

## MODELOS MURINOS DE ENFERMEDADES HUMANAS†

FERNANDO BENAVIDES<sup>1</sup>, JEAN-LOUIS GUENET<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Carcinogenesis, M.D. Anderson Cancer Center, The University of Texas, Smithville, TX, USA;<sup>2</sup>Unité de Génétique des Mammifères, Institut Pasteur, Paris, France

**Resumen** Este artículo es una revisión bibliográfica acerca de las mutaciones disponibles en el ratón de laboratorio, espontáneas, inducidas o generadas por manipulación genética, que son utilizadas como modelo de enfermedades humanas. Desde los comienzos del siglo pasado hasta nuestros días, los modelos murinos han contribuido a la comprensión de la patogénesis de muchas enfermedades y al desarrollo de nuevas terapias. La tendencia actual de las investigaciones biomédicas nos hace pensar que en el futuro próximo la disponibilidad de modelos murinos se verá muy acrecentada por la gran cantidad de técnicas de manipulación genética y proyectos de mutagénesis química existentes. La denominada era "pos-genómica" ya está entre nosotros y será esencial contar con estos modelos animales para el estudio funcional de las secuencias obtenidas de los proyectos de secuenciación del genoma humano y murino.

**Palabras clave:** modelos animales, enfermedades hereditarias, ratón de laboratorio

**Abstract** *Murine models for human diseases.* This article is a bibliographic review concerning mouse mutations, spontaneous, induced or genetically engineered, as models of human genetic diseases. Since the beginning of the last century, mouse models have been instrumental in the understanding of the pathogenesis of many diseases and designing of new therapies. A number of recent technological advances in embryo manipulation and many large-scale mutagenesis screens will dramatically increase the availability of new mouse models in the near future. In the "post-genomic" era, mouse mutants will have a significant role as a model system for functional genome analysis of the upcoming whole-genome information of the human and mouse genomes projects.

**Key words:** animal models, genetic diseases, laboratory mouse

### El ratón como modelo en Medicina Experimental

Desde que Sir A. Garrod descubrió en 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 ha 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 melanogaster*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* (recordar que ambos tienen sus genomas secuenciados en forma completa) 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 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: el primer borrador de ambos genomas está completo<sup>1</sup>.
- Existe una cantidad enorme de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénicas, además de miles de mutaciones y un gran número de rearrreglos cromosómicos disponibles.

Recibido: 28-IX-2000

Aceptado: 18-X-2000

†Extracto del libro *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios Básicos y Aplicaciones*, F.J. Benavides, J-L. Guénet (en preparación)

**Dirección postal:** Dr. Fernando Benavides, Department of Carcinogenesis, Science Park. M.D. Anderson Cancer Center, The University of Texas, Park Road 1C, P.O. Box 389, Smithville, Texas 78957, USA.

Fax: (512) 237-2444

e-mail: fbenavides@sprd1.mdacc.tmc.edu

- Es el único animal que posee sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales ("ES cells") para generar quimeras, lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (por ej.: los ratones KO) o condicionales (por ej.: el sistema Cre/loxP).
- 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 cepas y los mapas genéticos.

### 1. Modelos provenientes de mutaciones espontáneas o inducidas

Estas mutaciones se encuentran listadas, con una pequeña descripción y bibliografía, en el libro "Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse" (1996). Las listas actualizadas pueden encontrarse en Internet (MGI: <http://www.informatics.jax.org>) o puede consultarse revistas especializadas\*. 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. Tres ejemplos de este tipo de mutaciones son: la mutación *aku*, modelo de la alcaptonuria humana, la mutación *hph1*, modelo de la fenilcetonuria y, finalmente, la mutación *mdx*, modelo de la distrofia muscular de Duchene/Becker<sup>2, 3</sup>.

### 2. Modelos generados por transgénesis

#### *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 falte 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 ser 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 inducida 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 donde se expresará 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, el uso de recombinasas sitio-específicas como Cre o Flp han provocado un vuelco hacia este tipo de transgénesis condicional<sup>4, 5, 6</sup>.

#### *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 sobreexpresión de la hormona de crecimiento de la rata. En este caso, la expresión del gen era llevada a cabo por el agregado de un promotor ubicuo (el promotor del gen de la metalotionina), lo que llevaba 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 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 *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<sup>7, 8</sup>.

#### *Modelos producidos por la incorporación de genes humanos*

Existen muchos ejemplos de esta clase de transgénicos, entre los más destacados podemos nombrar el caso del ratón transgénico sensible al virus de la polio y los mo-

\* Las revistas *Mammalian Genome*, *Genomics* y *Nature Genetics* proveen una excelente cobertura de las novedades sobre la genética del ratón.

delos murinos para la osteogénesis imperfecta tipo II y para la anemia falciforme ("sickle-cell anemia"). En el primer caso, se produjeron ratones transgénicos para todos las cepas 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 los síntomas clínicos observados en humanos y primates y 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<sup>9</sup>.

#### *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 un YAC purificado en el pronúcleo de un huevo 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 desconocida o poco estudiada<sup>6, 10, 11</sup>. Utilizando este sistema se han creado dos modelos originales de enfermedades humanas muy complejas, como son la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y el síndrome de Down<sup>12, 13</sup>.

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 YAC individual (conteniendo fragmentos de ADN del cromosoma 21 humano). En total este panel de ratones abarca una región continua 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)<sup>14, 15</sup>.

Trabajos similares se están llevado 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*, en este caso un alelo "nor-

mal" 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. 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<sup>16</sup>.

### **3. Modelos generados in vitro por manipulación de células ES**

La disponibilidad de cultivos de células pluripotenciales (células ES) ha ampliado enormemente el espectro de las posibilidades de manipulación del genoma murino, en particular las mutaciones dirigidas o ratones "knock-out" (KO). 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*. Existe en la actualidad un crecimiento enorme en el número de ratones KO que plantea un verdadero problema de espacio en todos los bioterios. Como ejemplo basta mencionar que las predicciones para el año 2001 hablan de 3000 publicaciones utilizando ratones KO.

Por ejemplo, existe un modelo del síndrome de Lesch-Nyhan que fue producido seleccionando *in vitro* células ES mutadas (sin actividad de la enzima HPRT). Otro modelo de la misma enfermedad fue creado infectando células ES con retrovirus defectivos para actividad de la enzima HPRT seguido de selección para el fenotipo deseado. Existen ratones KO que son excelentes modelos para la fibrosis quística, la enfermedad de Gaucher, la anemia falciforme y la  $\beta$  talasemia, entre muchos otros (veremos varios ejemplos más adelante).

### **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 libro de Jackson y Abott (2000). 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/o en un momento del desarrollo determinado. Por lo tanto, esta estrategia es la única capaz de ser utilizada para el estudio de la inactivación de genes que son esenciales para el desarrollo pero tienen un patrón de expresión reducido. 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 aquellas que son producidas en los plasmocitomas<sup>14</sup>.

### Las mutaciones como modelos para el estudio de enfermedades humanas

El descubrimiento de mutaciones en el ratón (con patologías similares a enfermedades humanas) es una situación frecuente en los bioterios. A lo largo del siglo XX se han descrito más de 1.000 mutaciones —entre espontáneas e inducidas—, muchas de ellas de gran valor en medicina experimental (ver el "Mouse Locus Catalog" en <http://www.informatics.jax.org/locus.html>). Además de estas mutaciones espontáneas e inducidas se han creado miles de líneas de ratones transgénicos y KO (ver <http://www.biomednet.com/db/mkmd>), las cuales son potencialmente útiles en la identificación de células o tejidos blanco en ciertas patologías y también en el desarrollo de nuevas terapias<sup>17, 18</sup>. 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<sup>19, 20</sup>.

#### 1. Modelos murinos de enfermedades hereditarias simples (mendelianas)

##### *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 adrenal y tiroideas, e inclusive componentes de los huesos cartilaginosos y membranosos de la cabeza. En la Tabla 1 podemos observar una lista de genes en los cuales se han identificado mutaciones, tanto en el ratón como en sus 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:

##### Enfermedad de Hirshprung (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<sup>ls</sup>* y *Ednrb<sup>s</sup>*)<sup>21</sup>.

##### Piebalatismo (PT)

El piebalatismo ("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 epitelomas, las sorderas ocasionales y la heterocromía del iris. Numerosas mutaciones en el oncogén *Kit* son las responsables del piebalatismo 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<sup>w</sup>*) se localiza en el cromosoma 5 del genoma murino y se han identificado alrededor de 60 alelos diferentes. Los ratones heterocigotas exhiben manchas blancas en la cabeza y el vientre, un fenotipo muy similar al del piebalatismo humano. Los ratones homocigotas (*Kit<sup>w</sup>/Kit<sup>w</sup>*), en su inmensa mayoría, mueren durante el desarrollo embrionario. Sólo algunos alelos, denominados viables (*v*), permiten la sobrevivencia de los ratones homocigotas (*Kit<sup>w-v</sup>/Kit<sup>w-v</sup>*), aunque éstos son anémicos, estériles, sordos y de pelaje blanco, pero, a diferencia de los albinos, tienen ojos oscuros, ya que no está afectada la migración de los melanocitos hacia la retina. Es

\* Nótese que la nomenclatura para los genes humanos es siempre en mayúscula y para el ratón sólo la primera letra en mayúscula (ambos deben anotarse en letra cursiva). Las mutaciones recesivas se anotan en minúscula y las dominantes llevan la primera letra en mayúscula.

TABLA 1. *Desórdenes de células derivadas de la cresta neural*

| Nombre del gen                                 | Símbolo                   | Modelo  | Enfermedad humana   |
|--|---------------------------|---|---|
| Endothelin 3                                   | <i>Edn3<sup>ts</sup></i>  | KO, Espontáneo  | Síndrome de Waardenburg-Shah                                  |
| Endothelin receptor type B                     | <i>Ednrb<sup>ts</sup></i> | Inducido químicamente, KO, Inducido por radiación, Espontáneo                       | Enfermedad de Hirschprung; Síndrome de Waardenburg-Shah       |
| Kit oncogen                                    | <i>Kit<sup>tr</sup></i>   | Inducido químicamente, Inducido por radiación, Espontáneo                           | Piebalismo  |
| Microphthalmia-associated transcription factor | <i>Mitf<sup>mi</sup></i>  | Inducido químicamente, Inducido por radiación, Inserción de un transgén, Espontáneo | Síndrome de Waardenburg tipo 2                                |
| Pink-eyed dilution                             | <i>P</i>                  | Inducido químicamente, inducido por radiación, Espontáneo                           | Albinismo oculocutáneo tipo 2                                 |
| Paired box protein-3                           | <i>Pax3<sup>Sp</sup></i>  | Inducido por radiación, Espontáneo  | Síndrome de Waardenburg tipo 1; Síndrome de Klein-Waardenburg |
| Tyrosinase                                     | <i>Tyr<sup>c</sup></i>    | Inducido químicamente, Inducido por radiación, Espontáneo                           | Albinismo oculocutáneo tipo 1                                 |

interesante que todas las mutaciones, tanto en el hombre como en el ratón, afectan el dominio tirosina quinasa de la proteína. El fenotipo que estamos describiendo es idéntico al que muestran los ratones afectados por la mutación *Steel* (*Sl*). El locus *Sl* (ahora *Kitl<sup>Sl</sup>*) 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 piebalismo<sup>22</sup>.

