

CAPÍTULO VII

Las mutaciones

7.1. Un genoma cambiante

En los capítulos precedentes hemos considerado la estructura y organización íntima del genoma como parámetros inmutables. Esta manera de presentar al genoma nos ha permitido explicar los mecanismos que reglan la transmisión de los caracteres de una generación a otra, pero no corresponde totalmente con la realidad. De hecho, como la gran mayoría de las estructuras biológicas, el genoma es objeto de cambios, más o menos radicales y más o menos frecuentes, conocidos como mutaciones.

Una mutación es el cambio, en general irreversible, de una característica del genoma. Este cambio, que por otro lado puede no ser observado inmediatamente a nivel del fenotipo, se transmite como un nuevo rasgo hereditario y se presenta bajo las formas más variadas y sutiles. Las mutaciones son muy frecuentes en los mamíferos y presentan un interés considerable para los genetistas, además de su intrínseco valor evolutivo, por ser generadoras de diversidad genética. Todos los seres vivos, sin excepción, sufren mutaciones en sus genomas y este proceso es fundamentalmente aleatorio. Las mutaciones pueden presentarse sobre células somáticas o germinales, en células embrionarias o adultas, en cada caso con consecuencias diferentes. Pueden afectar tanto secuencias que codifican para proteínas como secuencias regulatorias o repetitivas. Las mutaciones tienen ventajas e inconvenientes: una ventaja es que la aparición de mutaciones permite a los individuos adquirir polimorfismos (variabilidad genética) y por consecuencia evolucionar; un inconveniente es que la mayor parte de esas mutaciones tienen efectos deletéreos o patológicos, representados por las enfermedades hereditarias.

Durante el transcurso del desarrollo embrionario temprano, las células del organismo se multiplican a una velocidad muy rápida y por lo tanto pueden surgir muchas mutaciones. Dentro de esas mutaciones, muchas provocan la muerte de las células que las portan y son eliminadas del organismo. En otros casos, las mutaciones pueden impedir que las células se diferencien hacia un tejido en particular y son, por lo tanto, fuertemente contra-seleccionadas. Finalmente, algunas mutaciones no afectan ni las funciones ni la supervivencia de la célula, por lo que son transmitidas a las generaciones siguientes. En este último caso, el embrión estará constituido de una mezcla (de proporciones variables) de dos o más estirpes celulares, lo que se denomina un **mosaico genético** (en referencia a la heterogeneidad de su constitución genética).

Las mutaciones no son siempre detectables en forma inmediata, por ejemplo si se presentan sobre genes que no forman parte (o dejaron de hacerlo) del repertorio de genes que se expresan en un determinado tejido, o si son mutaciones recesivas en estado de heterocigosis. Si la mutación aparece en un clon celular que contribuye con la formación de las gónadas, y por consecuencia de las gametas, aquella será transmitida a las generaciones siguientes y todas las células serán heterocigotas para la nueva mutación. En los adultos pueden presentarse mutaciones en aquellos tejidos con alto recambio (alta actividad mitótica), tales como la médula

ósea, el intestino, los bronquios y la piel. Muchas veces las mutaciones somáticas pueden provocar la transformación de las células en células tumorales, especialmente cuando afectan a oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN.

Podemos resumir diciendo que el evento mutacional es a la vez un fenómeno natural, universal, aleatorio e inevitable. Por el lado negativo, es la causa de las enfermedades hereditarias y el cáncer. Por el otro, las mutaciones favorecen la existencia de los **alelos** (formas alternativas de los genes), lo que permitió (indirectamente) el descubrimiento de las leyes que gobiernan la transmisión de los caracteres hereditarios y la aparición de una variada gama de modelos animales para enfermedades humanas (ver Capítulo IX). Con respecto a lo último, hay muchos casos donde el reconocimiento de un modelo murino homólogo a una enfermedad humana ha permitido progresos en el manejo de esa enfermedad. Por ejemplo, el descubrimiento de un modelo murino para la **alcaptonuria** y la localización del gen en el ratón han permitido la localización del gen homólogo en el hombre.

A medida que el conocimiento del genoma del hombre y los modelos animales se agrande (con la disponibilidad de sus secuencias completas), las perspectivas se presentarán aún más prometedoras. Por ejemplo, sería interesante investigar por qué una mutación ocurrida sobre el mismo gen de la distrofina tiene efectos tan diferentes en el ratón y en un niño afectado por la distrofia muscular de Duchenne. Como veremos más adelante, hay una necesidad imperiosa de generar nuevas mutaciones en el ratón con el objeto de poder evaluar la función de todos los genes y desarrollar nuevos modelos animales.

7.2. Los diferentes tipos de mutaciones

7.2.1 Mutaciones tradicionales versus mutaciones dirigidas

Las mutaciones identificadas hasta el momento en los roedores de laboratorio pueden ser de dos tipos:

- (i) Aquellas que aparecieron espontáneamente o después de un tratamiento mutagénico. Son alrededor de 1500 en el ratón, 200 en la rata, y no más de unas decenas en el hámster, el jerbo y el cobayo en conjunto. En la mayoría de los casos, estas mutaciones se traducen en un fenotipo patológico. A este tipo de mutaciones se las conoce como **mutaciones tradicionales**.
- (ii) Aquellas que resultan de la manipulación *in vitro* del genoma de **células embrionarias totipotentes (células ES, del inglés *embryonic stem cells*) por recombinación homóloga** (ver Capítulo VIII). A estas mutaciones se las denomina **mutaciones dirigidas** (del inglés *targeted mutations*), y son posibles, al momento de este escrito, sólo en el ratón. Actualmente son más numerosas que las mutaciones tradicionales y su número crece velozmente. Información detallada sobre muchas líneas de ratones mutantes se puede encontrar en In-

temet (<http://tbase.jax.org/>). A este acercamiento en el cual se producen alelos mutantes en genes conocidos se lo conoce en inglés como “*gene-driven mutagenesis*”, en oposición a la mutagénesis experimental en la cual genes desconocidos son identificados en base a cambios fenotípicos (“*phenotype-driven*”).

Las mutaciones tradicionales y las dirigidas se oponen en varios aspectos. Si bien un número constante de mutaciones tradicionales ha sido clonado por un enfoque posicional (*positional cloning*) en los últimos años, una gran parte es desconocida en términos moleculares. En la mayoría de los casos, las mutaciones tradicionales sirven para identificar nuevos genes, aunque son también fuente de nuevos alelos en loci ya conocidos. En cambio, las mutaciones dirigidas son bien conocidas en términos moleculares ya que se producen a partir de secuencias clonadas, pero, en general, no son fuente de identificación de nuevos genes.

Las mutaciones tradicionales tienen en general un fenotipo muy evidente, contrariamente a las mutaciones inducidas *in vitro*, que tienen a menudo un fenotipo “engañoso”; el mismo suele ser muy severo (lo que provoca la muerte del animal a un estadio muy precoz del desarrollo) o muy discreto (compatible con un desarrollo normal). En estas condiciones, las mutaciones tradicionales son *a priori* un mejor modelo para las patologías humanas que las mutaciones inducidas; aunque la descripción de nuevas técnicas de mutagénesis condicionadas al tejido y momento adecuados están cambiando el panorama (ver Capítulo VIII). Las mutaciones dirigidas, producidas por recombinación homóloga, conllevan la interrupción de una secuencia codificante y –comúnmente– generan genes que no son traducidos a proteínas (**alelos nulos**). Por el contrario, los mecanismos que generan las mutaciones tradicionales son muy numerosos, de origen diverso, y aportan mucha información sobre la estructura y los mecanismos de regulación de los genes en los mamíferos.

El **albinismo** es un ejemplo interesante de la variedad de las mutaciones tradicionales ya que existen alrededor de 100 alelos espontáneos y generados por radiación que presentan cambios sutiles en la molécula de la enzima **tirosinasa**. El albinismo en los roedores de laboratorio es equivalente al albinismo oculocutáneo tirosinasa negativo en los seres humanos, la forma más común de esta enfermedad autosómica recesiva. La tirosinasa es una enzima esencial para la producción de melanina a partir de tirosina, en particular los pasos de conversión hacia dihidroxi-fenil-alanina (DOPA) y DOPA-quinona. En los ratones, el alelo *himalayan* (*Tyr^{c-h}*) está asociado a una mutación sin sentido en el codón 422 que resulta en la producción de una enzima termo sensible con producción de melanina sólo en las regiones más frías del cuerpo, como las extremidades de las orejas y las patas (equivalente a la mutación presente en los gatos Siameses). Este es sólo un ejemplo de la sutileza de los cambios debidos a mutaciones que podemos encontrar en la función de una proteína. Otros alelos de la tirosinasa con un fenotipo particular son *extreme dilution* (*Tyr^{c-e}*), *chinchilla mottled* (*Tyr^{c-m}*), *platinum* (*Tyr^{c-p}*) y *ruby eyed dilute* (*Tyr^{c-r}*), entre otros.

Como veremos más adelante, muchas mutaciones generadas por agentes químicos son del tipo puntual (transiciones o transversiones de bases) y a veces no implican más que una pérdida parcial de la actividad de la proteína. De esta manera, el estudio molecular de mutaciones tradiciona-

les aporta casi siempre información original y transferible a la especie humana. Para una breve descripción de los mutantes más usados como modelo de enfermedades humanas, ver el Capítulo IX. Además, existe información sobre cientos de mutaciones espontáneas y dirigidas en el ratón en los siguientes sitios de Internet: <http://www.ornl.gov/TechResources/Trans/hmepg.html>; <http://www.jax.org/resources/documents/imr/> y <http://jaxmice.jax.org/jaxmicedb/html/models.shtml>.

7.2.2 Mutaciones puntuales y cromosómicas

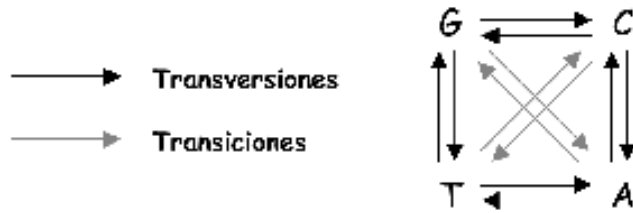
Teniendo en cuenta la naturaleza de la alteración a nivel del genoma, los genetistas clasificaron históricamente a las mutaciones en **puntuales** y **cromosómicas**. Las mutaciones cromosómicas eran aquellas detectables con la ayuda del microscopio óptico. Las mutaciones puntuales (o génicas) correspondían a una alteración que no era detectable por los medios habituales de observación de cromosomas. Esta subdivisión de las mutaciones se remonta a la época en la cual el microscopio óptico era el único medio disponible para visualizar algún cambio a nivel del material hereditario. Por lo tanto, las mutaciones indetectables por este simple análisis cromosómico (pero reconocidas como tal por su efecto), fueron designadas con el término general de mutaciones puntuales, en oposición a las visibles como rearrreglos cromosómicos. La noción de mutación puntual fue evolucionando con el tiempo y actualmente sabemos que comprende un ensamble de varios eventos diferentes a nivel del ADN. En algunos casos se trata de cambios muy simples, como el reemplazo de un nucleótido por otro (**sustituciones**), mientras que otras veces hay un corrimiento completo del marco de lectura sobre uno o varios exones, como consecuencia de deleciones o de intercalaciones de segmentos de ADN.

7.2.2.1 Sustituciones

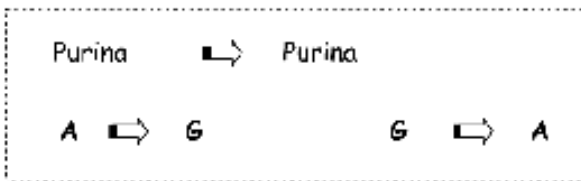
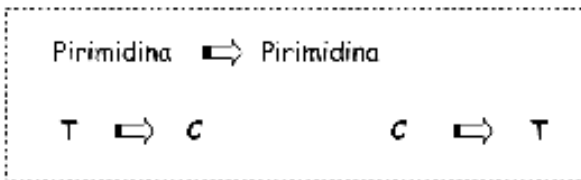
La sustitución de un nucleótido por otro puede ser diferenciada en dos clases de eventos. La **transición** es el reemplazo de una base pirimídica por otra base pirimídica o de una púrica por otra púrica. En cambio, la **transversión** es el reemplazo de una base pirimídica por una base púrica o viceversa (**Figura 7.1**).

Consideremos un triplete de ARNm, tal como UGC, que codifica normalmente para el aminoácido cisteína. Este triplete puede ser modificado de diferentes formas por sustitución de nucleótidos, pero analizaremos sólo las concernientes a la tercera base, la citosina. Si esta citosina es reemplazada por uracilo –la otra base pirimidílica del ARN– el triplete deviene en UGU. Esta transición no tiene ningún efecto sobre el producto del gen porque UGU, tanto como UGC, codifican para el aminoácido cisteína. Este tipo de mutación es llamada **silenciosa**.

En otro caso de transversión, si la citosina (base pirimídica) es reemplazada por una adenina (base púrica) se forma el codón UGA que es una de las señales de detención de la traducción, por lo tanto la cadena polipeptídica va a interrumpirse en forma prematura, generando una proteína trunca sin función biológica. Estas sustituciones se llaman mutaciones **sin sentido**



Transiciones



Transversiones

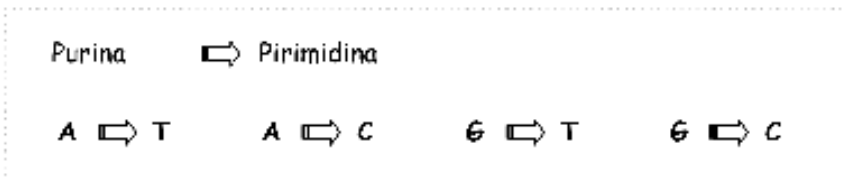
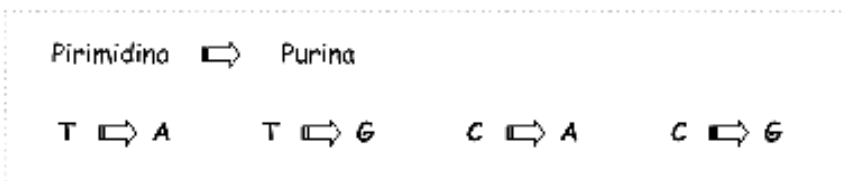


Figura 7.1 Las sustituciones. Las mutaciones por sustitución de nucleótidos pueden ser transiciones, cuando una base es reemplazada por otra base del mismo tipo, y transversiones, cuando una pirimidina es reemplazada por purina, o viceversa. En conjunto, hay cuatro transiciones y ocho transversiones posibles.

(del inglés *nonsense mutations*). Por ejemplo, si el gen afectado es la tirosinasa, la melanina no será elaborada y la coloración del animal portador de la mutación (en estado homocigota) estará suprimido, como es el caso ya visto del albinismo.

La última forma de modificar la "letra" final del codón UGC consiste en reemplazar la citosina por una guanina (transversión), formando el nuevo triplete UGG. En este caso, el cambio provoca la incorporación a la cadena polipeptídica de un aminoácido diferente (el triptofano en lugar de la cisteína) y las consecuencias son variadas, en función del sitio de la sustitución y los cambios en la estructura física de la proteína (por ejemplo la función biológica se verá mucho más afectada si la sustitución se produce cerca del sitio activo). Este tipo de sustitución se conoce como una mutación de **sentido erróneo** (del inglés *missense mutations*). En el caso de que no se modifique la función y sólo se alteren las características físico-químicas de la proteína, se genera una **aloproteína** (por ejemplo, las aloenzimas son variantes electroforéticas de una isoenzima). Las mutaciones que corren el marco de lectura de los codones en la molécula de ARNm son llamadas mutaciones por **corrimiento de lectura** (del inglés *frameshift mutations*) y se deben normalmente a sustituciones o a pequeñas deleciones.

Las mutaciones que provocan sustitución de aminoácidos en la cadena polipeptídica son muy frecuentes y representan lo que se ha convenido en llamar **polimorfismo bioquímico**. Se trata de mutaciones presentes en las poblaciones naturales y que juegan, quizás, un papel importante en la evolución. En el hombre, se conocen muchas mutaciones de este tipo y una gran parte de ellas está asociada a patologías hereditarias. Es el caso, por ejemplo, de la anemia falciforme, la cual resulta de una transversión A>T en el sexto codón del primer exón del gen de la β globina, lo que se traduce en la incorporación de una valina (GTG) en lugar de un ácido glutámico (GAG). En el ratón, se conocen también numerosos ejemplos, ya sea entre los genes de las globinas o cientos de otros genes en los cuales se han producido mutaciones inducidas por productos químicos mutágenos. Las sustituciones de bases que acabamos de ver se traducen en mutaciones que cambian la significación del mensaje codificado en los exones; pero existen también otras mutaciones puntuales que interfieren en la señal de comienzo de la transcripción (cajas TATA y CAAT) o los sitios de corte y empalme (*splicing*) del mensajero.

7.2.2.2 Deleciones e inserciones

Existen mutaciones que conllevan la deleción de un segmento de ADN de tamaño variable, desde algunas bases hasta cientos de kilobases. Es el caso de la mutación *mdx* (*Dmd^{Jmdx}*) en el ratón (réplica de la distrofia muscular de Duchenne en el hombre), en la cual una deleción provoca la transcripción de un mensajero anormal y, en definitiva, la falta de **distrofina**, una proteína importante para el funcionamiento del músculo. Como veremos más adelante, las mutaciones generadas por radiación X suelen comprender grandes deleciones, como es el caso de la mutación murina *nackt* (*Cts^{Inkt}*), donde el gen de la catepsina L (*Ctsl*) se encuentra anulado por una deleción que abarca dos exones.

Como hemos visto en el Capítulo I, el genoma de los mamíferos contiene miles de copias de distintos tipos de secuencias de ADN llamadas **retroposones** (en inglés, *retrotransposons* o *trans-*

posable elements). Estas secuencias son también una fuente de nuevas mutaciones por inserción. La inserción no es la única forma en la que los retroposones pueden causar mutaciones. Al encontrarse dispersos en miles de copias homólogas a lo largo del genoma, estas secuencias pueden favorecer fenómenos de recombinación con delección de segmentos de ADN.

Los retrovirus, en particular el de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), son capaces de provocar mutaciones intercalándose en un gen bajo la forma de un provirus (en inglés, *insertional mutagenesis*). Este descubrimiento fue realizado por primera vez en el ratón por los investigadores Nancy Jenkins y Neal Copeland (Estados Unidos), cuando determinaron que la mutación *dilute* (*Myo5a^d*) estaba asociada a la presencia en el ADN de un retrovirus. Este también es el caso de la mutación *hairless* (*hr*) asociada a una retrotransposición viral.

7.3. Las mutaciones espontáneas

7.3.1 Frecuencia de las mutaciones espontáneas

En la rata y el ratón, la frecuencia de las mutaciones espontáneas es bien conocida debido a la existencia de miles de animalarios (bioteros) que crían líneas consanguíneas. En estos sistemas de cría, el acoplamiento entre progenitores muy emparentados facilita la observación de fenotipos mutantes debido a las mayores posibilidades de que las mutaciones se encuentren en el estado homocigota. (Más allá de los ratones de laboratorio, se sabe de la existencia de ratones mutantes usados por sacerdotes chinos, mil años antes de Cristo.) En términos generales, se considera a la mutación como espontánea porque el evento que la originó es desconocido. La tasa de mutaciones espontáneas en el ratón es bien conocida debido a que ha sido utilizado por millones (durante muchos años) para estudiar los efectos de los agentes mutagénicos sobre el patrimonio hereditario. Se considera que la frecuencia de aparición de mutaciones espontáneas en el ratón es del orden de 5×10^{-6} por gameta y por generación, para las mutaciones recesivas, y de 2×10^{-7} por gameta y por generación, para las mutaciones dominantes.

Esta tasa puede ser calculada analizando (a escala molecular) el genoma de dos cepas consanguíneas que tengan ancestros comunes y que hayan divergido después de muchas generaciones de haber sido separadas (como sucede entre las sublíneas, ver Capítulo IV). El resultado de este cálculo es del mismo orden: 10^{-6} por generación. Dicho de otra forma, para un gen de tamaño mediano, podrá surgir una mutación espontánea cuando el gen se haya replicado 100.000 veces. En términos prácticos esto quiere decir que un ratón de entre 100.000 nacidos portará una mutación recesiva en un locus determinado. De todas formas, esta tasa debe ser considerada como un valor promedio ya que existen loci que mutan mucho más frecuentemente que otros, llamados en inglés *mutational hotspots*. Por ejemplo, los sitios del genoma

donde la citosina se encuentra metilada (alrededor del 1%) suelen ser muy mutables y la mutación suele ser una transición G-C → A-T. Esta alta tasa de mutaciones se observa con los loci *Agouti*, *hairless* y *Kit* (*Dominant White Spotting* o *W*), entre otros. En el caso de la mutación *W*, el locus *Kit* presenta una tasa de mutación 10 veces más elevada que el promedio.

7.3.2 Identificación de las mutaciones en los animalarios

En las instalaciones de cría de roedores de laboratorio existen dos condiciones que favorecen el descubrimiento de animales mutantes. Por un lado, la cría de roedores con sistemas de apareamiento consanguíneo y, por el otro, la observación diaria y atenta de los animales por parte de los técnicos e investigadores. En ciertos casos, la modificación del fenotipo puede ser muy sutil y pasar desapercibida a la observación simple. En general, los mutantes son identificados en dos etapas: primero, la observación de un fenotipo anormal que no corresponde al estándar de la línea consanguínea (animal **fenodeviante**), y segundo la confirmación de que la anomalía es hereditaria.

A la hora de estudiar un fenotipo mutante, es importante tener en cuenta dos aspectos básicos de las mutaciones: la **penetrancia** y la **expresividad**. Es muy común observar, según las líneas consanguíneas (o individuos), que un mismo genotipo presenta una expresión fenotípica de intensidad variable. En el ratón, la mutación *brachyury* (*T*), letal en estado homocigota pero que causa acortamiento de la longitud de la cola en los portadores heterocigotas, es una buena demostración de este fenómeno. La longitud de la cola varía de un ratón heterocigota a otro, yendo desde una cola casi normal hasta prácticamente la ausencia de cola. La expresividad tiene en cuenta la intensidad de la expresión de un fenotipo a nivel individual y depende de los otros genes contenidos en el genoma (**genes modificadores**) y también de efectos ambientales. En el caso de la mutación *brachyury* la expresividad es extremadamente variable (**Figura 7.2**).

Por otro lado, la penetrancia de un gen mide el porcentaje de portadores que expresa el fenotipo mutante. En algunos casos, como las mutaciones *nude* y *hairless*, el 100% de los animales que son homocigotas para la mutación expresan el fenotipo sin pelo, en este caso se habla de **penetrancia completa** o total. Otras mutaciones, en cambio, pueden presentar animales que a pesar de portar la mutación no expresan el fenotipo, como sucede con algunos ratones SCID (*scid/scid*) que escapan al fenotipo clásico, representado por la ausencia de linfocitos B y T maduros (fenómeno conocido en inglés como *leaky phenotype*).

Determinación de la base genética de un fenotipo mutante

Ante el hallazgo de un fenotipo anormal surgen tres preguntas fundamentales: (i) ¿Está este rasgo determinado genéticamente? (ii) ¿Es un carácter genético simple (monogénico) o complejo (poligénico)? (iii) ¿Es un nuevo alelo de una mutación ya descrita?

Existen varias formas de confirmar que el nuevo carácter es hereditario:

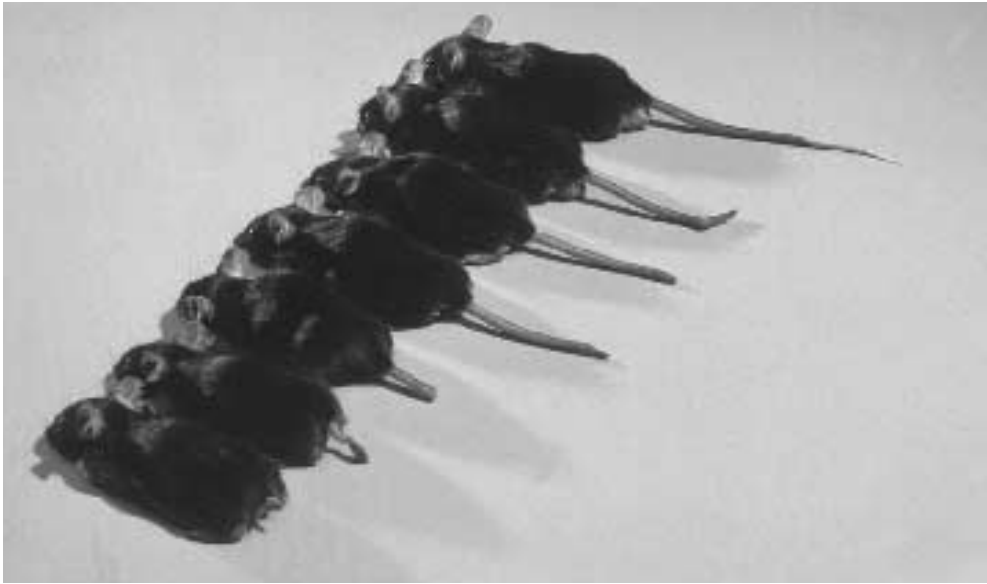
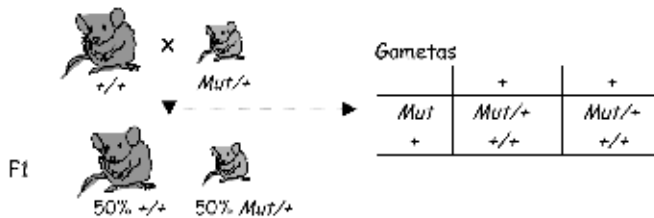


Figura 7.2 La expresividad de las mutaciones. Dos ejemplos de variabilidad en la expresión son las viejas mutaciones *brachyury* y *piebald*. La mutación semidominante *brachyury* (*T*) es letal en estado homocigota pero causa acortamiento de la longitud de la cola en los heterocigotas. La longitud de la cola varía de un ratón a otro, desde una cola casi normal hasta la casi ausencia de cola. La foto de arriba muestra la variabilidad en la intensidad de la expresión del fenotipo a nivel individual en ratones heterocigotas *T/+*. El otro ejemplo es la mutación *piebald* (ahora *Ednrb*). La foto de abajo muestra la variabilidad en el tamaño de las áreas blancas (ausencia de melanocitos) en ratones homocigotas *Ednrb/Ednrb*; dicho tamaño está influenciado por diferentes genes modificadores. Fotos Jean-Louis Guénet, *Unité de Génétique des Mammifères, Institut Pasteur, París, Francia.*

Primero, acoplando el supuesto mutante (si es fértil), con animales normales –no emparentados– para analizar su descendencia. Los resultados posibles son :

- (i) Si en las crías de esta cruce encontramos animales mutantes (portando la misma anomalía) en una proporción cercana al 50% y el resto de aspecto normal, esto quiere decir que la mutación es **dominante** (el alelo mutante se expresa igual, más allá de la naturaleza del otro alelo). El símbolo del alelo mutante se deberá escribir en cursiva y con la letra inicial en mayúscula, por ejemplo *Mut* (por mutante), y el alelo normal o salvaje (del inglés, *wild type*) se simboliza con el signo “+” (**Figura 7.3**). En la práctica, la gran mayoría de los animales *Mut/Mut* mueren antes de nacer y se conocen muy pocas mutaciones estrictamente dominantes, en el sentido de que no se pueda distinguir los animales de genotipo *Mut/Mut* de aquellos *Mut/+*. Además, muchas mutaciones dominantes tienen fenotipos muy sutiles y con grandes variaciones en la expresividad. Los ejemplos más destacados son las mutaciones *Caracul* (*Ca*), cromosoma 15, *Rex* (*Re*), cromosoma 11, y *Trembler* (*Tr*) también en el cromosoma 11 (ahora *Pmp22^{Tr}*, del inglés *peripheral myelin protein, 22 kDa*).

A. Mutaciones Dominantes



B. Mutaciones Recesivas

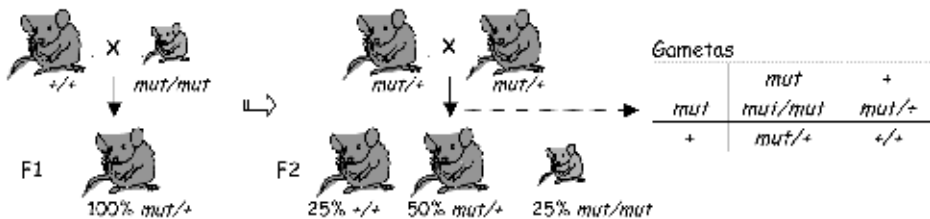


Figura 7.3 Determinación de la base genética de un fenotipo mutante. Si la mutación es dominante (**A**), al cruzar un ratón afectado con uno normal (no relacionado), el 50% de las crías será mutante y el otro 50% normal. Si todos los individuos F1 resultantes de la cruce propuesta son de fenotipo normal quiere decir que la mutación (de existir) es recesiva (**B**). Para demostrarlo debemos cruzar los animales F1 entre sí para obtener la generación F2: si la mutación es recesiva, el 25% será mutante (mut/mut) y el 75% normal (50% $mut/+$ y 25% $+/+$).

