

Capítulo 6.

Estandarización genética, transgenización y clonación

RAFAEL JIMÉNEZ MEDINA

Departamento de Genética

Facultad de Ciencias

Universidad de Granada

POBLACIONES NATURALES Y DE LABORATORIO

Elementos de genética de poblaciones

Frecuencias génicas y genotípicas

EFFECTOS DE LA SELECCIÓN, CONSANGUINIDAD, DERIVA GENÉTICA Y VARIABILIDAD GENÉTICA

Selección

Consanguinidad

Deriva genética

ESTANDARIZACIÓN GENÉTICA

Animales monocigóticos

Líneas consanguíneas

Híbridos F1

Líneas coisogénicas

Líneas congénicas

Líneas consanguíneas recombinantes.

Líneas no consanguíneas

TRANSGENIZACIÓN Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

CLONACION (METODOLOGÍA BÁSICA Y RESULTADOS ACTUALES)

CONTROL DE LA PUREZA GENÉTICA

Polimorfismo bioquímico

Osteometría

Histocompatibilidad tisular

Polimorfismo en la secuencia del ADN

Otros métodos

PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN GENÉTICA (CRIOPRESERVACIÓN Y MANEJO ADECUADO)

RESUMEN

BIBLIOGRAFÍA

Considerado como un “reactivo biológico” empleado en investigación, el animal de laboratorio debe ofrecer un nivel de calidad al menos similar al del resto de componentes empleados en esta actividad. La calidad de un animal de laboratorio viene determinada por sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas o de cualquier otra índole que definen su fenotipo, y éste es el resultado de la interacción entre su genotipo y el ambiente. Por tanto, dado que el ambiente de los animalarios es muy homogéneo por estar rigurosamente controlado, las características de un animal de laboratorio derivan principalmente de su patrimonio genético. En consecuencia, el control y la preservación de la calidad genética del animal de laboratorio deben ser prioritarios.

Desde principios del siglo XX, cuando se establecieron las primeras colonias de ratones en cautividad, derivadas de la especie *Mus musculus domesticus*, se han desarrollado centenares de cepas o líneas, muchas de las cuales son ya muy diferentes de los primitivos ratones silvestres (Figura 6-1). En la mayoría de los casos el proceso de cambio ha sido dirigido por los criadores, que de esta manera han conseguido obtener animales nuevos que nunca antes generó la naturaleza y que probablemente nunca los habría generado. Podemos decir por tanto que ha sido posible inducir un proceso de “evolución artificial” dirigida hacia la “fabricación” de animales con las características biológicas deseadas. En realidad, esto no es nuevo y viene haciéndose desde la Prehistoria, cuando los humanos comenzaron a domesticar animales y plantas para su uso particular (ganadería y agricultura).

En términos biológicos, la evolución consiste en el cambio en la estructura genética de las poblaciones, de acuerdo con una serie de reglas que se encarga de estudiar la Genética de Poblaciones. Por esta razón, una persona dedicada al mejoramiento animal necesita tener una serie de conocimientos básicos sobre Genética de Poblaciones. Solo así podrá prever los efectos que, sobre su población de animales de laboratorio, puede tener su actuación a la hora de diseñar los cruzamientos o seleccionar los progenitores de cada generación.



Figura 6-1. Diferentes tipos de cepas de ratón obtenidas por sistema de cruce homocigótico y heterocigótico. De izquierda a derecha desnudos, (Swiss, nu/nu), cepa Swiss OF1 y cepa C57BL/6. Foto cortesía de CRIFFA, España

POBLACIONES NATURALES Y DE LABORATORIO

Elementos de genética de poblaciones

Una población o colonia de animales de laboratorio es aquella constituida por animales que se reproducen entre sí por vivir dentro de límites de espacio reducido y bien definido y que, además, y precisamente por esta causa, mantienen en común un cierto grado de parentesco o relación genética, ya sea de especie, subespecie, raza, variedad, cepa, línea o familia.

Por otra parte, una población natural es un conjunto o comunidad de individuos de una misma especie que conviven en un mismo lugar geográfico y que, por tanto, se reproducen libremente.

A primera vista, no parecen existir grandes diferencias entre ambos tipos de poblaciones, aunque lo cierto es que son radicalmente distintas por varias causas principales, entre las cuales, la más importante es el tipo de selección de los individuos de cada generación que se reproducen para obtener la siguiente.

Mientras que en las poblaciones naturales actúa la selección natural, que se manifiesta a través del medio ambiente en que vive la población, en un animalario actúa casi exclusivamente la selección artificial que ejerce el hombre, es decir, en cada generación es el criador quien decide qué individuos deberán cruzarse para originar la siguiente generación, y transmitirán por tanto su información genética a la misma. El resto de los individuos podemos decir que ya nacen muertos desde el punto de vista genético.

En cualquier caso, el hecho de que haya una selección implica obviamente, que en cada generación se producirá un cambio en el patrimonio genético, puesto que algunos genotipos son favorecidos con respecto a otros. Habrá por tanto un cambio en las frecuencias genotípicas y en las frecuencias génicas de la población.

Frecuencias génicas y genotípicas

Se entiende por frecuencia génica (o alélica) a la proporción (generalmente expresada en tantos por uno) en que se encuentra un determinado alelo de un gen en una población concreta, respecto del total de alelos de ese gen que existe en la población.

De esta forma, si llamamos p a la frecuencia del alelo "A" (dominante), $1 - p = q$ será la frecuencia del alelo "a" (recesivo), es decir, $p + q = 1$.

Análogamente, las frecuencias genotípicas serían las de cada genotipo en la población. Así, si d es la frecuencia del genotipo "AA" (homocigoto dominante), h es la frecuencia de "Aa" (heterocigoto) y r es la de "aa" (homocigoto recesivo), entonces tendremos que $d + h + r = 1$.

Estas dos expresiones son válidas siempre y en cualquier población, ya sea natural o de laboratorio. La ley de Hardy-Weinberg (Figura 6-2) da cuenta, desde un punto de vista teórico, de las relaciones que existen entre las frecuencias génicas y las genotípicas en una población "panmítica", es decir, una población ideal de gran tamaño (elevado número de individuos), que no está sometida a fenómenos de migración, mutación o selección, en la que los cruces se producen al azar. En tales condiciones, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación, o dicho en otras palabras, la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

En efecto, si consideramos en una población los alelos "A" y "a" de un gen dado, existirá una frecuencia p del alelo "A" y una frecuencia q del alelo "a". Si el apareamiento se produce al azar, ambos alelos, que se encontrarán representados con las mismas frecuencias en el conjunto de gametos de la población, podrán combinarse al azar entre sí para dar la siguiente generación. En este caso, las frecuencias de las distintas combinaciones genotípicas serán las expresadas en el cuadro de la Figura 6-2, y las frecuencias genotípicas serán: p^2 para AA, $2pq$ para Aa y q^2 para aa, donde por supuesto se mantendrán las condiciones antes mencionadas de $p + q = 1$ y que $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

Lógicamente, es bastante problemático que en una población real se den tantas circunstancias favorables, en cuyo caso se originarán desviaciones en uno y otro sentido, traducidas por la aparición de unos u otros caracteres, modificándose la proporcionalidad antes señalada y, por tanto, los valores medios establecidos.

♂ GAMETOS	(p) A	(q) a
♀ (p) A	p AA	pq Aa
(q) a	pq Aa	q aa

Figura 6-2. Ley de Hardy-Weinberg. Cuando se cruzan entre sí al azar los gametos de una población en que las frecuencias alélicas (gaméticas) son p para A y q para a , las frecuencias genotípicas de la siguiente generación vendrán dadas por éstas, según las expresiones: p^2 para AA , $2pq$ para Aa y q^2 para aa . Tales frecuencias alélicas y genotípicas permanecerán invariables de generación en generación si no hay factores evolutivos que tiendan a cambiarlas

EFFECTOS DE SELECCIÓN, CONSANGUINIDAD, DERIVA GENÉTICA Y VARIABILIDAD GENÉTICA

La ley de Hardy-Weinberg no se aplica, por definición, más que a poblaciones de efecto ilimitado, en las cuales los apareamientos se realizan al azar. Sin embargo, en la realidad este tipo de población es muy raro y, desde luego, difícilmente aplicable a los roedores, en los que las poblaciones son relativamente pequeñas y los acoplamientos están mediatizados por factores de atractivo respecto a unos congéneres y repulsión respecto a otros.

Esto es aún más acusado en el caso de los roedores de laboratorio por multitud de razones: los apareamientos, por ejemplo, son siempre decididos por el criador en función de un protocolo más o menos rígido y el número de progenitores es siempre muy limitado.

Por tanto, existen determinados factores que afectan grandemente la composición genética de las poblaciones de laboratorio, tales como la selección, la consanguinidad y la deriva genética.

Selección

Consiste en la elección, según sus características, de los animales de una generación para reproducirse y dar lugar a la siguiente. En zootecnia, esta elección se hace de acuerdo a un programa que tenga en cuenta los siguientes objetivos: fijar un rasgo determinado, alterar el promedio de expresión de un carácter en la colonia y mantener una adecuada tasa de reproducción.

No obstante, los efectos de la selección dependen del nivel de variación genética existente en la población, de manera que los resultados serían nulos si dicha variación también lo fuera (no sería posible seleccionar nada si todos los individuos son iguales). Por tanto, en muchas ocasiones es conveniente hacer una estimación previa de las posibilidades de éxito de un proyecto de selección. Para ello es preciso calcular el grado de "heredabilidad" del carácter a seleccionar en la población. Puesto que el grado de expresión de un carácter cuantitativo (también llamado valor fenotípico) depende del genotipo y del ambiente, la heredabilidad se define como la proporción de la variación fenotípica total de ese carácter que es debida a diferencias genéticas entre los individuos de la

población. Así, en un proceso de selección, la heredabilidad se puede cuantificar como $H = G / D$, donde H es la heredabilidad del carácter, G es la ganancia de selección (diferencia entre el valor fenotípico medio de la generación filial y el de la población original), y D es el diferencial de selección (diferencia entre el valor fenotípico promedio del grupo de progenitores seleccionados y el de la población original).

Los métodos de selección más utilizados son los siguientes:

- (a) *Selección genotípica o individual*. Se basa sólo en los valores individuales de cada animal. Los individuos que expresan los caracteres más extremos se seleccionan y cruzan entre sí. Es el método más simple.
- (b) *Selección familiar*. Las familias se seleccionan como unidades. El valor de cada familia es el resultado del promedio de todos los miembros que la componen. Las familias que expresan los valores más altos se seleccionan íntegras.
- (c) *Selección interfamiliar*. De cada familia se seleccionan los individuos que tienen el mejor comportamiento o expresión del carácter se seleccionan de cada familia, sin tener en cuenta el promedio de la misma.

Existen una serie de factores que limitan la selección. Entre ellos están la baja fertilidad, que puede ponerse de manifiesto cuando intentamos seleccionar un carácter limitante, y la pérdida de la variación genética, que se manifiesta muy significativamente en las cepas consanguíneas.

Consanguinidad

Se dice que un animal es consanguíneo cuando sus progenitores tienen parentesco familiar entre sí, compartiendo uno o varios antecesores comunes. La consanguinidad reduce la heterocigosis y, por consiguiente, aumenta la homocigosis. El número de *loci* homocigotos aumenta y la variabilidad genética decrece, tendiendo los animales a hacerse más homogéneos fenotípicamente. Al cabo de 20 generaciones de apareamientos hermano x hermana, los heterocigotos habrán desaparecido casi por completo (Figura 6-3).

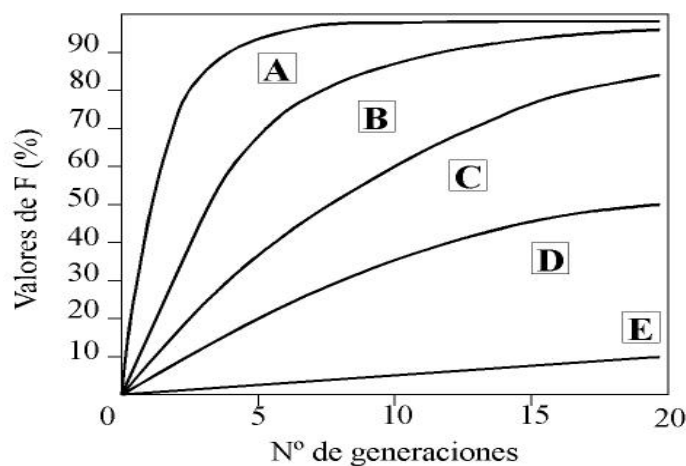


Figura 6-3. Efectos que los distintos sistemas de apareamiento tienen sobre el ritmo de aumento del coeficiente de consanguinidad (F). Mientras que el cruce al azar en poblaciones grandes garantiza un crecimiento muy lento de la consanguinidad (curva E), los cruces hermano por hermana (curva B) provocan incrementos rápidos del coeficiente de consanguinidad y, por tanto, de la homocigosis. Al cabo de 20 generaciones, éste alcanza valores cercanos al 99%. Curva A: autofecundación en organismos hermafroditas; Curva C: cruce entre primos hermanos; Curva D: cruce entre primos segundos

La reducción de la heterocigosis se expresa con el coeficiente de consanguinidad (F), que mide la disminución del número de *loci* heterocigotos después de varias generaciones consanguíneas, tomando como base la población de la cual proviene dicha línea consanguínea. La fijación de genes en homocigosis se hace muy rápidamente por consanguinidad, siendo necesarias muy pocas generaciones para obtener un grado de homocigosis elevado.

La **depresión por consanguinidad** es una de las consecuencias negativas de la consanguinidad. Se manifiesta por ejemplo cuando se deriva una línea consanguínea de otra que no lo es, mediante la aparición de un descenso en la aptitud biológica de la cepa (fertilidad, ritmo de crecimiento, viabilidad, etc.). Este fenómeno se debe a razones tales como la pérdida de combinaciones alélicas favorecidas por la selección natural, o la acumulación de alelos recesivos deletéreos, que en estado homocigoto se expresan libremente, lo cual no ocurre en heterocigosis.

Deriva genética

En realidad, los individuos que componen una generación no representan más que una muestra de la totalidad de descendientes posibles de la generación parental, y este fenómeno está controlado únicamente por el azar. Esto hace que las frecuencias génicas puedan variar considerablemente de generación en generación, debido al error de muestreo, fenómeno que será tanto más intenso cuanto menor sea la muestra de reproductores tomada para dar lugar a la siguiente generación.

A este movimiento aleatorio que modifica la frecuencia de un alelo se le llama deriva genética, y puede llegar fácilmente a fijar uno de los alelos y eliminar el otro, perdiéndose así toda posibilidad de polimorfismo.

Este efecto de la deriva genética es mucho más acusado en las poblaciones de laboratorio, donde sólo unos pocos individuos de cada generación serán seleccionados para producir la siguiente. En estas condiciones, puede perderse un alelo y fijarse el alternativo al azar en una sola generación.

Como hemos visto, la selección tiende a fijar determinados caracteres con expresión fenotípica apreciable, la consanguinidad reduce considerable y rápidamente la heterocigosis y por consiguiente la variabilidad genética de una población, y la deriva genética puede modificar drásticamente las frecuencias alélicas al azar. Por tanto, estos agentes evolutivos actúan fuertemente sobre las poblaciones de laboratorio, que pueden sufrir cambios rápidos en su estructura genética. El resultado es que al cabo de unas pocas generaciones dichas poblaciones son radicalmente diferentes de la población original. Sin embargo, estas alteraciones escapan muchas veces del control humano, por lo que es necesario tomar medidas para prevenir los cambios genéticos en las poblaciones de laboratorio.

ESTANDARIZACIÓN GENÉTICA

La experimentación científica basada en el uso de animales de laboratorio necesita que éstos cumplan una serie de requisitos que permitan la reproducción de los resultados. A igualdad de condiciones ambientales, la variación observada en tales resultados es principalmente debida al patrimonio genético de los animales empleados. Para dar respuesta a estas exigencias se han desarrollado diferentes tipos de animales de laboratorio (véase Figura 6-1). Determinados experimentos requieren una población uniforme de animales, que no presenten diferencias genéticas entre ellos, para lo que se usan cepas o líneas consanguíneas. Otras veces hace falta que tales animales presenten algún rasgo fenotípico o genotípico concreto, para lo que se usan líneas coisogénicas, líneas congénicas o líneas transgénicas. Existen también experimentos que requieren el uso de lotes de animales genéticamente diferentes: líneas no consanguíneas. En aquellos casos en los cuales las diferencias genéticas se muevan dentro de un rango de variación controlado y predecible los híbridos F1 y las líneas congénicas recombinantes pueden dar una respuesta adecuada. En cualquier caso, disponemos en la actualidad de un arsenal de poblaciones de laboratorio cuyo patrimonio genético está

perfectamente estandarizado, y es por tanto, capaz de satisfacer la mayor parte de los requerimientos de la investigación biológica. Existe un índice internacional de animales de laboratorio, que periódicamente se encarga de actualizar M.F.W. Festing de la Universidad de Leicester. Esta importante obra reúne un compendio de todos los tipos de animales de laboratorio existentes, clasificados según su origen genético (véanse también páginas web en Anexo II).

Animales monocigóticos.

La uniformidad fenotípica requerida en muchos experimentos sólo es posible si existe uniformidad genotípica. La naturaleza proporciona algunos ejemplos de animales genéticamente idénticos: son los gemelos univitelinos o monocigóticos. Los componentes de una misma camada son generalmente diferentes desde el punto de vista genético pues cada uno de ellos proviene de la fusión de un óvulo y un espermatozoide y, en animales no consanguíneos, cada gameto lleva una combinación alélica distinta, fruto de los procesos de segregación y recombinación. Sin embargo, los gemelos monocigóticos se originan por la escisión de un único cigoto y el posterior desarrollo independiente de cada una de las células hijas resultantes. Esto es posible gracias a la totipotencia (capacidad para generar un organismo completo) que mantienen las células derivadas del cigoto durante varias rondas de división mitótica.

Sin embargo, los casos de monocigosis producidos de forma natural son muy escasos y, por tanto, su potencial uso en investigación es muy reducido actualmente. Este fenómeno se produce con cierta frecuencia en el ganado bovino y ovino, aunque de forma impredecible. Existe no obstante una excepción, el armadillo de nueve bandas (*Dasipus novemcinctus*), que invariablemente produce camadas de cuatro gemelos monocigóticos.

En estos momentos se están desarrollando técnicas destinadas a la producción de animales monocigóticos. Básicamente, se trata de la manipulación directa de embriones en los primeros estadios de desarrollo. Mediante la escisión mecánica de las células embrionarias aún totipotentes se puede reproducir de manera artificial el proceso natural por el que se producen los gemelos monocigóticos. Las células totipotenciales aisladas generan un organismo completo cuando son transferidas al útero de una hembra gestante. Por otra parte, se está avanzando en el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* de células totipotentes, lo que podría permitir la producción masiva de animales monocigóticos en el futuro.

Líneas consanguíneas

En el caso del ratón de laboratorio, se llaman líneas consanguíneas a las producidas, generalmente a partir de la subespecie salvaje *Mus musculus domesticus*, mediante un proceso de consanguinidad por cruces hermano x hermana no inferior a 20 generaciones. Al cabo de este tiempo, el grado de homocigosis es tal que afecta prácticamente a la totalidad de los genes. En consecuencia, todos los individuos de la línea resultan ser genéticamente idénticos.

En la actualidad, existen alrededor de un millar de líneas consanguíneas de ratones bien establecidas, algunas de las cuales se mantienen desde principios de siglo. El hecho de ser consanguíneas les confiere una serie de características generales comunes a todas ellas. Una de las más significativas es la isogenicidad. Esto significa que los animales presentan más del 99% de los loci idénticos, o sea que poseen el mismo genotipo en un locus determinado. Como resultado de esto todos los individuos de una misma cepa son histocompatibles y por lo tanto pueden utilizarse para estudios inmunológicos, de trasplante de tumores, de injertos, etc. Otra característica es la homocigosidad en más del 99% de los loci los cuales fueron segregados desde la población parental. Son cepas genéticamente estables en el tiempo: no cambian como consecuencia de la selección, de la endocría o de la deriva génica. Pueden sufrir cambios por mutaciones, pero estos son mucho más lentos, y para evitarlos se recomienda realizar controles periódicos. La uniformidad fenotípica de estos animales,

derivada de la genotípica, a su vez es fruto del proceso genético de consanguinidad y se a distintos niveles de interés en relación con la investigación.

