

¿Qué nos enseñan los ratones transgénicos?

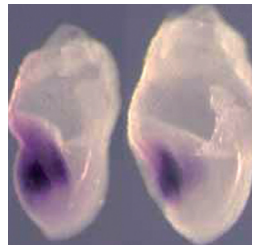
Hilda Lomelí Buyoli y Leda C. Torres Maldonado

Los genes y los momentos mágicos del desarrollo de un organismo

La pregunta fundamental de la biología del desarrollo es cómo una célula única —el huevo fertilizado— puede dar origen a la diversidad de células que en conjunto componen a un organismo metazoario. Esta pregunta puede abordarse como un problema de división celular, diferenciación y morfogénesis: una célula genera al reproducirse una variedad de tipos celulares que se organizan espacial y temporalmente adoptando formas y constituyendo órganos. También puede expresarse en términos genéticos de la siguiente manera: ¿Cómo un mismo genotipo celular (un genoma único) puede dar origen a cientos de fenotipos celulares diferentes? Sabemos que no todos los genes presentes en una célula se expresan todo el tiempo y que las características fenotípicas de una célula específica resultan del balance entre los que se expresa y lo que no se expresa. Por ello, en la medida en que hemos ido entendiendo más del control genético y su relación con el comportamiento celular, más interconexión se ha ido estableciendo entre la genética y la embriología, de manera que actualmente al referirnos a esta disciplina pensamos en la genética del desarrollo.

La secuenciación de genomas y la posibilidad de manipularlos en una diversidad de organismos ha acelerado enormemente la comprensión de algunas preguntas fundamentales del desarrollo, de tal forma que actualmente conocemos la identidad de genes que son capaces por sí solos de echar a andar cascadas o programas de expresión genética y así producir transformaciones esenciales en el embrión. Un ejemplo que ilustra esta idea es el del gen *Sry*, presente en el cromosoma Y de mamíferos, que al activarse en machos modifica un programa de expresión destinado a producir hembras y en su lugar establece uno que causa la determinación masculina. Así, hemos comprendido que cada uno de los eventos del desarrollo puede explicarse en términos de circuitos genéticos interpretados y ejecutados por redes de proteínas que operan dentro de las células y entre las células, determinando el comportamiento celular. Dilucidar estos programas genéticos, las redes de señalización que establecen y cómo esta información se traduce en forma y tamaño es el reto de la genética del desarrollo.

Una de las conclusiones más importantes que ha derivado de los descubrimientos genéticos es que existen patrones generales de desarrollo en muy diversos organismos que utilizan



genes similares. Así, el estudio de un modelo animal resulta de utilidad para entender un proceso que ocurre en otro organismo. Los organismos vertebrados, por ejemplo, pasan por un conjunto similar de estadios embrionarios. En todos los casos, después de la fertilización ocurre una serie de divisiones celulares que da lugar a estructuras blastulares o *blastodermos*, que pueden describirse como esferoides o balones vacíos. Este estadio es seguido por un momento fundamental llamado *gastrulación* caracterizado por una gran cantidad de movimientos celulares e invaginaciones en el que los balones van rellenándose de células para formar una *gástrula*. Durante la gastrulación ocurre la creación de tres grupos de células o capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. El concepto de capa germinal proviene de la observación de que cada uno de estos grupos de células da origen o es el 'germen' de ciertos tejidos o linajes específicos. Por ejemplo, del ectodermo se deriva la piel y las células nerviosas.

Distintas especies animales han sido utilizadas como modelos para estudiar el desarrollo. Cada una de ellas presenta ventajas para enfoques diferentes. Históricamente los organismos que más se han utilizado han sido el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, la rana *Xenopus laevis*, el pez cebra *Danio rerio* y, de entre los mamíferos, el ratón. En nuestro laboratorio hemos estado interesados en el desarrollo de mamíferos, por lo que nos hemos centrado en el estudio del ratón.

El uso del ratón (*Mus musculus*) en el laboratorio para el estudio de biología humana a través de experimentos de genética clásica tiene por lo menos 100 años de historia (Guénet y Bonhomme, 2004). En sus orígenes la genética del desarrollo del ratón se basaba en la observación de características como el color de la piel, la morfología y el comportamiento en mutantes naturales. Estos enfoques se enriquecieron con el establecimiento de métodos para cultivar embriones antes y después de la implantación al útero y con la habilidad de

combinar células de distintos genotipos, lo que eventualmente condujo, hace ya 50 años, a la obtención de ratones quiméricos. Posteriormente, el éxito al derivar líneas celulares a partir de tumores embrionarios (teratocarcinomas) generó la idea de que podrían obtenerse líneas celulares de embriones tempranos con la potencialidad de contribuir a distintos tejidos del embrión. Esta línea de investigación finalmente alcanzó su clímax con el establecimiento de líneas celulares embrionarias llamadas células ES, con capacidad de diferenciar hacia todos los tipos celulares incluyendo la línea germinal. Hacia finales de los 80 fue posible manipular el genoma en células embrionarias totipotenciales y, a partir de ese momento, fueron incorporándose técnicas cada vez más sofisticadas para hacer del ratón un organismo modelo de la más alta resolución genética y quizá el más poderoso para entender y modelar las enfermedades humanas, como síndromes, malformaciones y cáncer, así como para la búsqueda de productos genéticos de valor terapéutico (Guénet y Bonhomme, 2004). En la actualidad el genoma del ratón ha sido completamente secuenciado y sabemos que el 99% de sus genes tiene homólogo en humanos.

Las múltiples maneras de manipular el genoma de un ratón *in vivo*

Hoy en día el genoma del ratón puede ser manipulado de todas las formas imaginables (Nagy *et al.*, 2003). La primera tecnología de transferencia genética que se estableció fue la inserción de ADN exógeno dentro de los cromosomas de ratón para producir mutantes de 'ganancia-defunción', es decir, con sobre-expresión o expresión nueva de un gen. Esta tecnología consiste básicamente en inyectar ADN lineal dentro del pronúcleo de un cigoto fertilizado. El proceso puede sintetizarse de la siguiente manera: ovocitos fertilizados son extraídos del oviducto de una ratona y con un micromanipulador el gen de interés, usualmente contenido en un plásmido linearizado, es inyectado en el pronúcleo, donde el ADN se integra al azar en el genoma

y es heredado a todas las células del ratón. Los ovocitos inyectados son inoculados en el oviducto de una madre nodriza en donde continúa su desarrollo produciéndose así un ratón transgénico. Los ratones transgénicos han sido extensamente utilizados principalmente para estudios de regulación genética. En estos estudios se introducen al ratón fragmentos de ADN conteniendo putativas regiones regulatorias de genes de interés, dirigiendo la expresión de los llamados genes *reporteros*, como por ejemplo el gen de la proteína verde fluorescente. De esta manera se puede visualizar y definir si el fragmento de ADN al que están unidos los reporteros es capaz de dirigir la expresión genética en tejidos específicos. Los ratones transgénicos también han sido útiles para estudiar los efectos fenotípicos de la expresión de un gen; no obstante, esta tecnología no nos permite conocer los efectos de perder una función genética. En ese sentido, la posibilidad de generar ratones transgénicos con pérdida de función significó un gran avance para la genética del ratón.

Para la creación de mutantes nulas específicas de ratón, llamadas en inglés “knockouts” fue clave la disponibilidad de las ya mencionadas líneas celulares embrionarias totipotenciales (ES), también conocidas ahora como células ‘madre’, las cuales actualmente permiten la manipulación de su genoma de múltiples maneras. Todos los métodos que se utilizan actualmente para hacer mutagénesis en el ratón se basan en alterar los genes en las células ES y después utilizar éstas para producir ratones, primero quiméricos y finalmente líneas puras. Los dos primeros ejemplos de alteraciones genéticas específicas se reportaron en 1988 por los grupos de Mario Capecchi y Oliver Smithies (Guénet y Bonhomme, 2004), galardonados en 2007 con el premio Nobel. La estrategia que se desarrolló para lograr este tipo de mutaciones se basó en el uso de la llamada recombinación homóloga. La recombinación homóloga es un evento de baja frecuencia que ocurre de manera natural cuando se introduce al núcleo de la célula un fragmento de ADN con homología a alguna región del genoma. Consiste en la inte-

gración por recombinación del ADN que se introduce, a las regiones homólogas del genoma, en sustitución de las secuencias endógenas. Si se dispone de vectores adecuados, se pueden introducir secuencias homólogas en células ES, seleccionar estos eventos de recombinación y, a través de ellos, introducir modificaciones nulficantes en lugares precisos del genoma. La recombinación homóloga llamada en inglés “gene targeting” ha tenido, como puede suponerse, un impacto enorme en el entendimiento de la función genética. Es difícil precisar cuántos genes han sido inactivados hasta ahora usando esta tecnología, pero entre los que se han reportado en la literatura y la información disponible en distintas bases de datos como la “Mouse knockout & mutation database”, el “Mouse genetics database” y el “Lexicon genetics”, se calcula que hacia 2004 habría entre 2500 y 2700 genes diferentes estudiados mediante la producción de mutantes nulas (Austin *et al.*, 2004). Esta cantidad corresponde apenas a un poco más del 10% de los genes que se expresan en ratón, por lo que en años recientes ha habido iniciativas por parte de la comunidad genómica del ratón para coordinar esfuerzos internacionales y producir las mutantes de todos los genes en un tiempo breve y hacerlos disponibles a la comunidad científica. Estas iniciativas se han englobado en lo que se conoce como el “Knockout mouse project” (Austin *et al.*, 2004).

El análisis de mutaciones nulas en el ratón también hizo posible conocer las limitaciones de esta tecnología, ya que muchos genes involucrados en funciones múltiples durante el desarrollo producían mutantes con muy temprana letalidad, lo que sólo permitía conocer la causa más temprana de su muerte, pero no sus diversos papeles a lo largo del desarrollo. Esta limitación condujo a la implementación de nuevas herramientas, ahora con el objetivo de lograr mutaciones condicionales y/o específicas de ciertos tejidos o bien, restringidas temporalmente. El primer sistema de este tipo que se desarrolló fue el llamado *creLox*, el cual se basa en el uso de una recombinasa llamada Cre proveniente de un fago. El sistema consis-

te en usar ratones transgénicos con la expresión de Cre dirigida por regiones regulatorias o promotores específicos, tales que restringen la expresión de Cre a sitios de interés. Estos ratones son cruzados con ratonas transgénicas que contienen insertos de las secuencias consenso llamadas *loxP*, que son los blancos sobre los que actúa la recombinasa Cre. Dichas secuencias consenso se colocan de manera específica flanqueando los genes que se quieren mutar. En la progenie de estos dos ratones Cre actúa *in vivo* sobre sus sitios consenso provocando la supresión de aquello que éstos flanquean. Sin embargo, esta supresión sólo ocurre en los tejidos donde Cre está activa. De esta manera se logra suprimir o alterar el gen de interés únicamente en regiones específicas. Con diferentes diseños, el sistema puede usarse para inactivar o activar la expresión de un gen. Como veremos mas adelante, en nuestro laboratorio lo hemos utilizado para la activación genética. Otras formas de hacer mutaciones que han tenido éxito, en las que se logra además un control temporal de la acción de Cre, involucran el uso de sistemas regulatorios inducibles con tetraciclina y otros antibióticos.

Las metodologías a las que nos hemos referido abren todo tipo de posibilidades con relación a lo que se conoce como genética reversa, es decir, la que parte de alterar un gen para entender su función, se va del genotipo al fenotipo. Existe también el enfoque conocido como genética directa, en la que se parte de un fenotipo y se va al genotipo. Esto es, se identifican mutantes con una característica y se determina cuál es el gen mutado. Estos enfoques han podido usarse extensamente en mosca y pez cebra, sin embargo, dado el enorme número de individuos que tienen que analizarse en este tipo de estrategias, se antojaba difícil hacerlo en el ratón, considerando la duración de sus ciclos reproductivos y el tamaño relativamente pequeño de sus progenies. No obstante, actualmente ya se han utilizado exitosamente estrategias de mutagénesis tanto con agentes químicos como por la inserción al azar de secuencias de ADN, que tienen el doble papel

de interrumpir genes y sirven para la posterior identificación de los genes mutados. Los detalles que han hecho posibles estas metodologías no pueden revisarse en este espacio.

Finalmente, en tiempos recientes se ha incorporado la poderosa estrategia del ARN interferente para impedir la expresión de genes específicos *in vivo*. El uso de la tecnología del ARNi para la pérdida de función y el estudio de la función genética ha resultado revolucionario y se ha aplicado a una gran variedad de organismos. Hasta hace poco no había sido posible la utilización del ARNi en células de mamíferos debido a que el ARNi en estas células provoca una respuesta citotóxica. Este efecto no-específico puede evitarse usando ARNs cortos (22 nucleótidos), los cuales pueden mediar de manera específica y eficiente la supresión genética (Kunath, 2006). Sin embargo, el tamaño de estos ARNs había complicado su uso en el caso de la supresión permanente, ya que se carecía de un sistema para la expresión estable de ARNi pequeños (llamados siARN por “small interfering ARN”). Recientemente se han reportado sistemas basados en el uso de plásmidos y de promotores de la ARN polimerasa III, mediante los cuales se logra la síntesis continua de siARNs y la supresión genética estable (Brummelkamp *et al.*, 2002). Con este sistema se han generado líneas de ES con pérdida de función de genes específicos a los que en inglés se han llamado “knock downs”. Posteriormente se han derivado embriones a partir de las ES con la supresión genética, y estudiando los fenotipos embrionarios, se ha demostrado que se recapitulan fenotipos anteriormente descritos de mutantes nulas producidas por recombinación homóloga (Kunath *et al.*, 2003; Lickert *et al.*, 2004). A continuación ejemplos de lo aprendido.

Oct4, un gen de totipotencialidad y destino celular

Nuestro grupo de trabajo se interesa en analizar el papel de diversos genes durante el desarrollo embrionario del ratón. Uno de los genes que hemos estudiado es el gen *Oct4*, que

codifica para la proteína OCT4, un factor que regula la transcripción activando y reprimiendo la expresión genética y que pertenece a la familia de factores transcripcionales llamados "POU", los cuales se caracterizan por contener un motivo de unión a ADN separado en dos dominios, lo que les confiere una gran flexibilidad en su interacción con el ADN (Okamoto *et al.*, 1990). En el ratón, el gen *Oct4* se expresa en las células pluripotentes del blastocisto y la gástrula, si bien su expresión se apaga gradualmente a medida que las células van integrándose a las capas germinales. El gen *Oct4* se expresa también en las células precursoras de los gametos, así como en líneas celulares derivadas de éstas y, además, se encuentra en otras líneas celulares pluripotentes derivadas del embrión temprano, tales como las antes mencionadas ES (Yeom *et al.*, 1996).

