

Modelo de inmunodeficiencia: el ratón BALB/c.Cg-Fox1^{nu}

Maschi F., Principi G., Rogers E., Ayala M., Cagliada P., Carbone C.

Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias.

Universidad Nacional de La Plata - Calles 60 y 118 s/n (1900) La Plata

[*fmaschi@fcv.unlp.edu.ar](mailto:fmaschi@fcv.unlp.edu.ar)

Recibido el 17/08/2011 - Aceptado el 08/10/2011



Resumen

En los últimos 40 años, el desarrollo de modelos murinos ha posibilitado realizar avances trascendentes en el estudio y terapéutica de muchas enfermedades humanas y animales. Asimismo, el empleo de retrocruzas ha permitido crear ratones congénicos, como resultado de transferir una mutación a otra cepa. El objetivo de este trabajo fue desarrollar la línea congénica BALB/c.Cg-Fox1^{nu}, introduciendo la mutación Fox1^{nu} presente en la línea N:NIH(S) a la línea consanguínea BALB/c. Se aparearon ratones de ambas líneas para la producción de la línea congénica hasta la generación N10. Para ello se utilizaron retrocruzas seguidas de intercruzas y selección de ratones mutantes. La línea congénica BALB/c.Cg-Fox1^{nu} incorporó la porción más pequeña del cromosoma donante portando la mutación Fox1^{nu}. Esta nueva línea murina, actualmente disponible en el bioterio de la FCV UNLP (Universidad Nacional de la Plata), representa una importante herramienta en el campo de la inmunología, como modelo en oncología y para comparar estudios donde el ratón BALB/c es su homólogo inmunocompetente.

Palabras claves: ratón, mutación, congénica, retrocruza, modelo inmunodeficiencia

IMMUNODEFICIENT MODELS: THE BALB/c NUDE MOUSE

Summary

The development of murine models has made possible to achieve significant advances in the study and treatment of many human and animal diseases in the last 40 years. Furthermore, the usages of backcross programs allow the obtention of congenic mice as a result of transferring a mutation to another mice strain. The aim objective of this work was to develop the congenic line BALB/c.Cg-*Fox1^{nu}* by introducing the *Fox1^{nu}* mutation present in the line NIH(S) into the inbred strain BALB/c.

Both mice lines were mated for the attainment of the congenic strain until the N10 generation. This was performed by using backcrossing followed by intercrosses and the selection of mutant mice. Therefore, the smallest portion of the donor chromosome carrying the mutation *Fox1^{nu}* was included in the congenic line BALB/c.Cg-*Fox1^{nu}*. This new murine line, currently available in the animal facility of the FCV-UNLP, represents an useful tool for immunology research, as well as an animal model in oncology and in comparative studies where the BALB/c mouse is the homologous immunocompetent.

Key words: mice, mutant, congenic, backcross, immunodeficient model.

Introducción

El desarrollo de modelos murinos mediante el empleo de nuevas tecnologías de manipulación genética y reproductiva ha producido una revolución en la obtención de animales genéticamente modificados, considerándose a éstos como una herramienta de gran precisión lo que ha posibilitado realizar avances trascendentes en el estudio y terapéutica de muchas enfermedades humanas y animales (1, 2, 3).

Existen diversas tecnologías para lograr este propósito, una de ellas es a través de la creación de líneas congénicas. Estas últimas son el resultado de transferir una mutación de interés, por medio de la reproducción sexual, a otro fondo genético, generalmente a una línea de ratón consanguínea.

La generación de estos modelos es esencial para estudiar tanto el efecto de las mutaciones espontáneas como el de las inducidas o de aquellas producidas por manipulación genética, ya que permite mantenerlas en una línea consanguínea definida aumentando la uniformidad genotípica y reduciendo la variabilidad genética. Además brinda la posibilidad de identificar y analizar genes modificadores que pueden estar presentes en una endocría; y sirve como control para estudios comparativos entre animales de la misma línea (4).

Los modelos animales portadores de mutaciones de interés para realizar estudios en particular, permiten mediante la incorporación de esa mutación a otros fondos genéticos, la

obtención de nuevos modelos, lo cual beneficia a la comunidad científica, ya que multiplican exponencialmente las posibilidades para el uso de los mismos.

Uno de los modelos espontáneos que más se utiliza en el mundo es el ratón BALB/c, esta es una línea conocida por sus múltiples usos en diversas disciplinas, particularmente para la producción de anticuerpos monoclonales (5, 6). Este modelo se encuentra disponible en nuestra institución desde el año 1993.

Dentro de las líneas inmunodeficientes el más empleado es el ratón exocriado N:NIH(S)-*Fox1^{nu}*. Este ratón, también llamado "nude", presenta en estado homocigota una mutación espontánea lo que le produjo su fenotipo desnudo o sin pelo, característica que le dio el nombre a la mutación, carece de un timo funcional y produce un número reducido de células T maduras por lo que no rechazan tejidos alo y xenotransplantados. El hecho de que acepten el trasplante de tumores humanos ha sido uno de los descubrimientos más importantes que ha contribuido con el desarrollo de las investigaciones sobre el cáncer, convirtiendo a estos individuos en el primer modelo de animal de experimentación inmunodeficiente. (7; 8, 9). Esta línea de ratón se encuentra disponible en el bioterio de la FCV UNLP desde el año 1996.

