

CAPÍTULO 7

Calidad genética

Silvana Nora Milocco

Introducción a la genética de los animales de laboratorio

En las investigaciones donde se utilizan animales, la validez y la reproducibilidad de los resultados son factores claves y están determinados por tres variables fundamentales: los antecedentes genéticos, el ambiente físico y el estado sanitario de los animales de laboratorio. Dado que en los bioterios de producción el ambiente está controlado, se debe prestar especial atención a la calidad microbiológica y a la calidad genética de los mismos. Los científicos, médicos veterinarios, personal de cuidado animal y administradores de instalaciones deben conocer el patrimonio genético de los animales de investigación que desarrollan, usan, cuidan y albergan (Fahey y col. 2013).

Si nos remontamos al origen de los roedores de laboratorio y especialmente de los ratones y ratas, observamos que desde comienzos del siglo XX comenzaron a establecerse las primeras líneas estandarizadas. Los ratones se emplearon por primera vez para investigaciones genéticas por el biólogo francés Lucien Cuénot en 1902. La creación de la primera línea consanguínea fue la cepa DBA, llamada así por portar alelos mutantes recesivos en tres loci del color del pelaje: *dilute* (d), *brown* (b) y *non-agouti* (a). En el año 1918 en el *Cold Spring Harbor Laboratory* se desarrollaron las cepas más conocidas incluyendo C57BL/6, C57BL/10, C3H, CBA y BALB/c. Cabe señalar que muchas de las cepas endocriadas de ratones, ratas y cobayos que se utilizan en la actualidad, fueron producidas y desarrolladas entre 1920 y 1930. Posteriormente se distribuyeron en institutos de investigación y establecimientos comerciales de producción por muchas generaciones creando un gran número de líneas. Durante los últimos 30 años, las mejoras en las tecnologías que permiten la manipulación genética del genoma del ratón han permitido la creación de miles de cepas mutantes y animales modificados genéticamente, convirtiéndose en una excelente herramienta para el estudio de diversas enfermedades.

Existen más de 1500 cepas y stocks de ratas y ratones que se mantienen en laboratorios y bioterios de todo el mundo. Cada uno juega un rol único en las investigaciones biomédicas, y, por lo tanto, el conocimiento de sus cualidades, mantenimiento, control de calidad, nomenclatura y métodos de producción, son esenciales si se quieren utilizar de manera eficiente. Cada cepa o stock posee características genéticas únicas que deben tenerse en cuenta al seleccionar el modelo animal con el cual se va a realizar la experimentación. En algunos casos se requerirá de una población de animales uniformes, sin diferencias genéticas entre ellos, por lo

que se utilizarán cepas o líneas consanguíneas. En otros, el reactivo biológico deberá presentar alguna característica definida, y entonces las líneas coisogénicas, líneas congénicas o líneas genéticamente modificadas serán los modelos a escoger. En experiencias donde se quiera simular una población normal, se usarán líneas no consanguíneas o stocks exocríados, por ser animales con una amplia variabilidad genética. Y en aquellos casos en los cuales se busque que las diferencias genéticas tengan un rango de variación controlado y predecible se utilizarán los híbridos F1 y las líneas congénicas recombinantes (Jiménez Medina, 2001).

Características y mantenimiento de mamíferos de laboratorio genéticamente controlados

La variación genética, si no se controla, puede interferir con la precisión de una experiencia. Esta interferencia es similar a la que se produce cuando se trabaja con animales no definidos microbiológicamente o cuando se les administra una dieta variable o el macroambiente y el microambiente no están controlados. Pero si el método experimental utilizado es poco preciso y la meta del estudio es sólo obtener un resultado estimativo o si el efecto que produce dicho tratamiento es muy grande, entonces es posible utilizar animales genéticamente variables sin afectar la interpretación de los resultados. Sin embargo, si se pretende obtener resultados válidos, seguros, consistentes y reproducibles, deben utilizarse animales genéticamente definidos.

Colonias o stocks exocríados

Un stock exocríado es una colonia de animales de laboratorio no definidos genéticamente, generalmente mantenidos como una colonia cerrada. El término "no definido genéticamente" significa que el genotipo de un animal en un locus determinado, generalmente no se conoce. Excepto aquellos genotipos que pueden ser obvios como el color de capa, y tienen un alto grado de heterocigocidad.

Los stocks no son genéticamente estables a lo largo del tiempo, esto hace que su distribución nacional sea muy restringida, por lo que los resultados obtenidos en trabajos de investigación donde se los utiliza no serán comparables. Las colonias hermanas tendrán solamente una muestra de los genes presentes en la colonia parental (dependiendo del tamaño del grupo fundacional), así y todo, aún si las colonias tienen el mismo nombre y provienen del mismo stock, serán genéticamente distintas. Inclusive diferentes camadas serán genéticamente diferentes dependiendo del carácter estudiado y del grado de variabilidad intrínseca del stock. Sin embargo, todos los animales del mismo stock comparten características de grupo, como el color del pelaje, una buena tasa reproductiva, y en comparación con otras cepas son relativamente dóciles. Esto último, hace que las hembras se utilicen como nodrizas en técnicas de reproducción asistida (Benavides y col. 2020).

La ausencia de marcadores genéticos significa que la autenticidad de la colonia no se puede chequear con gran certeza. El control de calidad se basa comúnmente en la evaluación de los rasgos fenotípicos esperados, como el color del pelaje, el crecimiento y las características reproductivas, basándose en datos de las grandes colonias de criadores comerciales (Benavides y col. 2020). Si accidentalmente se mezclaran dos colonias pasaría mucho tiempo antes de que nos diéramos cuenta de lo ocurrido. Esta contaminación puede alterar los resultados de las experiencias.

Mantenimiento de un stock de exocría

Para mantener un stock se debe minimizar la velocidad de variación en un período determinado. Los cambios pueden ocurrir como resultado de la selección (la selección natural como respuesta a cambios ambientales o selección artificial impuesta por aquellas personas que manejan las colonias), endocría, deriva génica, mutaciones y contaminación genética. Siempre que sea posible se debe evitar la selección, excepto que los animales presenten anomalías o estén enfermos y deban ser sacrificados. La endocría y la deriva génica pueden controlarse manteniendo una población grande y siendo cuidadoso al elegir el sistema reproductivo. En una colonia cerrada, donde se realizan apareamientos al azar, la velocidad de endocría por cada generación es igual a:

$$F_1 = 1/8 N_m + 1/8 N_f$$

Donde F_1 es el aumento de la endocría en una generación dada y N_m y N_f es el número de machos y hembras que contribuyen potencialmente a la próxima generación.

Para mantener un porcentaje de endocría menor e igual al 1% se debe trabajar con 25 parejas de animales como mínimo. Lo ideal sería contar con 80 o más parejas reproductoras como fundadores del núcleo (Fig. 1).

Alojando animales con el mismo color de capa en distintas habitaciones se evita la contaminación genética. El monitoreo genético se puede utilizar para asegurar que no ocurra un cambio genético rápido. Sin embargo, el único método práctico para los stocks es el estudio de la forma de la mandíbula o bien encontrar un marcador genético que se segregue dentro de la población y determinar la frecuencia génica de dicho marcador en un número considerable de animales.

Nomenclatura

Si bien algunos stocks de exocría siguen teniendo una denominación histórica, tales como los ratones Swiss, las ratas Wistar o Sprague Dawley, los cobayos Dunkin-Harley y los conejos New Zealand White, esto no tiene significado alguno, ya que dos stocks pueden tener el mismo

nombre por estar remotamente relacionados y presentar características muy distintas, es decir, que sus nombres proporcionan poca información sobre sus características genéticas o fenotípicas (**Chia R. y col. 2005**).

El ICLAS (Consejo Internacional para la Ciencia de Animales de Laboratorio) recomienda que para que un stock se considere tal, tiene que haberse criado como una colonia cerrada durante por lo menos cuatro generaciones y debe tener menos del 1% de endocría por generación.

Debido a la falta de homogeneidad genética, estos grupos de animales deben nombrarse como "stocks" o "colonias" y no como cepas o líneas. Por la misma razón no existe una nomenclatura oficial sobre estos animales y los últimos reglamentos son de 1972 y no son aplicados con uniformidad. Actualmente, existen dos tendencias:

(i) utilizar nombres con 2 a 6 letras en mayúscula y aclarar en el texto que se trata de ratones exocriados (Por ejemplo: SENCAR, NMRI, etc.).

(ii) usar un nombre compuesto, colocando en primer lugar el código del criador o de la institución que produce los animales, dicho nombre debe escribirse abreviado, con mayúscula y no tener más de 4 letras; seguido van dos puntos que indican que se trata de un stock de exocría y por último el nombre del stock escrito con 2 a 4 letras mayúsculas. Por ejemplo: Cri:CD-1 (es el stock CD-1 criado en el "Charles River Laboratories"); N:NIH (S) (es un stock denominado NIH de origen Swiss (S) criado en el NIH (N)). (Davisson M. 1994).

