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *New Rat Models of obesity and type II diabetes (Special Issue)*. *ILAR News* 32 (3), 1990.
- NATORI T, KAWANO K. *The LETL rat: a model for IDDM without lymphopenia*. *ILAR News* 35: 15-18, 1993.
- PAIGEN K. *A miracle enough: the power of mice*. *Nature Medicine* 1: 215-220, 1995.
- PARATORE C, EICHENBERGER C, SUTER U, SOMMER L. *Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease*. *Human Molecular Genetics* 11: 3075-3085, 2002.
- PULITI A, PREHU MO, SIMON-CHAZOTTES D, FERKADJJI L, PEUCHMAUR M, GOOSSENS M, GUÉNET JL. *A high-resolution genetic map of mouse chromosome 15 encompassing the Dominant megacolon (Dom) locus*. *Mammalian Genome* 6: 763-768, 1995.
- RAHMANI Z, BLOUIN JL, CREAU-GOLDBERG N, WATKINS PC, MATTEI JF, POISSONNIER M, PRIEUR M, CHETTOUH Z, NICOLE A, AURIAS A, et al. *Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 5958-5962, 1989.
- RAMANATHAN S, POUSSIER P. *BB rat lyp mutation and Type 1 diabetes*. *Immunological Reviews* 184: 161-171, 2001.

- ROLSTAD B. *The athymic nude rat: an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses?* Immunological Reviews 184: 136-144, 2001.
- SCHORPP M, HOFMANN M, DEAR TN, BOEHM T. *Characterization of mouse and human nude genes.* Immunogenetics 46: 509-515, 1997.
- SCHUURMAN H-J, HOUGEN HP, VAN LOVEREN H. *The mu (Rowett Nude) and mu^N (nznu, New Zealand Nude) rat: an update.* ILAR News 34: 3-12, 1992.
- SCOTT J. *The spontaneously diabetic BB rat: sites of the defects leading to autoimmunity and diabetes mellitus. A review.* Current Topics on Microbiology and Immunology 156: 1-14, 1990.
- SERIKAWA T, YAMADA J. *Epileptic seizures in rats homozygous for two mutations, zitter and tremor.* Journal of Heredity 42: 441-444, 1986.
- SHIMA K, ZHU M, MIZUNO A. *Pathoetiology and prevention of NIDDM lessons from the OLETF rat.* Journal of Medical Investigation 46: 121-129, 1999.
- SICINSKI P, GENG Y, RYDER-COOK AS, BARNARD EA, DARLISON MG, BARNARD PJ. *The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation.* Science 244: 1578-1580, 1989.
- SMITH DJ, ZHU Y, ZHANG J, CHENG JF, RUBIN EM. *Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2 Mb set of YAC/PI clones from human chromosome 21-q22.2.* Genomics 27: 425-434, 1995.
- SMITH DJ, STEVENS ME, SUDANAGUNTA SP, BRONSON RT, MAKHINSON M, WATABE AM, O'DELL TJ, FUNG J, WEIER HU, CHENG JF, RUBIN EM. *Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates mini-brain in learning defects associated with Down syndrome.* Nature Genetics 16: 28-36, 1997.
- SMITHIES O. *Animal models of human genetic diseases.* Trends in Genetics 9: 112-116, 1993.
- SOUTHARD-SMITH EM, KOS L, PAVAN WJ. *Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model.* Nature Genetics 18: 60-64, 1998.
- STACEY A, BATEMAN J, CHOI T, MASCARA T, COLE W, JAENISCH R. *Perinatal lethal osteogenesis imperfecta in transgenic mice bearing an engineered mutant pro α 1(I) collagen gene.* Nature 332: 131-136, 1988.
- SUNDBERG JP, SCHULTZ LD. *Inherited mouse mutations: models for the study of alopecia.* Journal of Investigative Dermatology 96: 95S-96S, 1991.
- SUNDBERG JP. (Ed). *Handbook of mouse mutations with skin and hair abnormalities.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1994.
- TANAKA Y, HIROKAWA N. *Mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease.* Trends in Genetics 18: S39-S44, 2002.
- TUVESON DA, JACKS T. *Technologically advanced cancer modeling in mice.* Current Opinion in Genetics and Development 12: 105-110, 2002.
- WATERS ST, FU SM, GASKIN F, DESHMUKH US, SUNG SS, KANNAPPELL CC, TUNG KS, McEWEN SB, McDUFFIE M. *NZM2328: a new mouse model of systemic lupus erythematosus with unique genetic susceptibility loci.* Clinical Immunology 100: 372-383, 2001.
- YOKOI N, KANAZAWA M, KITADA K, TANAKA A, KANAZAWA Y, SUDA S, ITO H, SERIKAWA T, KOMEDA K. *A non-MHC locus essential for autoimmune type 1 diabetes in the Komeda Diabetes-Prone rat.* Journal of Clinical Investigation 100: 2015-2021, 1997.
- YOKOI N, KOMEDA K, WANG HY, YANO H, KITADA K, SAITOH Y, SEINO Y, YASUDA K, SERIKAWA T, SEINO S. *Cblb is a major susceptibility gene for rat type 1 diabetes mellitus.* Nature Genetics 31: 391-394, 2002.