

# ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

MONOGRÁFICO

24

*ier*

Instituto de Estudios Riojanos

ZUBÍA. MONOGRÁFICO  
REVISTA DE CIENCIAS.  
Nº 24 (2012). Logroño (España).  
P. 1-171, ISSN: 1131-5423

## **DIRECTORA**

Purificación Ruiz Flaño

## **CONSEJO DE REDACCIÓN**

Luis Español González

Rubén Esteban Pérez

Rafael Francia Verde

Juana Hernández Hernández

Luis Miguel Medrano Moreno

Patricia Pérez-Matute

Enrique Requeta Loza

Rafael Tomás Las Heras

## **CONSEJO CIENTÍFICO**

José Antonio Arizaleta Urarte

(Instituto de Estudios Riojanos)

José Arnáez Vadillo

(Universidad de La Rioja)

Susana Caro Calatayud

(Instituto de Estudios Riojanos)

Eduardo Fernández Garbayo

(Universidad de La Rioja)

Rosario García Gómez

(Universidad de La Rioja)

José M<sup>a</sup> García Ruiz

(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)

Javier Guallar Otazua

(Universidad de La Rioja)

Teodoro Lasanta Martínez

(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)

Joaquín Lasierra Cirujeda

(Hospital San Pedro, Logroño)

Luis Lopo Carramiñana

(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)

Fernando Martínez de Toda

(Universidad de La Rioja)

Juan Pablo Martínez Rica

(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)

José Luis Nieto Amado

(Universidad de Zaragoza)

José Luis Peña Monné

(Universidad de Zaragoza)

Félix Pérez-Lorente

(Universidad de La Rioja)

Eduardo Viladés Juan

(Hospital San Pedro, Logroño)

Carlos Zaldívar Ezquerro

(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)

## **DIRECCIÓN Y ADMINISTRACIÓN**

Instituto de Estudios Riojanos

C/ Portales, 2

26071 Logroño

publicaciones.ier@larioja.org

Suscripción anual España (1 número y monográfico): 15 €

Suscripción anual extranjero (1 número y monográfico): 20 €

Número suelto: 9 €

Número monográfico: 9 €

INSTITUTO DE ESTUDIOS RIOJANOS

# ZUBÍA

---

REVISTA DE CIENCIAS

Monográfico Núm. 24

PANORAMA ACTUAL DE LA  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN LA RIOJA

Coordinadora  
PATRICIA PÉREZ-MATUTE



Gobierno de La Rioja  
Instituto de Estudios Riojanos  
LOGROÑO  
2012

**Panorama actual de la investigación biomédica en La Rioja** / coordinadora, Patricia Pérez-Matute. – Logroño : Instituto de Estudios Riojanos, 2012  
171 p. : gráf. ; 24 cm – (Zubía. Monográfico, ISSN 1131-5423; 24). – D.L. LR 413-2012  
1. Ciencias biomédicas - Investigación - La Rioja. I. Pérez-Matute, Patricia. II. Instituto de Estudios Riojanos. III. Serie  
61:001.891(460.21)  
57:001.891(460.21)

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de esta publicación pueden reproducirse, registrarse ni transmitirse, por un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por ningún medio, sea electrónico, mecánico, fotoquímico, magnético o electroóptico, por fotocopia, grabación o cualquier otro, sin permiso previo por escrito de los titulares del copyright.

- © Logroño, 2012  
Instituto de Estudios Riojanos  
C/ Portales, 2  
26001-Logroño, La Rioja (España)
- © Diseño de cubierta e interior: ICE Comunicación
- © Imagen de la cubierta y contracubierta: Detalle de los efectos del tratamiento de 24 horas de un fármaco antirretroviral sobre el adipocito humano (*Patricia Pérez-Matute*). Fotografías con luz ultravioleta del cerebro (a la izquierda) y del corazón (a la derecha) de un ratón transgénico (*Alfredo Martínez*)

Producción gráfica: Reproestudio, S.A. (Logroño)

ISSN 1131-5423  
Depósito Legal: LR 413-2012

Impreso en España - Printed in Spain

# ÍNDICE

## **PRESENTACIÓN**

Patricia Pérez-Matute (*Coordinadora*) ..... 7-8

---

## **PRIMEROS AÑOS DE ANDADURA DEL CIBIR**

José Ignacio Nieto (*Consejero de Salud y Servicios Sociales del Gobierno de La Rioja*) ..... 9-10

---

## **MARTA PÉREZ-FERNÁNDEZ, JAVIER PÉREZ, JULIO GÓMEZ**

Análisis mediante CG-MS de volátiles en el aliento de personas con cáncer en el tracto respiratorio

*Study of breath compounds in people that suffer lung cancer* ..... 11-21

---

## **SARA VELILLA OSÉS, RUTH ABARZUZA CORTAIRE, EVA RODO ARNEDO, ANA IBÁÑEZ MUÑOZ, SARA MARTA GUALLAR LEZA**

Seguimiento de un año con Ranibizumab para el edema macular diabético refractario: estudio piloto

*One year follow-up of Ranibizumab for refractory diabetic macular edema:*

*a pilot study* ..... 23-32

---

## **ELENA DOMÍNGUEZ-GARRIDO**

Diagnóstico Molecular: Genética Humana y Salud en La Rioja

*Molecular Diagnostic: Human Genetic and Health in La Rioja* ..... 33-40

---

## **SONIA MARTÍNEZ-HERRERO, IGNACIO M. LARRÁYOZ, LAURA OCHOA-CALLEJERO, JOSUNE GARCÍA-SANMARTÍN, ALFREDO MARTÍNEZ**

Producción de ratones modificados genéticamente como modelos de enfermedades humanas

