

EL LOCUS T

Un modelo genético natural para el estudio de la reproducción y la diferenciación

Humberto Ossa R. Biol.*

"...Las mutaciones a nivel del locus T determinan un cuadro de fenómenos típicos, caracterizados por abortos habituales, infertilidad masculina y variaciones en el tamaño, o ausencia de la cola".

DEFINICION

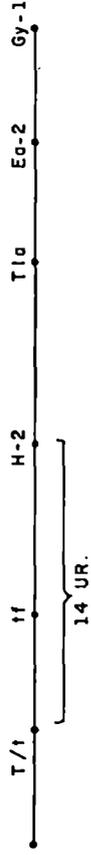
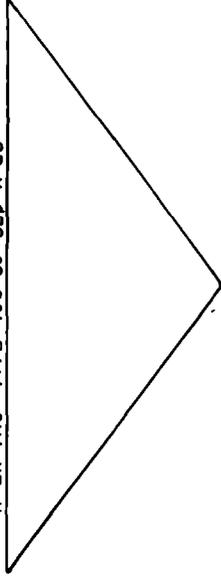
El locus T es una región cromosómica ubicada a 14 unidades de recombinación genética, a la izquierda del complejo mayor de histocompatibilidad murino, hacia el lado del centrómero del cromosoma 17 (3) (ver fig. 1). Dicha región genética codifica, normalmente, para proteínas de membrana importantes en la comunicación intercelular, en el desarrollo embrionario, la espermatogénesis y en especial la diferenciación de la hoja germinativa ectodérmica. Las mutaciones a nivel del locus T determinan un cuadro de fenómenos típicos que se caracterizan por abortos habituales, infertilidad masculina y variaciones en el tamaño, o ausencia de la cola (ver fig. 2).

HISTORIA

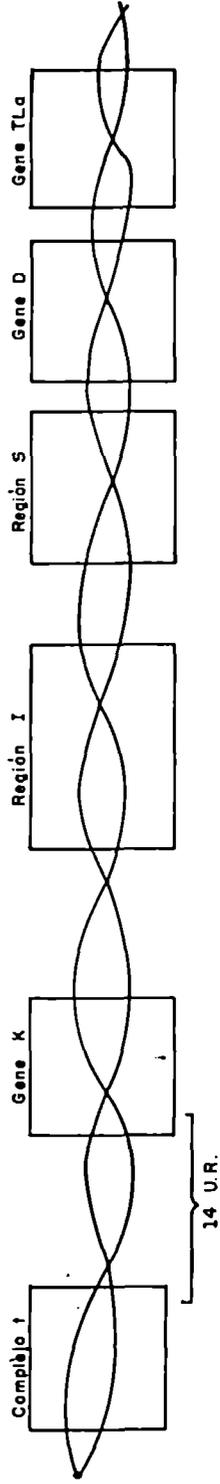
El locus T fue descubierto en 1927 por la radióloga soviética Nelly Drobovolskaia Zawadkaia, mientras experimentaba con ratones machos: las gónadas de los ratones fueron irradiadas y luego los machos fueron cruzados con hembras no irradiadas, para observar en la prole los posibles efectos mutagénicos causados por los rayos X en la línea germinal. Sorpresivamente dicha investigadora encontró que algunos de los descendientes para la F1, de uno de los machos irradiados, presentaba una cola de aspecto particular (muy corta), con relación a los ratones normales.

* Profesor, Univ. Mayor de Cundinamarca. Unidad de Bacteriología.

H-2K IrlB-Ic3-Ss-SLp H-2D



GENES DEL COMPLEJO H-2



Representación diagramática del cromosoma 17 del ratón, mostrando las posiciones de los Complejos H-2 y Locus T, además:
 Ii: Marcador Tufted, TLa: Antígeno timo leucemia, Ea-2 Antígeno eritrocitario 2, Gy-1 Virus de Gross-1 (Klein 1975 b)

Al cruzar estos ratones de cola corta (mutantes) entre sí y a su vez con sus progenitores (retrocruce de prueba), la investigadora demostró que esta mutación se heredaba como un carácter autosómico dominante y lo denominó "Brachyury" o T (por Tail). A continuación, la investigadora asignó los posibles genotipos que controlaban las características silvestres y mutantes, señalando además que la mutación en estado homocigoto (T/T), es invariablemente letal.