- (ii) Si todos los individuos F_1 resultantes de la cruce propuesta son de fenotipo normal quiere decir que la mutación (de existir) será **recesiva** (los efectos fenotípicos del alelo mutante son suprimidos por la presencia del alelo normal). En este caso el símbolo del alelo mutante deberá expresarse en cursiva y minúscula, por ejemplo *mut*. Para demostrar esto debemos cruzar los animales F_1 entre sí (intercruza $F_1 \times F_1$) para obtener la generación F_2 . Podemos confirmar que la mutación es recesiva si entre los animales F_2 obtenemos un 25% de mutantes (*mut/mut*) y un 75% de normales (*+/+* y *+/mut*) (**Figura 7.3**).
- (iii) Un último resultado posible puede darse cuando, siendo el animal afectado un macho, observamos que en la F_1 todos los animales son normales. Los machos F_1 reciben el cromosoma Y del padre (ratón mutante) y un cromosoma X normal de la madre (ratón normal); las hembras F_1 reciben el cromosoma X mutado del padre y uno normal de la madre, por lo tanto, el 100% de las hembras será portadora. En la F_2 (luego de cruzar los F_1 entre sí), sólo el 50% de los machos presenta de nuevo la mutación. En este caso, la mutación es recesiva y **ligada al sexo** (portada por el cromosoma X). En el caso de una mutación dominante ligada al sexo, todas las hembras F_1 serán mutadas (por recibir el cromosoma X mutado del padre) y los machos normales. En la generación F_2 , el 50% de los machos y el 50% de las hembras presentarán de nuevo la mutación.

Es necesario resaltar que estos cálculos son teóricos y en realidad, dentro de las pocas mutaciones ligadas al sexo que encontramos en el ratón, las cruces se suceden de otra forma. Esto es debido a que la transmisión de las mutaciones ligadas al cromosoma X es bastante compleja y muchas veces depende del sentido de los cruzamientos. Tomemos como ejemplo la mutación espontánea semidominante *Tabby* (*Ta*), gen *Eda* (*ectodysplasin-A*) (ahora *Eda^{Ta}*), de la cual existen alrededor de 20 alelos mutantes surgidos en forma independiente. Los machos *Tabby* (hemicigotas *Ta/Y*) y las hembras heterocigotas (*Ta/+*) se reproducen normalmente, pero no así las hembras homocigotas (*Ta/Ta*) que suelen ser infértiles. Los machos hemicigotas y las hembras homocigotas comparten el mismo fenotipo, caracterizado por la ausencia de pelos *guard* y *zigzag*, zonas de alopecia detrás de las orejas y defectos en la cola y los dientes. Las hembras heterocigotas se reconocen fácilmente (en particular sobre fondo agutí) por su pelaje característico con bandas transversales de color oscuro. Si cruzamos una hembra rayada (*Ta/+*) con un macho normal (*+/Y*), obtendremos hembras rayadas (*Ta/+*) y normales (*+/+*), así como machos mutantes hemicigotas (*Ta/Y*) y normales (*+/Y*).

Segundo, se pueden acoplar (si están disponibles) los padres del supuesto mutante con animales normales (no emparentados) para luego cruzar las crías F_1 entre sí. Esto es esencial cuando los animales portadores de la anomalía (supuesta mutación) son infértiles o mueren al destete antes de la madurez sexual. Si encontramos animales mutantes en la descendencia, quiere decir que la mutación es dominante pero que el progenitor que está transmitiendo el alelo mutante no porta la mutación en forma somática (por eso su fenotipo es normal), sino que posee una gónada mosaico, con células mutantes y células normales. En este caso, la mutación no podrá ser conservada por los métodos clásicos de cría.

Finalmente, se puede cruzar (entre sí) a los padres del supuesto mutante para ver si vuelven a tener otra cría con el mismo defecto, e involucrar en los cruzamientos a los hermanos del mutante. En el caso que ninguno de los cruzamientos anteriores nos dé información útil, sólo queda cruzar de diversas formas el núcleo original donde apareció el mutante; es decir, hermano x hermana, padre x hija, madre x hijo, etcétera. Al obtener algún individuo mutante entre las crías estaríamos confirmando que se trata de una mutación recesiva.

Con respecto a la determinación de la base genética de las mutaciones, es importante tener presente la existencia de animales denominados **fenocopia**. Se habla de fenocopia cuando un individuo simula una mutación pero no posee la misma información genética (genotipo). Por ejemplo, si a un ratón normal se le administra **aloxano**, éste destruye las células pancreáticas y produce diabetes, por lo que siendo genéticamente normal es una fenocopia de los ratones genéticamente diabéticos.

7.3.3 El vacío fenotípico (Phenotype Gap)

Con la disponibilidad de las secuencias completas de los genomas de organismos eucariotas (ver Capítulo VI), ha nacido una nueva era denominada **post-genómica** cuyo énfasis está puesto en el estudio sistemático de la función de los genes. Una de las rutas hacia ese estudio sistemático es a través del análisis y la generación de nuevos mutantes. Aunque a primera vista pudiera parecer que existen suficientes ratones mutantes, sólo existen mutaciones para una fracción mínima del total de genes de los mamíferos (alrededor del 10%), hecho que se conoce como "**vacío fenotípico**" (del inglés *phenotype gap*). Por ejemplo, el modelo murino de la alcaptonuria, enfermedad humana autosómica recesiva descubierta a principios del siglo XX por Archibald Garrod, fue descubierto recién 90 años más tarde. Este descubrimiento fue realizado, al azar, en el *Institut Pasteur*, debido a que los ratones homocigotas para la mutación *aku* (gen *Hgd*, ahora *Hgd^{aku}*) ennegrecían la viruta con su orina (ver Capítulo IX). La alcaptonuria es un desorden del metabolismo de la tirosina como resultado de un defecto en la enzima oxidasa del ácido homogentísico. Este ácido es excretado en la orina y se vuelve de color negro con la exposición al aire.

Tal es la importancia de descubrir nuevas mutaciones que, en el ratón, existen varios proyectos internacionales abocados a la búsqueda de fenotipos mutantes, espontáneos e inducidos por mutágenos químicos o manipulación genética. Como veremos más adelante, a la cabeza de estos proyectos se encuentran varios grupos trabajando exclusivamente en la generación de mutantes por mutagénesis química. Por otro lado, en el *Jackson Laboratory* (Estados Unidos) existen proyectos como el *Mouse Mutant Resource* (MMR) y el *Induced Mutant Resource* (IMR) que cuentan con una producción anual de tres millones de ratones (ver <http://www.jax.org/resources/documents/imr/>). Más allá del sistema utilizado, debido a la baja saturación de mutaciones en el genoma del ratón, la gran mayoría de las mutaciones inducidas se produce sobre nuevos loci. Recordar que la característica más importante de las mutaciones es que se transmiten genéticamente y, por lo tanto, pueden ser propagadas y mantenidas a lo largo del tiempo. Por más valiosa que sea una nueva mutación será inútil si no está disponible para los investigadores.

Los programas de descubrimiento y caracterización de nuevas mutaciones se ocupan de identificar nuevos mutantes que puedan tener alguna importancia en el área biomédica. Cada animal que presenta un nuevo fenotipo mutante es cruzado con una línea consanguínea no relacionada para determinar si esa característica es transmitida a la descendencia, y de qué manera lo hace. A su vez, cada nueva mutación es evaluada para detectar un posible alelismo con mutaciones ya descritas y de fenotipo similar. Finalmente, se realiza la caracterización básica de los animales mutantes que incluye la búsqueda de defectos anatómicos (en la observación grosera y en la necropsia), el análisis histopatológico de todos los tejidos y los estudios bioquímicos de sangre y orina. Luego son derivados a los distintos especialistas en inmunología, endocrinología, desarrollo embrionario, reproducción y neurología, entre otros.

7.4. Los agentes mutágenos

Junto con la toma de conciencia del peligro que representa la polución ambiental sobre la salud pública, en especial sus efectos cancerígenos, se ha incorporado la noción de **agente mutágeno**. En realidad, hace muchos años que los investigadores tratan de identificar agentes, o sustancias, capaces de aumentar la frecuencia de las mutaciones espontáneas, casi desde que se comenzó a trabajar en genética experimental. El ratón ha sido muy utilizado en los estudios concernientes a evaluar el riesgo de la utilización de la energía nuclear. Por un lado, William Russell y su esposa, L. B. Russell, en *Oak Ridge Laboratories* de Estados Unidos; y por el otro Mary F. Lyon, Bruce M. Cattanaach y A. G. Searle en *Harwell*, Inglaterra, han consagrado la mayor parte de sus carreras a este tipo de investigaciones. Además de las radiaciones y los agentes químicos, debemos tener en cuenta aquellos virus capaces de generar mutagénesis por inserción.

Actualmente, muchos fenómenos relacionados a la mutagénesis han sido aclarados y sabemos, en particular, que la mayor parte de las radiaciones y muchos agentes químicos son capaces de inducir mutaciones sobre el genoma de los mamíferos con una eficacia variable. Hoy en día, los genetistas han ideado herramientas muy útiles para evaluar la actividad mutagénica de un compuesto por medio del uso de ratones transgénicos. Estos valiosos modelos son los ratones *BigBlue* y *MutaMouse*, ambos transgénicos para genes reporteros de origen bacteriano. El primer modelo porta copias del gen *lacI* y el segundo del gen *lacZ*, en ambos casos dentro de un vector viral (bacteriófago lambda). El método de detección de mutaciones es muy sencillo y se realiza por medio de métodos colorimétricos en placas de cultivo (para más detalles ver <http://eden.ceh.uvic.ca/intro.htm>). Estos modelos murinos pueden ser empleados para evaluar la toxicidad genética o la tasa de mutaciones *in vivo*.

7.4.1 Las radiaciones

Las investigaciones sobre las radiaciones han acaparado la atención de los científicos desde fines del siglo XIX. La primera evidencia de que un agente externo podía aumentar el número

de mutaciones fue aportada en 1927 por Hermann Müller, quien demostró los efectos mutagénicos de los rayos X en la mosca de la fruta (*Drosophila*), trabajos por los que fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1946.

Todas las radiaciones pueden ser agentes mutagénicos a condición de que tengan energía suficiente para entrar en contacto con el ADN. Los rayos cósmicos que llegan del espacio, formados por una mezcla de protones y de fotones de muy alta energía, son responsables de muchas mutaciones de las que denominamos “espontáneas”. Tanto la luz ultravioleta (UV) como las radiaciones ionizantes se han utilizado en estudios de mutagénesis en bacterias; aunque los mecanismos de mutagénesis son bastante diferentes para cada tipo de radiación.

Uno de los agentes mutagénicos más efectivos en bacterias es la radiación UV de longitud de onda corta. La longitud de onda efectiva para la mutagénesis está comprendida entre los 200 y 300 nm. El mecanismo más importante de la acción de la luz UV es la formación de dímeros (timina-timina; timina-citosina; citosina-citosina) entre pirimidinas adyacentes, lo que incrementa enormemente la probabilidad de que durante la replicación, la polimerasa de ADN inserte un nucleótido incorrecto. En los mamíferos, los rayos UV son sólo mutagénicos sobre las células de la epidermis (jugando un rol fundamental en la aparición de melanomas) ya que su energía es demasiado baja como para afectar las gónadas y las células germinales, por lo tanto no es usado como mutágeno en animales de laboratorio. En humanos, la enfermedad **xeroderma pigmentosum** es el resultado de un defecto en los sistemas de reparación de los daños por radiación UV (los ratones KO para los genes *Xpa* y *Xpc* son un excelente modelo animal de esta enfermedad).

Las radiaciones ionizantes son formas de radiación más potente, e incluyen rayos de longitud de onda corta, como los rayos X, emisiones de elementos radioactivos (partículas α y β), y rayos γ . Estas radiaciones causan la ionización del agua y de otras sustancias; produciéndose indirectamente efectos mutagénicos debido a esta ionización. Entre los derivados químicos formados por la radiación ionizante se encuentran los radicales libres, siendo el más importante el radical hidroxilo (OH^\cdot). Los radicales libres reaccionan en la célula con macromoléculas, como el ADN, y las alteran produciendo rupturas que dan lugar a rearreglos cromosómicos. Al contrario que la radiación UV, la radiación ionizante penetra más fácilmente el vidrio y otros materiales. Por esta razón, las radiaciones ionizantes se usan con frecuencia para inducir mutaciones en animales de laboratorio, ya que su poder de penetración les permite alcanzar con facilidad las células germinales.

Experimentalmente, en el ratón, se han realizado muchos ensayos sobre los efectos mutagénicos de las radiaciones, en particular con el propósito de crear **complejos de delección** (del inglés *deletion complexes*) alrededor de ciertos loci. También se están realizando delecciones por radiación en células embrionarias (células ES) con el objetivo de crear una colección de ratones portando delecciones en zonas específicas, abarcando todos los cromosomas. Un ejemplo de este acercamiento es el *DelBank™ Resource* en el *Jackson Laboratory*, Estados Unidos (<http://www.jax.org/~jcs/Delbank.html>).

En forma general, podemos considerar que la tasa de mutaciones inducidas depende de la dosis de radiación (medida normalmente en una escala lineal de 0 a 7 Grays) y de la frecuencia de aplicación. Por ejemplo, el efecto mutágeno es mucho más perjudicial si una misma dosis de radiación es administrada todo en una sola vez (por ejemplo 7 Grays en un minuto) que si se administra a lo largo del tiempo (por ejemplo 7 Grays en 10 días). Esto es debido a que, en el primer caso, los mecanismos de reparación del ADN se encuentran saturados. A su vez, los tejidos irradiados serán más o menos sensibles según su tasa de replicación. En los machos, las gónadas están en perpetua actividad mitótica, desde la vida uterina hasta la muerte, en cambio, en las hembras las células sexuales están en reposo desde el nacimiento y entran en actividad recién en la pubertad, donde comenzarán a activarse en forma cíclica.

Por otro lado, si bien todas las células sexuales son sensibles a las radiaciones, las células en estado haploide (pos-meióticas, como los espermatozoides) carecen de los mecanismos de reparación de lesiones y de contraselección que poseen las células diploides (pre-meióticas, como las espermatogonias). Sin embargo, las mutaciones provocadas sobre las espermatogonias serán permanentes, ya que se trata de las células germinales de la espermatogénesis, y darán origen a muchas gametas mutantes. Las radiaciones pueden producir mutaciones puntuales y rearrreglos cromosómicos tanto en las espermatogonias como en los espermatozoides. En las espermatogonias los rearrreglos cromosómicos suelen ser fuertemente contraseleccionados por lo que sólo las mutaciones puntuales pasan a la descendencia. En el ratón de laboratorio, podemos considerar que una radiación γ aplicada sobre las espermatogonias en dos dosis de 5 Grays (distribuidas en salidas de 0,5 a 1 Gray por minuto), a un intervalo de 24 horas, producirá cuatro veces más mutaciones que las que se producirían en forma espontánea.

7.4.2 Los agentes químicos

La genetista escocesa Charlotte Auerbach fue la primera en demostrar, en la década de 1960, el peligro que representaba la utilización de un agente químico (el "gas mostaza") para las personas, debido a su fuerte actividad mutagénica. Hoy en día, se conocen varios productos químicos que son mutagénicos, clasificándose según su modo de acción en: (i) **análogos de bases**, (ii) **agentes intercalantes**, y (iii) **agentes que reaccionan con el ADN**.

Debido a su similitud estructural, los análogos de bases se incorporan en el ADN (durante la replicación) en lugar de las bases correspondientes. Cuando uno de estos análogos de bases se incorpora en el ADN, la replicación puede ocurrir normalmente aunque ocasionalmente, ocurren errores de lectura que resultan en la incorporación de bases erróneas. La **6-amino purina** es un ejemplo de análogo de base que se incorpora en el ADN en lugar de las bases "oficiales" (A, T, G y C), lo que provoca transversiones o transiciones en las futuras replications del ADN. Estas sustancias son menos mutagénicas en los mamíferos que en las bacterias (donde fueron evaluadas originalmente) porque los nucleótidos son sintetizados de manera diferente en los vertebrados.

Los agentes intercalantes son moléculas planas que se insertan entre dos pares de bases del ADN, separándolas entre sí. Durante la replicación, esta conformación anormal puede conducir a microinserciones o microdelecciones, originando mutaciones por corrimiento de lectura. Dentro de los agentes intercalantes encontramos el **naranja de acridina**, el **bromuro de etidio** y la **proflavina**.

Existe una serie de agentes químicos que reaccionan directamente con el ADN que no se está replicando, ocasionando cambios químicos en las bases al momento de la replicación. Entre ellos encontramos al ácido nitroso (HNO_2), la hidroxilamina (NH_2OH) y los **agentes alquilantes**. En los mamíferos, los agentes alquilantes -donde se encuentra clasificado el gas mostaza- son los agentes más peligrosos y pueden incluso formar parte de la contaminación ambiental. Se trata de sustancias que fijan los radicales metilo (CH_3) o etilo (C_2H_5) sobre las bases nitrogenadas que componen el ADN. La presencia de esos radicales metilo suplementarios, si no es reparado por las enzimas, provoca cambios de bases del tipo transversión o transición. Los agentes alquilantes utilizados incluyen el etil metano sulfonato (EMS) -muy usado en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*-, metil metano sulfonato (MMS), N-metil N-nitroso urea (MNU) y N-etil N-nitroso urea (ENU), este último usado comúnmente en el pez cebra y el ratón. Debido a su importancia como inductor de mutaciones puntuales en diversos programas de mutagénesis del ratón, lo veremos un poco más en detalle.

Mutagénesis por N-etil N-nitrosourea (ENU)

La observación realizada por William Russell y sus colaboradores acerca del poder mutágeno del ENU puede considerarse hoy en día como un hito en la historia de la genética del ratón. El agente químico ENU es un verdadero "supermutágeno" y ha probado ser muy efectivo en varios organismos, incluido el ratón. Las líneas consanguíneas más empleadas históricamente (por ser resistentes al tratamiento con ENU) han sido BTBR/Pas (una de las más resistentes), C57BL/6J, BALB/c, y C3H, lo que implica que la susceptibilidad al ENU estaría controlada genéticamente. La tasa de mutaciones inducidas por una dosis única de 250 mg/kg. de ENU es del orden de $1,5 \times 10^{-3}$ por locus y por gameta (la tasa de mutación más alta jamás reportada para un agente químico), lo que quiere decir que se espera descubrir, en promedio, una mutación por cada 700 loci, en cada gameta. Bajos los efectos del ENU, la tasa de mutaciones se eleva, aproximadamente, 120 veces con respecto a la tasa de mutaciones espontáneas. Siendo que este poderoso mutágeno actúa totalmente al azar, es lógico esperar muchas mutaciones diferentes e incluso varios alelos de una misma mutación. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones inducidas por ENU hasta el momento han sido localizadas en las regiones codificantes (mutaciones de sentido erróneo y sin sentido) o sitios de *splicing* de los genes, pero pocas en las regiones reguladoras (seguramente porque se conoce muy poco sobre estas regiones).

La gran experiencia previa indica que, en la mayoría de los casos, las mutaciones inducidas identifican "nuevos loci" más que producir "nuevos alelos" en loci ya conocidos; aunque con protocolos específicos, se pueden crear series de alelos en un mismo locus. La disponibilidad de formas alternativas de un gen (por ejemplo, alelos **hipomórficos** con funcionalidad reducida) pue-

de dar datos muy útiles sobre las funciones del gen de interés. Por ejemplo, la mutación *eed* (alelo nulo) causa la muerte temprana del embrión en estado homocigota; pero la disponibilidad de un alelo hipomórfico (generado por ENU) permitió la supervivencia del embrión por más tiempo, aportando datos sobre sus funciones como regulador de **genes homeóticos**. Otro ejemplo de mutación inducida por ENU es *ferrochelataza deficiencia* (*Fech^{m1Pas}*), donde los ratones homocigotas sufren de **protoporfiria eritropoyética** (modelo de la deficiencia de **ferroquelatasa** en los humanos). Estos ratones enferman porque la actividad de la enzima mutante está reducida a un 3% del nivel normal, pero sobreviven lo suficiente para ser usados como modelo. Un alelo nulo del mismo gen sería, probablemente, incompatible con la vida.

Teniendo en cuenta la importancia del ratón como sistema modelo para el análisis de la funcionalidad del genoma y la necesidad de aumentar el número de mutaciones existentes (vacío fenotípico), se están llevando a cabo varios programas de mutagénesis química por ENU. La mayoría de estos programas son destinados a detectar mutaciones dominantes, y en menor medida a detectar mutaciones con efecto cuantitativo y mutaciones recesivas localizadas sobre una región específica del genoma. Entre los más destacados se encuentran: (i) *ENU Mutagenesis Programme*, Inglaterra (<http://www.mgc.har.mrc.ac.uk/mutabase/>), (ii) *The ENU-Mouse Mutagenesis Screen Project*, Alemania (<http://www.gsf.de/isg/groups/enu-mouse.html>), (iii) *The Neuroscience Mutagenesis Facility at The Jackson Laboratory*, Estados Unidos (<http://www.jax.org/nmf/>), (iv) *The Tennessee Mouse Genome Consortium*, Estados Unidos (<http://tnmouse.org>), (v) *Baylor College of Medicine Mouse Genome Project*, Estados Unidos (<http://www.mouse-genome.bcm.tmc.edu/ENU/MutagenesisProj.asp>) y (vi) *Centre for Modeling Human Disease (CMHD)*, Canadá (<http://www.cmhd.ca/>).

En el año 2000 fueron publicados en la revista *Nature Genetics* los primeros balances de los programas europeos de mutagénesis orientados hacia la búsqueda de fenotipos (en inglés, *phenotype-driven mutagenesis*). El grupo alemán recuperó 182 ratones mutantes con una gran variedad de fenotipos, luego de evaluar alrededor de 14.000 ratones por la presencia de mutaciones dominantes, y en menor medida, recesivas. Por su lado, el programa centralizado en Inglaterra publicó el hallazgo de 500 nuevas mutaciones dominantes, luego de evaluar 26.000 ratones híbridos (C3HxBALB/c)F1 (un promedio del 2% de recuperación de mutaciones dominantes) con el protocolo conocido como SHIRPA (*SmithKline, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment*). Este protocolo es una herramienta esencial de la evaluación fenotípica, que comprende el uso de alrededor de 40 ensayos diseñados para detectar mutantes en distintas áreas. Una parte de estas nuevas mutaciones ya ha sido mapeada por medio del uso de retrocruzamientos. Todos los datos de este programa de mutagénesis están archivados en la base de datos *Mutabase* (<http://www.mgc.har.mrc.ac.uk/mutabase/>).

Un programa ideal de mutagénesis en el ratón (por ser muy eficaz) se desarrolla, esencialmente, en las siguientes etapas:

Primer etapa (mutagénesis):

- (i) Machos BALB/c (o C3H) de 8 a 10 semanas de edad reciben, ya sea una dosis única de 250 mg/kg. de ENU, o cuatro dosis de 100 mg/kg., a intervalos semanales.

- (ii) Después de 13 semanas de reposo necesario para el retorno de la fertilidad (la ENU actúa sobre las espermatogonias produciendo una azoospermia transitoria), los animales son acoplados con hembras de otra línea consanguínea no albina (normalmente C3H en el caso de haber mutagenizado machos BALB/c), para producir animales F1. En este paso, pueden usarse también cruza con hembras BALB/c, con la ventaja de que, al aparecer una mutación, se formará una línea congénica de BALB/c (ver Capítulo IV). Esta progenie F1 es evaluada con diversos protocolos en busca de mutaciones dominantes.
- (iii) Los F1 son acoplados de nuevo con ratones de las líneas parentales (retrocruza), para rescatar sólo las hembras (N2).
- (iv) Las hembras N2 serán retrocruzadas con machos híbridos (C3HxBALB/c)F1 y se examinará la progenie correspondiente, en búsqueda de mutaciones recesivas.

Este protocolo experimental es el resultado de una larga experiencia sobre el tema que establece que los machos BALB/c son los únicos capaces de resistir una dosis grande del mutágeno y, simultáneamente, de recuperar la fertilidad. La elección de la línea C3H como *partenaire* es sólo para evitar que los animales descendientes de los BALB/c "mutagenizados" sean albinos, permitiendo así identificar eventuales mutaciones que afecten el color del pelaje.

Segunda etapa (búsqueda de fenotipos mutantes):

Todos los animales F1 son examinados periódicamente en forma muy cuidadosa, para hacer posible el hallazgo de mutaciones dominantes. Todos los descendientes de la cruce entre los machos F1 y las hembras N2 son también examinados con el mismo cuidado. Si bien no es el objetivo de este capítulo detallar todos los pasos a seguir en esta etapa, las partes más importantes del examen son: examen general al destete y al sexado; destete y aislamiento en cajas individuales por 8 semanas; examen de los miembros y de la cola al nacimiento y al día 12; examen de los ojos al tiempo de apertura de los párpados (día 12-13); seguimiento de las curvas de peso con respecto a sus compañeros de camada; análisis de la postura y la marcha a los 30-35 días de edad; examen de la pigmentación, piel y faneras; examen del color y la consistencia de las heces a los 15 días; toma de muestra de sangre y orina para exámenes bioquímicos. Todos los animales que presenten fenotipos aberrantes serán objeto de un examen posterior mucho más profundo. Se considera que casi el 90% de las mutaciones conocidas hasta el momento en el ratón han sido detectadas siguiendo este mismo protocolo (**Figura 7.4**). Los detalles de la evaluación de mutaciones en el ratón (extensivo a otros roedores) pueden encontrarse en el libro de Sundberg y Boggess (2000), *Systematic Approach to Evaluation of Mouse Mutations*.

Tercera etapa (localización genética):

Una vez que una mutación ha sido bien definida, el locus mutante debe ser localizado genéticamente, o identificado como un nuevo alelo de una mutación conocida (**prueba de**

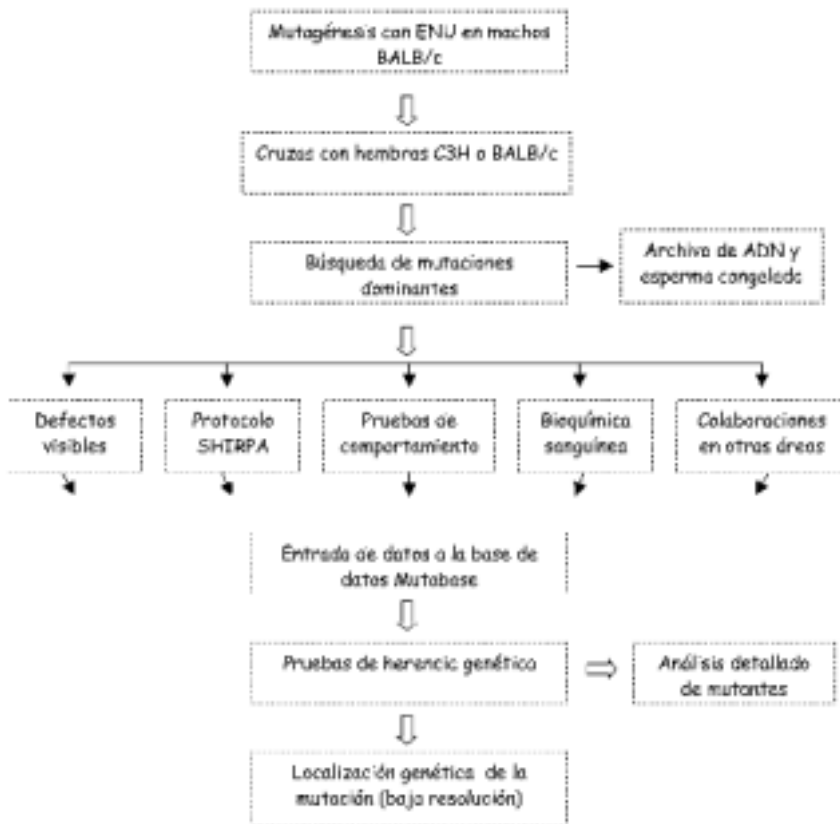


Figura 7.4 Esquema del programa de mutagénesis del ENU *Mutagenesis Programme* (Inglaterra). Los ratones BALB/c (machos, 10 semanas de edad) son inyectados con dos dosis de 100 mg/kg de ENU (intraperitoneal). Luego de un período de descanso donde recuperan la fertilidad, los machos son cruzados con hembras C3H. Los híbridos F1 son evaluados por la presencia de mutaciones dominantes usando una batería de ensayos, entre los que se encuentra el protocolo SHIRPA. Este protocolo incluye 40 ensayos que se aplican a las cinco semanas de vida. Una vez comprobado el carácter heredable del fenotipo anormal, se realiza la localización del gen responsable en una retrocruza.

alelismo). La localización genética consiste en el análisis de las muestras de ADN de una cruce adecuada (retrocruza o intercruza F2) con marcadores polimórficos repartidos regularmente a lo largo del genoma, para evaluar la presencia de un ligamiento genético (ver Capítulo VI).

La posibilidad de inducir mutaciones por agentes químicos en el ratón presenta también ventajas que no encontramos en las mutaciones inducidas por manipulación *in vitro*. Por ejemplo, una vez que existe un primer alelo mutante es posible obtener una serie de ellos por mutagénesis química. Verne M. Chapman, del *Roswell Park Memorial Institute*, Estados Unidos, ha producido (por mutagénesis con ENU) cuatro alelos suplementarios del gen *Dmd* (gen de la

distrofina, homólogo del gen humano *DMD*) y ha demostrado que cada uno de esos alelos afecta dominios diferentes de la proteína, dando fenotipos levemente diferentes. El análisis de estas variantes alélicas permitió un mejor conocimiento de las funciones del gen *Dmd*. Otro acercamiento a la mutagénesis experimental en el ratón es el uso del agente mutagénico EMS para generar mutaciones en cultivos de células ES. Luego de aislar los clones mutados, se pueden generar **ratones quimeras** (por inyección de blastocitos) que conlleven esa mutación en la línea germinal (del inglés *germline chimaeras*) y puedan, a su vez, pasarla a la descendencia.

Las mutaciones espontáneas y los rearreglos cromosómicos inducidos por agentes mutagénicos han probado ser herramientas útiles para lograr el acceso molecular inicial hacia muchos genes no clonados, e incluso regiones enteras de un cromosoma. Estos rearreglos, específicamente las deleciones, translocaciones e inversiones, han sido también esenciales para crear puntos de referencia moleculares en el desarrollo de los mapas físicos de grandes regiones cromosómicas.

A lo largo de los millones de años de la evolución, los organismos vivos han desarrollado varios mecanismos de defensa contra estos productos genotóxicos. Entre ellos hay que citar las barreras físicas y metabólicas que protegen al material genético. Lo primero está representado por las membranas nucleares (organismos eucariotas), y lo segundo por los distintos sistemas enzimáticos que degradan los productos genotóxicos en derivados inofensivos. Por supuesto, estas barreras no son infalibles y pueden ser vencidas; aún así, las células pueden reparar los daños causados al material hereditario gracias a mecanismos celulares muy sofisticados de reparación del ADN, como la **reparación por escisión** (del inglés *excision repair*), la **reparación posduplicación** (del inglés *postreplication repair*) y la **corrección de bases erróneas** (del inglés *mismatch repair*). Ultimamente, estos genes de reparación del ADN, han sido implicados también en los procesos del envejecimiento (ya que a edad avanzada comienzan a fallar).

7.5. Mutagénesis por inserción

Como acabamos de ver, se pueden inducir mutaciones en los roedores de laboratorio utilizando radiaciones o ciertos productos químicos genotóxicos. De hecho, una gran mayoría de las mutaciones que se conocen actualmente en el ratón proviene de este tipo de experiencias. En la década de 1980, se desarrolló un tipo de mutagénesis alternativa denominada **mutagénesis por inserción**. El desarrollo se basó en el descubrimiento mencionado más arriba, realizado por Jenkins y Copeland, donde demostraron que los retrovirus juegan un papel importante como agentes mutagénicos en el ratón y, probablemente, en todas las especies. Partiendo de esta información, muchos investigadores idearon la utilización (en el laboratorio) de ciertos virus ARN (susceptibles de ser retro-transcriptos bajo la forma de una copia de ADN) con el objeto de provocar mutaciones por intercalación. Una de las desventajas de las mutaciones por inserción es que, a diferencia de las inducidas por recombinación homóloga, se producen al azar y, por lo tanto, pueden ocurrir en cualquier locus a lo largo del genoma.

Por ejemplo, Rudolph Jaenisch y colaboradores (Estados Unidos), infectaron embriones de ratón (día 8 de gestación) con el virus MoMuLV. De esta manera obtuvieron varias mutaciones provocadas por la intercalación de una copia del virus dentro de un gen del ratón. Dentro de esas mutaciones, la más interesante es *Colla1^{Mov13}*, la cual provoca (al estado homocigota) la muerte del embrión al día 13 de gestación. Esta mutación resulta de la intercalación de una copia retroviral del virus de Moloney dentro del primer intrón del gen que codifica para la cadena α del procógeno tipo I. Esta técnica de mutagénesis por inserción retroviral presenta la ventaja de ser relativamente fácil de realizar (basta con infectar al embrión por inyección trans-placentaria al día 7 de la gestación), pero tiene a su vez un bajo rendimiento, ya que no todas las células se infectan y no todas las que se infectan participan en la formación de la línea germinal (gónadas).

Un grupo inglés, dirigido por Martin Evans (*Cambridge University*), ha utilizado un enfoque diferente y muy original de la inserción viral. Consiste en infectar, *in vitro*, células ES, cultivándolas sobre una capa de células soporte que producen y liberan al medio gran cantidad de retrovirus. Por lo tanto, las células ES integrarán varias copias del retrovirus y podrán ser posteriormente seleccionadas (para una mutación determinada) e inyectadas dentro de la cavidad de un blastocito receptor. Este embrión será una quimera formada por células normales y por células ES infectadas y nos permitirá, eventualmente, desarrollar líneas de ratones puras, descendientes sólo de las células ES mutantes. Con este enfoque, este grupo de investigadores produjo, entre otros, un ratón mutante para el gen *Hprt* (*hypoxanthine guanine phospho ribosyl transferase*) y, extrañamente, este ratón deficiente no presenta ningún fenotipo evidente. Por lo tanto, no constituye un buen modelo animal para el **síndrome de Lesch-Nyhan** en los humanos, como se esperaba.

Finalmente, las copias del ADN utilizadas para generar ratones transgénicos por microinyección pronuclear (ver Capítulo VIII) se pueden insertar, por azar, dentro de la secuencia de un gen funcional. En la mayoría de los casos, la interrupción de secuencias endógenas causada por la inserción de **transgenes** no ha resultado en un fenotipo aparente. No obstante, cualquier gen puede ser blanco de una irrupción debido a la inserción de un transgén y existen algunas mutaciones que han dado origen a disfunciones de carácter heredable. Estas mutaciones son muy valiosas ya que nos permiten clonar el gen mutado sin necesidad de hacer un extenso proyecto de clonaje posicional, utilizando la secuencia del virus como referencia.

7.6. Mutagénesis por recombinación homóloga

Los genetistas han soñado por muchos años con poder provocar una mutación particular en un gen considerado, *a priori*, de interés científico. Este sueño comenzó a ser realidad cuando a fines de la década de 1980 los investigadores Kirk Thomas y Mario Capecchi imaginaron la posibilidad de reemplazar, *in situ*, una secuencia de ADN normal por la secuencia homóloga, modificada por el investigador *in vitro*. Esto último, provocando la recombinación de un segmento de ADN normal con un segmento transfectado —previamente modificado— en células embrionarias totipotentes (*ES cells*).

Primero, hay que disponer de la secuencia del gen que queremos modificar, indispensable para comenzar el proyecto. Luego se produce (*in vitro*) la mutación dentro de la secuencia codificante del gen (exones), intercalando un pequeño gen (por ejemplo, el gen de la resistencia al antibiótico neomicina) que servirá además como marcador de selección para distinguir las células ES que han incorporado la copia rearrreglada. Una vez seleccionadas, las células ES mutadas *in vitro* son inyectadas en blastocitos de ratón para obtener ratones quimera, de los cuales obtendremos los ratones mutantes. En los últimos 10 años, se ha incorporado el uso de recombinasas sitio específicas (por ejemplo, el sistema Cre/loxP), posibilitando la obtención de mutaciones condicionadas a un tipo de tejido o limitadas a un momento específico del desarrollo. Además, estas técnicas permiten crear ratones con rearrreglos cromosómicos, como deleciones, duplicaciones e inversiones. Los procesos utilizados para la obtención de ratones **knock-out** (KO) por recombinación homóloga en cultivos de células ES y la microinyección de ADN en embriones unicelulares para la producción de ratones transgénicos serán vistos en detalle en el Capítulo VIII.

7.7. Mutagénesis por “trampa de genes” (*Gene-trap mutagenesis*)

Más allá del éxito de la mutagénesis dirigida por recombinación homóloga, los investigadores siguen teniendo interés en realizar mutagénesis al azar (no dirigida), debido a que las mutaciones “molecularmente” definidas (ratones KO) presentan algunas desventajas, como ser la falta de identidad entre las lesiones moleculares generadas en el laboratorio y las halladas en los trastornos genéticos humanos. Una alternativa interesante es la “trampa de genes”, ya que esta metodología se encuentra a mitad de camino entre la mutagénesis dirigida y la mutagénesis completamente al azar. El uso de vectores diseñados para encontrar las secuencias estimuladoras de los genes (en inglés, *enhancer trap vectors*) fue el puntapié inicial de esta técnica. En pocas palabras, los **vectores trampa** (en sus tres versiones: *enhancer-*, *promoter-* y *gene-trap vectors*) son introducidos en el genoma de las células ES y -usurpando el aparato de transcripción de los genes- se insertan en las adyacencias de las secuencias codificantes, generando alelos nulos. Por medio de este método de inserción, se están creando miles de clones de células ES mutantes (16.000 clones al momento de este escrito), los cuales son potencialmente apropiados para generar ratones KO. Algunos programas de inserción de vectores trampa en el ratón y en cultivos humanos son *The Gene Trap Project of the German Human Genome Project*, Alemania (<http://tikus.gsf.de>); *The BayGenomics Gene Trap Project*, California, Estados Unidos (<http://baygenomics.ucsf.edu>); *The CMHD Gene Trap Project*, Toronto, Canadá (<http://www.cmhd.ca>) y *Lexicon Genetics*, Texas, Estados Unidos (<http://www.lexgen.com>).

Más allá de las técnicas que se utilicen actualmente (y de las que vendrán en el futuro), lo que es importante resaltar es que la generación y el estudio de las mutaciones en los roedores de laboratorio van a contribuir, en forma significativa, al entendimiento del funcionamiento del genoma de los mamíferos (lo que se conoce en inglés como *functional genomics*). Esto podrá ser realidad debido a que las mutaciones proveen un sistema directo y maleable para asociar ciertos fenotipos con algunas regiones del genoma y, finalmente, con las secuencias de ADN

propiamente dichas. La **Tabla 7.1** resume las características de todas las estrategias de mutagénesis descritas en este capítulo.

Tipo de Mutagénesis	Tasa de mutaciones	Tipo de mutaciones	Ventajas	Desventajas
Espontánea	5×10^{-6} / locus	Muy variada: puntuales, deleciones inserciones etc.	Fenotipo visible Fácil de identificar	Baja frecuencia Sólo fenotipos visibles
Rayos X	$10-50 \times 10^{-5}$ / locus	Deleciones, inversiones y translocaciones	Los rearrreglos sirven como marca para el clonado del gen	Afecta varios genes Difícil de identificar
ENU	150×10^{-5} / locus	Mutaciones puntuales	Mutaciones en un gen por vez Aplicable en gran escala	No aporta marcas para el clonado del gen
Inserción de transgén o retrovirus	5-7% de los ratones transgénicos	Irrupción de una secuencia codificante	Aporta marcas para el clonado del gen	Técnica muy laboriosa No aplicable en gran escala
Inserción por Trampa de genes	100% de los ratones transgénicos	Irrupción de una secuencia codificante	Permite estudiar patrones de expresión Facilita el clonado del gen	Requiere el conocimiento de la estructura del gen Técnica muy laboriosa
Dirigida por recombinación homóloga	100% de los ratones transgénicos	Inserciones o deleciones	Se puede diseñar según las necesidades	Fenotipos imprevisibles

Tabla 7.1. Comparación de las distintas estrategias de mutagénesis en el ratón. La tabla resume las características más importantes, ventajas y desventajas de los distintos tipos de mutagénesis aplicados en el ratón de laboratorio y la comparación con las mutaciones espontáneas.

7.8. La influencia del fondo genético sobre el fenotipo mutante

Como veremos en el Capítulo VIII, la uniformidad del fondo genético en el cual mantenemos la mutación (o transgén) es de suma importancia. El fenotipo observado en el animal mutante no es siempre consecuencia directa de la alteración genética del gen, sino que existen factores ambientales e interacciones con otros genes (**genes modificadores**). Se ha descrito en numerosas ocasiones la presencia de cambios en el fenotipo de una mutación por el sólo hecho de introducir el alelo mutante en otra línea consanguínea. Un ejemplo de lo último en el ratón es la mutación espontánea (oncogénica) Apc^{Min} , la cual provoca una gran incidencia de tumores intestinales en la línea C57BL/6J, pero una incidencia mucho menor en la línea AKR. Este fenómeno fue explicado por la presencia de un gen modificador (aunque no el único) llamado *Mom1* (*Modifier of Min*); la línea C57BL/6 porta un alelo nulo del gen, mientras que AKR tiene una copia salvaje del mismo, la cual protege de la aparición de tumores intestinales. (Es interesante notar que sin el conocimiento previo de la mutación Apc^{Min} , el gen *Mom1* difícilmente hubiese sido descubierto.)

Como hemos señalado en el Capítulo IV, la creación de líneas congénicas, por medio de retrocruzas repetidas contra una línea de fondo, es una alternativa ideal para mantener mutaciones espontáneas (muchas veces descubiertas en un fondo genético no definido o mixto) y dirigidas, tanto como transgenes. Esto es particularmente importante en el caso de los animales transgénicos y KO, debido al hecho de que, por cuestiones técnicas, suelen ser producidos en fondos mixtos del tipo FVB;B6 o I29;B6, respectivamente (ver Capítulo VIII). Una ventaja adicional de este método es la posibilidad de analizar el fenotipo mutante en más de un fondo genético definido; por lo tanto, se aconseja realizar más de una línea congénica por cada mutación.

Para una breve reseña práctica de cómo mantener las mutaciones en los animalarios, ver el Anexo I.

Bibliografía General

- BALLING R. *ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice. Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2: 463-492, 2001.
- BRAYTON C, JUSTICE M, MONTGOMERY CA. *Evaluating mutant mice: anatomic pathology. Veterinary Pathology* 38: 1-19, 2001.
- BROWN SD, PETERS J. *Combining mutagenesis and genomics in the mouse: closing the phenotype gap. Trends in Genetics*. 12: 433-435, 1996.
- BROWN SD, NOLAN PM. *Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function. Human Molecular Genetics* 7: 1627-1633, 1998.
- BROWN SD, BALLING R. *Systematic approaches to mouse mutagenesis. Current Opinion in Genetics and Development* 11: 268-273, 2001.
- CAPECCHI M. *Altering the genome by homologous recombination. Science* 244: 1288-1292, 1989.
- CHAPMAN VM, MILLER DR, ARMSTRONG D, CASKEY CT. *Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 1292-1296, 1989.
- CUTLER LINDER C. *The influence of genetic background on spontaneous and genetically engineered mouse models of complex diseases. Lab Animal (NY)* 30: 34-39, 2001.
- DE BOER J, ANDRESSOO JO, DE WIT J, HUIJMANS J, BEEMS RB, VAN STEEG H, WEEDA G, VAN DER HORST GT, VAN LEEUWEN W, THEMEN AP, MERADJI M, HOEIJMAKERS JH. *Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. Science* 296: 1276-1279, 2002.
- FLAHERTY L. *Generation, identification, and recovery of mouse mutations. Methods* 14: 107-118, 1998.
- GIBSON F, WALSH J, MBURU P, VARELA A, BROWN KA, ANTONIO M, BEISEL KW, STEEL KP. *A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. Nature* 374: 62-64, 1995.
- GUÉNET J-L. *Animal Models of Human Genetic Disease. In: "Gene targeting" ed. Manuel Vega, CRC Press, Boca Raton, pp 149-166, 1995.*
- HARTL D, JONES E. *Essential Genetics. Jones & Bartlett Pub, 2nd Edition, 1999.*
- JAUBERT J, JAUBERT F, MARTIN N, WASHBURN LL, LEE BK, EICHER EM, GUÉNET JL. *Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (Npr3). Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 10278-10283, 1999.
- JENKINS NA, COPELAND NG, TAYLOR BA, LEE BK. *Dilute (d) coat colour mutation of DBA/2J mice is associated with the site of integration of an ecotropic MuLV genome. Nature* 293: 370-374, 1981.
- JUSTICE M, NOVEROSKE JK, WEBER JS, ZHENG B, BRADLEY A. *Mouse ENU mutagenesis. Human Molecular Genetics* 8: 1955-1963, 1999.
- JUSTICE M. *Capitalizing on large-scale mouse mutagenesis screens. Nature Reviews Genetics* 1: 109-115, 2000.
- JUSTICE MJ, CARPENTER DA, FAVOR J, NEUHAUSER-KLAUS A, HRABE DE ANGELIS M, SOEWARTO D, MOSER A, CORDES S, MILLER D, CHAPMAN V, WEBER JS, RINCHIK EM, HUNSICKER PR, RUSSELL WL, BODE VC. *Effects of ENU dosage on mouse strains. Mammalian Genome* 11: 484-488, 2000.
- JUSTICE M. *Mutagenesis of the mouse germline. En: Mouse Genetics and Transgenics. A Practical Approach. Jackson I, Abbott C (Eds). Oxford University Press, New York, 2000.*
- MCDONALD JD, BODE VC, DOVE WF, SHEDLOVSKY A. *Pah^{ph-5}: a mouse mutant deficient in phenylalanine hydroxylase. Proceedings of the National Academy of Science USA* 87: 1965-1967, 1990.
- MILLS AA, BRADLEY A. *From mouse to man: generating megabase chromosome rearrangements. Trends in Genetics* 17: 331-339, 2001.
- MUNROE RJ, BERGSTROM RA, ZHENG QY, LIBBY B, SMITH R, JOHN SW, SCHIMENTI KJ, BROWNING VL, SCHIMENTI JC. *Mouse mutants from chemically mutagenized embryonic stemcells. Nature Genetics* 24: 318-321, 2000.
- NADEAU JH, FRANKEL WN. *The roads from phenotypic variation to gene discovery: mutagenesis versus QTLs. Nature Genetics* 25: 381-384, 2000.
- NELMS KA, GOODNOW CC. *Genome-wide ENU mutagenesis to reveal immune regulators. Immunity* 15: 409-418, 2001.

- NOLAN PM., KAPFHAMER D, BUCAN M. *Random mutagenesis screen for dominant behavioural mutations in mice*. *Methods* 13: 379-395, 1997.
- NOLAN PM, PETERS J, STRIVENS M, ROGERS D, HAGAN J, SPURR N, GRAY IC, VIZOR L, BROOKER D, WHITEHILL E, WASHBOURNE R, HOUGH T, GREENAWAY S, HEWITT M, LIU X, MCCORMACK S, PICKFORD K, SELLEY R, WELLS C, TYMOWSKA-LALANNE Z, ROBY P, GLENISTER P, THORNTON C, THAUNG C, STEVENSON JA, ARKELL R, MBURU P, HARDISTY R, KIERNAN A, ERVEN A, STEEL KP, VOEGELING S, GUÉNET JL, et al. *A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse*. *Nature Genetics* 25: 440-443, 2000.
- RINCHIK EM. *Developing genetic reagents to facilitate recovery, analysis, and maintenance of mouse mutations*. *Mammalian Genome* 11: 489-499, 2000.
- ROGERS DC, FISHER EM, BROWN SD, PETERS J, HUNTER AJ, MARTIN JE. *Behavioural and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment*. *Mammalian Genome* 8: 711-713, 1997.
- RUSSELL W, KELLY P, HUNSICKER J, et al. *Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 76: 5818-5822, 1979.
- RUSSELL LB. *Role of mouse germ-cell mutagenesis in understanding genetic risk and in generating mutations that are prime tools for studies in modern biology*. *Environmental Molecular Mutagenesis (Suppl)* 24: 23-29, 1994.
- SCHIMENTI J, BUCAN M. *Functional genomics in the mouse: phenotype-based mutagenesis screens*. *Genome Research* 8: 698-710, 1998.
- SHEDLOVSKY A, McDONALD JD, SYMULA D, DOVE WF. *Mouse models of human phenylketonuria*. *Genetics* 134: 1205-1210, 1993.
- STANFORD WL, STANFORD WL, COHN JB, CORDES SP. *Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond*. *Nature Reviews Genetics* 2: 756-768, 2001.
- SUNDBERG J, BOGGESS D. *Systematic Approach to Evaluation of Mouse Mutations*. CRC press, Boca Raton, 2000.
- VOSS AK, THOMAS T. *Identification of novel genes by gene trap mutagenesis*. *Methods in Molecular Biology* 175: 377-396, 2001.