*Production of genetically modified mice as models for human diseases* ..... 41-52

---

## **GERMÁN CUESTO, NURIA DOMÍNGUEZ-ITURZA, LILIAN ENRÍQUEZ-BARRETO, PATRICIA FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, GADEA MATA, EMILIO SYRIANI, MIGUEL MORALES**

La activación de PI3K controla la formación de sinapsis en el sistema nervioso central

*PI3K activation controls synaptic formation in the central nervous system* ..... 53-80

---

## **ROSETE S. PAIS, ICIAR P. LÓPEZ, JOSÉ G. PICHEL**

El sistema de IGFs en la homeostasis y patología del pulmón: implicación en su desarrollo, regeneración tras daño y cáncer no microcítico

*The IGF system in lung homeostasis and disease: involvement on pulmonary*

*development, injury recovery, and non-small cell cancer* ..... 81-112

---

**LAURA VINUÉ, ELENA RUIZ, INÉS OLARTE, SERGIO SOMALO,  
BEATRIZ ROJO-BEZARES, FERNANDA RUIZ-LARREA, MYRIAM ZARAZAGA,  
YOLANDA SÁENZ, CARMEN TORRES**

Frecuencia y caracterización de integrones en aislados clínicos y alimentarios de *Escherichia coli*. La relación entre los integrones y la multiresistencia a antibióticos  
*Occurrence and characterization of integrons in clinical and food Escherichia coli isolates. The relation between integrons and antimicrobial multiresistance* ..... 113-128

---

**PATRICIA PÉREZ-MATUTE, JOSÉ RAMÓN BLANCO, LAURA PÉREZ-MARTÍNEZ,  
JAVIER AGUILERA-LIZARRAGA, EMMA RECIO, MERCEDES SANZ,  
CONCEPCIÓN GARCÍA-GARCÍA, JOSÉ ANTONIO OTEO**

Investigación en VIH y Lipodistrofia en el Hospital San Pedro-Cibir: modelos *in vitro* de adipocitos para el estudio de los efectos tóxicos de fármacos antirretrovirales  
*Research on HIV and Lipodistrophy at San Pedro Hospital-Cibir: in vitro adipocyte models for the study of toxic effects of antiretroviral drugs*..... 129-147

---

**ARÁNZAZU PORTILLO, SONIA SANTIBÁÑEZ, PAULA SANTIBÁÑEZ,  
ANA M. PALOMAR, LARA GARCÍA-ÁLVAREZ, LOURDES ROMERO,  
LUIS METOLA, VALVANERA IBARRA, JOSÉ R. BLANCO, JOSÉ A. OTEO**

1987: Un caso de enfermedad de lyme - 2012: Centro de Referencia en Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores  
*1987: A case of Lyme disease - 2012: Reference Centre of Rickettsioses and Arthropod-Borne diseases*..... 149-163

---



## PRODUCCIÓN DE RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE COMO MODELOS DE ENFERMEDADES HUMANAS

SONIA MARTÍNEZ-HERRERO<sup>1</sup>, IGNACIO M. LARRÁYOZ<sup>1</sup>,  
LAURA OCHOA-CALLEJERO<sup>1</sup>, JOSUNE GARCÍA-SANMARTÍN<sup>1</sup>,  
ALFREDO MARTÍNEZ<sup>1\*</sup>

### RESUMEN

El estudio preclínico de nuevos fármacos requiere la existencia de modelos animales capaces de reproducir fielmente las enfermedades humanas. Las técnicas de ingeniería genética ayudan a establecer nuevos modelos animales. Los animales transgénicos son aquellos en que se incorpora un nuevo gen, que no estaba presente en el genoma de la especie original. Por otro lado, los modelos knockout son animales a los que se les elimina un gen concreto. Ya que en muchos casos la eliminación de un gen puede ser incompatible con la vida del ratón, se han desarrollado los modelos de knockout condicional donde se elimina el gen pero sólo de un órgano concreto, permitiendo así la vida del animal y el estudio de la pérdida del gen en células específicas. Con la ayuda de estas técnicas disponemos hoy en día de buenos modelos animales para estudiar enfermedades como el cáncer, el Alzheimer o la diabetes.

*Palabras clave:* Modelos animales; ratones modificados genéticamente; animales transgénicos, modelos knockout; ingeniería genética.

*Preclinical studies for new drugs require animal models which closely recapitulate human diseases. Genetic engineering techniques are helpful in establishing new animal models. Transgenic animals are those in which a new gene has been incorporated in the original species genome. On the other hand, knockout models consist in the elimination of a gene from the whole animal. Since, in many cases, eliminating a gene may result in mouse lethality,*

---

\* E-mail: amartinezr@riojasalud.es.

1. Unidad de Oncología. Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), C/ Piqueras, 98, 26006 Logroño, La Rioja, España.

*conditional knockout models have been developed where a gene is eliminated only from a specific organ, allowing the animals to thrive and providing materials to study the consequences of losing a gene in specific cell types. With help from these techniques, nowadays we have access to many animal models for diseases such as cancer, Alzheimer's disease, or diabetes.*

Key words: *Animal models; genetically modified mice; transgenic animals, knockout models; genetic engineering.*

## 1. INTRODUCCIÓN

La investigación de la fisiología de los organismos vivos siempre se ha enfrentado al problema de que todos los sistemas y órganos están íntimamente conectados entre sí, haciendo difícil la adjudicación de una función concreta a órganos o tejidos específicos. Una práctica clásica en biología consiste en extirpar un órgano y estudiar los efectos de esa intervención; obviamente cualquier función que resulte dañada indicará que el órgano eliminado era responsable de mantener dicha actividad fisiológica. Así, por ejemplo, se comprobó que la extirpación del páncreas en animales de experimentación conducía a una diabetes severa, implicando así a este órgano en la regulación del metabolismo glucídico. Otra línea de experimentación consiste en inyectar sustancias ajenas al organismo y comprobar sus efectos a lo largo del tiempo.