Los genotipos propuestos fueron:

- $+/+$ = genotipo normal silvestre (no mutante).
- $T/+$ = genotipo heterocigoto portador de la mutación.
- T/T = genotipo homocigoto mutante invariablemente letal.

Cinco años después, la misma investigadora en compañía de N. Koboziéff dan el paso más importante en la historia del Locus T, al cruzar un ratón mutante (T/t) perteneciente a la cepa isogénica BTBR, con un ratón silvestre, (*Mus musculus*). Ellos encontraron para la F^1 de éste cruce, que aparecían animales con ausencia absoluta de cola, lo cual indicaba que el parental silvestre poseía un gen que influenciaba de alguna forma al gen mutante del parental endogámico, haciendo que éste potenciara su acción, representada por el fenotipo sin cola.

Análisis genéticos posteriores, realizados por los Genetistas L. C. Dunn y D. Bennett, (3-4-5-7) establecieron que este nuevo mutante encontrando en poblaciones de ratones silvestres se heredaba como su carácter autosómico recesivo, que se presentaba como alelo del mutante dominante. Cuando los dos mutantes (T) y (t) se encuentran en estado alélico determinando el genotipo de doble heterocigoto (T/t) que es el responsable del fenotipo caracterizado por ausencia de cola. Los mencionados investigadores encontraron además, que el mutante recesivo (t) en estado homocigoto (t/t) podía ser letal, semiletal o viable. Esto hace pensar que dicho polimorfismo era generado por mutaciones diferentes que afectaban una familia de genes ligados y relacionados funcionalmente, dentro de la población estudiada.

Cuando se ampliaron los estudios con ratones silvestres de la misma especie, pero tomados de poblaciones aisladas geográficamente, se pudo comprobar que existían diferentes mutantes recesivos (t), además, si dos de estos genes mutantes se encontraban en estado homocigoto y provienen del mismo origen (t^X/t^X) el individuo que los porta no es viable, mientras que si dichos genes son de origen diferente (t^X/t^Y) se complementan permitiendo la viabilidad, aunque dicho arreglo interfería con el desarrollo de la espermatogénesis (profase I de la meiosis), haciendo que los machos sean estériles. En la actualidad se conocen 9 grupos de complementación diferentes, que agrupan cerca de 50 alelos encontrados en las poblaciones estudiadas, siendo los más representativos: $t^{1,2}$, $t^{W7,3}$, t^0 , t^{W5} , t^9 , t^{W1} , $t^{WPa}^{1,2}$ (Ver Tabla 1 y Fig. 2).

CARACTERIZACION DE LAS MUTACIONES

Basados en las observaciones anteriores L. C. Dunn y D. Bennett (6) mantienen las mutaciones mediante cruces controlados así:

1. Cruce entre dobles heterocigotos para la mutación de un mismo origen que determina un sistema letal balacenoado:

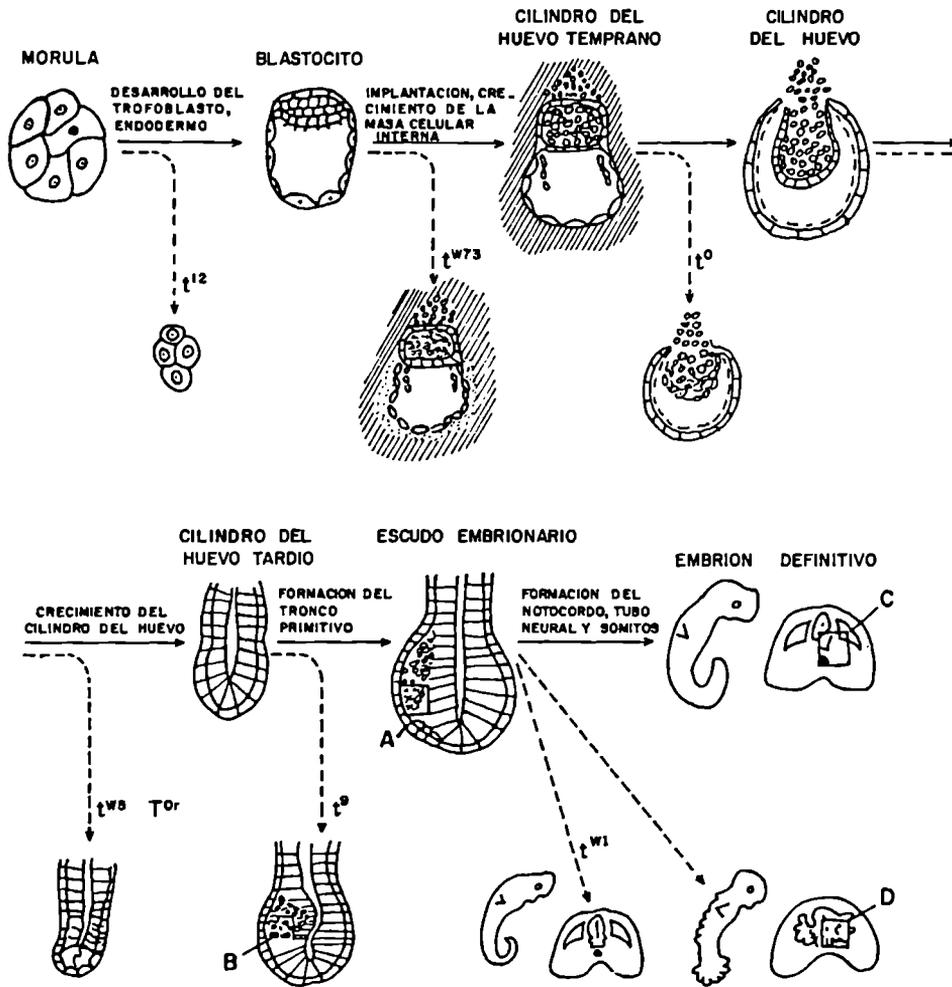
TABLA NUMERO 1

RESUMEN DE LOS EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO, PRODUCIDOS POR LOS ALELOS HOMOCIGOTOS T/T Y F/F

Tomado de Bennet (3)

Tipo de factor	Días de Viabilidad	Muerte del embrión	Tejido afectado	Tipo de defecto
t^{12}	1	2-3	Morula	No formación al blastocisto.
$t^{w7.5}$	3	4-5	Trofotodermo	Fracaso para el establecimiento en las conexiones con la decidua uterina.
t^0	5	6-7	Masd celular interna	Fracaso de la diferenciación de los octodermos embrionario y extraembrionario.
t^{w5}	6.5	8-10	Ectodermo embrionario	Degeneración del ectodermo embrionario.
t^9	7	8-11	Tronco primitivo	Crecimiento incontrolado del tronco primitivo.
t^{w1}	9	11-21	Tubo neural	Degeneración de la porción ventral del tubo neural.
t^{w2}	14	14-21	Cerebro anterior	Octocefalia, anoftalmia, Microftalmia, acéfalo.
$t^{wPa.1}$	15	15		
T	8.5	10-11	Notocordo	Irregularidades del tubo murai y notocordo, fracaso del desarrollo de las conexiones elantoides.
<u>T</u> _{or}	7	8-9	Ectodermo embrionario	Degeneración del ectodermo embrionario.
To	?	10-11	Mesodermo notocordal	Ausencia de la parte posterior del cuerpo, fracaso del crecimiento de la superficie del antoideo, fracaso de la diferenciación de los sonidos.

DESARROLLO TEMPRANO DEL RATON NORMAL Y DE LOS DIFERENTES HOMOCIGOTOS PARA EL COMPLEJO t



LA LINEA CONTINUA INDICA EL DESARROLLO NORMAL, MIENTRAS QUE LA LINEA PUNTEADA INDICA EL ESTADIO DONDE SE INTERRUMPE EL DESARROLLO NORMAL CUANDO SE PRESENTA EN ESTADO HOMOCIGOTO UN MUTANTE t DEL MISMO ORIGEN.

Tomado de: BENNETT (3)

$T/t^X \times T/t^X$: Parentales (fenotipo sin cola).

$T/T \times T/t^X$: Filial 1 (50% letales (T/T y t^X/t^X) y 50% viables de fenotipo sin cola).

2. Cruce entre dobles heterocigotos para la mutación de origen diferente (t^X, t^Y), donde los homocigotos para esta se complementan a pesar de producir esterilidad masculina.

$T/t^X \times T/t^Y$: Parentales portadores de mutaciones t de origen diferente y fenotipo sin cola.

$T/T \times T/t^X, T/t^Y$: Filial 1: (25% letales T/T), 50% viables de genotipo doble heterocigoto y fenotipo sin cola y 25% homocigotos t^X/t^Y que se complementan permitiendo la viabilidad con machos estériles.

Entre 1960 y 1970, estos investigadores se dedicaron a estudiar la embriogénesis, tanto normal como anormal de las diferentes cepas de ratones que estaban estudiando, tratando de encontrar a que nivel afectaban el desarrollo embrionario los homocigotos mutantes del mismo origen. Se encontró toda una gama de fenómenos, pues cada mutante interfiere con un estadio preciso del desarrollo embrionario en la siguiente forma:

Mutante t^{12}

Los embriones portadores del alelo letal t^{12} , cuando se encuentran en estado homocigoto, (t^{12}/t^{12}) pueden alcanzar satisfactoriamente el estado de mórula, hacia el tercer día del desarrollo embrionario, pero son incapaces de alcanzar el primer paso de diferenciación hacia el establecimiento del trofotodermo (10). Estos embriones hacia los tres días y medio del desarrollo mueren demostrando una anormal producción y utilización de lípidos, lo cual origina un metabolismo anaerobio anormal.

Histológicamente se demostró que el principal defecto que inducía el aborto en estos mutantes homocigotos para t^{12} , era una marcada deformación en la membrana de sus células que impedía la comunicación intercelular necesaria para que se complete el paso de mórula a blastocito. A causa de esto las blastómeros de la mórula no migran hacia un extremo para formar la masa celular interna, lo que determina el fracaso del desarrollo a este nivel incipiente produciéndose el aborto del tejido embrionario en estado de mórula al tercer día de gestación. (3).

Recientemente se sugirió que las células de estos abortos presentan deficiencia en la producción de RNA ribosomal, pues sus nucleolos son anormales.

Mutante t^{w73}

Los homocigotos para este mutante (t^{w73}/t^{w73}), alcanzan satisfactoriamente el estadio de blastocisto y comienzan el proceso de implantación. Este proceso, sin embargo, se interrumpe al fracasar la diferenciación de las células invasivas que implantan el blastocisto sobre la decidua uterina, lo que impide que se establezca la comunicación madre-embrión necesaria para la nutrición del tejido embrionario. Se sabe, además, que esta anomalía se debe al fracaso en la diferenciación normal del trofotodermo. Los embriones son abortados al cuarto día de la gestación (3).

Mutante t^0

Los homocigotos para t^0 (t^0/t^0), se implantan exitosamente, pero fracazan en el momento de diferenciar su hoja germinativa ectodérmica. En forma normal, en este momento de la gestación, la hoja germinativa ectodérmica aparece dividida en ectodermo embrionario y ectodermo extraembrionario (originado de la proliferación de las células del cono de la ectoplacenta). En estos homocigotos mutantes no se logran diferenciar adecuadamente los derivados de la hoja germinativa ectodérmica, lo cual hace que el embrión sea abortado poco tiempo después.

Estudios de microscopía electrónica de células obtenidas de estos abortos revelaron acúmulos lipídicos y mitocondrias anormales (12), (10). Los embriones homocigotos para este mutante son abortados al quinto día de la gestación (3).

Mutante t^{W5}

Los mutantes homocigotos para t^{W5} ($t^{W5} t^{W5}$) sufren un proceso normal de diferenciación del ectodermo embrionario y extraembrionario, alcanzando a formar el cilindro del huevo (elongación endodérmica recubiertas de células ectodérmicas). Sin embargo, en estos mutantes las células correspondientes al ectodermo embrionario se tornan hiperpigmentadas y mueren (12). Los efectos de este gen mutante están marcadamente restringidos a nivel de la diferenciación sobre el tipo de ectodermo de origen embrionario. Todo lo anterior determina el aborto de los embriones al sexto día de la gestación (3).

Mutante t^9

Este controvertido gen mutante, descubierto hacia la década de los años setenta por Bennet, es muy característico. Normalmente un embrión a los 7 días de desarrollo comienza la diferenciación del tronco primitivo a mesodermo, y en el octavo día ha hecho regresión para cerrar el tubo neural. Estos embriones normales ya poseen dos pliegues cefálicos, notocorda y 2 a 8 pares de somitos; además, las células mesodérmicas, para esta época, ya comienzan su migración.

En los embriones homocigotos para t^9 (t^9/t^9) se producen alteraciones en la diferenciación del mesodermo, presentando alteraciones en la membrana celular, sin la formación de filipodios o prolongaciones citoplasmáticas que dan la forma estelar característica de estas células, y se inhibe además la migración, y la diferenciación del mesodermo y sus derivados. Todo parece indicar que la falta de filipodios conduce a defectos en la interacción célula-célula, lo que determina fallas en la adhesión y la motilidad e imposibilita la transición de tronco primitivo a mesodermo. Toda esta gama de fenómenos determina la muerte embrionaria alrededor del octavo día de la gestación (3).

Mutante t^{W1}

Durante el noveno día de la gestación en el ratón, ocurre el desarrollo del tubo neural. En embriones homocigotos para t^{W1} (t^{W1}/t^{W1}), se presenta una degeneración de las células de la porción ventral del tubo neural; las células pierden su forma característica tornándose elongadas, lo cual afecta el desarrollo de la porción cefálica y caudal, y provoca la muerte embrionaria alrededor del décimo día de la gestación. Los embriones abortados presentan un cuadro histológico caracterizado por edema, hidrocefalia y microcefalia. Los efectos producidos por este alelo recesivo letal se asemejan a los producidos por el mutante dominante T en estado homocigoto (T/T) (3). (Ver Fig. 2).

Mutantes t^{wpa1} , t^{wpa2} y t^{wpa3}

Estos son los últimos mutantes que reporta la literatura. Los embriones homocigotos

mueren durante la implantación o un poco tiempo después, con un cuadro de desorganización celular generalizada (9).

Otros efectos del complejo T/t

Distorsión de la segregación. Esta sólo se presenta en machos portadores. El apareamiento entre machos portadores del mutante *t* recesivo (T/t), (t/+), con hembras normales (+/+), produce distorsiones en la segregación genética que no están de acuerdo con las leyes mendelianas. Si se cruza un macho (t/+) con una hembra (+/+), se esperaría que para la F₁ se obtenga un 50% de hijos (t/+) y un 50% (+/+); sin embargo, el resultado real es hasta un 90% de portadores del mutante *t*. Lo anterior indica que los espermatozoides que dicho mutante son más eficientes que los normales para fecundar los óvulos. Este hecho podría explicar la persistencia de los genes mutantes recesivos durante la evolución de la especie, ya que el 35% de los ratones silvestres son portadores (12 - 13).

Efectos en el comportamiento cromosómico. Observaciones realizadas inicialmente por J. Klein y C. Hammerberg (10) y concluidas por M. Lyon (10), demostraron que la cromatina mutante (*t*) no sinapsa durante el zigotene meiótico con la cromatina normal. Esto explica en parte la distorsión de la segregación y el marcado desequilibrio de ligamiento entre el complejo T/t y el complejo mayor de histocompatibilidad (H-2); pues sólo cuatro H-2 diferentes están asociados con los 42 mutantes (*t*) encontrados hasta ahora. Shin y colaboradores (14), recientemente, postularon que la no complementariedad entre la cromatina mutante (*t*) y la cromatina normal se debe a una inversión que afecta a la primera. .

Efectos en la esterilidad masculina. Cuando quiera que se encuentren dos mutantes (*t*) de origen diferente haciendo alelismo (*t*⁰/*t*⁹), se complementan las mutaciones evitando la letalidad, pero todo macho portador es estéril (azoospermico), mientras que las hembras son normales.

Estudios más detallados sobre la espermatogénesis de estos ratones estériles demostró la existencia de espermatozoides anormales (teratospermias, oligospermia, etc, hasta azoospermias completas. En otros análisis se demostró que la espermatogénesis se desarrolla normalmente hasta la etapa de espermatocito primario, pero fracasa en el momento de iniciar la meiosis uno (profase). Estudios de microscopía electrónica revelaron anomalías de los microtúbulos que conectan la membrana, para permitir una normal nutrición, además de deformidades en el sitio donde el centríolo distal va a formar el flagelo.

CONCLUSION

El complejo T/t es, en estos momentos uno de los mejores modelos genéticos que explica las infertilidades masculinas (azoospermias) y femeninas (abortadoras habituales). Por esta razón varios grupos de investigadores han dedicado sus esfuerzos al esclarecimiento de estos fenómenos genéticos y embrionarios, que tienen una relación evidente con los fenómenos de selección natural, e implican sofisticados mecanismos moleculares.

Como se puede apreciar, los estudios sobre este modelo natural se encuentran muy avanzados en el ratón, existiendo sólo dos evidencias publicadas (8, 9) que demuestran tipos de herencia parecidos al locus T en el humano. Para los médicos veterinarios y los zootecnistas, es de gran importancia el conocimiento de este tipo de estudios para que traten de asociarlos con los frecuentes casos de fertilidad disminuída y de esterilidad de los animales domésticos.

REFERENCIAS

1. Artz, K., Shin, H.S., and Bennett. Gene mapping within the T/t complex of the mouse. *Cell* 28: 471-476. 1982.
2. Awdeh, Z.L., Raun, D., Yunis, E.J., and Alper, C. Extended HLA complement allele haplotypes: Evidence for T/t-like complex in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 80: 259-263. 1983.
3. Bennett, D. The T-locus of the mouse. *Cell*, 6: 441-454. 1975.
4. Bennett, D. Genetically programmed abnormalities of cell interaction. *Birth Defects*. 14: 285-292. 1979.
5. Bennett, D. Development antigen and differentiation. *Ex. Med. International Congress No. 432 Birth Defect. Proceeding of the fifth international Montreal Canadá.* 1980.
6. Bennett, D. and Dunn, L.C. Populations Genetics of T/t complex mutations. *Nature*. 270: 479. 1977.
7. Dunn, L.C. Abnormalities associated with a chromosome region in the mouse. *Science*. 144: 260-267. 1979.
8. Fellous, M., Boué, J., Malbrunot, C., Wollman, E., Sasportes, M., Van Cong, N., Marcelli, A., Rebourcet, R., and Hubert, Ch. A Five generation family with sacral agenesis and spina bifida: Possible similarities with the mouse T-complex. *Am. J. Med. Genet.* 12: 465-487. 1982.
9. Guennet, J.L., Condamine, H., Gaillard, J., and Jacob, F. Three new t-haplotypes in the mouse. *Genet. Res.* 36: 211-217. 1980.
10. Hammerberg, C., Klein, J. Linkage disequilibrium between H-2 and t-complexes in chromosome 17 of the mouse. *Nature*. 258: 295-299. 1975.
11. Klein, J., and Hammerberg, C. The control of differentiation by the T complex. *Immunological Reviews*. 33: 70-104. 1977.
12. Micková, M., and Ivanyi, P. Sex-dependent and H-2 linked influence on expressivity of the brachyry gene in mice. *J. Heredity*. 65: 369-372. 1974.
13. Shin, H.S., Stavnezer, J., and Bennett, D. Genetic structure and origin of t-haplotypes of mice, Analyzed with H-2 cDNA probes. *Cell*. 29: 969-976. 1982.
14. Shin, H.S., Flaerty, L., Artz, K., and Bennett, D. Inversion in the H-2 complex of t-Haplotypes in mice. *Nature* 306: 383-385. 1983.