Usos en investigación

El uso de estos animales va decreciendo con respecto a las cepas endocrías. Si bien no es una buena herramienta para llevar a cabo cierto tipo de investigaciones, en algunos casos tienen cierto valor como en estudios toxicológicos y farmacológicos, en los que es preferible emplear animales genéticamente no idénticos, pues así se simulan poblaciones normales. También son útiles cuando se necesita obtener una buena performance reproductiva y son muy utilizados en fisiología reproductiva, embriología y teratología. Al ser más económicos, pueden usarse cuando el costo del animal es muy significativo en proporción al costo total del experimento. También para poner a punto una nueva técnica, para la enseñanza, y cuando la uniformidad genética no es importante para los fines trazados. Finalmente, se utilizan en casos donde no hay cepas endocrías disponibles. Este es el caso de los grandes mamíferos utilizados en investigación como los conejos, perros, gatos, animales de granja, entre otros.

Stocks mutantes

Es un stock exocriado que tiene una mutación fija. La mutación puede encontrarse en estado homocigota dominante o recesivo o heterocigota. Existen más de 700 stocks mutantes de

ratones y 100 de ratas, de mucha importancia en investigaciones biomédicas. Hay varios modelos de obesidad y diabetes, desórdenes neurológicos, entre otros.

El mantenimiento de un stock mutante tiene sus ventajas y desventajas. La ventaja principal es su performance reproductiva. Las dos más grandes desventajas son la variabilidad en la expresión del carácter y la histoincompatibilidad entre el mutante y el individuo normal. Esto hace que no se utilicen en estudios inmunológicos, por ejemplo, para estudiar los efectos de trasplantes de tejidos normales a un mutante y viceversa.

Nomenclatura

Se denominan igual que el stock normal (sin mutación) agregándole el nombre del gen donde se encuentra la mutación: N:NIH (S)*Foxn1^{nu}*

Usos de stocks mutantes en investigación

En ratones (*ob/ob* ó *Lep^{ob}*), se llevan a cabo estudios importantes, como por ejemplo de infertilidad inducida por leptina, neuropatía diabética y fibrosis. Existen algunas mutaciones que causan alteraciones neurológicas, anemias y varios tipos de inmunodeficiencias. Los ratones N:NIH (S)*Foxn1^{nu}* son inmunodeficientes y se utilizan para mantenimiento de tumores pertenecientes a otras especies.

Cepas endocriadas

Una cepa endocriada se produce por el apareamiento ininterrumpido de hermanos por hermanas durante 20 o más generaciones, por lo tanto, todos los individuos tienen un antecesor común. De esta manera se logran animales genéticamente idénticos entre sí, que descienden de un único par de progenitores, los cuales no están emparentados. Estos cruzamientos endogámicos disminuyen la frecuencia de los genotipos heterocigotas y, al mismo tiempo se produce un aumento de homocigotas. La endocría se puede medir calculando el coeficiente de endogamia (F). El valor F nunca alcanza a 100, para que una cepa sea considerada como consanguínea debe tener por lo menos un F= 98,7%, el cual se alcanza en la generación número 20 de endocría. Se calcula que con cada generación de endocría el 19% de los loci que estaban en estado heterocigota pasan a ser homocigotas para uno u otro alelo, por eso se considera que después de la generación 20 de endocría la cantidad de loci que aún no se han fijado en el estado homocigota es menor al 1,3%. Sin embargo, se ha estimado que se necesitan 24 generaciones de apareamiento de hermanos para alcanzar una tasa de heterocigocidad menor al 1% y 36 generaciones para llegar casi al 100% de homocigocidad (Benavides y col. 2020).

Existen pocas cepas endocrías de hámster, cobayo, conejo y otras especies debido a que es muy costoso, porque el aumento de la consanguinidad hace que comiencen a expresarse genes deletéreos disminuyendo la productividad y aumentando la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y como consecuencia hay un aumento de la mortalidad.

Las cepas consanguíneas tienen las siguientes características:

Isogenicidad

Los individuos de una cepa endocría son isogénicos, es decir son idénticos en más del 98,7% de los loci los cuales se segregaron en la colonia original de fundación. Esta es la propiedad más importante y como resultado de ésta, todos los individuos de la misma cepa serán histocompatibles, es decir, las cepas son singénicas. Los animales singénicos aceptan trasplantes de tejido de cualquier individuo de la misma cepa y sexo. Además, un solo individuo puede analizarse en un determinado locus y tendremos la certeza que cada uno de los individuos de esa cepa tendrán el mismo genotipo para ese locus. Por lo tanto, el perfil genético de los genes presentes en esa cepa podrá ser realizado por distintos investigadores o grupos de trabajo (Fig. 1).

Homocigocidad

Las cepas endocrías son homocigotas en más del 98,7% de los loci los cuales fueron segregados de la población original. Pueden existir pocos genes recesivos escondidos, los cuales podrían llevar a confusiones, aún si se produjeran nuevas mutaciones pasaría un tiempo considerable antes que el gen se fijara. En contraste, los stocks exocrías pueden mantener genes deletéreos en una proporción cercana al equilibrio Hardy-Weimberg por muchas generaciones.

Estabilidad a largo plazo

Las cepas endocrías se pueden mantener genéticamente constantes por largos períodos de tiempo. No se producen cambios como resultado de selección, endocría, o deriva génica. El único cambio que puede ocurrir es por medio de mutaciones y generalmente actúan mucho más lento que las otras fuerzas. Sin embargo, la deriva génica en cepas endocrías como resultado de mutaciones ocurre y no debe ser ignorada. Afortunadamente es posible controlar este tipo de cambios genéticos manteniendo bancos de embriones congelados de cepas endocrías.

Uniformidad fenotípica

La eliminación de la variación genética lleva a una gran uniformidad en la mayoría de las características dentro de la cepa endocría. La importancia de esta uniformidad es que se necesitarán menos animales que si se utilizan un stock exocrío para alcanzar un nivel de precisión estadístico óptimo.

Individualidad

Cada cepa endocríada es una combinación única de alelos estimada en 30.000 loci diferentes, y por lo tanto difiere entre cada cepa. Estas diferencias pueden ser de gran interés en investigaciones biomédicas. Un estudio del porqué una cepa desarrolla un tipo particular de tumor o un patrón particular de conducta, mientras otra cepa no se comporta de la misma manera, puede llevar a dilucidar el desarrollo de tumores o patrones de comportamiento respectivamente.

Identidad

Una vez que una cepa endocríada se ha desarrollado y algunos loci polimórficos han sido caracterizados para proveer un perfil genético la cepa será identificada por su perfil genético.

Sensibilidad

Existen evidencias que las cepas endocríadas son más sensibles a los cambios ambientales que un stock exocríado. Su producción y uso requiere más atención en el manejo y en la dieta.

Distribución internacional

Algunas de las cepas más comunes tienen una distribución internacional, así trabajar en el Reino Unido, EEUU, Japón y Argentina puede ser virtualmente lo mismo trabajando con cepas endocríadas de ratas y ratones. Esto es posible debido a la estabilidad a largo plazo que presentan estas cepas, el hecho de que colonias hermanas son iguales a la colonia original, y porque es mucho más sencillo realizar controles de calidad genética en estos animales.

Nomenclatura

Tomada del "*International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice*". Muriel T. Davisson, *Mouse Genome* 92, 1994 (Davisson M. 1994).

Símbolos

Las cepas consanguíneas deben designarse con letras mayúsculas o una combinación de letras mayúsculas y números (comenzando con letra), por ejemplo, la cepa de ratones DBA o la cepa de rata SHR, aunque existen algunas excepciones en cepas muy conocidas como la cepa 129. Los símbolos de nuevas cepas deben ser preferentemente cortos y previamente confrontados con la lista existente para evitar duplicaciones. Las cepas con un origen común, separadas antes de la generación 20 de endocría (F20), deben ser tomadas como cepas relacionadas y por lo tanto sugerirlo en el nombre, por ejemplo, las cepas de ratón NZB, NZC, NZO.

Símbolos abreviados

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

Subcepas

Se debe utilizar el nombre de la cepa de origen, seguido de una barra y un símbolo apropiado de subcepa. Símbolos de subcepa: (a) números (ej.: DBA/1, DBA/2); (b) código del laboratorio, con la primera letra en mayúscula (ej.: BALB/cJ, la "J" es el código del Jackson Laboratory, USA); (c) iniciales de un apellido, con primera letra mayúscula (ej.: C3H/He, por Heston) y (d) la combinación de código y números. Algunas excepciones son permitidas en el caso de cepas muy conocidas como BALB/c, donde la "c" indica albinismo y no una subcepa.

Códigos de registro para laboratorios

Los códigos únicos de registro para cada laboratorio y los símbolos de subcepa son asignados por el ILAR (*"Institute for Laboratory Animal Resources"*) y deben solicitarse. El uso de estos códigos es apropiado para designar colonias de la misma cepa (sin diferencias genéticas) mantenidas por diferentes laboratorios. Debe colocarse al final del nombre completo de la cepa el signo "@" seguido del código del laboratorio, ej: C57BL/6J@Pas (la cepa C57BL/6 mantenida por el Instituto Pasteur).

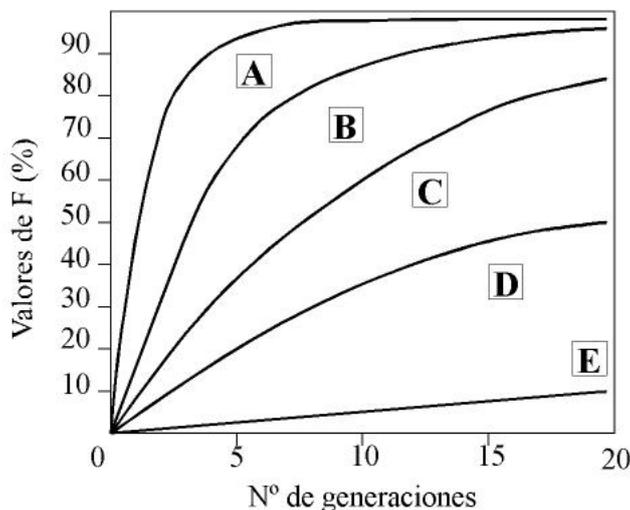


Figura 1. Efectos que los distintos sistemas de apareamiento tienen sobre el ritmo de aumento del coeficiente de consanguinidad (F). Mientras que el cruce al azar en poblaciones grandes garantiza un crecimiento muy lento de la consanguinidad (curva E), los cruces hermano por hermana (curva B) provocan incrementos rápidos del coeficiente de consanguinidad y, por tanto, de la homocigosis. Al cabo de 20 generaciones, éste alcanza valores cercanos al 99%. Curva A: autofecundación en organismos hermafroditas; Curva C: cruce entre primos hermanos; Curva D: cruce entre primos segundos. Adaptado de Festing MF. *Inbred strains in biomedical research*, Macmillan Press, London: Oxford University Press, New York, 1979.

Híbridos F1

Es la primera generación obtenida del cruzamiento entre dos cepas consanguíneas distintas. Si bien son genéticamente uniformes (isogénicas), serán heterocigotas para todos los loci en los que difieran las cepas parentales. La uniformidad genética a través del tiempo es una de las ventajas más claras de estas cepas de ratones. El vigor híbrido es otro de los rasgos destacados, presentan mayor resistencia a enfermedades y a cambios ambientales que las cepas que les dieron origen.

Nomenclatura

Se designan colocando primero a la progenitora, seguido por una "x" que simboliza el cruzamiento y en segundo lugar el macho, más F1. Puede utilizarse la forma completa del nombre: (C57BL/6 x DBA/2) F1 (por ejemplo, si es la primera vez que se lo menciona en una publicación) o su forma abreviada B6D2F1.

Cepas endocríadas recombinantes

Estas cepas son producidas a partir de dos cepas endocríadas progenitoras que se aparean para obtener híbridos F1. Estos se vuelven a cruzar y así obtenemos híbridos F2. De estos últimos se seleccionan al azar machos y hembras que se endocrían nuevamente dando origen a múltiples líneas. El reordenamiento y fijación de los genes originalmente presentes en las cepas progenitoras ocurre al azar en las cepas recombinantes así obtenidas.

Nomenclatura

Se designan con los símbolos abreviados de las cepas parentales separados por la letra "X" en mayúscula y sin dejar espacios. Se coloca el símbolo de la hembra primero. Por ejemplo: BXC es una línea recombinante derivada de una hembra C57BL/6 y un macho BALB/c.

Cepas coisogénicas

Si ocurre una mutación en una cepa endocríada se puede desarrollar una sublínea mutante. Si estos animales son totalmente viables y se propagan apareando a los homocigotas mutantes, entonces la línea mutante diferirá de la cepa endocríada solamente en un locus, denomi-

nado locus mutante. Dos cepas endocriadas que son genéticamente idénticas excepto en un solo locus como resultado de una mutación dentro de la cepa y una subsecuente separación en sublíneas, se dice que son coisogénicas. Actualmente se puede pensar en producir cepas coisogénicas para cualquiera de los genes clonados existentes, mediante la tecnología de “*gene targeting*”, el cual es el proceso de alterar una secuencia o gen específico en su ubicación en un genoma. Las posibles modificaciones incluyen la delección, inserción o sustitución de la secuencia endógena con secuencias alternativas. El direccionamiento se puede lograr mediante recombinación homóloga en algunos organismos o con nucleasas de edición del genoma dirigidas al sitio.

Nomenclatura

Las líneas coisogénicas deben designarse por el símbolo de la línea seguido de un guion, luego se escribe el símbolo del gen o alelo diferencial, por ejemplo: C57BL/6JEi-*tth* mutación *tth* (*tumor tilted head*) en la línea C57BL/6JEi

Cepas congénicas

Las cepas congénicas son aquellas producidas por retrocruzamientos. Es decir, cruzamientos repetidos de animales portadores de un gen mutante con animales de una cepa endocriada que normalmente no es portadora de dicho gen. Se obtienen retrocruzando durante 10 a 12 generaciones el híbrido F1 portador de la mutación seleccionada, con la cepa a quien quiere insertársele la mutación o cepa receptora. La línea así obtenida se mantiene luego en estado homocigótico por cruzamiento entre hermanos. Con este sistema no sólo se transfiere el gen mutante sino también una porción cromosómica adyacente, cuyo tamaño dependerá del número de generaciones de retrocruzamientos usados para obtener la cepa congénica.

Nomenclatura

Las líneas congénicas se designan con un nombre compuesto por dos partes separadas por un punto. La primera es el nombre completo, o abreviado, de la línea de fondo (la que recibe el locus diferencial) y, luego del punto, se coloca la abreviatura de la línea donante, un guion y, seguido, el símbolo del locus o alelo diferencial. Por ejemplo, B10.129-*H12b* es una línea con fondo C57BL/10Sn (=B10) pero que difiere de esa línea original en el alelo *H12b*, derivado de la línea 129. Si el origen de la línea donante de la mutación es desconocido puede indicarse como B6.Cg-*nkt*, en donde “Cg” indica línea congénica.

Cepas consómicas

En estas cepas se producen introduciendo un cromosoma entero a una línea receptora por medio de retrocruzas. Se denominan también líneas con sustitución de cromosoma Al igual que las líneas congénicas, se necesitan por lo menos diez generaciones de retrocruzas para obtenerlas. Generalmente se utiliza el cromosoma Y como donante, por ejemplo, para obtener animales con fondo C57BL6 pero que porten un cromosoma Y en su totalidad *Mus musculus castaneus* (la nomenclatura sería B6-Y^{CAS}). Para introducir cromosomas autosómicos las cruzas deben asistirse por marcadores moleculares, generalmente microsatélites (Benavides y col. 2004).

Animales genéticamente modificados

Animales transgénicos

La transgénesis consiste en la introducción de un gen extraño en el genoma de un individuo mediante la manipulación directa del cigoto del que procede. La producción de animales transgénicos, principalmente ratones, ha significado un gran avance científico para el estudio de los efectos de la expresión del gen introducido, ya sea normal o mutado. También para la obtención de modelos animales de enfermedades genéticas humanas o animales (Benavides y col. 2004).

Los métodos para obtener ratones transgénicos son: transgénesis por microinyección en el pronúcleo, transgénesis mediada por vectores y la transformación de células embrionarias (ES) in vitro con el ADN de interés.

Transgénesis por microinyección en el pronúcleo

Los ratones fueron los primeros animales transgénicos, hecho que ocurrió en el año 1980. Dos años más tarde, los científicos lograron introducir el gen de la hormona de crecimiento de la rata en ratones. Como resultado, los ratones crecieron mucho más rápido que los controles. Con esta y otras experiencias se demostraba que un gen de otra especie podía introducirse en un ratón, integrarse a su genoma, ser funcional y transmitirse a la descendencia.

La mayoría de los animales transgénicos se obtiene por medio de la microinyección de fragmentos de ADN extraño, directamente en uno de los dos pronúcleos de embriones en fase de una célula. A partir de ese momento, es posible que se produzca la incorporación del transgén en algún cromosoma del embrión. Es improbable predecir el lugar o el número de copias que se van a incorporar, es decir que el transgén microinyectado se integra aleatoriamente en el genoma como una copia única o más a menudo como un concatémero (cadena de ADN que contiene múltiples copias de una secuencia de nucleótidos dispuestas en serie una tras otra). Por este motivo, es probable que la expresión del transgén sea diferente y que se obtengan

fenotipos diferentes, a pesar de haber incorporado una misma porción de ADN (Benavides y col. 2020). Normalmente el ADN se integra en el genoma del 5-30% de los cigotos inyectados.

Transgénesis mediada por vectores

Los vectores virales son los más eficaces para transferir genes, ya que pueden transformar específicamente a una célula, y así promover la expresión de genes. Dentro de estos virus se encuentran los virus recombinantes, los adenovirus, los virus adeno- asociados, los retrovirus y los virus herpes simplex. La elección del vector va a depender de la eficiencia de la expresión del transgén, es importante que su realización sea sencilla y segura (Legorreta-Herrera M. y col. 2012). Los virus se integran en el genoma de las células infectadas, produciéndose la inserción de una sola copia del vector en un cromosoma dado. En este caso sólo se observan algunos cambios en el sitio de integración. La mayor desventaja de este método es que la expresión del ADN introducido se presenta en niveles bajos, otra desventaja es que dicha porción debe ser de tamaño pequeño (alrededor de 10 kb).

Una variante es el uso de vectores lentivirales para la producción de ratas y ratones transgénicos. Si bien los lentivirus también pertenecen a la familia de los retrovirus, la ventaja es que tienen la capacidad de infectar células en división y células en reposo, lo cual es muy ventajoso (Benavides y col. 2004).

Mutagénesis dirigida por recombinación homóloga de células madre embrionaria (*gene targeting*). Ratones knockout. Ratones knockin.

Esta técnica se basa en la atracción que tienen las regiones homólogas en la secuencia del ADN, permitiendo el intercambio de material genético entre dichas regiones. Es decir, que el transgén a insertar (exógeno) es homólogo a una región del ADN cromosómico (endógeno), y por lo tanto se localizará en un área específica del cromosoma. De esta manera, se puede predecir el sitio en donde se insertará el gen exógeno, y así se evita el inconveniente de la inserción al azar, como sucede en la inyección de pronúcleos. Es importante destacar que, en el proceso de recombinación homóloga, el ADN es intercambiado, a diferencia del proceso de inyección de pronúcleos, en donde el ADN resulta añadido. Este proceso no puede emplearse directamente en embriones, por lo que debe realizarse en células madre embrionarias. Estas células se obtienen del blastocisto y tienen la capacidad de permanecer en cultivos celulares sin perder su estado indiferenciado. Una vez seleccionadas las células que incorporaron el gen de interés correctamente, se las introduce en un embrión huésped.

Este método es el más utilizado para la generación de **ratones knockout y knockin**. En el caso de los ratones knockout se inactivan genes específicos mediante la inserción de un transgén que lleva información para la eliminación de uno o varios exones del gen que se desea anular. De esta forma, se impide la producción de la proteína de interés o se obtiene una proteína no funcional. Con esta técnica se han obtenido cientos de ratones knockout que han servido para analizar la función de genes endógenos y que han permitido simular enfermedades humanas para su estudio (Cavagnari BM., 2010) (Herrera Torres AM, 2005). Los knockin son

ratones en los que se introducen mutaciones dirigidas en la secuencia de un determinado gen; por ejemplo, la modificación de un codón concreto en la secuencia codificante para generar un cambio de aminoácido en la proteína correspondiente o la sustitución de la secuencia codificante de un gen, o de uno de sus dominios, por la de otro (De Jesús R. y col 2006).

Animales modificados genéticamente mediante edición génica. Sistema CRISPR/Cas9

La edición génica mediada por el sistema CRISPR/Cas9 es una tecnología de ingeniería genética que permite modificar el genoma de organismos vivos suprimiendo, alterando o agregando genes con el fin de introducir mutaciones específicas o corregirlas. A diferencia de otras herramientas usadas para alterar la secuencia de ADN, esta tecnología, bautizada como tijera molecular, permite eliminar o modificar la información genética de manera precisa y controlada de forma relativamente sencilla y cada vez más segura. La edición genética nos permite modificar, a voluntad, cualquier posición de cualquier gen de cualquier organismo. No se añade ningún gen externo, por lo tanto, no se trata de organismos transgénicos. Tan solo se modifica alguna letra del gen de interés, bien sea para inactivarlo o para reactivarlo. Las siglas CRISPR/Cas9 provienen de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, en español “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas.” La segunda es el nombre de una serie de proteínas, principalmente unas nucleasas, que las llamaron así por “*CRISPR associated system*” (es decir: “sistema asociado a CRISPR”).

Con el desarrollo esta técnica, se ha vuelto relativamente sencillo modificar genéticamente ratones y estudiar modelos mutantes. Los investigadores han utilizado modelos de desactivación de CRISPR para revertir la ceguera en ratones. Otro equipo ha utilizado modelos de ratón de CRISPR de retinosis pigmentaria para probar si es posible revertir la ceguera.

Además de los estudios mencionados anteriormente, CRISPR-Cas9 se ha utilizado para editar el gen de la β -globina para aumentar los niveles de hemoglobina fetal y así corregir con éxito la anemia de células falciformes en ratones. En otros estudios se ha utilizado CRISPR para alterar un gen que produce el aumento de los niveles de proteína amiloide- β en la enfermedad de Alzheimer. CRISPR también ha mostrado resultados prometedores en la edición del alelo genético responsable de la enfermedad de Huntington.

La contaminación genética y los controles de calidad

Los controles genéticos en los animales que se utilizan en investigación son de suma importancia, ya que cualquier cambio no detectado involucra una alteración de sus características fenotípicas. Tales alteraciones genéticas pueden producirse por mutaciones espontáneas, y frecuentemente pasan inadvertidas. Además, pueden acumularse en el tiempo, haciendo que la cepa se desvíe gradualmente de su estándar genético inicial, hasta alcanzar diferencias inadmisibles. Otra causa de contaminación genética se produce por un mal manejo de las colonias de animales, debido a errores en la selección de los progenitores. Estas alteraciones son

fácilmente evitables con un programa de cruces apropiado, pero cuando ocurren, sus efectos son drásticos e irreversibles (**Jiménez Medina, 2001**). De aquí la necesidad de establecer controles genéticos en las colonias de animales utilizados en investigación, para que los resultados sean reproducibles y tengan validez científica (**De Jesús R. y col 2006**). Frecuentemente, la obtención de resultados erróneos en una investigación es atribuida a distintos factores experimentales, pero muy pocas veces se repara en verificar la pureza genética de los animales utilizados (**Benavides y col. 2004**).

A través de un conjunto de técnicas se puede comprobar si los animales que se utilizan guardan las características genéticas originales de la línea a la cual pertenecen, o si presentan algún cambio a causa de una contaminación genética. Debemos tener en cuenta que estos controles no detectan mutaciones espontáneas, ya que al producirse al azar habría que evaluar todo el genoma.

Los controles para determinar la pureza genética se basan en el análisis de caracteres cualitativos o cuantitativos (enzimas, marcadores inmunológicos, marcadores de ADN) y compararlos con valores de referencia establecidos internacionalmente para la cepa. En todos los casos se trata de utilizar marcadores lo suficientemente polimórficos entre líneas como para detectar cruza accidentales (Benavides y col. 2004).

Se deben realizar controles de rutina, en bioterios donde se alojan cepas del mismo color de capa en la misma sala y cuando se sospecha de una contaminación genética.

Con motivos didácticos, podemos agrupar las técnicas de control genético en aquellas que controlan loci individuales y las que lo hacen sobre varios loci simultáneamente. Dentro del primer grupo encontramos los marcadores bioquímicos, los marcadores inmunológicos, el análisis del color del pelaje, caracteres reproductivos y la tipificación de microsatélites de ADN. Dentro de las técnicas que controlan varios loci simultáneamente encontramos los injertos de piel, los estudios morfológicos, el comportamiento reproductivo y el fingerprinting de ADN. En resumen, cualquier metodología que nos permita discriminar entre líneas consanguíneas puede ser empleada para un control genético. Aquellos laboratorios que realizan técnicas de PCR en forma rutinaria podrán incorporar otras variantes del control genético, más allá del análisis de marcadores microsatélites. Entre esas posibilidades se encuentran las técnicas RAPD's (*random amplified polymorphic DNA*), *LINE repeat sequence-PCR*, Inter-SSR PCR, análisis de SNP's, entre otras.

El control de los stocks se realiza a través de mediciones en el hueso de la mandíbula, ya que se demostró que su tamaño y forma están determinados por un grupo numeroso de genes de herencia cuantitativa. Para realizar este control se disecan y limpian las mandíbulas de un grupo de individuos. Su forma y tamaño se determina midiendo las distancias desde once puntos de referencia predeterminados hasta unos ejes de coordenadas rectangulares. Los datos así obtenidos se procesan posteriormente mediante un programa informático, que determina si tales parámetros se apartan o no del patrón que define al stock en cuestión.

Referencias

- Fahey JR., Kato H, Malcolm R. y Perez A. (2013) The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research. *Mamm Genome*. 24 (3-4) 89–94.
- Jiménez Medina R. (2001) Estandarización genética, transgenización y clonación. Jesús Zúñiga, Ramón Piñeiro González, Silvana Milocco y Josep Tur Marí (Eds.) *Libro Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal* (179-202). Madrid McGraw-Hill Interamericana.
- Benavides F., Rüllicke T., Prins JB., Bussell J., Scavizzi F., Cinelli P., Herault Y. y Wedekind D. (2020). Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats: FELASA Working Group Report. *Laboratory Animals*. 54 (2) 135-148
- Chia R., Achilli F., Festing M y Fisher E. (2005) The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics*. 37 (11) 1181-1186.
- Davisson M., (1994) International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice". *Mouse Genome* 92.
- Benavides FJ. y Guénet JL. Las líneas genéticamente estandarizadas y los controles de la pureza genética. *Libro Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones* (105-136) Universidad de Alcalá de Henares. Servicio de Publicaciones.
- Legorreta-Herrera M., Martínez-Flores F., Hernández Sánchez F. y Zentella-Dehesa A. (2012) Los vectores virales y la transgénesis. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud, UNAM*. 15 (1) 5-14.
- Benavides FJ. y Guénet JL. La transgénesis y la clonación en los roedores de laboratorio *Libro Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones* (208-263) Universidad de Alcalá de Henares. Servicio de Publicaciones.
- Cavagnari BM. (2010). Generación de animales transgénicos. Regulación de la expresión genética. *Arch. Argent. Pediatr*. 108 (5) 438-444.
- Herrera Torres AM. (2005). Principios básicos y simples de la tecnología transgénica y knockout. *Rev. CES. Med*. 19 (1) 43-51.
- De Jesús R. y Torres E. (2006) Evaluación de factores de reproducción para detectar posible contaminación genética en cepas consanguíneas de ratones. *Bol. Mal. Salud Amb*. Vol 46 (2) 161-168.