Hemos avanzado mucho desde los primeros tiempos heroicos de la investigación animal. Hoy tenemos un conocimiento bastante amplio de los principales sistemas que rigen la fisiología general y particular de cada órgano y tejido, gracias a muchas décadas de estudios muy cuidadosos. Además, la genética moderna nos ha permitido acceder al lenguaje íntimo de la naturaleza, abriendo un nuevo campo de investigación que nos permite estudiar a los organismos hasta un grado de detalle impensable hasta hace unos años. Sin embargo, las estrategias de estudio biológico siguen siendo las mismas, aunque las herramientas sean mucho más sofisticadas. En vez de inyectar sustancias ajenas al organismo, ahora podemos insertar un nuevo gen (que puede ser de otra especie o totalmente diseñado por el investigador), lo que da lugar a animales *transgénicos*. De igual manera, en vez de extirpar todo un órgano para ver los efectos de esta acción, ahora podemos eliminar un gen concreto de un organismo para estudiar sus funciones. Este tipo de modelo genético recibe el nombre de *knockout* y, como veremos más adelante, puede afectar a todo el organismo o sólo a un órgano o tipo celular, según interese al equipo investigador. Los modelos genéticos son especialmente útiles cuando queremos disponer de un modelo animal que reproduzca enfermedades humanas de origen genético; así podremos probar nuevas medicinas y terapias en estos animales antes de emplearlas en seres humanos.

La experimentación científica basada en el uso de animales de laboratorio requiere que éstos cumplan una serie de características que permitan la reproducción de los resultados. De esta forma, la variación observada en los resultados, bajo la igualdad de condiciones ambientales que nos ofrecen los ani-



malaria, es debida principalmente al patrimonio genético de los animales empleados. Los modelos genéticos requieren una población uniforme de animales, que no presenten diferencias genéticas entre ellos, para lo que se usan cepas o líneas consanguíneas. En el caso del ratón de laboratorio, las líneas más comunes son las producidas a partir de la subespecie salvaje *Mus musculus domesticus*, mediante un proceso de consanguinidad por cruces hermano con 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.

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. En la actualidad disponemos de numerosas 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. Las cepas de ratón más empleadas en investigación son C57BL/6, BALB/c, CD-1, SCID, y A/J.

Este trabajo de revisión presenta las distintas tecnologías que se utilizan en el CIBIR para generar modelos de enfermedades humanas a base de la modificación genética de animales de experimentación, fundamentalmente ratones. Para ello, se hará una pequeña descripción de los principales elementos genéticos utilizados en ingeniería genética y de las técnicas generales para producir ratones transgénicos y knockout.

## 2. ELEMENTOS DE REGULACIÓN GÉNICA

De forma similar a otras ingenierías, la ingeniería genética utiliza elementos de la propia naturaleza para reordenarlos y conseguir un efecto totalmente nuevo. Por ello es muy importante comprender bien el funcionamiento de la maquinaria genética de la célula y así dominar su lenguaje.

El concepto de gen no es unívoco y diversos expertos en genética lo definen de maneras distintas. Además, el estudio detallado de la genética nos depara nuevas sorpresas cada día, que llevan a la descripción de complicados mecanismos de regulación y contrarregulación que ofrecen un panorama muy complejo. De todas formas, para una descripción general, el concepto clásico de la genética puede ser suficiente. El DNA (ácido desoxirribonucleico) constituye el material genético de la célula. El DNA contiene regiones que se transcriben a moléculas de RNA (ácido ribonucleico) mensajero, que a su vez se traducirán a proteínas. Cada una de estas regiones de DNA que contienen la información necesaria para generar una proteína recibe el nombre de gen. Las amplias regiones de DNA que separan a las regiones codificantes (genes) entre sí fueron en su momento consideradas como "DNA basura". Hoy en día sabemos que estas regiones son muy importantes ya que en ellas se contiene la información que regula la expresión de los genes. Sorprendentemente, los genomas de una sardina, un pollo, una rata o una persona humana tienen todos aproximadamente el mismo número de genes, alrede-

de 30.000. Sin embargo, la cantidad de DNA no codificante entre estos genes aumenta con la complejidad evolutiva de los organismos, indicando la importancia de estas regiones. Delante de cada gen existe una región de longitud variable que se denomina *promotor* y que se ocupa de regular la expresión de dicho gen, es decir del número de copias de RNA mensajero que hay que producir en cada momento. Esta regulación se lleva a cabo por la unión de distintas proteínas, denominadas *factores de transcripción*, al promotor y que como consecuencia modulan el acceso de la RNA polimerasa, el complejo enzimático que sintetiza el RNA mensajero. Esta regulación a través de los promotores es también responsable de que los distintos órganos o tejidos expresen proteínas distintas, ya que algunos de estos promotores sólo se activan en tipos celulares concretos. Así, por ejemplo, el promotor de la tubulina  $\alpha$ -1 sólo se activa en las neuronas o el promotor de la caderina E sólo se activa en las células endoteliales. Los promotores también determinan el momento a lo largo del desarrollo embrionario donde un gen debe expresarse, por lo que también podremos utilizar estos promotores para expresar nuestros genes en momentos concretos. Obviamente, también existen promotores de expresión continua y generalizada en todas las células. En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos de promotores y su modo de acción. En la actualidad se han caracterizado muchísimos de estos promotores, lo que ofrece una amplia variedad de herramientas al investigador.

Sin embargo, el ingeniero genético no está restringido a usar sólo los elementos que se encuentran en los organismos superiores, sino que puede utilizar también elementos de regulación presentes en virus y bacterias. Uno de estos sistemas, que ha dado mucho juego en el desarrollo de modelos animales genéticamente modificados, es el sistema Cre/*loxP*. La proteína Cre, de origen viral, reconoce las secuencias *loxP* de forma que cuando encuentra dos de ellas en tándem corta toda la secuencia intermedia dejando una sola secuencia *loxP* (figura 1). El virus utiliza este sistema para procesos de recombinación que le son útiles, pero el ingeniero genético puede utilizar estas características para sus propios fines, como se verá más adelante.

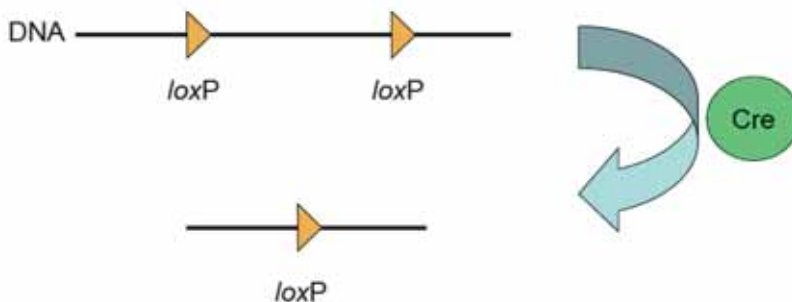


Figura 1. Esquema del funcionamiento del sistema Cre/*loxP*. Cuando hay dos regiones *loxP* en tándem en la misma hebra de DNA, la proteína Cre elimina la zona de DNA comprendida entre ambas secuencias, dejando una de ellas.

Veremos cómo el manejo de estos elementos genéticos, junto con un buen conocimiento de la embriología, permite la creación de modelos animales genéticamente modificados.

### 3. RATONES TRANSGÉNICOS

Como se ha comentado anteriormente, un ratón transgénico es aquel en el que se ha introducido un gen extraño al animal. Este gen puede ser de una especie distinta, como es el caso de genes humanos con mutaciones específicas que pueden predisponer a enfermedades de gran relevancia. Por ejemplo, se descubrió una familia sueca que tenía gran predisposición a desarrollar la enfermedad de Alzheimer. El estudio genético de esta familia llevó a identificar dos mutaciones en el gen de la proteína amiloide, APP (Citron *et al.*, 1992). Cuando este gen humano mutado se introdujo en ratones se observó que éstos desarrollaban todos los síntomas de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo la presencia de placas en el cerebro y déficits de memoria a edades bastante tempranas (Rodrigo *et al.*, 2004). Este modelo transgénico se utiliza en muchos laboratorios del mundo, incluyendo el CIBIR, para estudiar los mecanismos que llevan a la enfermedad de Alzheimer y para ensayar posibles terapias para la prevención y/o el tratamiento de esta enfermedad. Otro ejemplo de modelo transgénico es el que se utiliza en el grupo de Angiogénesis del CIBIR. En estos ratones, se expresa la proteína verde fluorescente (GFP), una proteína aislada de una medusa que confiere un brillante color verde a las células donde se expresa (Ward and Bokman, 1982). En este caso, la expresión de GFP está controlada por el promotor de la actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), de forma que sólo se expresa en algunas células de los vasos sanguíneos. Esta característica permite el seguimiento directo del desarrollo de nuevos vasos (angiogénesis), simplemente iluminando el tejido con luz ultravioleta (figura 2).

Pero, ¿cómo se genera un ratón transgénico? Lo primero, hay que construir un fragmento de DNA que contenga el gen que queremos transmitir precedido por un promotor específico que determine el órgano donde se ha de expresar el gen (tabla 1). Cuando se produce la fecundación en los ratones, el núcleo del espermatozoide se introduce en el óvulo y permanece diferenciado con su envoltura nuclear hasta que se produce la primera mitosis del cigoto. A este núcleo proveniente del espermatozoide se le denomina pronúcleo masculino. Con la ayuda de un micromanipulador, el DNA que hemos modificado en el paso anterior se inyecta en el pronúcleo masculino de forma que este nuevo material genético se inserte al azar en el genoma del nuevo ratón. Ya que el DNA se inyecta en el cigoto, que es la primera célula del nuevo ser, todas las células del ratón llevarán la modificación genética así producida. Después de una serie de divisiones del cigoto, el embrión modificado se implanta en el útero de una ratona portadora, que proporcionará el ambiente necesario para el desarrollo del embrión hasta su nacimiento.

**TABLA 1.**  
**Ejemplos de promotores y sus lugares o tiempos de expresión**

<b>Promotores específicos de células o tejidos</b>		
<b>Nombre del promotor</b>	<b>Expresión</b>	<b>Referencia</b>
β-actina humana	Global	(He <i>et al.</i> , 2001)
Nestina	Células madre	(Chen <i>et al.</i> , 2009)
Tubulina Tα-1	Neuronas-Sistema nervioso central	(Fernández <i>et al.</i> , 2008)
Proteína ácida fibrilar glial	Células de la glia	(Xu <i>et al.</i> , 2011)
Albúmina	Hígado	(Ehlken <i>et al.</i> , 2011)
Neurogenina 3	Páncreas	(Xie <i>et al.</i> , 2010)
Insulina humana	Células β pancreáticas	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
Proteína secretada por las células de clara	Pulmón	(Bertin <i>et al.</i> , 2005)
Cadena ligera de la miosina (MLC2a)	Corazón	(Fraccarollo <i>et al.</i> , 2011)
Cadherina 5	Endotelio	(Alva <i>et al.</i> , 2006)
Proteína renal regulada por andrógenos	Riñón	(Li <i>et al.</i> , 2008)
α-actina esquelética humana	Músculo esquelético	(McCarthy <i>et al.</i> , 2012)
Adiponectina	Tejido adiposo	(Owen <i>et al.</i> , 2012)
Timidina quinasa del virus del herpes simple	Hígado, bazo, pulmón	(Wang <i>et al.</i> , 1996)
Virus Epstein-Barr	Epitelio escamoso	(Tetreault <i>et al.</i> , 2010)
Virus del tumor mamario murino	Glándula mamaria	(Burga <i>et al.</i> , 2011)
<b>Promotores inducibles</b>		
<b>Nombre del promotor</b>	<b>Inductor de la expresión de Cre</b>	<b>Referencia</b>
Receptor de estrógenos mutado (ERT y ERT2)	Tamoxifeno	(Shi and Bassnett, 2007)
Receptor de la progesterona mutado	RU486	(Wunderlich <i>et al.</i> , 2001)
tTA <sup>1</sup> -tetO (sistema tet-OFF)	Doxiciclina/Tetraciclina	(Zhang <i>et al.</i> , 2010)
rtTA <sup>2</sup> -tetO (sistema tet-ON)	Doxiciclina/Tetraciclina	(Backman <i>et al.</i> , 2009)
Gen Mx1	Interferón e inductores del interferón (Poly I-C)	(Pajerowski <i>et al.</i> , 2010)
Proteína de choque térmico Hsp70l (sistema HOTcre)	Calor	(Hesselson <i>et al.</i> , 2009)

<sup>1</sup> tTA, transactivador controlado por la tetraciclina.

<sup>2</sup> rtTA, transactivador reverso controlado por la tetraciclina.

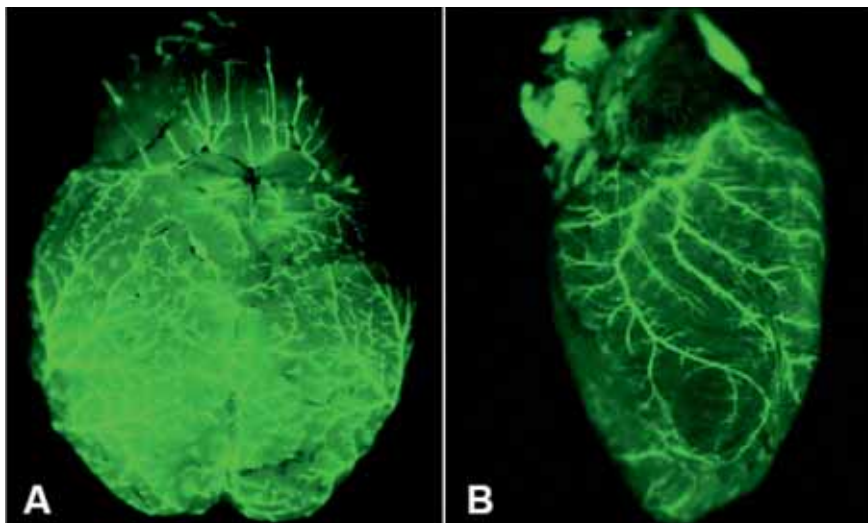


Figura 2. Fotografías con luz ultravioleta del cerebro (A) y del corazón (B) de un ratón transgénico que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en los vasos sanguíneos. La fluorescencia de los vasos permite seguir con detalle hasta los capilares más finos. Este modelo es muy útil para los estudios de angiogénesis que se llevan a cabo en el CIBIR.

La generación de ratones transgénicos es un método relativamente sencillo con una alta proporción de éxito. Sin embargo, esta metodología puede tener algunos problemas. La fuente principal de problemas es que la inserción del material genético se produce al azar, de forma que es corriente que un ratón transgénico contenga varias copias del DNA modificado que queríamos introducir. De igual forma, cabe la posibilidad de que el material genético modificado se introduzca en la región codificante de un gen importante, destruyendo así la función de dicho gen. Cuando estudiemos las consecuencias fisiológicas de la introducción del DNA extraño podemos atribuirle los defectos producidos por la destrucción del gen en cuyo espacio se ha introducido el transgén. Para evitar estos problemas, hay que estudiar la descendencia de al menos 3 ratones fundadores originales, ya que la probabilidad de que el transgén se introduzca en el mismo sitio en 3 embriones diferentes es inmensamente baja. Si todos los descendientes de los 3 fundadores tienen el mismo tipo de defectos, podremos atribuirlos sin lugar a dudas al material genético extraño introducido.

#### 4. RATONES KNOCKOUT

Los modelos knockout son aquellos en que se consigue eliminar un gen de un animal de experimentación. Este tipo de manipulación es mucho más compleja que la descrita para hacer animales transgénicos, ya que se requiere dirigir el DNA modificado a una zona muy concreta del genoma. Esto se consigue construyendo un vector de sustitución de grandes dimensiones. Este

vector contiene la zona modificada del gen que queremos sustituir además de largas regiones por delante y por detrás de esta región, que son exactamente homólogas a las regiones correspondientes del cromosoma. Además, en este vector se introduce un gen de selección positiva, es decir un gen que va a permitir vivir a aquellas células que lo lleven, y un gen de selección negativa, es decir un gen cuya presencia, en las condiciones adecuadas, conlleva la muerte de la célula (figura 3A). El gen de selección positiva suele ser el gen de resistencia a la neomicina (neo) mientras que el gen de selección negativa suele ser el de la tirosina kinasa (TK).

A diferencia de lo que ocurría con los ratones transgénicos, aquí no se usan cigotos sino células madre embrionarias. El vector de sustitución se introduce en estas células mediante técnicas de electroporación (un chispazo eléctrico) y se espera que el vector encuentre su zona homóloga en el genoma y que se inserte en él a través del proceso de recombinación homóloga. Las células madre son expuestas a una mezcla de G418, un análogo de la neomicina, y FIAU, un sustrato de la TK. Las células que no hayan incorporado el vector morirán ya que no son inmunes a la neomicina. De forma parecida, aquellas células donde no se haya incorporado el vector adecuadamente (esto es, eliminando la TK, que está en un extremo del vector), morirán por la actividad de la TK sobre su sustrato, que produce una sustancia altamente tóxica para la célula (figura 3B). Para comprobar todavía más la correcta inserción del vector, se realizan técnicas de Southern blotting sobre el DNA de las células seleccionadas. Una vez que se ha comprobado la correcta modificación de las células madre, éstas se inyectan en un embrión de ratón en la fase de blastocisto. En esta fase, el embrión tiene una amplia cavidad central, donde se inyectan las células. De forma similar a lo que se hacía con los transgénicos, estos embriones modificados se introducen en el útero de ratonas portadoras hasta su nacimiento. Los ratones que nacen de esta manipulación reciben el nombre de quimeras, ya que sus células provienen de dos fondos genéticos distintos. Parte de las células derivan del blastocisto no modificado, mientras que otras derivan de las células madre modificadas en el laboratorio. Para caracterizar fácilmente a estos animales, los investigadores recurren a un truco muy útil: obtienen los blastocistos de ratones con pelo blanco mientras las células madre las obtienen de ratones con el pelo marrón. De esta forma, los ratones quimera tendrán un pelaje a manchas blancas y marrones, que serán más o menos abundantes dependiendo de la contribución de cada tipo celular al patrón general del animal (figura 4). El cruce de estas quimeras con animales de pelo blanco nos permite seleccionar aquellos ratones donde los caracteres modificados se transmiten a través de las células germinales (aquellos descendientes de color oscuro).

Las construcciones más sencillas para generar ratones knockout sustituyen uno o varios exones del gen diana por el casete que lleva el gen de resistencia a la neomicina. De esta forma, se interrumpe de forma completa la expresión del gen diana en todos los órganos y tejidos del animal desde el momento de su concepción. Esto puede ser suficiente para estudiar algunos genes, pero un problema frecuente, especialmente si el gen a estudiar es im-



portante, es que la carencia del gen produzca letalidad embrionaria. En esta situación, habremos demostrado que el gen era importante pero no tendremos animales disponibles para estudios posteriores. Para evitar estos problemas se recurre al diseño y construcción de knockouts condicionales.

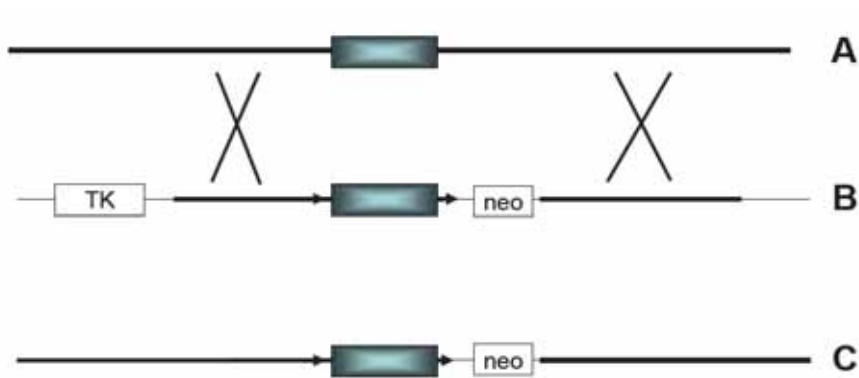


Figura 3. Esquema simplificado de los vectores empleados en la generación de ratones *knockout* condicionales. El gen de interés (rectángulo azul) se localiza en el genoma del ratón (A). Hay que construir un vector que contenga el gen de interés rodeado por secuencias *loxP* (cabezas de flecha), el gen de selección positiva (*neo*) y el gen de selección negativa (*TK*) (B). Este vector se integra en el genoma de las células madre mediante el proceso de recombinación (aspas grandes), de forma que al final nos quedamos con la construcción (C) insertada en el genoma.



Figura 4. Ratones quiméricos, producto de la inyección de células madres transformadas (pelaje oscuro) en blastocistos de ratones blancos.

## 5. KNOCKOUTS CONDICIONALES

La construcción de knockouts condicionales, es decir de aquellos animales donde el gen diana se elimina sólo en un órgano o tipo celular concreto, o en un tiempo específico del ciclo vital del animal, aprovecha la flexibilidad del sistema Cre/*loxP* que se ha expuesto anteriormente. El vector de sustitución es similar a lo expuesto para los knockout clásicos, pero se introducen 2 secuencias *loxP* rodeando al gen o al exón que queremos eliminar. Estas secuencias se introducen en regiones no codificantes del entorno del gen para evitar que tengan ninguna consecuencia fisiológica en los ratones que las lleven. La introducción y selección del vector es idéntica a lo descrito para los knockout clásicos, pero el resultado será un ratón en el que el gen diana está rodeado de secuencias *loxP* pero que no tiene ninguna consecuencia fisiológica. Estos animales reciben el nombre de ratones “floreados” (*floxed*, en inglés) y constituyen un estadio intermedio necesario en el camino hacia la construcción final del modelo.

Estos animales “floreados” se deben cruzar con ratones transgénicos que expresan la proteína Cre bajo el control de un promotor específico, que sólo se activa en un órgano o tipo celular concreto. Por ejemplo, uno de los modelos más utilizados en el CIBIR emplea ratones donde el gen de la adrenomedulina está “floreado”. Cuando estos ratones se cruzan con otros que portan la proteína Cre controlada por un promotor específico para neuronas, la proteína Cre se expresará sólo en neuronas y en estas células se producirá la ablación del gen de la adrenomedulina. Sin embargo, en el resto de células no se producirá la ablación del gen a pesar de que en todas ellas el gen está “floreado”, ya que en estas células no se expresa la proteína Cre. De esta forma se obtienen ratones que viven sin problemas, ya que tienen una expresión relativamente normal de adrenomedulina, pero cuyas neuronas carecen de este gen, permitiendo el estudio detallado de las funciones del gen de la adrenomedulina en el sistema nervioso (Fernandez *et al.*, 2008).

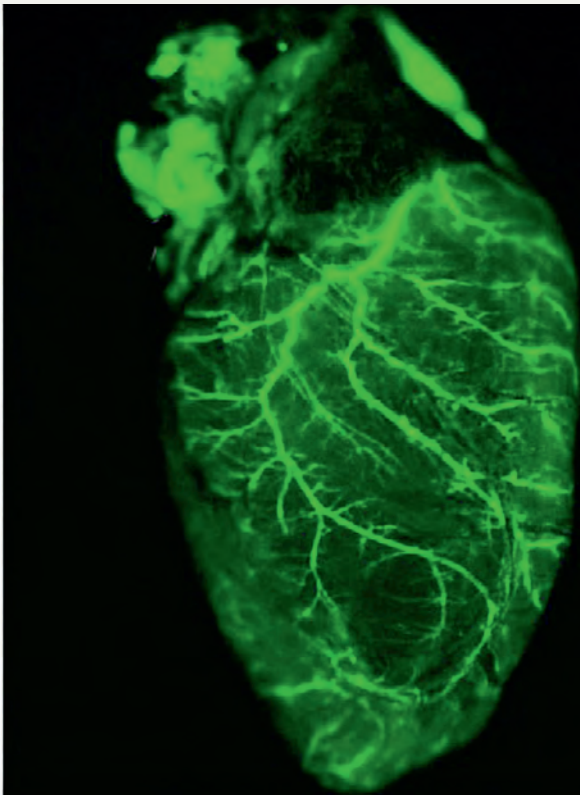
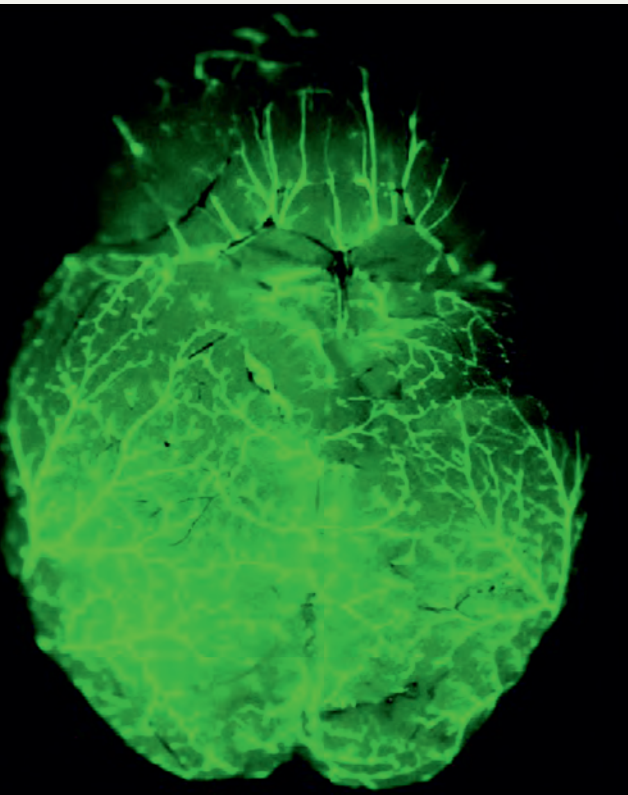
Obviamente, una vez que se tiene una línea de ratones con un gen “floreado”, ésta se puede cruzar con distintos transgénicos para conseguir la delección del gen en distintos órganos o tejidos. Si el promotor que se emplea para controlar la expresión de Cre se activa en un momento concreto del ciclo vital del animal, tendremos un knockout controlado temporalmente. De forma similar, si el promotor es sensible a la presencia de fármacos tendremos un knockout inducible, de forma que podremos disparar la destrucción del gen en el momento en que inyectemos la sustancia adecuada (Tabla 1). Por supuesto, cualquier combinación de todo lo anterior es posible y la imaginación del investigador es el único límite para este tipo de tecnología.

## BIBLIOGRAFÍA

Alva, J. A., Zovein, A. C., Monvoisin, A., Murphy, T., Salazar, A., Harvey, N. L., Carmeliet, P., Iruela-Arispe, M. L. (2006) VE-Cadherin-Cre-recombinase

- transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn*, 235, 759-767.
- Backman, C. M., Zhang, Y., Malik, N., Shan, L., Hoffer, B. J., Westphal, H., Tomac, A. C. (2009) Generalized tetracycline induced Cre recombinase expression through the ROSA26 locus of recombinant mice. *J Neurosci Methods*, 176, 16-23.
- Bertin, G., Poujeol, C., Rubera, I., Poujeol, P., Tauc, M. (2005) In vivo Cre/loxP mediated recombination in mouse Clara cells. *Transgenic Res*, 14, 645-654.
- Burga, L. N., Hu, H., Juvekar, A., Tung, N. M., Troyan, S. L., Hofstatter, E. W., Wulf, G. M. (2011) Loss of BRCA1 leads to an increase in epidermal growth factor receptor expression in mammary epithelial cells, and epidermal growth factor receptor inhibition prevents estrogen receptor-negative cancers in BRCA1-mutant mice. *Breast Cancer Res*, 13, R30.
- Chen, J., Kwon, C. H., Lin, L., Li, Y., Parada, L. F. (2009) Inducible site-specific recombination in neural stem/progenitor cells. *Genesis*, 47, 122-131.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., Selkoe, D. J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*, 360, 672-674.
- Ehlken, H., Kondylis, V., Heinrichsdorff, J., Ochoa-Callejero, L., Roskams, T., Pasparakis, M. (2011) Hepatocyte IKK2 protects Mdr2<sup>-/-</sup> mice from chronic liver failure. *PLoS One*, 6, e25942.
- Fernández, A. P., Serrano, J., Tessarollo, L., Cuttitta, F., Martínez, A. (2008) Lack of adrenomedullin in the mouse brain results in behavioral changes, anxiety, and lower survival under stress conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 12581-12586.
- Fracarollo, D., Berger, S., Galuppo, P., Kneitz, S., Hein, L., Schutz, G., Frantz, S., Ertl, G., Bauersachs, J. (2011) Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction. *Circulation*, 123, 400-408.
- He, B., Deckelbaum, R. A., Miao, D., Lipman, M. L., Pollak, M., Goltzman, D., Karaplis, A. C. (2001) Tissue-specific targeting of the pthrp gene: the generation of mice with floxed alleles. *Endocrinology*, 142, 2070-2077.
- Hesselton, D., Anderson, R. M., Beinat, M., Stainier, D. Y. (2009) Distinct populations of quiescent and proliferative pancreatic beta-cells identified by HOTTre mediated labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14896-14901.
- Lee, N. S., Rohan, J. G., Zitting, M., Kamath, S., Weitz, A., Sipos, A., Salvaterra, P. M., Hasegawa, K., Pera, M., Chow, R. H. (2012) A novel dual-color reporter for identifying insulin-producing Beta- cells and classifying heterogeneity of insulinoma cell lines. *PLoS One*, 7, e35521.
- Li, H., Zhou, X., Davis, D. R., Xu, D., Sigmund C. D. (2008) An androgen-inducible proximal tubule-specific Cre recombinase transgenic model. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294, F1481-F1486.

- McCarthy, J. J., Srikuea, R., Kirby, T. J., Peterson, C. A., Esser, K. A. (2012) Inducible Cre transgenic mouse strain for skeletal muscle-specific gene targeting. *Skelet Muscle*, 2, 8.
- Owen, C., Czopek, A., Agouni, A., Grant, L., Judson, R., Lees, E. K., Mcilroy, G. D., Goransson, O., Welch, A., Bence, K. K., Kahn, B. B., Neel, B. G., Mody, N., Delibegovic, M. (2012) Adipocyte-specific protein tyrosine phosphatase 1B deletion increases lipogenesis, adipocyte cell size and is a minor regulator of glucose homeostasis. *PLoS One*, 7, e32700.
- Pajerowski, A. G., Shapiro, M. J., Gwin, K., Sundsbak, R., Nelson-Holte, M., Medina, K., Shapiro, V. S. (2010) Adult hematopoietic stem cells require NKAP for maintenance and survival. *Blood*, 116, 2684-2693.
- Rodrigo, J., Fernández-Vizarra, P., Castro-Blanco, S., Bentura, M. L., Nieto, M., Gómez-Isla, T., Martínez-Murillo, R., Martínez, A., Serrano, J., Fernández, A. P. (2004) Nitric oxide in the cerebral cortex of amyloid-precursor protein (SW) Tg2576 transgenic mice. *Neuroscience*, 128, 73-89.
- Shi, Y., Bassnett, S. (2007) Inducible gene expression in the lens using tamoxifen and a GFP reporter. *Exp Eye Res*, 85, 732-737.
- Tetreault, M. P., Yang, Y., Travis, J., Yu, Q. C., Klein-Szanto, A., Tobias, J. W., Katz, J. P. (2010) Esophageal squamous cell dysplasia and delayed differentiation with deletion of kruppel-like factor 4 in murine esophagus. *Gastroenterology*, 139, 171-181.
- Wang, Y., Krushel, L. A., Edelman, G. M. (1996) Targeted DNA recombination in vivo using an adenovirus carrying the cre recombinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3932-3936.
- Ward, W. W., Bokman, S. H. (1982) Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*, 21, 4535-4540.
- Wunderlich, F. T., Wildner, H., Rajewsky, K., Edenhofer, F. (2001) New variants of inducible Cre recombinase: a novel mutant of Cre-PR fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility. *Nucleic Acids Res*, 29, E47.
- Xie, T., Chen, M., Weinstein, L. S. (2010) Pancreas-specific Gsalpha deficiency has divergent effects on pancreatic alpha- and beta-cell proliferation. *J Endocrinol*, 206, 261-269.
- Xu, D., Borges, G. R., Davis, D. R., Agassandian, K., Sequeira López, M. L., Gómez, R. A., Cassell, M. D., Grobe, J. L., Sigmund, C. D. (2011) Neuron- or glial-specific ablation of secreted renin does not affect renal renin, baseline arterial pressure, or metabolism. *Physiol Genomics*, 43, 286-294.
- Zhang, Q., Triplett, A. A., Harms, D. W., Lin, W. C., Creamer, B. A., Rizzino, A., Wagner, K. U. (2010) Temporally and spatially controlled expression of transgenes in embryonic and adult tissues. *Transgenic Res*, 19, 499-509.



# ZUBÍA

24



Gobierno de La Rioja  
[www.larioja.org](http://www.larioja.org)



**Instituto  
de Estudios  
Riojanos**