#### Síndrome de Waardenburg (WS)

Se trata de 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 *Spotch* (*Sp*) son alélicos (cromosoma 1), siendo este último un alelo mutante del gen *Pax3* (su nueva nomenclatura es *Pax3<sup>Sp</sup>*). *Spotch* es una mutación semi-dominante que presenta varios alelos (*Sp*, *Sp<sup>d</sup>*, *Sp<sup>2H</sup>*, entre otros) que causan 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<sup>23</sup>. El gen murino *Mitf* resultó ser codificado por otro locus mutante, *microphthalmia* (*mi*), ahora *Mitf<sup>mi</sup>* (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 que llevan a defectos en la pigmentación y sordera. En general los alelos más severos se comportan en forma semi-dominante y los alelos menos severos son recesivos, estando localizadas las mutaciones, para cada clase, en dominios específicos de la proteína<sup>24</sup>.

#### 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 2 podemos observar algunos de estos mutantes que han resultado ser excelentes modelos, ya que comparten sorprendentes similitudes en el fenotipo.

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*, 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<sup>Sey</sup>*). La dosis génica parece

TABLA 2. Desórdenes de la visión y el oído

| Nombre del gen                              | Símbolo                    | Modelo  | Enfermedad humana                              |
|---|----------------------------|---|--|
| Myosin VIIA                                 | <i>Myo7a<sup>sh1</sup></i> | Inducido químicamente, Espontáneo                         | Síndrome de Ushers tipo IB                     |
| Paired box homeotic gene 2                  | <i>Pax2<sup>Krd</sup></i>  | Inserción de un transgén                                  | Coloboma de nervio óptico con enfermedad renal |
| Paired box homeotic gene 6                  | <i>Pax6<sup>Sev</sup></i>  | Inducido químicamente, Inducido por radiación, Espontáneo | Aniridia tipo 2                                |
| Phosphodiesterase, cGMP, rod receptor, beta | <i>Pdeb<sup>rd1</sup></i>  | Espontáneo  | Retinitis pigmentosa                           |
| Peripherin 2                                | <i>Prph2<sup>Rd2</sup></i> | Espontáneo  | Degeneración de retina                         |
| Rhodopsin                                   | <i>Rho</i>                 | Transgénico   | Retinitis pigmentosa tipo 4                    |

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<sup>25</sup>. 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 cepas consanguíneas clásicas (como las emparentadas C3H y CBA) 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<sup>rd1</sup>*)<sup>26</sup>.

#### 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 el 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 1B, 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 1B. Actualmente se sabe que la mutación *sh1* es un alelo mutado del gen *Myo7a*, por lo tanto su nueva nomenclatura<sup>27</sup> es *Myo7a<sup>sh1</sup>*.

#### 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 del 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 3 se muestra una lista de genes murinos, y sus respectivas enfermedades homólogas humanas, que se encuentran involucrados en diversos trastornos óseos. Todos estos modelos animales presentan fenotipos que imitan, o permiten explicar, algunos aspectos de la correspondiente enfermedad humana.

Las mutaciones dirigidas (KO) de los genes *Hoxd13* y *Gli3*, miembros de las familias de factores de transcripción "homeodomain" y "zinc-finger", respectivamente,

TABLA 3. Enfermedades de los huesos y el tejido conectivo

| Nombre del gen                      | Símbolo                      | Modelo                                  | Enfermedad humana                              |
|-------------------------------------|------------------------------|---|--|
| Procollagen type 1, alpha 1         | <i>Cola1<sup>Mov13</sup></i> | KO, Inducido por radiación, Transgénico | Osteogénesis imperfecta; Ehlers-Danlos tipoVII |
| Procollagen type 2, alpha 1         | <i>Col2a1</i>                | KO, Transgénico                         | Acondrogénesis tipo2; Displacia metafisiaria   |
| Procollagen type 9, alpha 1         | <i>Col9a1</i>                | KO, Transgénico                         | Displacia epifisaria múltiple                  |
| Procollagen type 11, alpha 1        | <i>Col11a1<sup>cho</sup></i> | KO, Espontáneo                          | Síndrome de Stickler tipo II                   |
| Fibroblast growth factor receptor 1 | <i>Fgfr1</i>                 | KO                                      | Síndrome deacrocefalosindactilia tipoV         |
| Fibroblast growth factor receptor 3 | <i>Fgfr3</i>                 | KO                                      | Acondroplasia; Enanismo tanatofórico           |
| GLI-Kruppel family member           | <i>Gli3<sup>xt</sup></i>     | Inducido por radiación, Espontáneo      | Síndrome de Greig                              |
| Homeo box D13                       | <i>Hoxd13</i>                | KO                                      | Sindactilia tipo II                            |

te, 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*, 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<sup>28</sup>.

Recientemente, se ha demostrado que las señales intercelulares mediadas por el factor de crecimiento de los fibroblastos (símbolo en inglés: 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 el Enanismo Tanatofórico, el cual causa enanismo y mortalidad perinatal en los heterocigotas. Es interesante notar 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<sup>29</sup>.

Finalmente, hablaremos brevemente de los colágenos, los cuales constituyen las principales fibras del tejido conectivo y las proteínas más abundantes de la matriz extracelular. Existen, por lo menos, 19 genes de colágeno, cuyos productos interaccionan (en forma de hélices triples) para formar las distintas fibras de colágeno. Por lo tanto, distintas 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 *Col11a1* 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 (Col1a2)*], y otras transgénicas y/o KO (*Cola1*, *Col2a1*, *Col5a2*, *Col9a1* y *Col 10a1*)<sup>30</sup>.

#### 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 (ver Tabla 4).

#### 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  $\beta$  (gen *App*), forma "wild type", o aquellos que expresan una forma mutante de la misma, 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 o "tangles", la otra lesión histopatológica característica de EA. Cabe destacar que estos ratones 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*  $-/-$ )<sup>31</sup>.

#### 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. En la Tabla 4 hay algunos ejemplos de modelos murinos pertenecientes a la primera categoría (mutación *Cchl1a3* y ratones KO para el gen *Ryr1*) y a la segunda categoría (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 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

TABLA 4. *Desórdenes neurológicos y neuromusculares*

| Nombre del gen                          | Símbolo                    | Modelo                            | Enfermedad humana                       |
|---|----------------------------|-----------------------------------|---|
| Apolipoprotein E                        | <i>Apoe</i> <sup>p</sup>   | KO                                | Alzheimer tipo 2                        |
| Amyloid beta precursor protein          | <i>App</i>                 | KO, Transgénico                   | Alzheimer                               |
| Ataxia telangiectasia                   | <i>Atm</i>                 | KO                                | Ataxia-telangiectasia                   |
| Dystrophin myotonic kinase, B15         | <i>Dm15</i>                | KO, Transgénico                   | Distrofia miotónica                     |
| Dystrophia, muscular dystrophy          | <i>Dmd</i> <sup>mdx</sup>  | Inducido químicamente, Espontáneo | Distrofia muscular de Duchenne y Becker |
| Fragile X mental retardation syndrome 1 | <i>Fmr1</i>                | KO                                | Síndrome X Frágil                       |
| Huntington disease gene homolog         | <i>Hdh</i>                 | KO                                | Enfermedad de Huntington                |
| Laminin, alpha 2                        | <i>Lama2</i> <sup>ly</sup> | Espontáneo                        | Distrofia muscular congénita            |
| Spinocerebellar ataxia 1                | <i>Sca1</i>                | Transgénico                       | Ataxia espinocerebelosa tipo 1          |
| Superoxide dismutase-1, soluble         | <i>Sod1</i>                | KO, Transgénico                   | Esclerosis lateral amiotrófica          |



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<sup>mdx</sup>*). 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 y en especial para el estudio de posibles terapias génicas. Muy recientemente, en 1996, se creó un modelo murino que se acerca aún 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)<sup>32, 33, 34</sup>.

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 microsatélite de ADN (motivo tri-nucleótido) 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<sup>35</sup>.

#### *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 de bioterio. 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<sup>36</sup>.

Existen varias mutaciones que presentan defectos en el crecimiento del pelo de las cuales se conocen las fa-

llas bioquímicas específicas que las producen<sup>37</sup>. 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* (*Ta*), *crinkled* (*cr*) y *downless* (*dl*) las cuales carecen de células productoras del factor de crecimiento EGF (*Ephitelial 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. La mutación *wa1*, imitada por el ratón KO para el gen *Tgfa* ("transforming growth factor alpha"), es un buen ejemplo de una mutación que pudo ser asociada 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.

Las mutaciones espontáneas *hairless* (*hr*) y *hairless rhino* (*hr<sup>rh</sup>*) son alélicas, autosómicas recesivas 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 comienzan 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 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* (ver inmunodeficiencias), 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<sup>38</sup>. 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 autosómica recesiva *nackt* (cromosoma 13), un KO espontáneo del gen *Ctsl* (catepsina L). Esta última presenta, además, una marcada deficiencia de linfocitos CD4<sup>+39</sup>.

#### *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 5. Teniendo en cuenta que los tejidos hematopoyéticos son de fácil acceso (aptos para aislar células primordiales) y sabiendo de la disponibilidad de líneas isogénicas de ratones, muchos laboratorios han redoblado sus esfuerzos en realizar trabajos en el área de la terapia génica.

### Anemias

La anemia falciforme ("Sickle cell anemia"), 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  $\beta$  globina. Es interesante describir cómo se creó un modelo murino para la anemia falciforme utilizando los genes de las globinas. El principal inconveniente del ratón transgénico que co-expresaba el gen humano de la  $\gamma$  globina y el gen (humano) mutado de la  $\beta$  globina [ $\beta$ S(6Val)] era que no desarrollaba el fenotipo anémico porque la  $\beta$  globina endógena (murina) interfería con la polimerización de las dos cadenas humanas. Este problema fue resuelto introduciendo los transgenes  $\gamma$  y  $\beta$  globina humanos en ratones que portan una mutación nula (inducida químicamente) en el gen de la  $\beta$  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<sup>40, 41</sup>.

### 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 CMH, las transducción de señales por tirosina quinasa etc.

Muchas mutaciones clásicas (espontáneas) sirvieron como punto de partida para el descubrimiento de genes implicados en enfermedades humanas. Este es el caso de *bg* (*beige*), 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 humano se encuentra mutado en los pacientes afectados de CHS<sup>42</sup>.

TABLA 5. *Enfermedades inmunológicas y hematológicas*

| Nombre del gen                     | Símbolo                  | Modelo  | Enfermedad humana                          |
|------------------------------------|--------------------------|---|--|
| Adenosine deaminase                | <i>Ada</i>               | KO  | Inmunodeficiencia combinada severa (SCID)  |
| CD40 ligand                        | <i>Cd40l</i>             | KO  | Inmunodeficiencia con altos niveles de IgM |
| Coagulation factor VIII            | <i>F8</i>                | KO  | Hemofilia A                                |
| Cytochrome b-245, beta polypeptide | <i>Cybb</i>              | KO  | Enfermedad crónica granulomatosa           |
| Fas antigen 1                      | <i>Fas<sup>br</sup></i>  | Espontáneo  | Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune     |
| Hemoglobin alpha gene cluster      | <i>Hba</i>               | Inducido químicamente, KO, Inducido por radiación | Alfa Talasemia                             |
| Hemoglobin beta gene cluster       | <i>Hbb</i>               | Inducido químicamente KO                          | Beta Talasemia                             |
| Hemoglobin beta gene cluster       | <i>Hbb</i>               | Inducido químicamente                             | Anemia Falciforme                          |
| Lysosomal trafficking regulator    | <i>Lyst<sup>bg</sup></i> | Espontáneo  | Síndrome Chediak-Higashi                   |
| Recombination activating gene-1    | <i>Rag1<sup>r</sup></i>  | KO  | Inmunodeficiencia combinada severa (SCID)  |

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 cepa AKR/J en 1976 (*nude streaker*), ambas son alélicas y mapean en el cromosoma 11. Es una de las mutaciones recesivas más difundida comercialmente y se encuentra disponible en varias cepas endocriadas y exocriadas, siendo también conocidos como «ratones atímicos». 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 disgenesia del epitelio tímico debido a una mutación puntual en el gen *winged helix*, una proteína de pegado (“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 limitado a un grupo de enfermedades asociadas con defectos en el compartimento epitelial del timo (Displasia Tímica). La nueva nomenclatura<sup>43</sup> 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<sup>nu</sup>*.

La mutación *scid* (“severe combined immunodeficiency”) es autosómica recesiva y apareció espontáneamente en el año 1980 en el Fox Chase Cancer Center de Filadelfia 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. 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 y exitoso 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<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> e inclusive inmunoglobulinas humanas (Ig G) en sangre periférica. El hecho de que estos ratones fueran muy susceptibles a la infección por HIV-1 permitió 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<sup>44, 45</sup>.

#### 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 autotolerancia dentro del sistema inmune. Estas son las mutaciones *lymphoproliferation* (*lpr*) y *generalized lymphadenopathy* (*gld*). Son dos mutaciones autosómicas recesivas surgidas independientemente en las cepas 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. La causa molecular de la mutación *lpr* es un defecto en el gen *Fas* (cromosoma 19), gen que codifica para un antígeno perteneciente a la familia de los receptores de TNF (“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*<sup>46</sup>.

#### Enfermedades metabólicas

En la Tabla 6 se describen mutaciones en varios genes murinos que sirven como modelo experimental en enfermedades metabólicas y hormonales. Entre ellos, hay dos modelos (*Hexa* y *Hprt*) 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.

TABLA 6. Enfermedades metabólicas y hormonales

| Nombre del gen  | Símbolo                     | Modelo                | Enfermedad humana             |
|---|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Apolipoprotein B  | <i>Apob</i>                 | KO, Transgénico       | Hipolipoproteinemia           |
| Apopolipoprotein E  | <i>ApoE<sup>b</sup></i>     | KO, Transgénico       | Hiperlipoproteinemia tipo III |
| Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator homolog | <i>Cftr</i>                 | KO                    | Fibrosis Quística             |
| Ferrochelatase  | <i>Fech<sup>mIPas</sup></i> | Inducido químicamente | Porfiria Eritropoyética       |
| Hexokinase A  | <i>Hexa</i>                 | KO                    | Enfermedad de Tay-Sachs       |
| Hexokinase B  | <i>Hexb</i>                 | KO                    | Enfermedad de Sandhoff        |
| Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase             | <i>Hprt</i>                 | KO                    | Síndrome de Lesch-Nyhan       |

### 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 X caracterizada por retardo mental y automutilación compulsiva<sup>47</sup>.

Recientemente, se creó un ratón KO para el gen *Aprt* que 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 *Aprt* 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<sup>48</sup>.

### 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 inflamación 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. 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. 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<sup>49, 50</sup>.

### Arteriosclerosis

Las enfermedades cardiovasculares que genera la arteriosclerosis son una de las principales causas 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 nulos (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 en-

sayo 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<sup>51, 52</sup>.

## 2. Modelos murinos de enfermedades hereditarias complejas (multigénicas)

### Cáncer

A principios del siglo XX, cuando se comenzó a experimentar con las primeras cepas 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 u oncogénos, muchas veces acompañado por fenómenos de inestabilidad genómica. Es importante aclarar que el cáncer familiar, del cual nos ocuparemos aquí, 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 cepas 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*<sup>2, 3</sup>.

La tecnología transgénica ha sido de particular importancia para el estudio de la expresión de oncogénos 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 *ras* 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. Cuando *Myc* es ligado al promotor del virus de tumor mamario

murino (MMTV) causa cáncer de mama, y cuando es unido al “enhancer” de la cadena pesada de inmunoglobulinas, la malignidad observada es de origen linfóide<sup>53</sup>. Por lo tanto, la regulación alterada del gen *Myc* aumenta notablemente la posibilidad de crecimiento tumoral sin ser necesaria la mutación del gen. Por otro lado, 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 (“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<sup>54</sup>.

Vale la pena comentar que muchos de estos ratones transgénicos que portan oncogénos han sido centro de grandes controversias en la comunidad científica. Este es el caso del OncoMouse (ratones transgénicos que expresan oncogénos como la línea 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 el NIH logró 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. En la Tabla 7 podemos observar las mutaciones y los ratones transgénicos más importantes para el estudio del cáncer familiar.

### 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, 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 relacionado con poliposis

TABLA 7. *Cáncer hereditario*

| Nombre del gen                    | Símbolo                  | Modelo                    | Enfermedad humana  |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|--|
| Adenomatous polyposis cell        | <i>Apc<sup>Min</sup></i> | Inducido químicamente, KO | Poliposis familiar,  |
| Breast cancer 1                   | <i>Brca1</i>             | KO                        | Cáncer de mama tipo 1  |
| MutL ( <i>E. coli</i> ) homolog 1 | <i>Mlh1</i>              | KO                        | Cáncer del colon no relacionado con poliposis (HNPCC) tipo 2 |
| MutS ( <i>E. coli</i> ) homolog 2 | <i>Msh2</i>              | KO                        | Cáncer del colon no relacionado con poliposis (HNPCC) tipo 1 |
| Neurofibromatosis tipo1           | <i>Nfl</i>               | KO                        | Neurofibromatosis tipo1                                      |
| Retinoblastoma-1                  | <i>Rb1</i>               | KO                        | Retinoblastoma familiar                                      |
| Transformation-related protein 53 | <i>Trp53</i>             | KO, Transgénico           | Síndrome de Li-Fraumeni                                      |
| Wilm's tumor homolog              | <i>Wt1</i>               | KO                        | Tumor de Wilm; Síndrome de Denys-Drash                       |

tipos 2 y 3, respectivamente. Efectivamente, los ratones KO, 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<sup>55, 56</sup>.

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 inducida químicamente que afecta al gen homólogo *Apc*, se trata de la mutación *Multiple intestinal neoplasia (Min)*, ahora *Apc<sup>min</sup>*, cuyos portadores desarrollan adenomas y adenocarcinomas intestinales. El número de adenomas intestinales depende enormemente de un gen modificador denominado *Mom1 (modifier of Min)* presente en varias cepas consanguíneas<sup>57</sup>.

#### 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* (cromosoma17q), 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* (cromosoma11) 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 cepa, se desarrollan distintos tipos de tumores en estos ratones transgénicos. Esta característica es muy útil para poder aislar posibles genes modificadores ("modifier genes") de la incidencia tumoral<sup>58</sup>.

#### Obesidad y diabetes

La mutación espontánea *ob* (*obese*, cromosoma 6) fue descrita en The Jackson Laboratory (USA) en el año 1949 en la cepa endocriada 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<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* puede alcanzar dos a tres veces los valores de un ratón normal. 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, estamos hablando de la mutación *diabetes* (*db*) en el cromosoma 4 del ratón. Existen varias mutaciones independientes de esta mutación, aparecidas espontáneamente en The Jackson Laboratory y en el Instituto Pasteur de París. Finalmente se descubrió que se trataba del gen que codificaba para el receptor de la leptina (*Lep<sup>rb</sup>*)<sup>59</sup>

La diabetes mellitus dependiente de la insulina (o 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  $\beta$  de los islotes de Langerhans). Existe una cepa consanguínea de ratones llamada NOD (por Non Obese Diabetes) que desarrolla en forma espontánea

nea 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 cruces experimentales con cepas 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-Idd15*. Para que se desarrollen los síntomas diabéticos debe estar presentes varios alelos susceptibles de los mencionados loci. Además, estos alelos se comportan en forma aditiva. Actualmente, gracias al desarrollo de líneas congénicas portando regiones cromosómicas de la cepa susceptible, se está trabajando en la identificación de los genes de susceptibilidad<sup>60</sup>.

### 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 diferencias 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<sup>m1Pas</sup>*), inducida por mutagénesis química, la cual constituye 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<sup>m1Pas</sup>/Fech<sup>m1Pas</sup>* muestran ictericia, son muy 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 cepa particular y recesivo en otra<sup>17, 18</sup>.

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 (conocidas en inglés como mutaciones "missense", por cambiar aminoácidos) 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 sepamos mucho sobre ellas<sup>61, 62</sup>. Como conclusión podemos decir que la colección de mutaciones del ratón, acumuladas en las décadas pasadas por los genetistas y bioteristas, representa una fuente valiosa de modelos animales para el estudio de los desórdenes genéticos humanos homólogos<sup>36, 63, 64</sup>. Algunas de esas mutaciones son conocidas en términos moleculares y por lo tanto utilizadas para el desarrollo y evaluación de nuevas terapias para el uso humano. En el futuro próximo la disponibilidad de modelos murinos se verá muy acrecentada por la gran cantidad de técnicas disponibles para el diseño de alteraciones en el genoma murino y los proyectos conjuntos de mutagénesis química por etil nitroso urea (ENU)<sup>65</sup>. La denominada era "post-genómica" ("post-genomics" o "funcional genomics") ya está entre nosotros y será esencial contar con estos modelos animales para el estudio funcional de las secuencias obtenidas de los proyectos de secuenciación del genoma humano y murino. En este sentido, podemos asegurar que la genética del ratón, y con ella la genética de los mamíferos, está experimentando una verdadera revolución.

### Bibliografía

1. Benavides F, Guénet JL. Mapeo de genes en el ratón. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 507-10.
2. Bedell, M.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes & Development* 1997; 11: 1-10.

3. Bedell, M.A., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., et al. Mouse models of human disease. Part II: Recent progress and future directions. *Genes & Development* 1997; 11: 11-43.
4. Borelli, E.R., Heyman, R., Hsi, M., et al. Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7572-6.
5. Bernstein, A. and Breitman, M.L. Genetic ablation in transgenic mice. *Molecular Biology and Medicine* 1989; 6: 523-30.
6. Jackson y Abbott. *Mouse Genetics and Transgenics. A practical approach.* Oxford: Oxford University Press; 2000.
7. Cory, S. and Adams, J. M. Transgenic mice and oncogenesis. *Ann Rev Immunol* 1988; 6: 25-48.
8. Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, et al. Acute leukemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 1990; 344: 251-3.
9. Koike S, Taya C, Kurata T, et al. Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 951-5.
10. Lee, J.T. and Jaenisch, R. A method for high efficiency YAC lipo-fection into murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research* 1996; 24: 5054-5.
11. Umland T, Montoliu L, Schütz G. The use of yeast artificial chromosomes for transgenesis. In: Houdebine, L.M. (ed). *Transgenic animals: generation and use.* Harwood Press, 1997, p 289-98.
12. Huxley C, Passage E, Manson A, et al. Construction of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A by pronuclear injection of human YAC DNA. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 563-9.
13. Rahmani Z, Blouin JL, Creau-Goldberg N, et al. Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5958-62.
14. Smith DJ, Zhu Y, Zhang J, et al. Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2Mb set of YAC/P1 clones from human chromosome 21-q22.2. *Genomics* 1995; 27: 425-34.
15. Smith DJ, Stevens ME, Sudanagunta S, et al. Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates mini-brain in learning defects associated with Down syndrome. *Nature Genet* 1997; 16: 28-36.
16. Barnes GT, Duyao MP, Ambrose CM, et al. Mouse Huntington's disease gene homolog (Hdh). *Somat Cell Mol Genet* 1994; 20: 87-97.
17. Paigen, K. A miracle enough: the power of mice. *Nature Medicine* 1995; 1: 215-20.
18. Guénet, J.-L. Animal models of human genetic diseases. In: Vega MA (ed). *Gene Targeting.* CRC Press, 1995, p 149-166.
19. Smithies O. Animal models of human genetic diseases. *Trends Genet* 1993; 9: 112-6.
20. Sundberg JP. *Handbook of mouse mutations with skin and hair abnormalities.* Boca Raton: CRC Press, 1994.
21. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, et al. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994; 79: 1267-76.
22. Fleischman RA. From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development. *Trends Genet* 1993; 9: 285-90.
23. Tassabehji M, Newton VE, Liu XZ, et al. The mutational spectrum in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2131-7.
24. Jackson IJ, Raymond S. Manifestations of microphthalmia. *Nat Genet* 1994; 8: 209-10.
25. Hanson I, van Heyningen V. Pax6: more than meets the eye. *Trends Genet* 1995; 11: 268-72.
26. McInnes RR, Bascom RA. Retinal genetics: a nullifying effect for rhodopsin. *Nat Genet* 1992; 1: 155-7.
27. Gibson F, Walsh J, Mburu P, et al. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature* 1995; 374: 62-4.
28. Dolle P, Dierich A, LeMour M, et al. Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* 1993; 75: 431-41.
29. Muenke M, Schell U. Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet* 1995; 11: 308-13.
30. Stacey AJ, Bateman T, Choi T, et al. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta in transgenic mice bearing an engineered mutant proa1 (I) collagen gene. *Nature* 1988; 332: 131-6.
31. Pericak-Vance MA, Haines JL. Genetic susceptibility to Alzheimer disease. *Trends Genet* 1995; 11: 504-8.
32. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989; 244: 1578-80.
33. Cox GA, Sunada Y, Campbell KP, et al. Dp71 can restore the dystrophin-associated glycoprotein complex in muscle but fails to prevent dystrophy. *Nat Genet* 1994; 8: 333-9.
34. Megeney LA, Kablar B, Garrett K, et al. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* 1996; 10: 1173-83.
35. Jansen G, Groenen PJ, Bachner D, et al. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 1996; 13: 316-24.
36. Doolittle, D., Davisson, M., Guidi, J, et al. Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In: Lyon M, Rastan S, Brown S (eds). *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse.* Oxford: Oxford University Press, 1996, p 17-854.
37. Sundberg JP, Schultz LD. Inherited mouse mutations: models for the study of alopecia. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 95S-6S.
38. Ahmad W, Faiyaz ul Haque M, Brancolini V, et al. Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene. *Science* 1998; 279: 720-4.
39. Benavides F, Giordano M, Fiette L, et al. Nackt (nkt), a new hair loss mutation of the mouse with associated CD4 deficiency. *Immunogenetics* 1999; 49: 413-9.
40. Ryan TH, Townes TM, Reilly MP, et al. Human sickle hemoglobin in transgenic mice. *Science* 1990; 247: 566-7.
41. Fabry ME. Transgenic animal models of sickle cell disease. *Experientia* 1993; 49:28-36.
42. Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* 1996; 382: 262-5.
43. Schorpp M, Hofman M, Dear TN, et al. Characterization of mouse and human nude genes. *Immunogenetics* 1997; 46: 509-15.
44. Hendrickson EA. The SCID mouse: relevance as an animal model system for studying human disease. *Am J Pathol* 1993; 143: 1511-22.
45. Jhappan C, Morse HC 3rd, Fleischmann RD, et al. DNA-PKcs: a T-cell tumour suppressor encoded at the mouse scid locus. *Nat Genet* 1997; 17: 483-6.
46. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995; 81: 935-46.
47. Kuehn, M.R., Bradley, A., Robertson, E.J., et al. A potential animal model for Lesch-Nyhan Síndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 1987;



- 326: 295-8.
48. Rossiter BJ, Caskey CT. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: Lesch-Nyhan syndrome and gout. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, and Valle D. (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p 1679-7-06.
  49. Drumm ML, Collins FS. Molecular biology of cystic fibrosis. *Mol Genet Med* 1993; 3: 33-68.
  50. van Doorninck JH, French PJ, Verbeek E, et al. A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *EMBO J* 1995; 14: 4403-11.
  51. Goldstein MR. Lipoprotein(a): friend or foe? *Am J Cardiol* 1995; 75: 319.
  52. Knecht TP, Glass CK. The influence of molecular biology on our understanding of lipoprotein metabolism and the pathobiology of atherosclerosis. *Adv Genet* 1995; 32: 141-98.
  53. Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, et al. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 1985; 318: 533-8.
  54. Nerenberg M, Hinrichs SH, Reynolds RK, et al. The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science* 1987; 237: 1324-9.
  55. Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371: 75-80.
  56. Baker SM, Plug AW, Prolla TA, et al. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet* 1996; 13: 336-42.
  57. Dietrich WF, Lander ES, Smith JS, et al. Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* 1993; 75: 631-9.
  58. Jacks T. Lessons from the p53 mutant mouse. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 319-27.
  59. Hamann A, Matthaei S. Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104: 293-300.
  60. Wong FS, Janeway CA Jr. Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11: 643-7.
  61. Erickson, R. P. Why isn't a mouse more like a man? *Trends in Genetics* 1989; 5: 13.
  62. Erickson, R. P. Mouse models of human genetic disease: which mouse is more like a man? *Bio-Essays* 1996; 18: 993.
  63. Brandon, E.P., Idzerda, R.L., McKnight, G.S. Targeting the mouse genome : a compendium of KOs (part 1). *Current Biology* 1995; 5: 758-65.
  64. Brandon, E. P., Idzerda, R.L., McKnight, G. S. Targeting the mouse genome : a compendium of KOs (part 2). *Current Biology* 1995; 5: 625-34.
  65. Nolan PM, Peters J, Strivens M, et al. A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nat Genet* 2000; 25: 440-3.

----

*Under the microscope, the most striking and obvious difference between ourselves and all the other great apes is that we have one pair of chromosomes less. The reason, it immediately becomes apparent, is not that a pair of ape chromosomes has gone missing in us, but that two ape chromosomes have fused together in us. Chromosome 2, the second biggest of the human chromosomes, is in fact formed by the fusion of two medium-sized ape chromosomes, as can be seen from the pattern of black bands on the respective chromosomes. Pope John-Paul II, in his message to the Pontifical Academy of Sciences on 22 October 1996, argued that between ancestral apes and modern human beings, there was an "ontological discontinuity" - a point at which God injected a human soul into an animal lineage. Thus can the Church be reconciled to evolutionary theory. Perhaps the ontological leap came at the moment when two ape chromosomes were fused, and the genes for the soul lie near the middle of chromosome 2.*

Bajo el microscopio, la diferencia más asombrosa y evidente entre nosotros y todos los demás grandes monos es que nosotros tenemos un par menos. De inmediato se hace patente que la razón no es que un par de los cromosomas de mono se haya perdido en nosotros, sino que dos cromosomas de mono se han fusionado en nosotros. El cromosoma 2, el segundo más grande de los cromosomas humanos, en realidad está formado por la fusión de dos cromosomas de mono de tamaño medio, tal como puede observarse a partir del patrón de bandas negras sobre los cromosomas respectivos. El Papa Juan Pablo II, en su mensaje a la Academia Pontificia de Ciencias el 22 de octubre de 1996, sostenía que entre los monos ancestrales y los seres humanos había una "discontinuidad ontológica", un punto en el cual Dios inyectó un alma humana en una estirpe animal. De este modo, la Iglesia puede resignarse a la teoría evolutiva. Tal vez, el salto ontológico llegó en el momento en el que dos cromosomas de mono se fusionan y los genes del alma se hallan cerca del punto medio del cromosoma 2.

Matt Ridley

*Genome: the autobiography of a species in 23 chapters*. New York: Harper Collins, 1999, p 24  
 (Genoma: la autobiografía de una especie en 23 capítulos. Traducción de Inés Cifuentes. Madrid: Grupo Santillana de Ediciones S.A., 2000, p 38)