Las características biológicas de los ratones, sus tiempos generacionales cortos y el conocimiento actual de metodologías para realizar la transferencia de un alelo mutado como el *Fox1^{nu}*, a una de las líneas de ratones que más se utiliza como el BALB/c, posibilita la obtención de un nuevo modelo murino inmunodeficiente en nuestro país. Estos animales tendrían la mutación y la mayoría de las características correspondientes a su fondo genético sobre el cual se hayan evaluado los resultados de las diversas pruebas. Actualmente existen trabajos en oncología de diversos autores (13, 14, 15) en los que se utilizan ratones BALB/c inmunocompetentes que se deben inmunosuprimir para tener éxito en el mantenimiento de diversas líneas tumorales, por lo cual se considera que contar con un modelo murino inmunodeficiente con el fondo genético en BALB/c constituye un valioso aporte para dichas investigaciones.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar la línea congénica BALB/c.Cg-*Fox1^{nu}*, a partir de la introducción de la mutación *Fox1^{nu}*, en la línea consanguínea BALB/c@LP.

La producción de esta línea congénica ha llevado 5 años desde su inicio. Luego de 10 generaciones de retrocruzas (N10) se infiere que la línea BALB/c@LP ha incorporado una porción pequeña del cromosoma 11 de la línea donante es decir un 0,1 % del genoma de la línea donante, portando la mutación *Fox1^{nu}*. A partir de la N10 se continúa manteniendo la línea congénica BALB/c.Cg-*Fox1^{nu}* utilizando el manejo establecido para una endocría.

Producción y mantenimiento:

Los ratones BALB/c.Cg-*Fox1^{nu}* necesitan una infraestructura adecuada para su manejo y producción como así también someterse a un programa de controles microbiológicos

periódicos. Por su condición de inmunodeficientes, deben mantenerse en ambientes bajo un sistema de barreras sanitarias absolutas (11). Su condición microbiológica es la de animales SPF (Specific Pathogen Free), esto significa que tienen su flora intestinal normal y que están libres de microorganismos patógenos específicos.

El bienestar de estos animales depende, en gran medida, del sistema de alojamiento que se elija, del diseño y control del ambiente y del entrenamiento del personal técnico. Estos factores se consideran fundamentales para su producción y mantenimiento.

El ambiente físico:

El ambiente físico debe diseñarse y operarse de manera tal que permita establecer controles ambientales estrictos, brindando seguridad y confort a los animales, minimizando las posibilidades de introducción o transmisión de agentes infecciosos. Se deben alojar en aisladores flexibles, cabinas aisladoras, estantes ventilados o micro aisladores.

Las condiciones ambientales requeridas se logran mediante un buen diseño del sistema de ventilación y presurización; del control de la temperatura y la humedad relativa; siendo parámetros macro y microambientales de extrema importancia. Las áreas destinadas para el lavado, procesamiento y esterilización de insumos deben funcionar como una barrera efectiva entre los animales y el ambiente exterior.

Los materiales, las dimensiones y el diseño de las cajas, rejillas, comederos y bebederos que se utilicen para el alojamiento de los animales deben estar de acuerdo con lo establecido por las normativas internacionales (10).

Esta cepa de ratones requiere alimento y agua de bebida estéril, temperatura ambiente en un rango entre 24 +/- 2° C, humedad relativa entre 55 +/- 10 %, una ventilación entre 10 y 15 recambios de aire por hora, un fotoperiodo uniforme luz/oscuridad de 14/ 10 horas y ruidos por debajo de los 85 db.

Manejo reproductivo:

El manejo reproductivo de estas colonias se realiza mediante el empleo del sistema de consanguinidad para mantenimiento de una endocría en el núcleo de fundación; utilizando apareamientos monogámicos entre hembras heterocigotas $+/Fox1^{nu}$ y machos homocigotos $Fox1^{nu}/Fox1^{nu}$, esto permite el registro de datos completos para la cepa. Para aumentar la producción se recomienda formar un núcleo de expansión (3), utilizando apareamientos poligámicos de un macho nude y dos o tres hembras $+/Fox1^{nu}$, para luego retirar la hembra parturienta a una caja individual para poder aparearlas nuevamente luego del destete.

Para confirmar la ausencia de contaminaciones en los ratones se debe confirmar mediante un programa de controles microbiológicos que incluya microorganismos oportunistas, el ambiente y los insumos.