Desde el inicio, el descubrimiento de *Oct4* generó un gran interés, ya que su patrón de expresión sugería que podría tener un papel en el mantenimiento de la pluripotencialidad celular. Esta función, además de ser particularmente interesante para la biología del desarrollo, tiene implicaciones biotecnológicas importantísimas en el área del uso de células madre con fines médicos. Diversas evidencias confirmaron el papel esencial de este gen en el mantenimiento de la pluripotencialidad. Por ejemplo, se observó que los embriones nulos o con ausencia de función de *Oct4* se desarrollaban hasta formar una mórula compacta y generaban una estructura muy parecida a un blastocisto, pero sus células internas eran incapaces de formar la masa celular interna, por lo que morían antes de la implantación (Nichols *et al.*, 1998). Otras evidencias obtenidas *in vitro* revelaron que variaciones en los niveles de expresión de *Oct4* en células pluripotentes causaban una diferenciación y pérdida de pluripotencialidad (Niwa *et al.*, 2000). Por éstas y otras observaciones, la mayor parte de los estudios hechos para *Oct4* hasta ahora se habían enfocado en su papel como factor de pluripotencialidad. No obstante, estas mismas y otras evidencias sugieren que este gen

podría participar en iniciar ciertos programas de diferenciación del ectodermo y endodermo antes de apagarse. Por ejemplo, en los estudios hechos con células ES se ha visto que dosis específicas de OCT4 pueden asociarse a identidades celulares específicas; así, la duplicación de la dosis favorece la formación de endodermo y la disminución a la mitad causa la formación de trofotodermo (Niwa *et al.*, 2000). En otro trabajo se observó que incrementos en la expresión de este gen, en presencia de un factor de crecimiento llamado LIF determinan la diferenciación de células ES a precursores neuronales (Shimozaki *et al.*, 2003). Por otra parte, en un trabajo reciente realizado con ES humanas en cultivo que se basa en ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, se reportaron un total de 572 diferentes genes que podrían ser blancos de OCT4, ya que sus regiones regulatorias son capaces de unirse *in vitro* a este factor transcripcional (Boyer *et al.*, 2005). Si bien en este trabajo no se determinó si OCT4 actuaría como activador o como represor de la transcripción, entre los genes reportados se encuentran algunos relacionados con el establecimiento de ciertos linajes celulares, como *Sox2*, *Sox17*, *Pax2*, *Cdx2*, *FoxA2* y *Gata6*. Por todo lo anterior pensamos que *Oct4* puede desempeñar, además de su participación en el mantenimiento de la pluripotencialidad, un papel en el establecimiento del destino celular.

Para analizar éstas y otras posibles funciones tardías de *Oct4* distintas a la pluripotencialidad, en nuestro grupo de trabajo utilizamos un ratón transgénico en el que se expresa este gen de manera elevada y en forma ubicua desde las primeras etapas embrionarias. Para generar este ratón usamos el sistema *creLox* de inducción de expresión *in vivo* al que antes nos referimos. Hicimos esto porque la inyección de ADN conteniendo secuencias de *Oct4* en ovocitos fertilizados no era viable, dado el papel de OCT4 en la pluripotencialidad, en cambio la estrategia de activación *in vivo*, nos permitiría una acumulación gradual de la proteína, haciendo posible la implantación de los embriones. Los ratones utilizados para inducir la

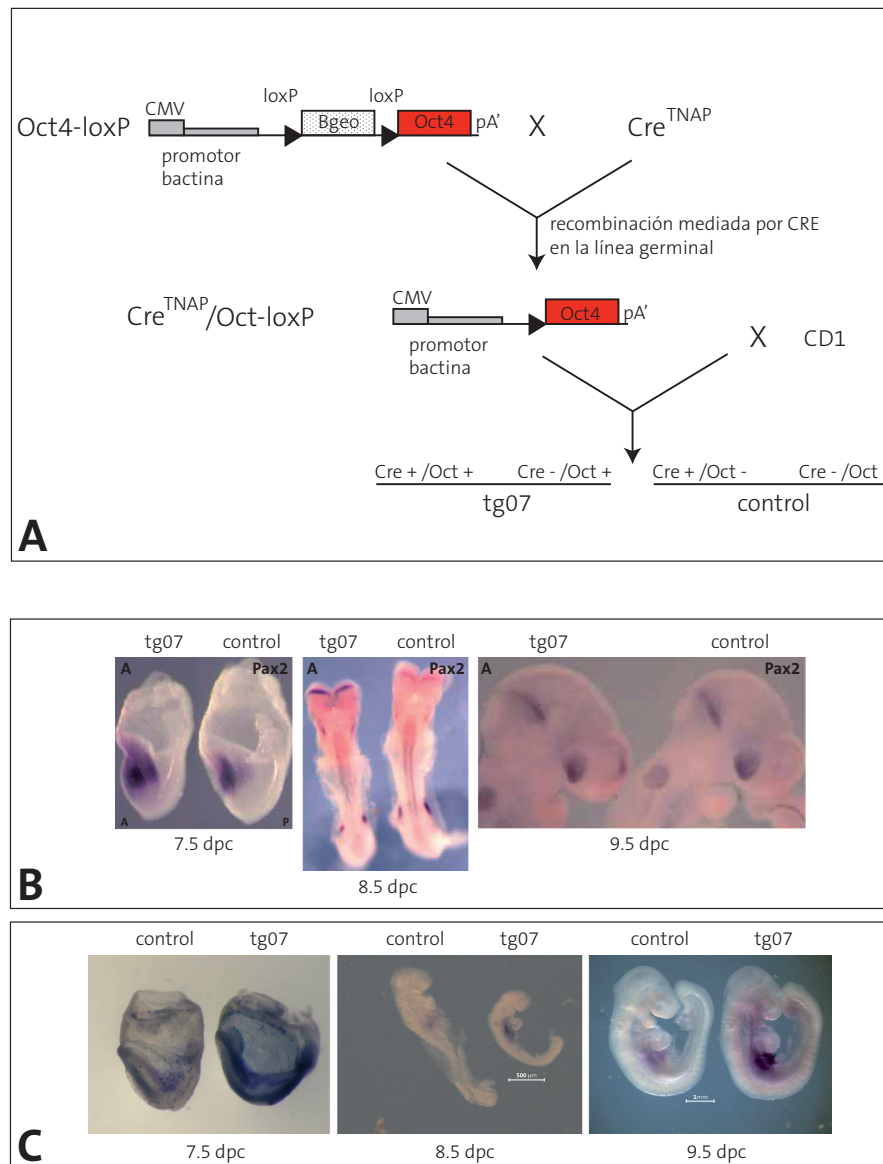


Figura 1.

A. Modelo de expresión generalizada de *Oct4*. Se cruzan las líneas Cre^{TNAP} y $Oct4-loxP$ para obtener dentro de su progenie machos $Cre^{TNAP}/Oct4-loxP$ en cuyos espermatozoides se ha activado la expresión de *Oct4*. En una segunda generación proveniente del cruzamiento de los ratones $Cre^{TNAP}/Oct4-loxP$ con hembras silvestres, se obtienen embriones en donde el genoma de los espermatozoides $Cre^{TNAP}/Oct4-loxP$ es transmitido a todas las células del nuevo embrión produciéndose así expresión generalizada de *Oct4*. Estos embriones son denominados tg07. **B.** Expresión de *Pax2* en embriones control y embriones con expresión elevada de *Oct4* (tg07). Se muestra la hibridación *in situ* en tres diferentes etapas de desarrollo: 7.5, 8.5 y 9.5 días (Ramos-Mejía *et al.*, 2005). **C.** Expresión de *Gata6* en embriones control y embriones con expresión elevada de *Oct4* (tg07). Se muestra la hibridación *in situ* en tres diferentes etapas de desarrollo: 7.5, 8.5 y 9.5 días (Torres Maldonado *et al.*, 2005).

expresión de *Oct4* en todo el embrión fueron dos: uno llamado Cre^{TNAP} en el que se expresa la recombinasa Cre exclusivamente en las células germinales (Lomeli *et al.*, 2000) y otro (llamado *Oct4-loxP*) que contiene una inserción del gen *Oct4* inactivo, pero cuya expresión es activable por la acción de Cre. En la **figura 1A** se presenta un esquema que ilustra cómo se utilizaron estos ratones para lograr la expresión generalizada de *Oct4* en su progenie. Los embriones en donde se observa incrementada la expresión de *Oct4* se denominaron tgO7 y presentaron diferentes alteraciones fenotípicas severas y morían a mitad de la gestación (día embrionario 13). Entre sus alteraciones se encuentran la cabeza reducida, malformaciones craneofaciales, engrosamiento de la cola, edema, alteración en el número de vértebras y extremidades defectuosas.

Para reconocer cómo afecta la modificación de la expresión de *Oct4* en las diferentes regiones afectadas, nos centramos primero en analizar el efecto de su incremento en la región conocida como *neuroectodermo* que da lugar al sistema nervioso central. Cabe señalar que esta región es la última en perder la expresión de *Oct4* en el ratón normal. Se analizó por hibridación *in situ* la expresión de genes relacionados con el establecimiento de las diferentes regiones del cerebro. Se encontró un efecto sobre la expresión del gen *Pax2*, el cual presenta un aumento muy notorio en sus niveles de expresión en los embriones tgO7 (**figura 1B**). Este aumento resultó de mayor importancia al descubrirse que la secuencia de la región reguladora de *Pax2* presenta un sitio consenso de unión para OCT4 (Pfeffer *et al.*, 2002) y que en el pez cebra, un gen llamado *Pou2*, que es ortólogo o equivalente a *Oct4*, regula la expresión de *Pax2* (Burgess *et al.*, 2002). Como conclusión de este trabajo proponemos que la expresión inicial de *Pax2* en el ratón depende de *Oct4* (Ramos-Mejía *et al.*, 2005).

Por otra parte, se sabe que el mismo gen *Pou2* en pez cebra participa también en la formación de endodermo. Esto quedó demostrado al observarse que mutantes del gen *Pou2*

no se desarrollan por carecer de endodermo. *Pou2* en pez cebra activa la expresión de *Sox17*, el primer gen en la cascada de diferenciación a endodermo (Reim *et al.*, 2004). Por estas observaciones analizamos la influencia de *Oct4* sobre la expresión de diferentes genes marcadores de endodermo en los embriones del ratón tgO7. Entre los marcadores analizados se encontraban *Gata4*, *Gata6*, *Sox17* y *FoxA1*. Observamos que al aumentar la expresión de *Oct4* aumenta la expresión de *Gata6* (**figura 1C**) y *Sox17* en los días embrionarios 8.5 y 9.5 dpc (días *post coitum*). Estos hallazgos sugieren que *Oct4* podría estar regulando estos genes y participando así en la determinación de endodermo antes de apagarse en el epiblasto.

Para demostrar de manera contundente la participación de *Oct4* en la regulación de *Pax2*, *Gata6* y *Sox17 in vivo*, estamos realizando ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina contra OCT4 durante el desarrollo embrionario normal en ratón. A través de estos estudios podremos determinar si en el ratón normal OCT4 se une a las regiones regulatorias de *Pax2* durante la regionalización del cerebro y a *Gata6* y *Sox17* durante la formación del endodermo.

Una mutación que afecta la morfogénesis del espermatozoide

El trabajo que ahora vamos a describir ilustra el uso del sistema *CreLox* para la generación de mutantes con expresión restringida a alguna región específica del embrión. En este caso lo que hicimos fue utilizar el ratón Cre^{TNAP} antes descrito para dirigir la expresión de un gen mutado a las células germinales y gametos de manera exclusiva. El gen que queríamos estudiar se llama *ckit* y codifica para un receptor transmembranal con actividad de tirosín cinasa. La proteína Kit se expresa durante la espermatogénesis en los gametos que aún no han iniciado la meiosis, llamados *espermatogonias*. Además, una proteína más pequeña o truncada llamada *tr-kit*, también codificada por el mismo gen, se expresa en los gametos haploides o espermatidas, es decir, los gametos que ya han termina-

do la meiosis, así como en el espermatozoide maduro. Se sabe que *tr-kit* induce la activación de la fosfolipasa llamada PLCgamma1, aunque se desconoce el papel de la actividad de PLCgamma1 en las espermátidas. Como se verá mas adelante, esta información resulta relevante para el desarrollo de este trabajo.

Por su patrón de expresión, experimentos *in vitro* y observaciones fenotípicas de mutantes naturales, se había propuesto que *kit* tendría diferentes funciones durante el desarrollo de las células germinales y la gametogénesis. Entre otras cosas podía esperarse que la sobreactivación de este gen en las espermatogonias pudiera conducir a una desregulación de la proliferación, quizá acompañada de la formación de tumores. Con el propósito inicial de estudiar el potencial oncogénico de *Kit*, usamos el sistema *creLox* para activar la expresión de la proteína *Kit^{D814Y}* en las células germinales de ratones transgénicos. *Kit^{D814Y}* es una forma mutante de la proteína *Kit*. La mutación que tiene este gen la convierte en un receptor constitutivamente activo; es decir, uno que no necesita a su ligando para funcionar y por lo tanto está funcionando todo el tiempo. Éste es otro ejemplo de una mutación con ganancia de función.

Al caracterizar a los ratones que portaban el gen mutado de manera activa (llamados KDY), observamos que no se producían alteraciones en la proliferación y migración de las células germinales, ni tumores. Sin embargo, había un efecto en la fertilidad de los ratones machos, causando en los casos más severos esterilidad, así como alteraciones significativas en la morfología de los espermatozoides; es decir, deformidades en la forma de su cabeza y flagelo (figura 2A, B). La observación de este fenotipo nos pareció importante, ya que, como se mencionó antes, el gen *kit* dirige la expresión de *tr-kit* en las espermátidas, y por lo tanto decidimos estudiar lo que estaba pasando en estos ratones en la etapa final de la morfogénesis del espermatozoide, llamada *espermiogénesis*.

Para hacer un análisis ultraestructural de las espermátidas y espermatozoides de los ratones mutantes hicimos observaciones en el

microscopio electrónico. Dichas observaciones nos indicaron que el defecto en la morfología del espermatozoide estaba asociado a la deslocalización de una estructura microtubular denominada *manchette*, la cual se forma alrededor del núcleo de las espermátidas elongantes y participa en darle forma a la cabeza del espermatozoide. Por otra parte, mediante inmunohistoquímica demostramos que en ratones silvestres o normales (sin la mutación) PLCgamma1 se fosforila o activa de manera específica durante la elongación de las espermátidas y se localiza subcelularmente en la región a partir de la cual se forma el *manchette* (figura 2C). Estos nos pareció muy significativo cuando además encontramos que los espermatozoides con expresión de *Kit^{D814Y}* presentaban un aumento en la fosforilación de PLCgamma1 en comparación con los espermatozoides del ratón silvestre. La activación de PLCgamma1 durante la elongación de las espermátidas coincidía también con la etapa en la que se expresa *tr-kit*. Todas estas observaciones nos llevaron a proponer que los defectos encontrados en los espermatozoides se debían a la desregulación de la vía de PLCgamma1, y que la activación de esta vía, probablemente mediada por *tr-kit*, participa en la morfogénesis del espermatozoide (Schnabel *et al.*, 2005).

¿Dónde viven los ratones transgénicos?

A principios de 2005 se inauguraron en el Instituto de Biotecnología las nuevas instalaciones del bioterio. Así, contamos ahora con un “bioterio de barrera” que está libre de esporas, virus y bacterias. Las salas se encuentran aisladas, con diferente presión en el interior y en el exterior, lo que no permite la entrada de aire al momento de abrir las puertas. En todas las áreas hay un programa continuo de desinfección y cada sala cuenta además con un sistema de control de temperatura y de filtración de aire. Todo el material es previamente esterilizado antes de ingresar. Dentro de este ambiente controlado se reproducen ratones de alta calidad microbiológica, es decir, libres de patógenos específicos

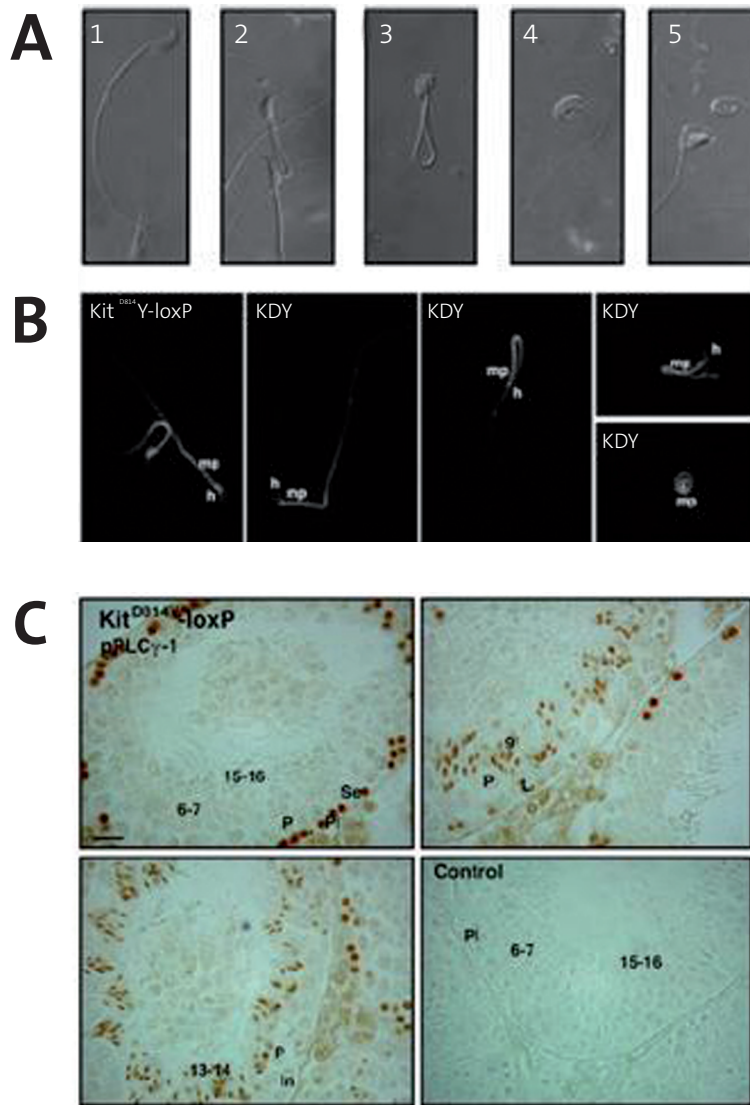


Figura 2.

A. Microscopía de Normansky de los espermatozoides de ratones mutantes (KDY): (1) espermatozoide aparentemente normal, (2) flagelo doblado, (3) flagelo en lazo, (4) flagelo enrollado y con malformación en la cabeza y (5) malformación en la cabeza. **B.** Tinción de actina de espermatozoides del ratón control (Kit^{D814Y-loxP}) y del ratón mutante (KDY). En el mutante no se observa actina en el citoesqueleto posacrosomal en la cabeza del espermatozoide, al compararlo con los espermatozoides normales. mp: pieza media, h: cabeza. **C.** Las células espermatogénicas del ratón KDY (lado derecho) presentan mayor señal de PLCgamma1 fosforilada que las del ratón normal (lado izquierdo). Esto se aprecia más claramente en las espermátidas de los estadios 11 y 12. Pi: espermaticito en preleptoteno, L: espermaticito en leptoteno, P: espermaticitos en paquiteno, los números indican los estadios de la espermiogénesis (Schnabel *et al.*, 2005).

(SPF). Por el momento el bioterio se encarga de la reproducción de las líneas silvestres de consumo. Además, contamos con áreas de cuarentena y áreas para experimentación en las que albergamos a más de veinte líneas de ratones transgénicos.

Para valorar que nuestros ratones estén libres de patógenos específicos, se tiene un programa de centinelas, que son ratones que se encuentran dentro de las diferentes áreas. Periódicamente se sacrifican centinelas con el fin de tomar suero para su posterior análisis. Hasta el momento los resultados han mostrado que nuestros animales están efectivamente libres de los patógenos más comunes. Para poder mantener a nuestras colonias libres de patógenos tenemos que seguir un riguroso procedimiento de ingreso, pasando por una ducha desinfectante, vestir ropa estéril, gorro, cubreboca y botas especiales. Tener colonias de ratones SPF es vital para el trabajo de investigación con ratones transgénicos, por ello también hemos utilizado procedimientos de transferencia embrionaria y estamos implementando la fertilización *in vitro* para introducir nuevas colonias transgénicas con calidad garantizada. Además, para poder albergar un número ilimitado de líneas transgénicas, estamos implementando metodologías de congelamiento de esperma. Estas condiciones harán posible, en el corto plazo, la creación de una unidad de ratones transgénicos en nuestro instituto.

Comentarios finales

Es claro que el futuro del ratón como organismo modelo es virtualmente ilimitado y que su genoma será exhaustivamente explorado en los próximos años. Además de contar ahora con su secuencia genómica completa, mediante la informática se han obtenido logros de la mayor relevancia. Así, por ejemplo, se han desarrolla-

do un sin número de programas de predicción, se han generado múltiples bases de datos en las que se colecta y organiza información de diversos tipos, tales como la descripción de fenotipos, las mutaciones existentes, los patrones de expresión de una variedad de genes del desarrollo, etc. Así mismo, se encuentran disponibles en la red atlas que permiten visualizar de manera tridimensional al embrión de ratón en todas sus etapas. Por otra parte, los esfuerzos colectivos, como el del “Knockout mouse project” predicen que en el corto plazo se podrá tener acceso a cualquier mutación imaginable. En lo experimental, si bien la mayor parte del trabajo seguirá dependiendo del uso de las células ES, cabe mencionar que, al igual que “Dolly”, el ratón también puede ser clonado exitosamente a partir de células somáticas, lo que hace posible la creación de mutaciones somáticas.

En México hemos logrado establecer algunas de las tecnologías que permiten manipular el genoma de ratón y hemos aprendido a hacer estudios fenotípicos de algunas mutantes. Sin embargo, es importante mencionar que no ha habido una participación muy numerosa de la comunidad científica mexicana en esta área, de manera que hemos muy pocos grupos en el país trabajando en genética del desarrollo del ratón. Las razones de ello podrían ser, entre otras, que los proyectos de mutagénesis en ratón son de alto costo y de muy largo plazo, o quizás que el manejo de las técnicas de manipulación genómica requieren de entrenamientos largos y mucha habilidad manual. También es probable que no hayamos divulgado suficientemente la importancia de este modelo. Sin duda sería deseable que más grupos de investigación se interesaran en este importante campo del conocimiento y creemos que en el Instituto de Biotecnología tenemos las condiciones adecuadas para trabajar en ello. ●

Bibliografía

- Austin, C. P. *et al.*, "The knockout mouse project", en *Nat. Genet.*, vol. 36, 2004.
- Boyer, L. *et al.*, "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells", en *Cell*, vol. 122, 2005.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards y R. Agami, R., "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells", en *Science*, vol. 296, 2002.
- Burgess, S. *et al.*, "The zebrafish spiel-onhe-grenzen (*spg*) gene encodes the POU domain protein *Pou2* related to mammalian *Oct4* and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis", en *Development*, vol. 129, 2002.
- Guénet, J. L. y F. Bonhomme, *The Laboratory Mouse*, Londres, Elsevier Academic Press, 2004.
- Kunath, T., "Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype", en *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, 2003.
- _____, "Transgenic RNA interference to investigate gene function in the mouse", sometido, 2006.
- Lickert, H. *et al.*, "Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodeling complexes in heart development", en *Nature*, vol. 432, 2004.
- Lomelí, H. *et al.*, "Targeted insertion of Cre recombinase into the TNAP gene: excision in primordial germ cells", en *Genesis*, núm. 26, 2000.
- Nagy, A. *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual* (3a. ed), Nueva York, CSH Press, 2003.
- Nichols, J. *et al.*, "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor *Oct-4*", en *Cell*, vol. 95, 1998.
- Niwa, H., J. Miyazaki y A. Smith, "Quantitative expression of *Oct-3/4* defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells", en *Nat. Genet.*, vol. 24, 2000.
- Okamoto, K. *et al.*, "A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in the mouse embryonic cells", en *Cell*, vol. 60, 1990.
- Pfeffer, P.L. *et al.*, "The activation and maintenance of *Pax2* expression at the mid-hindbrain boundary is controlled by separate enhancers", en *Development*, vol. 129, 2002.
- Ramos Mejía, V. *et al.*, "Phenotypic analyses of mouse embryos with ubiquitous expression of Oct4: effects on mid-hindbrain patterning and gene expression" en *Dev. Dyn.*, núm. 232, 2005.
- Reim, G. *et al.*, "The PUO domain protein Spg (*Pou2/Oct4*) is essential for endoderm formation in cooperation with the HMG domain protein Casanova", en *Developmental Cell*, vol. 6, 2004.
- Schnabel, D. *et al.*, "Ectopic expression of KitD814Y in spermatids of transgenic mice, interferes with sperm morphogenesis", en *Dev. Dyn.*, núm. 233, 2005.
- Shimozaki, K. *et al.*, "Involvement of *Oct3/4* in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures", en *Development*, vol. 130, 2003.
- Torres Maldonado, L., V. Ramos Mejía y H. Lomelí Buyoli, "Efecto de la sobreexpresión de *Oct4* en el desarrollo del endodermo en ratón", VII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo, A.C., México, 2005.
- Yeom, Y. *et al.*, "Germline regulatory element of *Oct-4* specific for the totipotent cycle of embryonal cells", en *Development*, vol. 122, 1996.