Por otra parte, el hecho de que en cada línea consanguínea se fija al azar uno de los alelos de todos y cada uno de los genes, hace que todas ellas sean únicas en cuanto a sus características genéticas. Esta individualidad permite definir muy precisamente los parámetros que definen a cada línea. De aquí se deduce la necesidad de establecer unas normas de nomenclatura que adjudiquen un nombre concreto y universal a cada línea consanguínea. Según el comité internacional establecido al efecto (*“Committee on Standardized Nomenclature for Inbred Strains of Mice”*), las líneas consanguíneas genéticamente definidas deben denominarse por un código de una a cuatro letras mayúsculas (ejemplos: BALB, A, DBA, RF), aunque algunos nombres impuestos y generalizados antes de la implantación de esta norma siguen manteniéndose (ejemplos: C57BL, 129, C3H). Se considera una *subcepa* a la línea consanguínea derivada de otra original entre las generaciones 8 y 19 de cruces consanguíneos, y que no se ha cruzado con ella durante al menos 12 generaciones. También se consideran subcepas las líneas transferidas a un laboratorio diferente al de referencia, o aquellas en las que se ha detectado un cambio apreciable con la original. Se denominan con el nombre de la cepa original seguido por una barra y algún símbolo identificativo (ejemplos: C57BL/6, C57BL/6J, DBA/2).

Además de las ventajas que tienen las líneas consanguíneas derivadas de su uniformidad, muchas de ellas son especialmente apreciadas por sus características particulares. Así, la cepa AKR desarrolla leucemias de tipo linfóide y la cepa CBA es especialmente resistente a la inducción del cáncer. En general, muchas de estas cepas constituyen inmejorables modelos animales de enfermedades humanas de distinta etiología: genética, infecciosa, degenerativa

A pesar del elevado número de líneas consanguíneas disponibles, su variedad es del todo insuficiente para satisfacer los requerimientos de la investigación actual. Existen características tales como la agresividad, fertilidad, docilidad y el mismo instinto maternal, que siendo interesantes en toda línea consanguínea, son no obstante muy variables de unas a otras, aunque indudablemente tienen un origen determinado genéticamente. Estos caracteres son difíciles de estudiar mediante los análisis genéticos clásicos de la herencia mendeliana puesto que, en la mayoría de los casos, el determinismo genético de las mismas es polifactorial y complejo (herencia cuantitativa) y a veces varios caracteres tienen un origen genético común e interconectado (pleiotropía). Así, por ejemplo, se supone que son más de 30 genes los implicados en los procesos de histocompatibilidad, responsables del rechazo de injertos de piel de una línea a otra. Además, su expresión puede variar según el sexo, la edad o el estado sanitario del individuo.

Para intentar salvar todos estos inconvenientes, los genetistas de mamíferos han desarrollado dos nuevas categorías de animales de laboratorio: las líneas congénicas y las líneas consanguíneas recombinantes, que veremos más adelante.

Híbridos F1

Se denominan híbridos F1 a los descendientes de un cruce entre dos líneas consanguíneas diferentes. Por tanto, presentarán la máxima heterocigosis, pues serán heterocigotos para todos aquellos loci en que diferían las dos líneas cruzadas. Esto hace aparecer el denominado vigor híbrido que, al contrario que la depresión por consanguinidad, provoca una exacerbación de la aptitud biológica de los individuos. Se manifiesta por unas mayores tasas de crecimiento y reproducción, una mayor longevidad y resistencia a las enfermedades y tratamientos con drogas, y camadas más numerosas. Sin embargo, los híbridos F1 mantienen muchas de las cualidades de las líneas consanguíneas. Son uniformes tanto en genotipo (heterocigosis definida) como en fenotipo y, a consecuencia de ello presentan el mismo grado de isogenicidad que las líneas consanguíneas. Por estas

razones, los híbridos F1 son muy apropiados para la investigación biomédica y en estudios sobre el poder carcinogénico y teratogénico de sustancias y otros agentes químicos o físicos.

Líneas coisogénicas

En una población consanguínea pueden aparecer, y de hecho aparecen, gametos portadores de mutaciones susceptibles de ser heredados. Si tales mutaciones no afectan ni a la viabilidad ni a la fertilidad del nuevo individuo, se pueden conseguir, a partir de ellas, nuevas líneas que sólo difieren de la original en una sola mutación. Estas líneas se denominan líneas consanguíneas mutantes, y al conjunto de las dos líneas (original y mutante), se les llamaría líneas coisogénicas.

Este tipo de líneas es de gran interés para los estudios genéticos, siendo bien conocidas por ejemplo las líneas mutantes de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Existen también numerosas líneas coisogénicas de ratón, que son muy interesantes pues permiten investigar el determinismo genético de determinados caracteres biológicos. Estas líneas se denominan con el nombre completo de la cepa original y la subcepa coisogénica, seguidos de un guión y un símbolo indicativo del gen mutante. Por ejemplo, la línea *A/J-lgh* es una cepa coisogénica derivada de la subcepa J de la cepa A, mutante para el gen “long hair” (pelo largo), de utilidad en la investigación del desarrollo y las características del pelo en mamíferos.

Sin embargo, las líneas coisogénicas presentan diferentes inconvenientes graves:

- a) Su obtención raramente puede ser dirigida, y siempre depende de la ocurrencia de un fenómeno tan poco frecuente como una mutación.
- b) Los efectos de las mutaciones son a menudo discretos y por consiguiente no trascienden al nivel fenotípico.

Líneas congénicas

Una línea congénica es una línea consanguínea que deriva de otra, establecida gracias a un sistema de apareamientos particular y que difiere de ella en un solo carácter (o en un número muy pequeño de ellos). Consiste en reemplazar en una línea consanguínea dada el alelo original *a*, por ejemplo, por otro *b*, de otra línea diferente, mediante el uso de sistemas de apareamiento adecuados. Para comenzar se obtiene un híbrido de primera generación entre ambas líneas, tras lo cual se inicia una serie de cruces retrógrados (con una de las líneas parentales), que se dirigen en uno u otro sentido según que el carácter en cuestión se manifieste como dominante, recesivo o codominante. Tras un número de generaciones de retrocruzamiento estimado suficiente (generalmente superior a 8), se procede a la puesta en estado homocigoto del carácter en cuestión, mediante cruces consanguíneos, tras lo cual, la línea congénica se puede considerar establecida. Esta operación puede realizarse con tantos alelos como se desee de un mismo locus, o de *loci* diferentes. (Figura 6-4).

Los alelos recesivos no se pueden detectar en los individuos heterocigotos, lo cual dificulta el proceso. En ciertos casos favorables, existe cerca del locus que nos interesa, un marcador genético fácilmente reconocible que se hereda ligado, dada su gran proximidad espacial en el cromosoma, lo cual facilita grandemente su selección. Sin embargo, en la mayoría de los casos, esto no ocurre, por lo cual, tras cada generación hace falta realizar un cruce de prueba (con el homocigoto recesivo) para identificar la presencia del alelo que nos interese y poder elegir los animales aptos para producir la siguiente generación.

Las líneas congénicas presentan una gran ventaja respecto a las líneas consanguíneas mutantes (coisogénicas), y es que pueden ser establecidas de forma dirigida para todos los alelos de todos los loci, sea cual sea la línea consanguínea original que se escoja.

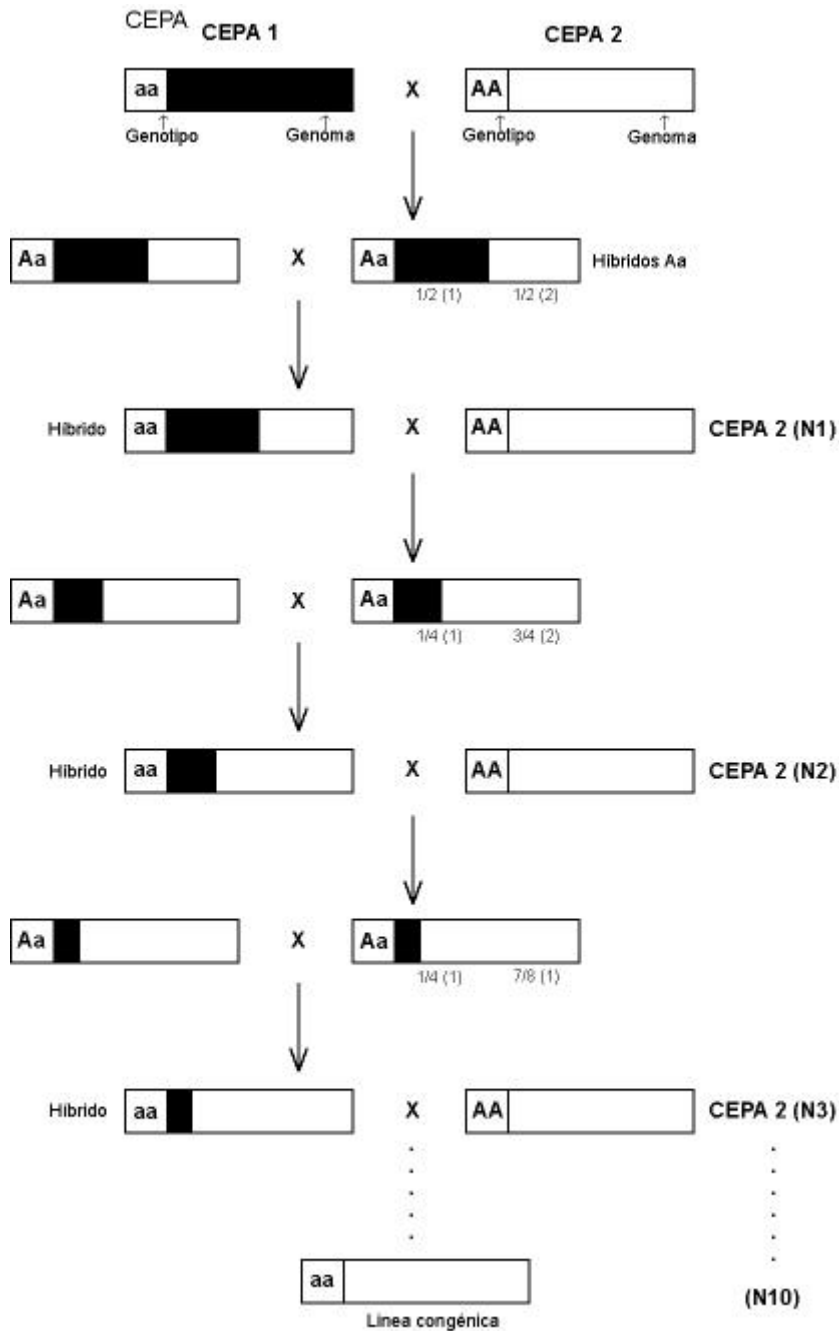


Figura 6-4. Sistema de retrocruzamientos y cruzamientos entre híbridos usado para generar una cepa congénica. En cada generación obtenida por retrocruzamiento (N1...N10) entre las cepas 1 (*aa*) y 2 (*AA*), los híbridos tienen la mitad de genes procedentes de la cepa 1 (parte rellena de la barra que representa el genoma) que en la generación anterior y son heterocigotos *Aa*. El alelo *a* que se pone en homocigosis en cada cruce posterior entre híbridos heterocigotos *Aa*. Tras un mínimo de 10 generaciones de retrocruzamientos (N10) los híbridos heterocigotos *Aa* tendrán un genoma casi exclusivamente originario de la cepa 2, excepto el alelo *a* procedente de la cepa 1. Cuando éste alelo *a* se disponga en homocigosis tras el último cruce entre heterocigotos, se habrá obtenido una cepa congénica con el genoma de la cepa 2 y el alelo *a* de la cepa 1, que se mantendrá por cruces consanguíneos.

Por otra parte, las líneas congénicas representan, desde el punto de vista genético, sólo una aproximación a la solución del problema de la coisogenicidad, dado el sistema de acoplamiento que se usa para producirlas. Por lo tanto, se caracterizan por un cierto grado de contaminación genética de vecindad que se debe al mecanismo por el que se lleva a cabo la transferencia de un gen desde una cepa a la otra, es decir, mediante la transmisión física por recombinación de trozos cromosómicos, que muy difícilmente implicarán a un único gen aislado.

Las líneas congénicas han sido y son de gran utilidad en el estudio de los procesos de histocompatibilidad. Así, se han podido aislar bajo la forma de líneas congénicas, más de 30 loci relacionados con estos procesos, las cuales son muy útiles para preparar antisueros contra cada uno de los antígenos de superficie implicados en el rechazo de trasplantes. Por otro lado, comparando varias líneas congénicas de una misma línea de base para un cierto comportamiento, como la sensibilidad a un determinado virus o la susceptibilidad a una infección parasitaria concreta, se puede conocer mejor el papel de los antígenos de superficie y comprender su significado biológico.

Las cepas congénicas se denominan siguiendo un código de nomenclatura similar al de las cepas coisogénicas. Se utiliza un símbolo compuesto por la denominación de la cepa hospedadora (en la que se ha introducido el nuevo gen), separada por un punto de la denominación de la cepa donadora (de la que se ha derivado el gen transferido), y seguido por un guión y el símbolo de dicho gen y/o alelo. Por ejemplo la línea congénica B10.129-*H12^b* contiene el gen *H12^b* de la línea 129, transferido al genoma de la línea B10. En ciertas ocasiones se utilizan abreviaturas de los nombres de las cepas y en otras no se siguen las reglas descritas por razones históricas.

Las líneas congénicas se utilizan principalmente en estudios sobre el control genético de los procesos de histocompatibilidad tisular (rechazo de trasplante).

Líneas consanguíneas recombinantes

Las líneas consanguíneas recombinantes (conocidas por las siglas RIS, del inglés *Recombinant Inbred Strains*) poseen un genoma que resulta del barajamiento de los genes de dos líneas consanguíneas parentales. Para ello, un grupo de individuos híbridos de primera generación (F1) entre dos líneas consanguíneas no emparentadas, se someten a un sistema de apareamientos consanguíneos hermano x hermana no inferior a 20 generaciones. La F1 representa el grado máximo de heterocigosidad pues llevan la mitad del genoma de cada parental y, por tanto, serán heterocigotos para todos los genes en que diferían las cepas parentales (también llamadas progenitoras). Durante el proceso de consanguinidad, en cada locus se fijará "al azar" un determinado alelo, que podrá ser diferente en cada una de las líneas que se están estableciendo. Al final del proceso, se habrán creado artificialmente varias nuevas líneas consanguíneas en las que, para cada locus concreto, se habrá fijado el alelo de un parental o el del otro. Si las líneas parentales son A y B, las diferentes líneas recombinantes así obtenidas se designarán entonces como AXB-1, AXB-2, AXB-3,..., AXB-n. En la nomenclatura de las líneas consanguíneas recombinantes se suelen utilizar abreviaturas de los nombres de las cepas progenitoras utilizadas. Así, las líneas recombinantes AKXL-1....-n derivan de las líneas AKR y C57L.

Además de las ventajas propias de toda línea consanguínea, las líneas recombinantes son de gran interés en determinados tipos de investigaciones. Así, permiten la detección de ligamiento genético, la detección de nuevas características determinadas genéticamente o el estudio del determinismo genético de ciertos caracteres biológicos.

Líneas no consanguíneas

Determinados experimentos no precisan el uso de animales consanguíneos para su realización. Para otros incluso es más conveniente el uso de animales no consanguíneos. Es el caso de los estudios

toxicológicos, en los que es preferible emplear animales genéticamente no idénticos, pues así se simula mejor la situada en las poblaciones humanas. Por tanto, existen también líneas de animales no consanguíneos, para las cuales se establecen sistemas de cruces que tienden a mantener el coeficiente de consanguinidad (F) en los niveles más bajos posibles, estableciendo acoplamientos entre animales no emparentados por lazos familiares. Existen varios sistemas de cruces para conseguir este propósito, cuya elección depende principalmente del tamaño de la colonia, es decir, del número de efectivos que la componen. Para colonias muy numerosas se puede utilizar el sistema de cruces al azar, que teóricamente permiten el mantenimiento del valor de F en niveles aceptablemente bajos. En colonias más pequeñas, es necesario emplear patrones de cruces diseñados especialmente para reducir la consanguinidad. Uno de los sistemas más utilizados es el de cruces en rotación, ideado por Poiley en 1960. La colonia está dividida en varias unidades numeradas y para obtener una generación dada, se pasan machos de una unidad y hembras de otra distinta a una tercera, de forma rotatoria. Para la siguiente generación se procede de igual manera, con lo que machos y hembras con antepasados procedentes de una misma unidad no llegan a cruzarse hasta varias generaciones después. Dado su origen, las líneas no consanguíneas se caracterizan por presentar un alto grado de heterocigosidad, aunque indefinido, igual que su perfil genético.

Existen varias líneas no consanguíneas de uso general. Entre ellas se pueden citar las siguientes: NMRI, SWISS-WEBSTER, CD-1, OF. Entre sus ventajas están su reducido coste, facilidad de obtención, alta tasa reproductiva y elevado vigor. Sin embargo, carecen de las ventajas propias de las líneas consanguíneas, es decir homogeneidad y definición genética.

Las líneas no consanguíneas se utilizan principalmente en pruebas toxicológicas (13), como colonias destinadas al mantenimiento de múltiples alelos recesivos y como base de partida en experimentos de selección. Sin embargo, su uso es irrelevante en la investigación genética.

La mayor parte de las especies de experimentación distintas a la rata y el ratón de laboratorio, tales como gatos, perros, cabras, ovejas, cerdos o cobayas sólo están disponibles en forma de colonias de animales no consanguíneos.

TRANSGENIZACIÓN Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La transgenización consiste en la introducción de un gen extraño en el genoma de un individuo mediante la manipulación directa del cigoto del que procede. El desarrollo de técnicas que permiten la formación de animales transgénicos, principalmente ratones, ha supuesto un enorme salto cualitativo en el avance de la Genética del Desarrollo, por cuanto se puede transferir cualquier gen clonado, ya sea normal o mutado, para estudiar posteriormente los efectos de su expresión durante el desarrollo. También representa un avance definitivo en la obtención de modelos animales de enfermedades genéticas humanas.

Básicamente, existen dos métodos para obtener ratones transgénicos: la microinyección de ADN directamente en el pronúcleo de oocitos fecundados, y la infección de embriones con vectores retrovirales.

En el primer caso, se parte de un gran número de huevos de ratón fecundados, recolectados unas doce horas después del apareamiento entre machos fértiles y hembras estimuladas hormonalmente para provocarles una superovulación. Esto coincide con la etapa previa a la fusión de ambos pronúcleos (masculino y femenino). Entonces se inyecta una pequeña cantidad de ADN clonado en uno de los pronúcleos, con la ayuda de un micromanipulador equipado con una microaguja de vidrio y una micropipeta de sujeción (Figura 6-5). A continuación, los cigotos inyectados han de transferirse al útero de hembras "pseudopreñadas". Se trata de hembras normales que la noche anterior copularon con machos vasectomizados y, por tanto, estériles. Esto estimula hormonalmente a las hembras y favorece la implantación de los embriones, que son transferidos mediante una sencilla operación

quirúrgica. Los ratones nacidos de estas hembras deberán ser analizados para comprobar si son transgénicos o no, es decir, si han incorporado el ADN exógeno a su propio genoma. Para ello se extrae ADN de un pequeño trozo del rabo de estos animales y se investiga la presencia del transgén mediante PCR o *Southern blotting*. Además, este estudio ha de ser repetido varias generaciones después para verificar que la integración del transgén en el genoma ha sido estable.

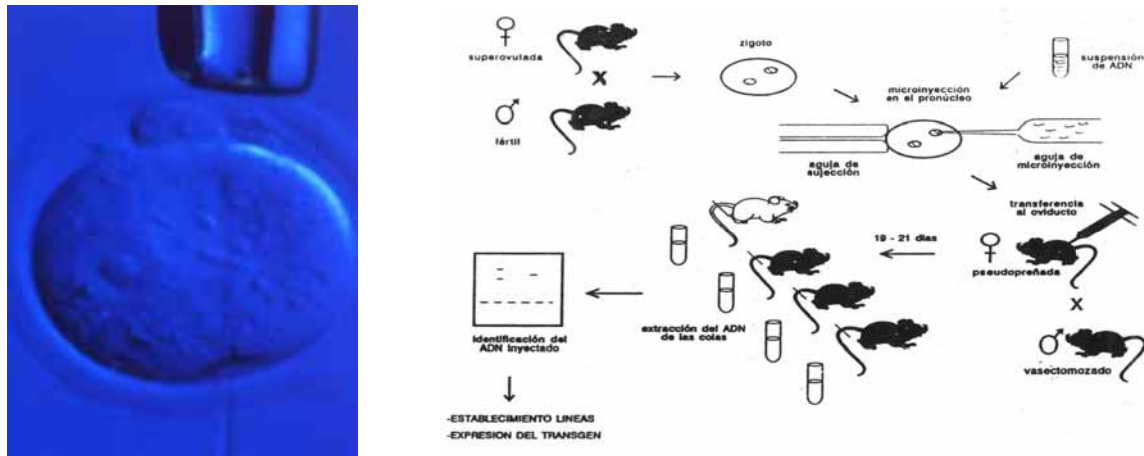


Figura 6-5. Sistema empleado para obtener cigotos transgénicos mediante microinyección de ADN exógeno en el pronúcleo masculino de oocitos fecundados con la ayuda de una microaguja de vidrio accionada por un micromanipulador. Foto y esquema cortesía del C.I.E.M.A.T. Madrid

La eficiencia de este método es realmente baja, resultando transgénicos menos del 5% de los individuos microinyectados. Además, no todos los transgénicos expresan el transgén y algunos de ellos muestran alteraciones indeseables en otros caracteres, que en la mayoría de los casos son consecuencia del mecanismo molecular por el que se lleva a cabo la integración, esto es, la recombinación no homóloga entre el ADN extraño y el de uno de los cromosomas del genoma del ratón. Si esta integración se produce en un punto que conlleva la generación de una mutación letal o deletérea, el individuo en cuestión no será finalmente útil.

En el segundo método, se infectan embriones de pre- o postimplantación con retrovirus, ya sean normales o mutantes, los cuales se integran por un mecanismo molecular preciso que lleva a la inserción de una sola copia en cada proceso (no ocurren las cadenas de múltiples insertos observadas con el método anterior). Sin embargo, puesto que se parte de embriones y no de cigotos, es frecuente la aparición de individuos mosaico, en los cuales sólo una parte de las células son transgénicas, mientras que el resto no lo son. Si la línea germinal de un ratón está entre las que ha incorporado el transgén, entonces dicho individuo podrá servir para establecer una línea transgénica, pues sus descendientes llevarán el transgén en todas sus células. La eficiencia de este segundo método es similar a la del anterior, aunque resulta más lento y complejo. Otra ventaja del método de microinyección es que no existe límite en cuanto al tamaño máximo del fragmento de ADN a insertar, mientras que el uso de retrovirus sí presenta esta limitación. Por el contrario, el uso de retrovirus es más barato, por cuanto no necesita del equipo de microinyección y más preciso, ya que proporciona transgénicos que portan una copia única e intacta del transgén.

La nomenclatura para los ratones transgénicos incluye: a) el nombre de la cepa receptora del transgén, b) tras un guión se pone un código que indica el tipo de transgénico (TgN para los obtenidos por inserción no homóloga, TgR para los obtenidos vía infección con un vector retroviral y TgH para los provenientes de inserción homóloga), c) un símbolo del gen (o fragmento de ADN) insertado entre paréntesis, d) un número que indica la línea fundadora y e) el código de registro del laboratorio que ha

producido el transgénico. Así, C57BL/6-TgN(*SODI*)3Cje es una línea transgénica producida por el Dr. Charles J. Epstein (Cje) de la Universidad de California, en la que el gen humano de la dismutasa de superóxido 1 (*SODI*) ha sido introducido mediante recombinación no homóloga (TgN) en el genoma de la cepa C57BL/6.

Los ratones transgénicos representan una de los más poderosos avances de la investigación biomédica de los últimos tiempos. Las ventajas de su uso no tienen equivalente en campos como la Genética del Desarrollo. Por ejemplo, la demostración de que el gen *SRY* del cromosoma Y es realmente el que determina el sexo en mamíferos, sólo fue definitiva cuando se pudo comprobar que ratones XX transgénicos para dicho gen se desarrollaban como machos. Además, los ratones transgénicos proporcionan unas posibilidades casi ilimitadas en la generación de modelos animales de enfermedades genéticas humanas.

Más recientemente se han desarrollado técnicas que permiten cambiar *in vitro* la copia correcta de cualquier gen conocido en células totipotenciales, por otra copia mutada artificialmente en puntos específicos, con el fin de alterar o silenciar la expresión de dicho gen. Cuando estas células se insertan en la línea germinal de embriones de ratón, estos manifestarán las deficiencias de desarrollo fruto de tal inactividad génica. Los llamados ratones "*knocked out*", obtenidos mediante estas técnicas de mutagénesis dirigida representan también un importante logro en la búsqueda de modelos animales de enfermedades genéticas humanas.

CLONACIÓN (METODOLOGÍA BÁSICA Y RESULTADOS ACTUALES)

La clonación de un mamífero consiste en la producción de uno o más individuos genéticamente idénticos a él, obtenidos mediante la sustitución de los núcleos haploides de oocitos no fecundados por los núcleos diploides de células somáticas del individuo de partida, y su posterior desarrollo en el útero de una hembra nodriza.

Aunque la idea de la clonación ha estado en la mente de los científicos durante décadas, lo cierto es que sólo ha comenzado a hacerse realidad en los últimos años. No obstante, los resultados son todavía bastante preliminares y a menudo no pasan de ser más que prometedores avances metodológicos.

La técnica básica descrita anteriormente es conceptualmente simple, pero presenta numerosos inconvenientes difíciles de solventar. El primer gran hito en la carrera por conseguir la clonación de un mamífero tuvo lugar en 1997, cuando investigadores del Instituto Roslin de Edimburgo consiguieron clonar una oveja a la que llamaron Dolly. Para ello utilizaron núcleos de células de glándula mamaria de oveja, los cuales fueron cultivados durante varias horas antes de ser transferidos al citoplasma de oocitos de oveja enucleados. A pesar de ello, no ha sido posible reproducir tales resultados hasta la fecha. Un avance más prometedor se ha producido en el intento de clonar ratones de laboratorio. Para ello se han introducido varios cambios técnicos que parecen ser importantes. Por ejemplo, los núcleos de partida se obtienen de células del cúmulus, que rodean normalmente a los oocitos maduros en los folículos ováricos. Además, se ha desarrollado un nuevo sistema de microinyección de los oocitos que resulta menos perturbador y aumenta enormemente la viabilidad de las células manipuladas. Con esta nueva técnica ha sido posible clonar decenas de ratones de forma claramente reproducible, lo que representa el primer avance sólido llevado a cabo en este campo. (Figura 6-6).

El Cuadro 6-1 resume los distintos tipos de animales de laboratorio existentes e indica sus principales campos de utilidad.



Figura 6-6. Ratones clónicos obtenidos mediante la inserción de núcleos diploides de células del cúmulo de folículos ováricos en oocitos enucleados. Se muestran los distintos individuos utilizados en el experimento: a la izquierda (fenotipo agoutí), la hembra de la que se obtuvieron los núcleos somáticos diploides; a la derecha (fenotipo negro), la hembra donante de los oocitos que posteriormente fueron enucleados; en el centro, se muestran dos de los ratones clónicos obtenidos (fenotipo *agoutí*), junto con la hembra (fenotipo albino), en cuyo útero se implantaron los embriones clónicos. La fotografía es gentileza del Dr. Yanagimachi, de la Universidad de Hawaii

Tipo de cepa	Características	Aplicaciones específicas en investigación
Consanguíneas	Homocigosis, genotipo definido, depresión consanguínea, isogenicidad, uniformidad, individualidad, universalidad.	Cualquier investigación realizable con ratones o ratas, excepto procesos de selección.
Híbridos F1	Heterocigosis, genotipo definido, vigor híbrido, isogenicidad, uniformidad.	Potencialmente similares a las cepas consanguíneas. Adecuados en estudios de carcinogénesis química.
Consanguíneas mutantes (coisogénicas)	Similares a las cepas consanguíneas, aunque con rasgos genéticos exclusivos.	Estudio de la función de genes concretos.
Congénicas	Similares a las coisogénicas. Obtención dirigida.	Similares a las coisogénicas. Útiles en estudios de Inmunogenética.
Consanguíneas recombinantes	Similares a las consanguíneas.	Detección de ligamiento genético. Construcción de mapas genéticos. Detección de caracteres genéticos.
Transgénicos e inhibición selectiva	Similares a las consanguíneas. Obtención por manipulación directa del genoma.	Genética del desarrollo. Obtención de modelos animales de enfermedades humanas de origen genético.
Cepas no consanguíneas	Heterocigosis. Genotipo indefinido.	Pruebas toxicológicas. Experimentos de selección. Mantenimiento de alelos recesivos letales o deletéreos.
Clónicos	Genoma de origen uniparental. Genotipo indefinido.	Genética del desarrollo temprano. Multiplicación de individuos con características únicas. Uso comercial.

Tabla 6.1. Características y aplicaciones específicas de los distintos tipos de animales de laboratorio según su origen genético

CONTROL DE LA PUREZA GENÉTICA

El control de la pureza genética es de suma importancia en toda cepa de animales de laboratorio, pues cualquier alteración no detectada de su patrimonio genético podrá implicar también una alteración de sus características fenotípicas. Tales alteraciones genéticas pueden producirse por mutación espontánea, que resulta inevitable y tiene lugar de forma aleatoria y frecuentemente inadvertida. Además, pueden acumularse en el tiempo, haciendo que la cepa se aleje progresivamente de su patrón genético inicial, hasta alcanzar diferencias inaceptables. En otras ocasiones es posible que se produzca una contaminación genética con el genoma de otra cepa diferente, debido a errores en la selección de los progenitores. Estas alteraciones son fácilmente evitables con un programa de cruces apropiado, pero cuando ocurren, sus efectos son drásticos e irreversibles.

Existen diversos métodos de control de la pureza genética de los animales de laboratorio. A continuación se exponen algunos de los más utilizados.

Polimorfismo bioquímico

Este método es muy útil en el control genético de líneas consanguíneas. Con frecuencia existen diferencias más o menos sutiles entre los distintos alelos de los genes de enzimas (isoenzimas), que no interfieren en su funcionalidad, pero que hacen que éstas presenten diferencias en su velocidad de migración a través de un gel de electroforesis. Una vez separadas en el gel (almidón o poliacrilamida), las distintas enzimas se visualizan añadiéndoles un sustrato que da un producto coloreado cuando es metabolizado por la enzima. Puesto que son homocigotos, los individuos de una cepa dada se caracterizan por presentar bien el alelo rápido o bien el alelo lento de un determinado locus polimórfico.

Si analizamos este polimorfismo isoenzimático en un buen número de genes, los resultados permiten la caracterización genética de individuos o grupos homogéneos de ellos. Esta utilidad se ha aplicado con éxito en la caracterización de las cepas consanguíneas. De esta forma, cada cepa viene definida por el patrón de variantes isoenzimáticas, a modo de un carnet de identidad bioquímico. Muchas cepas consanguíneas de rata y ratón han sido caracterizadas desde el punto de vista bioquímico por un conjunto de variantes alélicas para más de 30 *loci* polimórficos. Así, es posible conocer *a priori* el subconjunto de loci que diferencian a una cepa concreta de cualquier otra existente en el mismo animalario. El análisis periódico del patrón bioquímico correspondiente a este subconjunto (lo que en inglés se conoce como *critical subset*), permite ejercer un control riguroso de los posibles accidentes de contaminación genética entre líneas diferentes. Este tipo de seguimiento conviene hacerlo con la mayor periodicidad que permitan los recursos del laboratorio dado que, como ya se indicó antes, la contaminación genética provoca una alteración muy drástica en el genotipo y, además, es irreversible. Por otra parte, también es necesario realizar controles del patrón bioquímico completo de las distintas líneas consanguíneas presentes en el animalario, para su comparación con el patrón estándar de cada una de ellas. Es lo que se conoce como prueba de autenticidad. Esta práctica permite controlar las variaciones que hayan podido ocurrir por mutaciones espontáneas o la divergencia originada en el establecimiento de subcepas. Dada su mayor laboriosidad y coste, este tipo de controles se realizarán con una periodicidad menor que los del *critical subset*.

Se trata pues de una técnica muy fiable, ya que permite controlar un buen número de loci distribuidos por todo el genoma, y hacerlo de manera relativamente rápida aunque, en contrapartida, resulta algo cara y, por tanto, no al alcance de cualquier laboratorio.

Osteometría

Se ha demostrado que el tamaño y la forma de ciertos huesos está determinada por un grupo numeroso de genes de herencia cuantitativa. Además, estos genes muestran una fuerte penetrancia y expresividad, lo que implica que su expresión no se afecta en gran medida por la influencia del ambiente. Se trata por tanto de un modelo genético idóneo que ha permitido desarrollar métodos de control de la pureza genética de animales de laboratorio, que comprueban el mantenimiento sin alteraciones de las características morfométricas de los mismos, comparándolas en cada momento con un patrón estándar de referencia. Los huesos mandibulares se han empleado frecuentemente en este tipo de controles. Para realizar este control se disecan y limpian las mandíbulas de un grupo de individuos. Su forma y tamaño se determina midiendo las distancias desde once puntos de referencia predeterminados hasta unos ejes de coordenadas rectangulares. Los datos así obtenidos se procesan posteriormente mediante un programa informático, que determina si tales parámetros se apartan o no del patrón que define a la cepa en cuestión.

Aunque es utilizado también en el control de la pureza genética de animales consanguíneos, este método es especialmente útil en el control de líneas no consanguíneas, donde los métodos de estudio de parámetros monogénicos no resultan aplicables. Además de que permite el seguimiento simultáneo de varios loci, la principal ventaja de los controles osteométricos radica en su sencillez y reducido coste.

Histocompatibilidad tisular

El sistema inmunológico provee a los mamíferos de un mecanismo de defensa frente a la invasión por cuerpos extraños y organismos patógenos. El reconocimiento de tales agentes se efectúa a través de los anticuerpos, moléculas proteicas que se unen en forma específica a los antígenos, que son todas aquellas sustancias que no reconocen como propias. Consecuencia de ello es también el rechazo de trasplantes de órganos provenientes de otros congéneres. Puesto que existen más de treinta genes distintos implicados en el sistema de histocompatibilidad, el uso de trasplantes de piel supone un poderoso método para el control de la pureza genética de los animales de laboratorio, pues tales trasplantes serán rechazados si el individuo donante y el receptor no son genéticamente idénticos, tal como ocurre entre cepas no consanguíneas.

Básicamente consiste en la obtención de un fragmento de piel de la oreja del donante y su posterior implantación en una porción equivalente de la región dorsal del animal receptor, en la que previamente se ha extraído la piel original. También se utiliza generalmente el trasplante de fragmentos de piel de cola a cola. Estas técnicas son fiables, sencillas y baratas, por lo que tradicionalmente han sido utilizadas en numerosos laboratorios. Sin embargo, los resultados se obtienen a largo plazo, pues se necesita un mínimo de tres o cuatro semanas para poder admitir que el trasplante no ha sido definitivamente rechazado. Incluso en ocasiones puede inducir a error ya que trasplantes en apariencia aceptados resultan finalmente rechazados al cabo de varios meses, a consecuencia de antígenos “menores” de histocompatibilidad. También se pueden dar falsos rechazos por causas no inmunológicas, tales como infecciones o mala manipulación. Por estas razones y dada la existencia actualmente de otras técnicas más fiables y rápidas, su utilización es cada vez menor.

Algunos de estos inconvenientes se solventan llevando a cabo técnicas inmunológicas *in vitro*. Las células sanguíneas, tanto linfocitos como eritrocitos, también poseen numerosos antígenos de superficie, susceptibles de inducir la producción de anticuerpos específicos en un animal genéticamente distinto. Es posible producir sueros que permiten tipificar líneas consanguíneas concretas (SRTS, de *strain-restricted typing sera*). Para ello, ratones de una línea determinada (X, por ejemplo) son inoculados semanalmente con células sanguíneas de ratones procedentes de una o varias líneas diferentes (generalmente aquellas que coexisten en el mismo animalario y que, por tanto, podrían ser fuente de contaminación genética). Tras cuatro o cinco semanas, los ratones de la cepa X inoculados contienen en su suero anticuerpos frente a todos los antígenos sanguíneos que los diferencian de las otras cepas. Por tanto, podremos usar este suero SRTS para controlar la pureza genética de la cepa X, exponiendo sus células a dicho suero. Si se produce reacción antígeno-anticuerpo, los ratones ensayados habrán sido contaminados genéticamente por alguna de las cepas vecinas. Estas reacciones se pueden detectar por métodos tales como las pruebas de citotoxicidad o de hemaglutinación. En las pruebas de citotoxicidad se toman linfocitos de los individuos problema y se ponen en contacto con el suero SRTS obtenido en su misma cepa. Si poseen antígenos distintos a los de su cepa por contaminación genética, los linfocitos se lisarán en presencia de complemento. La lisis celular se puede detectar añadiendo un colorante como el azul de tripano, que penetrará en el citoplasma de las células lisadas, tiñiéndolas, pero no en el de las células vivas. En los experimentos de hemaglutinación se aíslan eritrocitos de individuos de la cepa problema y se ponen en contacto con el suero SRTS apropiado. La unión de los anticuerpos se pone de manifiesto por la aglutinación que provoca en los eritrocitos, fácilmente visible a la lupa.

Polimorfismo en la secuencia del ADN

Todos los métodos de control vistos hasta ahora se basan en el análisis de caracteres fenotípicos, fruto de la expresión de los genes, y cuya posibilidad de variación está por tanto restringida por la selección natural. Cabe entonces la posibilidad de que se produzcan variaciones a nivel genómico que no trasciendan al plano fenotípico, pasando así inadvertidas. Por esta razón, los métodos de análisis directo del ADN mediante la detección de marcadores moleculares son incomparablemente más poderosos y adecuados si deseamos tener un control estricto de la pureza genética de los animales de laboratorio. Existe un grupo de técnicas de análisis genético molecular que permiten la caracterización precisa de individuos concretos de cualquier especie y, en nuestro caso, de líneas consanguíneas, mediante el establecimiento de lo que se ha dado en llamar el *DNA finger printing* o huella genética. Entre ellos, los más utilizados en zootecnia son: RFLP (polimorfismo para la longitud de fragmentos de restricción) y VNTR (número variable de repeticiones en tandem). (Figura 6-7).

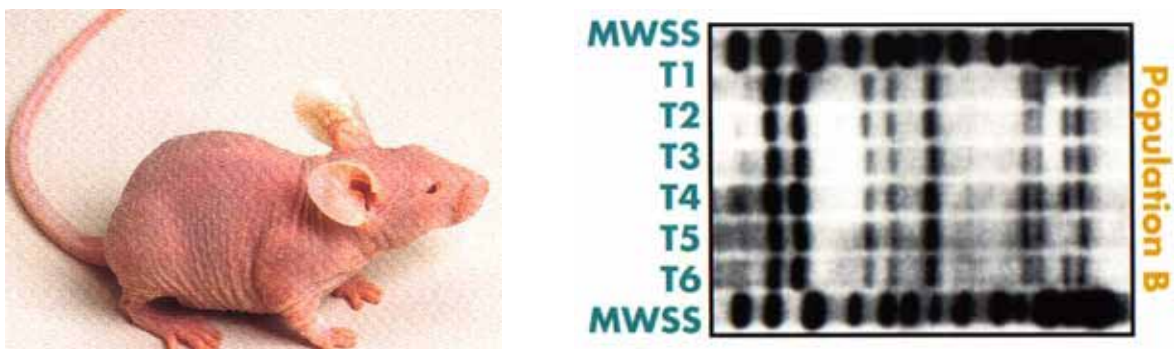


Figura 6-7. Técnica de RFLP para caracterización genética. Cortesía de Charles River Co

El estudio de RFLP se basa en el uso de endonucleasas de restricción (ER), enzimas que cortan el ADN por sus sitios diana, que presentan a su vez una secuencia concreta de 4 ó 6 pares de bases generalmente. Cuando el ADN genómico de un animal es cortado con una ER se producen numerosos fragmentos que pueden ser separados por electroforesis. La detección de algunos de ellos por la técnica de *Southern blotting* permite definir un patrón de bandas característico de dicho animal o cepa. Para ello, los fragmentos de ADN separados por electroforesis son transferidos directamente a la superficie de un filtro de nylon, donde se les hace hibridar por complementariedad de bases con un DNA marcado radiactivamente, que sirve como sonda molecular. Las bandas en las que se produjo hibridación se pueden visualizar finalmente mediante una autorradiografía. Las posibilidades son casi infinitas pues el patrón de bandas resultante será distinto si usamos otra ER y/u otra sonda molecular. Las variaciones genéticas causadas por mutaciones espontáneas o por contaminación genómica pueden alterar la localización y número de las dianas para las ER, alterando así también el citado patrón de bandas. De esta forma se pueden detectar cambios sutiles en el ADN, producidos casi en cualquier lugar del genoma.

El estudio de VNTR es posible gracias a la existencia de microsatélites, que están representados en decenas o centenas de millares por todo el genoma de los mamíferos. Son secuencias de ADN formadas por la repetición (10-30 veces) de di-, tri- o tetranucleótidos tales como CA, GA o CGG. Se ha comprobado que es normal la existencia de variaciones en el número de repeticiones presentes en el genoma de distintos individuos o cepas. Ya que estos microsatélites se encuentran localizados entre regiones de secuencia única, en las que existen dianas para ER, las diferencias en el número de repeticiones implican también diferencias en la distancia que separan a tales dianas y, en consecuencia, en la longitud de los fragmentos de restricción generados por dichas ER. Para detectar

estas diferencias se realiza un *Southern blotting* en el que una sonda compuesta por una fracción del microsatélite se hibrida con ADN genómico cortado con una ER. Como en el caso anterior, se obtiene un patrón de bandas característico de cada individuo o cepa, que será distinto del obtenido con otras ER o con otras sondas.

Una variante de esta última técnica consiste en la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de las regiones con microsatélites utilizando para ello cebadores específicos de las secuencias únicas adyacentes.

Otros métodos

Además de los ya citados, existen otros muchos rasgos fenotípicos susceptibles de ser empleados en el control genético del animal de laboratorio. Veremos a continuación algunos de los más importantes.

Entre las distintas líneas de animales de laboratorio existen variantes en el color del pelaje. El fenotipo albino (blanco) está determinado por un alelo recesivo y, por tanto, se manifiesta en homocigosis. Existen otros genes implicados en el color del pelo, pero no se expresan en individuos albinos. Cuando una cepa albina se cruza con otra que no lo es, entonces el alelo del albinismo pasa a estar en heterocigosis y deja de expresarse (puesto que es recesivo), con lo que aparece la expresión de los genes para el color que estaban enmascarados en la cepa albina. El color resultante dependerá del genotipo de ambas cepas, y puede ser muy variable. Por tanto, el establecimiento de un sistema de cruces entre las distintas cepas presentes en el animalario puede servir como método de control genético, puesto que cada cruce deberá dar descendientes de un color predeterminado. Cualquier desviación de este patrón será un claro indicio de la presencia de una contaminación genética. En cualquier caso, se trata de un método de control no muy poderoso, puesto que no implica a muchos *loci* diferentes. Además, se necesita emplear mucho tiempo y supone siempre un riesgo de contaminación genética. Por tanto, no es aconsejable realizarlo con individuos de la colonia núcleo (ver la siguiente sección).

Existen además parámetros fisiológicos que caracterizan en forma somera a cada cepa de animal de laboratorio. Variables tales como el hematocrito, recuento de eritrocitos y linfocitos, contenido en hemoglobina, tasa de reproducción, promedio de individuos por camada, tasa de crecimiento, longevidad, respuesta a tratamiento con drogas, etc., deben ser controlados en toda línea consanguínea para comprobar que varían dentro de los límites normales en la misma. Así, la observación de un incremento neto significativo en la tasa reproductiva o en el promedio de individuos por camada, son claros indicios de que ha habido contaminación genética. Es una manifestación del ya mencionado vigor híbrido, fenómeno opuesto a la depresión por consanguinidad, que aparece en los individuos híbridos (F1) producidos en un cruce entre dos cepas consanguíneas.

PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN GENÉTICA (CRIOPRESERVACIÓN Y MANEJO ADECUADO)

La congelación de embriones representa el método más efectivo para la preservación de la pureza genética de los animales de laboratorio, ya que es sumamente improbable, si no imposible, que se produzcan alteraciones genéticas en estado de congelación.

Para realizar esta técnica se ha de partir de un elevado número de embriones, que se obtienen de hembras (de la cepa a preservar) tratadas con hormona folículo-estimulante (FSH) y con hormona luteinizante (LH), para producirles una superovulación. Posteriormente son apareadas con un macho de la misma cepa. Los embriones así obtenidos son recolectados antes de la implantación en el útero y sometidos a un proceso de congelación de acuerdo con un protocolo definido. Existen varios procedimientos de congelación, entre los cuales los más usuales son la congelación lenta, la

congelación rápida en dos etapas y la congelación rápida en un solo paso (vitrificación). En cualquier caso, ha de usarse un medio de cultivo con algún crioprotector, que evite la formación de cristales de hielo que romperían el embrión. Los crioprotectores más comunes son el dimetilsulfóxido (DMSO), el glicerol, el propilenglicol o el metanol y etilenglicol. El uso de uno u otro depende principalmente de la especie a congelar. Los embriones congelados se pueden conservar indefinidamente a -196°C en nitrógeno líquido.

Para descongelar los embriones es necesario un calentamiento rápido hasta 37°C y la transferencia posterior al útero de hembras pseudopreñadas (no necesariamente de la misma cepa) similares a las usadas en transgenización. Los ratones así obtenidos pueden servir de base para el establecimiento de una nueva colonia.

La criopreservación de embriones abre la posibilidad del establecimiento de bancos de embriones, lo cual ofrece importantes ventajas en el manejo de animales de laboratorio. Además del mantenimiento inalterable del acervo genético de las distintas cepas mediante la eliminación de la deriva y la contaminación genéticas, el uso de bancos de embriones ofrece, entre otras, las siguientes ventajas: a) permite la reposición inmediata de líneas que hayan de ser restablecidas tras su pérdida por accidente, o bien establecidas por primera vez en un animalario concreto; b) supone un método relativamente barato para el mantenimiento de un gran número de líneas distintas en un espacio reducido; c) representa un método eficaz y barato para el transporte de animales entre distintos laboratorios; d) previene de la extinción de líneas especialmente valiosas, siempre que éstas se conserven en más de un banco de embriones; e) permite la disponibilidad casi inmediata de líneas cuya demanda se produce a niveles fluctuantes y, finalmente, f) puede ser utilizada como punto de partida para el establecimiento de líneas SPF, pues minimiza el riesgo de contaminación durante la gestación intrauterina.

Una vez establecida una colonia de animales de laboratorio, bien a partir de embriones congelados o a partir de animales derivados de una colonia de referencia, la preservación de su calidad genética depende casi exclusivamente del cuidado con ésta sea manejada en el animalario. Existen una serie de procedimientos que conviene seguir para evitar accidentes de contaminación genética. En primer lugar es necesario dividir la colonia en dos, estableciendo una “colonia núcleo” y una “colonia de expansión”. La primera deriva directamente de los individuos fundadores y debe estar sometida a un control riguroso de su calidad genética, bien mediante pruebas de autenticidad periódicas que garanticen su invariabilidad, bien mediante su renovación periódica con animales procedentes de una colonia de referencia en la que tales controles sean efectuados regularmente. Además, la colonia núcleo deberá mantenerse, siempre que sea posible, en habitaciones separadas de las demás, con objeto de reducir al máximo la posibilidad de cruce con otras cepas. Hay que tener en cuenta que cualquier error en este sentido provocará una contaminación genética irreversible que podría fijarse y transmitirse a toda la colonia en pocas generaciones. La colonia de expansión se establece a partir de la colonia núcleo para satisfacer una mayor producción de animales. Su tratamiento debe ser similar al de la colonia núcleo, excepto en cuanto al origen de sus reproductores, que provienen de ésta. Si es necesaria una capacidad de producción aún mayor para satisfacer una gran demanda eventual, se puede establecer una “colonia de multiplicación”, partiendo de individuos procedentes de la colonia de expansión. En este caso no sería necesario mantener el sistema de cruces consanguíneos (hermano por hermana). Con este protocolo se establece una pirámide que tiene su vértice superior en la colonia núcleo y su base en la colonia de multiplicación. De esta forma, la continua renovación de los animales reproductores en cada uno de los tres niveles, asegura también que cualquier contaminación que pueda haberse producido en uno de ellos, será eliminada por completo al cabo de pocas generaciones, ya que la línea de herencia genética siempre discurre en sentido vertical, desde el vértice hasta la base. A diferencia de la colonia núcleo, las otras dos se pueden mantener en la misma habitación que otras cepas diferentes, si no se dispone de suficientes recintos de aislamiento. Sin embargo, conviene reunir sólo cepas que se diferencien por el color del pelaje, de tal modo que cualquier error o descuido pueda ser detectado fácil y rápidamente.

RESUMEN

Los animales de laboratorio son elementos imprescindibles en la investigación biomédica actual. Su valor específico está determinado en cada caso por sus características anatómicas, fisiológicas, bioquímicas o de cualquier otra índole, las cuales dependen a su vez de sus características genéticas. Por tanto, el patrimonio genético de los animales de laboratorio debe ser vigilado y protegido de los factores, tanto endógenos como exógenos, que puedan alterarlo. Este capítulo se dedica al estudio de estos factores y de la metodología de que disponemos para evitar tales alteraciones, y analiza la gran variedad de animales de laboratorio existentes en la actualidad.

Las colonias de animales de laboratorio son poblaciones artificiales y, como tales, están sujetas a los mismos procesos de cambio evolutivo que afectan a las poblaciones naturales, exceptuando lógicamente el efecto de la selección natural. Por ello, la primera parte del capítulo se centra en el estudio de factores tales como la selección artificial, la consanguinidad, la deriva genética y la mutación, que pueden cambiar la estructura genética de cualquier población, definida por sus frecuencias génicas y genotípicas. La ley de Hardy-Weinberg nos enseña que, en ausencia de estos factores de cambio evolutivo, dicha estructura genética tiende a mantenerse inalterada. Elementos tales como la consanguinidad o la deriva genética, provocan cambios paulatinos (aumento de la homocigosis y fijación de alelos al azar), que pueden pasar inadvertidos en sus primeros estadíos si la población es suficientemente grande. Sin embargo, estos cambios serán drásticos y rápidos si la población cuenta con un número muy reducido de efectivos. El aumento de la homocigosis conlleva además un proceso de depresión consanguínea que se manifiesta por una reducción neta de la aptitud biológica. Estos procesos son espontáneos y cambian las frecuencias génicas aleatoriamente, por lo que deben ser controlados en forma rutinaria y continua.

En poblaciones naturales la selección natural y la migración cambian las frecuencias génicas en forma sistemática. Sus análogos en las poblaciones de laboratorio son la selección artificial y la contaminación genética (cruces no deseados realizados por error con animales de otra cepa). Sus consecuencias son drásticas y a menudo desastrosas para la estructura genética de animales con genotipo definido. Estos efectos son generalmente irreversibles.

La estandarización genética se refiere a la obtención de cepas de animales genéticamente definidos. Dentro de este apartado se incluyen los animales monocigóticos, las líneas consanguíneas, líneas coisogénicas, líneas congénicas, líneas consanguíneas recombinantes y líneas no consanguíneas. Los animales monocigóticos son actualmente de poca trascendencia dada su escasez y la falta aún de técnicas de producción masiva. Las líneas consanguíneas son especialmente variadas y muy valiosas por sus características de homocigosis, uniformidad, exclusividad, isogenicidad, universalidad y clara definición de su patrón genético. Los híbridos F1 se obtienen mediante el cruce entre dos líneas consanguíneas. Poseen muchas de las características favorables de éstas, pero su heterocigosis definida les confiere ciertas ventajas adicionales, derivadas del vigor híbrido. Las líneas consanguíneas mutantes se caracterizan por poseer además un único carácter genético que las diferencian de la cepa de origen. Ambas cepas consanguíneas, original y mutante, constituyen un par de líneas coisogénicas. Las cepas congénicas son similares a las consanguíneas mutantes en cuanto a sus características genéticas, pero han sido obtenidas de forma artificial mediante un sistema de cruzamientos y retrocruzamientos predefinido, que permite pasar cualquier gen desde una cepa a otra diferente. Las líneas consanguíneas recombinantes constituyen grupos de líneas consanguíneas derivadas de híbridos F1, de modo que en cada una de ellas se ha fijado al azar uno de los dos alelos de cada gen en que se diferenciaban las dos cepas de partida. Son especialmente útiles para la construcción de mapas genéticos. Finalmente en este apartado, las líneas no consanguíneas presentan ciertas ventajas en determinados experimentos, especialmente en toxicología. Para mantener su alto grado de heterocigosis, es necesario establecer sistemas de cruces específicamente diseñados para evitar la consanguinidad y la deriva genética.

Las nuevas tecnologías de transgenización y mutagénesis dirigida han permitido obtener animales de laboratorio tras la manipulación directa de su genoma. Los animales transgénicos poseen un gen insertado artificialmente, bien por microinyección de ADN en el núcleo del cigoto, bien mediante la infección de embriones de pre- o postimplantación con vectores retrovirales portadores del transgén. Los ratones *knocked out* tienen silenciado uno varios de sus genes mediante la sustitución en células embrionarias totipotenciales de las copias correctas por otras mutadas *in vitro*. Ambos modelos representan un avance importante en la investigación de la Genética del Desarrollo y en la obtención de modelos animales de enfermedades genéticas humanas.

Los métodos de clonación persiguen obtener lotes de animales genéticamente idénticos a otros adultos preexistentes cuyas características sean de especial interés. Aunque los resultados obtenidos en animales domésticos de uso comercial no son reproducibles por ahora (oveja Dolly), los logros conseguidos en ratones de laboratorio son mucho más prometedores, ya que se han desarrollado técnicas que permiten repetir los procesos de clonación con superiores garantías de éxito.

El último apartado de este capítulo se dedica al estudio de los métodos de control de la pureza genética de los animales de laboratorio. Estos se pueden clasificar en dos grandes grupos: a) métodos de seguimiento y control de calidad genética, y b) métodos de prevención de la contaminación genética. Los primeros persiguen detectar las posibles alteraciones que hayan podido ocurrir inadvertidamente, bien en forma espontánea o por error en los cruces. El método básico consiste en comprobar periódicamente que un número suficiente (mejor cuanto más grande) de loci polimórficos se mantienen inalterados en nuestras cepas de animales de laboratorio, respecto a los patrones estándar que las caracterizan. Para ello se utilizan diversos marcadores genéticos. Entre los más habituales y efectivos están los genes de las enzimas (marcadores bioquímicos analizados mediante electroforesis de isoenzimas), genes que controlan el desarrollo del esqueleto (estudios osteométricos), genes implicados en el control del sistema inmunológico (estudios de histocompatibilidad tisular y reacciones de citotoxicidad *in vitro*), secuencias de ADN no informativo (estudios del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción o en el número de repeticiones en tandem de mini- y microsatélites), o genes involucrados en forma más o menos definida en caracteres biológicos tales como la longevidad, la tasa reproductiva o la susceptibilidad a drogas, entre otros.

Los métodos de prevención son la criopreservación de embriones y el correcto manejo de las colonias de laboratorio. La criopreservación de embriones es un método altamente efectivo que garantiza el mantenimiento inalterado de las características genéticas de los animales de laboratorio. Además, presenta otras muchas ventajas, tales como su economía, la facilidad de transporte, o la posibilidad de establecer bancos de embriones, que lo hacen especialmente aconsejable y de uso generalizado. Finalmente, el correcto manejo de la colonia implica el establecimiento de una estructura interna de la misma, que minimice en la medida de lo posible la alteración de su pureza genética. Esto implica la existencia de una colonia núcleo, aislada preferiblemente del resto y derivada directamente de los individuos fundadores, que será sometida a un seguimiento periódico, o bien será renovada periódicamente. De ésta derivará una colonia de expansión, más numerosa y también sometida a control, de la que obtendrán los animales para experimentación. En casos de mayor demanda, se puede derivar es ésta una tercera colonia de multiplicación, que no necesita ser controlada periódicamente. Esta estructura piramidal minimiza el riesgo de contaminación por cruce accidental con otras cepas y tiende a eliminar al cabo de unas pocas generaciones cualquier alteración genética que haya podido aparecer en las colonias superiores.

BIBLIOGRAFÍA

- Bedel M.A., Jenkins N.A., Copeland N.G.: Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev* 11:1, 1997
- Bedel M.A., Largaespada D.A., Jenkins N.A., Copeland N.G.: Mouse models of human disease. Part II: Recent progress and future directions, *Genes Dev* 11:11, 1997

- Bradley A., Liu P.: Target practice in transgenics. *Nat Genet* Oct;14(2):121-3, 1996
- Capecchi M.R.: targeted gene replacement, *Sci Am*, March issue: 34, 1994
- Cornall, R. J.; Aitman, T. J.; Hearne, C. M. & Todd, J. A. 1991. The generation of a library of PCR-analyzed microsatellite variants for genetic mapping of the mouse genome. *Genomics*, 10: 874-881.
- Dagnæs-Hansen, F.: Laboratory animal genetics and genetic monitoring, en: *Handbook of laboratory animal science*, Svendsen P, Hau J (eds), London, CRC Press, p:89, 1994
- Festing M.F.W.: Production methods, en: *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*, 4th edition, Edinburgh and London, Churchill Livingstone, p:56, 1972
- Festing M.F.W.: *International index of laboratory animals*, Carshalton, Lion Litho Ltd, 1993
- Festing M.F.W.: Introduction to genetic monitoring, *Scand J Lab Anim* 17:119, 1990
- First, N. L. & Haseltine, F. P. 1991. *Transgenic animals*. Science Tech. Publishers, Madison, New York.
- Gahlmann, R.: Pros and cons of transgenic mouse mutagenesis test systems. *J Exp Anim Sci* Sep;35(5-6):232-43, 1993
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT et al: *Genética*. 5ª edición, Madrid, Interamericana McGraw-Hill, p:771, 1995
- Green, E. L.: Genetic methods in animal experimentation. In: *Methods of animal experimentation* Vol. VI (Ed. W. I. Gay). Acad. Press. London, pp: 4-135. 1981
- Grosveld F, Gollias G. (eds): *Transgenic animals*, London, Academic Press, 1992
- Haseman J.K., Hoel D.G.: statistical design of toxicity assays: role of genetic structure of test animal populations, *J Toxicol Environ Health*, 5:151, 1973
- Hedrich H.J.: Colony management, en: *Genetic monitoring of inbred strains of rats*, Hedrich HJ (ed), Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, p:11, 1990
- Hirabayashi M., Takahashi R., Sekiguchi J., Ueda M.: Viability of transgenic rat embryos after freezing and thawing. *Exp Anim* Apr;46(2):111-5, 1997
- Hogan B.; Beddington R.; Constantini F. & Lacey E.: *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour . New York. 1994
- Jackson LR, Trudel LJ, Fox JG, Lipman NS: Monoclonal antibody production in murine ascites. I. Clinical and pathologic features. *Lab Anim Sci* Feb;49(1):70-80, 1999
- Jaenisch, R.: Transgenic animals. *Science* 240:1468-1474. 1988
- Jeffreys, A.J., Wilson V., Thein, S.L.: Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316: 76-79. 1985
- King W.W., St Amant L.G., Lee W.R.: A technique for serial spermatozoa collection in mice. *Lab Anim Sci* Jun;44(3):295-6, 1994
- Lyon M.E., Searle A.G.: *Genetic variants and strains of the laboratory mouse*. Oxford University Press, 1990
- McFarlane M., Wilson J.B.: A model for the mechanism of precise integration of a microinjected transgene. *Transgenic Res* May;5(3):171-7, 1996
- Melloy, E. C. & Balk, M. W.: *The importance of laboratory animal genetics, health and the environment in Biomedical Research*. Acad. Press. New York. 1993
- Mizuno A., Hoshi M.: Frozen storage of mouse and rat embryos. *Rep Res Lab Tech Res Inst*, 83:15, 1986
- Nakagata N.: Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. *Exp Anim* Jan;44(1):1-8, 1995
- Nomura, T.: Practical development of genetically engineered animals as human disease models. *Lab Anim Sci* Apr;47(2):113-7, 1997
- Ono T., Muto S., Matsumoto T., Mochii M., Eguchi G.: Gene transfer into circulating primordial germ cells of quail embryos. *Exp Anim* Oct;44(4):275-8, 1995
- Pennisi E.: Transgenic lambs from cloning lab. *Science* Aug 1;277(5326):631, 1997
- Poiley S.M.: A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory animals colonies, *Proc Anim Care Panel*, 10:159, 1960

- Rao G.N., Birnbaum L.S., Collins J.J., et al: Mouse strains for chemical carcinogenicity studies: overview of a workshop. *Fundam Appl Toxicol*, 10:385, 1988
- Roths J.B., Foxworth W.B., McArthur M.J. et al: Spontaneous and engineered mutant mice as models for experimental and comparative pathology: history, comparison, and developmental technology. *Lab Anim Sci* Feb;49(1):12-34, 1999
- Snell G.D., Stimpfling J.H.: Genetics of tissue transplantation, en: *Biology of the laboratory mouse*, Green EL (ed), New York, McGraw-Hill, p:457, 1966
- Sikorski R., Peters R.: Transgenics on the Internet. *Nat Biotechnol* Mar;15(3):289, 1997
- Strickberger M.S.: *Genética*. 3ª edición, Barcelona, Omega SA, p:709, 1988
- Sztejn JM, McGregor T.E., Bedigian H.J., Mobraaten L.E.: Transgenic mouse strain rescue by frozen ovaries. *Lab Anim Sci* 1999 Feb;49(1):99-100,
- Swank R.T., Bailey D.W.: Recombinant inbred lines: value in the genetic analysis of biochemical variants. *Science*, 81:1249, 1973
- Suzuki H., Yorozu K., Watanabe T., Nakura M., Adachi J.: Rederivation of mice by means of in vitro fertilization and embryo transfer. *Exp Anim* Jan;45(1):33-8, 1996
- Trounson, A.O.: Cloning: potential benefits for human medicine. *Med J Aust* Dec 1-15;167(11-12):568-9,1997
- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. et al: Viable offspring derived from foetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810, 1997
- Wilmut, I.: Cloning for medicine. *Sci Am* Dec;279(6):58-63, 1998
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, et al: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369, 1998
- Yarus S.:Classifying transgenics. *Nat Biotechnol* Sep;14(9):1057, 1996