Datos biológicos:

Peso del macho adulto	25 – 40 gr
Peso del hembra adulta	20 – 35 gr
Peso al nacer	1 – 2 gr
Peso al destete	11 – 12 gr
Promedio medio de vida	2 – 3 años
Edad para el apareo	8 – 9 semanas
Ciclo estral	4 – 5 días
Duración del estro	6 – 11 hs
Vida reproductiva	8 – 12 meses
Gestación	19 – 22 días
Destete	19 – 21 días
Tamaño de camada promedio	1– 4 crías (prom. 2)
Consumo de agua	8 – 10 ml/animal/día
Consumo de alimento	3 – 6 gr/animal/día

La línea congénica BALB/c.Cg-*Fox1*^{nu} actualmente se mantiene, está disponible en nuestro país y representa no sólo una importante herramienta para estudios de inmunología sino también para utilizarse como modelo animal en estudios de oncología y terapias oncológicas (12); quimioterapia, mecanismos de resistencia a las mismas, radioterapia, inmunoterapia, pruebas de carcinogenicidad, estudio de nuevas combinaciones terapéuticas, enfermedades infecciosas, estudios del sistema inmune, rechazo de tejidos trasplantados, infecciones, mantenimiento y crecimiento de líneas tumorales, anticuerpos monoclonales, interferones e interleukinas entre otros.

Considerando las múltiples posibilidades para su utilización, en este sentido es de gran importancia la identificación de mutaciones en colonias de ratones de experimentación y su posterior transferencia y mantenimiento en fondos genéticos definidos lo cual permite obtener estos nuevos modelos animales.

Por otra parte la disponibilidad de estos roedores en nuestro medio contribuirá con el desarrollo de las investigaciones biomédicas en las cuales se requieran como modelos murinos.

Bibliografía:

- 1- Silver L. M. 1995. Mouse Genetics: Concepts and applications. Oxford University Press, Oxford.
- 2- Bedell MA, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland N. 1997. Mouse models of human disease. Part II: Recent progress and future directions. *Genes & Development* 11: 11 - 43.
- 3- Fernando J. Benavides, Jean-Louis Guénet. Manual de Genética de Roedores de Laboratorio, principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá. SECAL. Laboratory Animals Ltd. 2003, 115 – 125.
- 4- Maschi Fabricio, Ayala M., Benavides F. y Carbone C. 2009. Modelos animales: Desarrollo de la línea de ratones congénicos BALB/c.Cg-Cts^{pk}. *Journal of Basic Applied Genetics*. ISSN 1666-0390. 19 (2): 15 -19.
- 5- Michael F. W. Festing. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. Churchill Livingstone. 1976. 57 – 73.
- 6- Dasha Fuentes, R.R. González y Roxana Arroyo. 2001. Influencia de la edad y el sexo de ratones BALB/c sobre la producción de líquido ascítico rico en anticuerpos monoclonales. *Rev. Salud Anim.* Vol. 23 No. 1: 62-64
- 7- [Gazzaniga S](#), [Bravo A](#), [Goldszmid SR](#), [Maschi F](#), [Martinelli J](#), [Mordoh J](#), [Wainstok R](#). 2001. Inflammatory changes after cryosurgery-induced necrosis in human melanoma xenografted in nude mice. *J. Invest. Dermatol.*; 116(5):664-71.
- 8- [Alvarez MJ](#), [Prada F](#), [Salvatierra E](#), [Bravo AI](#), [Lutzky VP](#), [Carbone C](#), [Pitossi FJ](#), [Chuluyan HE](#), [Podhajcer OL](#). 2005. Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. *Cancer Res.* 15;65(12):5123-32
- 9- Carbone Cecilia, Fabricio Maschi. 2006. El ratón *nude* (*nu/nu*) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Química Viva*. 1 (5) 19 – 23.
- 10- National Research Council. Guía para el cuidado y Uso de los animales de Laboratorio. 8th edition. Institute of Laboratory Animals Resources. The National Academies Press, USA. 2011.
- 11- Lela K. Riley. 1999. Development of a Performance Assessment Program for Research Animal Diagnostic Laboratories and Defining Microbiologic Testing Standards. *Microbial Status and genetic Evaluation of Mice and Rats*. 7 -13.
- 12- [Clarke R](#), Vincent T, Lombardi. 1996. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res Treat.*; 39(1):69-86.
- 13- Xu Huimian, Chen Junqing, He. 1998. Establishment and biologic characteristic of transplantable peritoneal metastasis of BALB/c mice. *Journal of China Medical University*.

14- YE Yan-li, ZHOU Xin-xi, WANG Lian-gui. 2005. Reproduction of Nude Mice and Their Application in Experimental Oncology. Laboratory Animal Science and Administration.

15- Koehl, Gudrun E. Andrassy, Joachim; Guba, Markus; Richter, Sebastian; Kroemer, Alexander; Scherer, Marcus N.; Steinbauer, Markus; Graeb, Christian; Schlitt, Hans J.; Jauch, Karl-Walter; Geissler, Edward K. 2004. Rapamycin Protects Allografts From Rejection While Simultaneously Attacking Tumors in Immunosuppressed Mice. Transplantation. Volume 77 - Issue 9 - pp 1319-132.

Páginas web:

16-

http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/research_models_by_product_type/mutant_mice/athymic_nude.html

17- <http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=773>

18- http://www.vetmed.ucdavis.edu/Animal_Alternatives/cancer.htm

19- http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/34_1_2/34_1_2NudeMouse.shtml



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 10, Diciembre de 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar