

ANIMALS TRANSGÈNICS EN RECERCA I MODELS ANIMALS DE MALALTIES

LLUÍS MONTOLIU

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER),
Instituto de Salud Carlos III, Madrid

Adreça per a la correspondència: Lluís Montoliu. Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Campus de Cantoblanco. C. de Darwin, 3. 28049 Madrid. Tel.: 915 854 844.
Adreça electrònica: montoliu@cnb.csic.es.

RESUM

L'experimentació animal és essencial per poder interpretar adequadament el genoma humà i per reproduir les malalties que afecten les persones en altres organismes semblants a nosaltres. Entre aquests organismes destaquen els ratolins, un mamífer de petita mida però molt adequat per a la recerca en biomedicina. El genoma del ratolí també ha estat seqüenciat i, majoritàriament, comparteix el nombre de gens existents en el genoma humà, entre 20.000 i 25.000 gens. Addicionalment, tots aquests gens estan molt conservats evolutivament, i són similars als corresponents humans en un 95 %. Per tot això, la recerca sobre els gens del genoma del ratolí, indirectament, és una recerca sobre la funció dels gens humans. Tot allò que aprenem investigant la funció de determinats gens en el ratolí ho podem aplicar al coneixement dels gens homòlegs en humans. Finalment, els ratolins permeten la manipulació del seu genoma mitjançant tècniques de modificació genètica. Són els ratolins que anomenem *ratolins transgènics* o *mutants*, que porten nous gens o alteracions específiques en algun dels seus gens. Amb ells podem preparar models animals de moltes malalties que afecten els humans, per augmentar el nostre coneixement d'aquestes malalties i poder desenvolupar noves estratègies terapèutiques.

Paraules clau: ratolí transgènic, genoma, modificació genètica, cèl·lula troncal, biomedicina.

TRANSGENIC ANIMALS IN RESEARCH AND ANIMAL MODELS OF HUMAN DISEASES

SUMMARY

Animal experimentation is essential to allow the adequate interpretation of the human genome and to reproduce the pathologies that affect us, as human beings, in other similar organisms. Among them, mice stand up as a small size mammal that is very suitable for research in biomedicine. The mouse genome has also been sequenced and, mostly, shares with the human genome the number of existing genes, situated between 20.000 and 25.000 genes. Additionally, all these genes have been highly conserved through evolution, thus being 95% similar to the corresponding human versions. For all this, research on genes from the mouse genome, indirectly, is also research on the function of human genes. Everything that we can learn by investigating the function of specific genes in the mouse can be applied to our knowledge on the corresponding homologous genes in humans. Finally, mice also allow the manipulation of their genome through genetic modification techniques. These are known as transgenic or mutant mice, carrying new genes or specific alterations in some of their genes. With them, it is possible to generate animal models of many diseases affecting humans, to increase our knowledge on them and to eventually be able to develop new therapeutic strategies.

Key words: transgenic mice, genome, genetic modification, stem cells, biomedicine.

ELS RATOLINS: EXEMPLE D'ANIMAL D'EXPERIMENTACIÓ

Els animals d'experimentació són fonamentals en biomedicina. Especialment en aquesta època de recerca postgenòmica en què ens trobem. En efecte, després d'obtenir les seqüències dels genomes de molts animals, entre les quals les del genoma humà i d'altres mamífers, calia progressar en el nostre coneixement dels gens que els conformen. Saber llegir els genomes de molts mamífers ha servit per descobrir la majoria dels gens que hi són representats. Ara bé, poca o nul·la informació s'obté de la funció de tots aquests gens amb la consulta directa dels genomes. Per esbrinar la funció cal fer experiments i, òbviament, no es poden fer amb persones. Per això poder disposar de mamífers similars a nosaltres, els humans, ha estat i és un pas fonamental en el nostre coneixement dels genomes.

mental en el nostre coneixement dels genomes.

Entre tots els animals que es poden fer servir en experimentació destaca el ratolí. Malgrat que, en aparença, els ratolins siguin molt diferents dels humans, per exemple pel que fa a la mida, la realitat ens demostra que són dos animals mamífers que comparteixen molt en comú. En particular, el desenvolupament embrionari dels ratolins és molt similar al dels humans. Si comparem com es formen els òrgans, com es desenvolupen les extremitats, com funcionen els diferents sistemes fisiològics dels ratolins i dels humans arribarem a la conclusió que comparteixen molts aspectes. Aquesta versemblança general té un fonament genètic. En realitat els genomes de ratolins i humans comparteixen gairebé el mateix nombre de gens, entre 20.000 i 25.000 i, el que és més important, aquests

gens s'assemblen (són homòlegs) en un 95 %. Aquesta similitud no és només estructural, de seqüència de DNA, sinó funcional. És a dir, coneixent la funció d'algun gen en el ratolí podem esbrinar quina pot ser la funció del gen corresponent (del gen homòleg) del genoma humà i, per exemple, entendre com una funció anòmala del gen o de la proteïna que codifica pot acabar tenint conseqüències patològiques i esdevenir una malaltia.

Adicionalment, els ratolins són uns animals especialment adequats per a l'experimentació científica. La seva mida petita permet estabular-los en condicions òptimes, respectuoses amb el benestar animal, en espais reduïts. Per tant, en animalaris de dimensions limitades es poden estabular milers de ratolins, cosa que no seria possible amb mamífers de mida més gran (com per exemple els porcs, que també s'utilitzen en alguns aspectes de la recerca en biomedicina). Els ratolins tenen un temps de gestació relativament curt, d'unes tres setmanes, i un temps de generació igualment curt, entorn de tres mesos, ja que arriben a la seva maduresa sexual a les 6-8 setmanes de vida. Una altra característica que els fa especialment interessants és que les seves ventrades són nombroses, sovint de sis a dotze cries en cada part i, a diferència d'altres animals, permeten la cria contínua, és a dir, una femella que ha acabat de parir pot ser fertilitzada pel mascle l'endemà, i s'aconsegueixen molts animals d'unes determinades característiques genètiques en poc temps. Si lliguem tot això amb el fet que són animals que s'adapten molt bé a la cria en captivitat, és fàcil comprendre el seu èxit en la recerca biomèdica. D'igual rellevància és el fet que coneixem moltes variants mutants de ratolins, producte dels esforços inicials, al final del segle XIX i al principi del XX, dels cuidadors de mascotes, que, inconscientment, però

sistemàticament, en la seva tasca de seleccionar encreuaments que produïssin ratolins amb un pelatge o pigmentació singulars, van acabar establint les bases de moltes de les soques consanguínies actuals de ratolins, variants genètiques específiques que han estat indispensables en l'ús d'aquests animals en experimentació biomèdica (vegeu la figura 1).

La utilització de ratolins en recerca biomèdica per esbrinar tot allò que no entenem de les malalties que afecten les persones no solament està fonamentada en la gran similitud genètica existent entre els genomes, sinó que ha estat propiciada per l'existència d'un conjunt de tecnologies que permeten manipular, a voluntat de l'investigador, el genoma del ratolí. Es tracta dels mètodes de modificació genètica, amb els quals es poden introduir nous gens, i també inactivar-ne alguns, específicament, amb la generació dels ratolins que globalment coneixem com a transgènics i que també inclouen els mutants (o genoanullats, els ratolins *knockout*, com es coneixen en la terminologia anglesa). Actualment, al laboratori, es poden generar ratolins transgènics «a la carta», mitjançant la introducció de nous gens o l'alteració d'alguns ja existents. Amb aquests nous models animals, generats *ad hoc* al laboratori, i investigant quin efecte té sobre el ratolí, sobre el seu desenvolupament, el seu comportament, la seva fisiologia, podem anticipar (o, segons els casos, reproduir) quin podria ser l'efecte d'alteracions genètiques similars quan s'esdevenen en els humans.

RATOLINS TRANSGÈNICS I MUTANTS (GENOANULLATS)

Des del principi dels anys vuitanta del segle passat sabem com podem generar ra-

tolins transgènics. És a dir, coneixem la tècnica necessària per introduir nous gens (per exemple d'origen humà) en el genoma del ratolí. Els nous fragments de DNA, que es preparen al laboratori, es poden microinjectar en embrions de ratolí, acabats de fecundar, en l'estadi d'una sola cèl·lula. Aquestes molècules de DNA foranes s'anomenen *transgens* i els animals finalment portadors s'anomenen, lògicament, *transgènics* (Montoliu, 1997). Els embrions microinjectats es poden retornar a una femella, preparada per acollir-los, i que serà responsable de gestar-los i de dur-los a terme, generant les cries, entre les quals en trobarem algunes que hauran incorporat el DNA microinjectat, el transgèn, en totes o en algunes de les seves cèl·lules. Si finalment es confirma, es pot validar, la inserció del nou gen, del transgèn, en el genoma del ratolí, direm que l'animal resultant és un *fundador* d'una nova soca de ratolins modificats genèticament que, si tot va bé, transmetrà a la seva descendència, per sempre més, aquest nou gen i ens permetrà obtenir una colònia de ratolins portadors de la mateixa modificació genètica per fer experiments. La tecnologia inherent a la generació de ratolins transgènics no ha evolucionat gaire en els darrers trenta anys. Essencialment, malgrat l'aparició d'algunes petites variacions i millores metodològiques, continuem obtenint aproximadament ratolins transgènics amb un 5 % d'eficiència. Això vol dir que, normalment, és possible obtenir vora cinc ratolins modificats genèticament, transgènics, a partir de la microinjecció d'un centenar d'embrions de ratolí.

Actualment s'han generat ja milers de soques de ratolins transgènics, portadors de moltes modificacions genètiques. Potser un dels més coneguts (i dels més útils en biomedicina) són els ratolins transgènics verds fluorescents (vegeu la figura 2).

Aquests són uns ratolins que han estat obtinguts mitjançant la microinjecció d'un gen (*GFP*) que codifica una proteïna fluorescent, aïllada d'una medusa del pacífic. La seva singularitat i bellesa, incontestables, està associada a la seva gran utilitat en biomedicina, ja que totes les cèl·lules d'aquest ratolí transgènica són fluorescentes i, així doncs, es poden fer servir per a trasplantaments, per a recerca de trasplantaments cel·lulars (per exemple, de moll de l'os) o d'òrgans, aprofitant el fet que les cèl·lules trasplantades seran sempre fàcilment reconegudes una vegada introduïdes en un nou organisme, trasplantades a un nou ratolí, vista la seva fluorescència òbvia. La importància d'aquest gen marcador, *GFP*, fluorescent, en biomedicina, i de totes les variants fluorescentes multicolors que han vingut al darrere, queda perfectament il·lustrada amb el Premi Nobel de Química que van rebre l'any 2008 Osamu Shimomura, Martin Chalfie i Roger Y. Tsien, els descobridors de la proteïna fluorescent GFP i de les seves aplicacions (http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008).

Una altra categoria de ratolins modificats genèticament és la formada pels ratolins mutants, (genoanul·lats, *knockout* en anglès) (Montoliu, 2000). Però per descriure els ratolins mutants cal que em refereixi primer a les cèl·lules troncales pluripotents embrionàries (cèl·lules ES, de *embryonic stem*, en anglès). Aquestes cèl·lules ES són conegudes popularment com les «cèl·lules mare» embrionàries, malgrat que *mare* no és un terme científicament correcte i és més apropiat anomenar-les *troncals*, que és una traducció més fidedigna de l'anglès. Les cèl·lules ES van saltar a la premsa i van ser conegudes per la societat quan, l'any 1998, dos equips d'investigadors nord-americans, liderats per Thomson i Gearhart, van donar a conèixer que havien obtingut les primeres cèl·lules ES humanes, a partir

d'embrions humans (Thomson *et al.*, 1998; Shamblott *et al.*, 1998). En realitat, més enllà de la novetat que representava haver descrit aquestes cèl·lules en l'espècie humana, aquells investigadors no van fer més que reproduir el que ja s'havia obtingut disset anys abans, l'any 1981, quan els laboratoris de Martin Evans i de Gail Martin van descriure, per primera vegada, aquestes cèl·lules en un mamífer, en el ratolí (Evans i Kaufmann, 1981; Martin, 1981).

Per què són tan importants les cèl·lules ES? Per respondre aquesta pregunta cal primer referir-nos, breument, al seu origen. Les cèl·lules ES apareixen molt aviat

en el desenvolupament embrionari preimplantacional, abans que l'embrió s'implanti a la matriu, en una fase que coneixem com a *blastocist*, que apareix als 3-4 dies del desenvolupament embrionari del ratolí (a la setmana en el desenvolupament embrionari humà). Després d'un seguit de divisions inicials que converteixen l'embrió original unicel·lular en una pilota de 32-64 cèl·lules, aparentment idèntiques, té lloc la primera gran diferenciació cel·lular i les cèl·lules es distribueixen asimètricament, en un costat de l'embrió, formant un botó, deixant una cavitat, tot plegat envoltat per una capa de cèl·lules. Doncs bé, les cèl·lules



FIGURA 1. Diferents ratolins mutants portadors de variants genètiques que alteren la pigmentació, origen de moltes de les actuals soques establertes de ratolins que es fan servir en biomedicina. La figura és un compendi de fotografies de diversos autors extretes de la web *Color genes*, <http://www.espcr.org/micemut>, que coordina l'autor d'aquest capítol.

del botó s'anomenen *massa interna celular*, que està formada fonamentalment per cèl·lules troncales pluripotents embrionàries, les cèl·lules ES. A partir d'aquestes cèl·lules ES es generaran tots i cadascun dels tipus cel·lulars existents en l'organisme, fet que demostra la seva pluripotència i la seva singularitat. Martin Evans, entre altres, es va adonar que era possible extreure aquestes cèl·lules ES dels embrions de ratolí i mantenir-les indefinidament en cultiu al laboratori, on, per exemple, era possible modificar-les genèticament. Juntament amb experiments liderats pels laboratoris de Mario Capecchi i Oliver Smithies, al final dels anys vuitanta, entorn de l'any 1987, va ser possible dissenyar un protocol que permet modificar genèticament, i específicament, un gen en concret de la totalitat de gens existents en el genoma del ratolí, fent servir homologia de seqüències de DNA i aprofitant un procés existent en les

cèl·lules, anomenat *recombinació homòloga*. Les cèl·lules resultants, modificades, es poden reintroduir en altres embrions de ratolí per contribuir a la formació de nous individus, els quals formaran els seus òrgans també a partir d'aquestes cèl·lules ES modificades. Els animals resultants d'aquesta modificació genètica són quimèrics, ja que provenen de dos tipus cel·lulars diferents, les cèl·lules ES en cultiu, i l'embrió que actua de receptor. Si el quimerisme arriba a colonitzar els òrgans interiors, en particular les gònades, els testicles i els ovaris, quan aquest ratolí hagi de generar nous gàmetes (per exemple, nous espermatozoides) també els farà a partir de cèl·lules derivades de les ES en cultiu, i per tant portadores de la modificació genètica específica. Així doncs, es transmetrà aquesta modificació genètica, inicialment obtinguda en cèl·lules ES en cultiu, a la descendència d'aquestes quimeres i, mitjançant els encreuaments adients, es pot arribar a obtenir una soca de ratolins portadora d'una mutació, d'una alteració genètica precisa en un gen, que constitueix una nova soca de ratolins mutants, genoanul·lats, un nou model animal.

Novament, la rellevància de l'ús de les cèl·lules ES de ratolí i el seu paper preponderant en la generació de molts models animals nous, com a soques de ratolins portadores, cadascuna, de mutacions específiques en gens concrets del genoma, que contribueix al coneixement de la seva funció, va ser reconegut amb el Premi Nobel 2007 de Fisiologia o Medicina, que va recaure, merescudament, en Capecchi, Evans i Smithies (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007) (Montoliu, 2008). Mitjançant la generació i l'anàlisi posterior de molts ratolins genoanul·lats, cadascun amb una inactivació específica, s'ha pogut investigar el paper de molts gens en molts processos biològics i la seva rellevància en

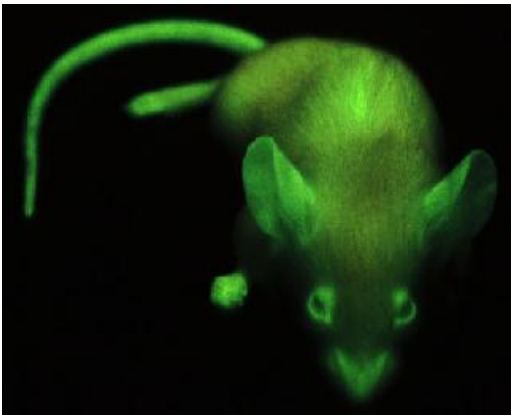


FIGURA 2. Ratolí transgènic fluorescent. Ratolí generat mitjançant la introducció d'un gen, anomenat *GFP* (de l'anglès *green fluorescent protein*), que prové d'una medusa del pacífic, *Aequorea victoria*, i que codifica una proteïna que és fluorescent si s'il·lumina amb una llum d'una longitud d'ona característica. Fotografia proporcionada pel professor Andras Nagy (Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadà) (<http://www.mshri.on.ca/nagy>).

malalties, malformacions i alteracions diverses en el desenvolupament i funcionament normal de l'organisme.

MODELS ANIMALS GENERATS I PER GENERAR

Des de fa més de vint anys s'han generat centenars de nous models animals, ja sigui amb ratolins transgènics o amb ratolins mutants (Montoliu, 2002). Sovint es pot tenir la sensació que ja s'ha pogut estudiar i esbrinar la funció de tots i cadascun dels gens, que gairebé no queden gens per investigar. Ans al contrari, aquesta sensació és errònia. Només ens cal mirar periòdicament les estadístiques del (poc) que coneixem del genoma i del (molt) que encara ignorem, aprofitant la base de dades del laboratori Jackson (JAX; <http://www.jax.org>), referència mundial en genètica del ratolí (vegeu la taula 1).

Dels més de 25.000 gens que coneixem, incloent-hi els que codifiquen proteïnes, només coneixem la funció d'un 36 %. La resta, el 64 % restant, encara avui ens és desconegut. I malgrat l'enorme quantitat de gens modificats genèticament, d'allels alterats que s'han obtingut, novament només representen poc més del 35 % dels gens existents. Finalment, la figura més esclaridora de l'estat actual de la qüestió es pot obtenir repassant el nombre de malalties humanes conegudes de base genètica (entorn de vint mil) i el nombre de models animals que s'han produït i analitzat per estudiar-les (entorn de tres mil). No obstant això, aquests més de tres mil ratolins modificats genèticament produïts corresponen en realitat a poc més de mil malalties estudiades, amb un o més models animals murins, és a dir, poc més d'un 5 % del total de malalties possibles! Totes aquestes xifres, que es poden revisar periòdicament

en les bases de dades d'anotacions en genòmica funcional del ratolí, ens diuen que hi ha un llarg camí encara per recórrer, molts models animals encara hauran de ser generats i molts gens dels quals ho ignorem gairebé tot, menys la seqüència de DNA, els haurem d'estudiar fent servir models animals, i generar més ratolins modificats genèticament.

Aquesta és la realitat i aquesta és la raó per la qual s'han posat en marxa diverses iniciatives internacionals, unint forces i recursos de diversos països, encaminades a l'obtenció sistemàtica de ratolins mutants per a tots i cadascun dels gens presents en el genoma, per tal de poder estudiar totes les funcions. Atès que la immensa majoria de gens humans estan presents en el genoma del ratolí, aquesta proposta pretén analitzar funcionalment els nostres genomes, fent servir els ratolins com a animals d'experimentació i aprofitant les eines de què disposem per a la manipulació controlada del seu genoma, mitjançant modificació genètica.

Aquest projecte global s'anomena, en anglès, International Knockout Mouse Consortium (IKMC; <http://www.knockoutmouse.org>), i té per objectiu produir, fent servir cèl·lules ES, ratolins genoanul·lats de tots i cadascun dels gens del genoma del ratolí. El projecte és una unió de diverses iniciatives de caire continental, en què trobem projectes europeus (EUCOMM; <http://www.eucomm.org>), estatunidencs (KOMP, <http://www.komp.org>; i TIGM; <http://www.tigm.org>) i canadencs (NorCOMM; <http://www.norcomm.org>). Una ràpida consulta a qualsevol d'aquestes pàgines web permet saber, en qualsevol moment, quin nombre de gens ja ha estat inactivat, en cèl·lules ES, quin percentatge del genoma representa i quants gens queden encara per estudiar.

Obtenir les cèl·lules ES portadores de mutacions en cada gen és només el primer

pas. Posteriorment cal fer servir aquestes cèl·lules ES genèticament modificades per obtenir els ratolins quimèrics i, mitjançant encreuaments específics, poder finalment derivar-ne els ratolins mutants, primer com a heterozigots i després com a veritables homozigots mutants, sobre els quals podrem aplicar una bateria d'experiments per estudiar-ne el fenotip, les característiques diferencials que pot tenir aquest ratolí mutant en relació amb el ratolí salvatge, no modificat genèticament. Aquest és un procés complex i car, que requereix una inversió en infraestructures i molts diners per poder dur a terme totes les tasques previstes. Es calcula que el cost necessari, mínim, per fenotipar un d'aquests nous models animals generats així (incloent-hi totes les etapes: *a*) obtenció de cèl·lules ES modificades genèticament, *b*) obtenció de quimeres, *c*) obtenció d'heterozigots i d'homozigots mutants, *d*) ampliació de la colònia de ratolins mutants i *e*) fenotipatge dels ratolins mutants) és de 50.000 \$USA. Tenint en compte que són uns vint mil el nombre de gens que cal investigar, és relativament senzill fer la multiplicació, que ens donarà com a resultat que la inversió necessària és de 1.000.000.000 \$USA, mil milions de dòlars.

Aquesta inversió ha d'estar focalitzada en dos dels aspectes més importants del procés, els que tenen a veure amb les anàlisis del fenotip i els aspectes logístics de distribució i arxiu.

Atès que és impossible generar i estudiar els vint mil nous models animals en un sol centre de recerca, cal establir un protocol normalitzat que permeti poder comparar els resultats analítics obtinguts per diferents centres. Així sorgeix el concepte de la *clínica del ratolí* (*mouse clinic*, en anglès) com a centre que disposa dels equips i la tecnologia necessària per analitzar els ratolins, per fenotipar-los, de manera sistemà-

tica, aplicant protocols de treball normalitzats arreu, els mateixos. Aquesta és una proposta essencialment europea i, per això a Europa és on funcionen les clíniques de ratolins més importants, a Estrasburg (Clinique de la Souris, <http://www-mci.u-strasbg.fr>) i a Munic (German Mouse Clinic, <http://www.mouseclinic.de>). Esbrinant què funciona bé i què no funciona bé de l'organisme es pot arribar a deduir l'efecte que ha tingut, sobre el ratolí, la inactivació d'aquest gen en particular i, alhora, inferir quina pot ser la funció específica del gen i de la proteïna que codifica en el conjunt de l'organisme.

Un segon aspecte per a l'estudi sistematitzat de models animals, de ratolins modificats genèticament de nova generació, igualment important, és l'aspecte logístic. És evident que tots aquests vint mil tipus de ratolins mutants no poden estar generats en un sol centre, i és igualment lògic admetre que no és possible mantenir tots aquests ratolins vius, simultàniament, en tots els centres de recerca. S'imposa, doncs, una estratègia que permeti l'arxivament i la distribució eficaç de les soques de ratolins mutants a qualsevol laboratori del món. Per això, a més de construir centres de fenotipatge, com les clíniques de ratolí, cal construir centres d'arxivament i distribució, repositoris. En ratolins aquest tema s'aborda mitjançant la criopreservació d'embrions o d'esperma de ratolí a temperatures molt baixes, de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, fent servir nitrogen líquid, que garanteix el manteniment indefinit de les soques de ratolins i la seva revitalització, quan és necessari, aplicant protocols de descongelació molt específics. Els embrions o l'esperma congelat es poden enviar als laboratoris que necessitin revitalitzar aquest determinat model animal. El centre receptor, en rebre aquests embrions o esperma congelat, procedirà a la descongelació controlada i transferirà els

embrions resultants a altres femelles perquè els gesti, per tal de reconstituir la soca de ratolins mutants criopreservada. Hi ha diverses iniciatives d'arxius arreu del món. A Europa, la iniciativa líder, finançada per la Comissió Europea, és el projecte EMMA (European Mouse Mutant Archive, <http://www.emmanet.org>), del qual Espanya forma part per mitjà del CNB-CSIC, a Madrid, com a nus espanyol d'aquesta plataforma tecnològica.

Actualment, la majoria dels models animals generats en ratolins transgènics i mutants corresponen a diversos intents per reproduir diferents tipus de càncer, que afecta una extensa varietat de tipus cel·lulars. Mitjançant diverses estratègies s'intenta posar de manifest el possible efecte de determinats oncogenes i s'investiga el seu paper en l'origen dels càncers. Però també hi ha molts ratolins generats per a l'estudi de les malalties cardiovasculars, musculars, metabòliques, d'alteracions de la reproducció i, en particular, com més va més, com a model d'alguna de les milers de malalties rares (de baixa prevalença), que afecten menys d'una de cada dues mil persones; sovint, gràcies a aquests models animals, únics, és una de les poques maneres que té la medicina actual per aprendre quelcom de nou sobre aquestes malalties.

Al nostre laboratori, per exemple, hem caracteritzat, mitjançant models animals, les alteracions visuals que afecten les persones amb albinisme, una condició genètica rara, que afecta una de cada disset mil persones, i que resulta de la mutació en algun dels gens, com per exemple el que codifica l'enzim tirosinasa, implicats en la biosíntesi de pigment, de la melanina. L'absència de pigmentació està associada a una pèrdua notable de les capacitats visuals (menys agudes visual, poca o nul·la visió nocturna, pèrdua de visió tridimensio-

nal, etc.); fins fa poc, no s'entenia quina podia ser la relació amb la generació de pigment. L'ús de models animals, en concret de ratolins transgènics, ha permès descobrir que el dèficit enzimàtic no solament implica una hipopigmentació evident, sinó que comporta una disminució local, a la retina, de la producció d'un dels components intermediaris en la síntesi del pigment, la L-DOPA. Mitjançant una estratègia bioquímica i genètica, en ratolins transgènics, es va aconseguir produir L-DOPA sense produir pigment i els ratolins transgènics resultants continuaven sent, aparentment, albins, però tenien la seva capacitat visual restaurada (Lavado *et al.*, 2006).

Igualment, com més va hi ha més ratolins que serveixen per investigar les alteracions del sistema nerviós. Alteracions psíquiques associades a l'angoixa, l'estrès, la por, trastorns de la sociabilitat, trastorns d'addicció a les drogues, alcoholisme, tabaquisme, etc., es poden estudiar amb models animals que porten alteracions en determinats gens, candidats a futurs medicaments que permetin regular o controlar alguna d'aquestes respostes de l'organisme al seu entorn. Sovint, però, la recerca sobre algun d'aquests nous models de ratolí pot donar sorpreses i l'efecte esperat pot servir per investigar nous aspectes no previstos inicialment. Per exemple, al nostre laboratori es va generar un nou model animal per a l'estudi de l'esquizofrènia, mitjançant la producció d'un ratolí genoanul·lat amb la inactivació del gen que codifica un receptor, Sigma-1, de funció poc coneguda a escala de les neurones (Langa *et al.*, 2003). No obstant això, poc després, es va descobrir que aquest ratolí modificat genèticament era molt útil per a la recerca sobre nous mecanismes de percepció del dolor i, per tant, per a la recerca sobre nous medicaments analgèsics possibles (Cendan *et al.*, 2005).

Dues de les millors bases de dades per esbrinar quins models animals s'han generat, i sobre quina malaltia o gen determinat, es troben a l'OMIM i la MPD: (OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>; MPD, Mouse Phenome Database, <http://phenome.jax.org>).

TIPUS DE MODELS ANIMALS

Hi ha molts tipus de models animals; en concret, molts tipus de ratolins modificats genèticament (Montoliu, 2003, 2006). Els ratolins transgènics, els que incorporen un nou gen (o gens) portadors de nova informació genètica a l'individu, es poden obtenir, com ja he comentat, per microinjecció directa de DNA al nucli d'embrions unicel·lulars. Aquesta és la tecnologia bàsica. Però es pot potenciar amb l'ús de vectors lenti-vírics, un tipus de retrovirus que poden inserir al genoma fragments de DNA molt eficaçment, malgrat que sovint les integracions múltiples que produeixen fan molt difícil l'anàlisi del fenotip resultant. Igualment, es pot augmentar la taxa d'inserció del transgèn al genoma fent servir transposases, unes proteïnes que poden tallar un fragment de DNA situat entre unes seqüències invertides determinades, i transferir tot el que hi hagi enmig a posicions relativament a l'atzar en el genoma. En aquest cas, el problema sol ser l'alteració inesperada del genoma en els llocs d'inserció del transposó.

També es poden fer microinjeccions de RNA d'interferència (iRNA), per minvar o inactivar l'expressió d'algun gen. Els ratolins modificats genèticament resultants són els genominvats, en els quals s'aconsegueix reduir l'expressió d'un gen sense fer-la desaparèixer completament, com en una soca de ratolins mutants o genoanullats.

També es pot regular l'expressió del transgèn a voluntat de l'investigador, mitjançant les estratègies de producció de ratolins transgènics induïbles, en els quals l'expressió del DNA forà introduït es regula per la presència, o no, de determinades molècules efectores del sistema. Sovint aquests sistemes d'expressió induïble fan servir mecanismes heteròlegs, importats d'altres organismes, com per exemple els bacteris, per evitar possibles interferències amb altres processos fisiològics interns de l'organisme mateix que volem regular.

Pel que fa als ratolins mutants, obtinguts a partir de cèl·lules ES genèticament modificades, n'hi ha també de molts tipus. Els mutants clàssics (genoanullats) són els que acostumen a inactivar el gen en qüestió a totes les cèl·lules de l'organisme, de manera irreversible. Per altra banda, algunes d'aquestes mutacions són més subtils, i sovint corresponen a una substitució d'un o pocs nucleòtids, de manera similar a com s'estableixen moltes malalties humanes de base genètica. Aquests són els ratolins genomodificats.

Molts dels gens que conformen els nostres genomes són pleotòpics, és a dir, codifiquen funcions que són necessàries en diferents moments del desenvolupament de l'organisme, potser inicialment durant fases embrionàries i després també en algun òrgan adult. La inactivació d'algun d'aquests gens, si és realment indispensable per al desenvolupament embrionari correcte, no produirà ratolins vius, ja que els ratolins mutants, deficientes en la funció d'aquest gen, no podran néixer ni mantenir-se, ni tampoc seria possible esbrinar la funció del gen en una fase adulta. Per això es va desenvolupar la tecnologia dels ratolins mutants condicionals. En aquests ratolins, el gen que es vol inactivar es «marca» amb unes seqüències específiques de DNA, que normalment no són reconegu-

TAULA 1. Genòmica funcional (genomes humà i del ratolí)

	Nombre	Percentatge
Gens coneguts amb seqüència de nucleòtids (a)	29.665	—
Gens coneguts que codifiquen proteïnes	26.957	90,87 % (de a)
Gens amb anotació funcional	10.698	36,06 % (de a)
Gens representats en trampes gèniques	12.569	42,37 % (de a)
Nombre total d'alelles genèticament modificats	25.392	—
Nombre total de gens amb alelles genèticament modificats	10.505	35,41 % (de a)
Nombre total de malalties humanes conegudes amb una base genètica (b)	20.014	—
Nombre total de models animals generats per a l'estudi de malalties humanes	3.043	
Nombre total de malalties humanes conegudes amb base genètica que han estat estudiades en models animals (ratolins modificats genèticament)	1.009	5,04 % (de b)

Fonts consultades: Mouse Genome Informatics Statistics (http://www.informatics.jax.org/mgihome/homepages/stats/all_stats.shtml), i base de dades de l'Online Mendelian Inheritance in Man Statistics (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/mimstats.html>) [data de consulta: maig del 2010].

des per cap proteïna endògena, però sí que poden ser reconegudes per una recombinasa específica. En presència d'aquesta recombinasa, i només en la seva presència, és quan es produeix la inactivació específica del gen. L'expressió del gen que codifica aquesta recombinasa pot constituir un ratolí transgènic normal, i es pot restringir a un òrgan, un tipus celular, o un moment del desenvolupament o una fase adulta determinada, aprofitant els senyals de control de la transcripció propis d'algun gen. Per altra banda, es pot fer servir una estratègia d'expressió induïble en què, mitjançant l'acció d'un efector, s'encengui o apagui la funció de la recombinasa. Naturalment, es poden combinar diferents estratègies i preparar un transgèn que activi la inactivació d'un gen només en la fase adulta, i només, per exemple, en cèl·lules musculars, a voluntat de l'investigador. Els ratolins mutants condicionals han permès superar les limitacions inherents a la tècnica i l'existència de gens d'expressió indispensable per

al desenvolupament embrionari de l'organisme que, sense aquesta variació, no haurien pogut ser estudiats en models animals. Hi ha diversos sistemes que s'utilitzen avui dia per generar ratolins mutants condicionals, com per exemple el sistema CRE recombinasa/lox o el sistema FLP recombinasa/flp.

A més dels animals transgènics, per addició de nous gens, i genoanul·lats, per supressió o inactivació de gens, també es poden obtenir ratolins modificats genèticament mitjançant tècniques de transferència nuclear, de clonatge. En efecte, es pot transferir una construcció gènica, una nova molècula de DNA a cèl·lules en cultiu, per fer servir després el seu nucli per reconstruir un nou embrió de ratolí, que donaria lloc a un animal «clonat» i transgènic (Montoliu, 2004).

Finalment, els ratolins transgènics també han servit, de manera molt important, per investigar el potencial terapèutic de les diferents propostes de cèl·lules troncales («ma-

re»), pluripotents, en medicina regenerativa, en terapèutica cel·lular. Des de les propostes inicials de cèl·lules troncales embrionàries, amb tot els avantatges i problemes que comporten (Montoliu, 2003b), fins a les darreres propostes de cèl·lules pluripotents induïbles (iPS). Les cèl·lules iPS són una de les propostes més innovadores que s'han donat a conèixer recentment (Montoliu, 2009). Mitjançant la reintroducció d'un petit grup de gens específics, tres o quatre, és possible reconvertir una cèl·lula somàtica, en principi de qualsevol òrgan del cos, en una cèl·lula que, des de tots els punts de vista, és indistingible d'una cèl·lula troncal pluripotent embrionària, amb la gran diferència que no és necessari fer servir cap embrió per obtenir-la.

L'ús final i el possible impacte de totes aquestes propostes i aplicacions en biomedicina continuarà sent investigat mitjançant la generació i l'estudi de nous models animals, de nous ratolins modificats genèticament.

BIBLIOGRAFIA

- CENDÁN, C. M.; PUJALTE, J. M.; PORTILLO-SALIDO, E.; MONTOLIU, L.; BAEYENS, J. M. (2005). «Formalin-induced pain is reduced in sigma(1) receptor knockout mice». *Eur. J. Pharmacol.*, 511 (1): 73-74.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. (1981). «Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos». *Nature*, 292: 154-156.
- LANGA, F.; CODONY, X.; TOVAR, V.; LAVADO, A.; GIMÉNEZ, E.; COZAR, P.; CANTERO, M.; DORDAL, A.; HERNÁNDEZ, E.; PÉREZ, R.; MONROY, X.; ZAMANILLO, D.; GUITART, X.; MONTOLIU, L. (2003). «Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (sigma 1) knockout mice». *Eur. J. Neurosci.*, 18 (8): 2188-2196.
- LAVADO, A.; JEFFERY, G.; TOVAR, V.; VILLA, P. de la; MONTOLIU, L. (2006). «Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin». *J. Neurochem.*, 96 (4): 1201-1211.
- MARTIN, G. R. (1981). «Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7634-7638.
- MONTOLIU, L. (1997). «Transgénesis por microinyección». *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 91(2): 63-70.
- (2000). «Modificació genètica d'animals». *Treballs de la Societat Catalana de Biologia*, 50: 133-140.
- (2002). «Medicina genómica: la utilización de animales transgénicos en modelos de enfermedades genéticas humanas». A: REOL TEJADA, J. M. [ed.]. *Genómica y Farmacogenómica*. Madrid: Publicaciones de la Real Academia de Farmacia, p. 55-74.
- (2003a). «Trasiego de genes (animales transgénicos, mutantes y clónicos)». A: GARCÍA BARRENO, P. [ed.]. *50 años de ADN*. Madrid: Espasa-Fórum, p. 183-227.
- (2003b). «Células troncales: aspectos científicos». A: LACADENA, J. R. [ed.]. *Células troncales humanas: aspectos científicos, éticos y jurídicos*. Bilbao: Publicaciones de la Universidad Pontificia Comillas / Desclée de Brouwer, p. 23-62.
- (2004). «Clonación en mamíferos: aspectos científicos e implicaciones terapéuticas». A: Fernández Piqueras, J. [ed.]. *Últimas investigaciones en biología: células madre y células embrionarias*, p. 55-88. Madrid: Publicaciones de la Universidad Internacional Menéndez y Pelayo: Ministerio de Educación y Ciencia.
- (2006). «Animals modificats genèticament: ratolins transgènics i mutants. Definició, obtenció i aplicacions en Biologia, Biomedicina i Biotecnologia». *Treb. Soc. Cat. Biol.*, 57: 109-111.
- (2008). «La modificación genética dirigida en ratones es premiada con el Nobel de Fisiología o Medicina de 2007». *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 74: 81-99.
- (2009). «Células pluripotentes inducidas». A: CASCALES Y FLORA DE PABLO, M. [ed.]. *Células madre y terapia regenerativa*. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia / Instituto de España, p. 83-99.
- SHAMBLOTT, M. J.; AXELMAN, J.; WANG, S.; BUGG, E. M.; LITTLEFIELD, J. W.; DONOVAN, P. J.; BLUMENTHAL, P. D.; HUGGINS, G. R.; GEARHART, J. D. (1998). «Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 13726-13731.
- THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. (1998). «Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts». *Science*, 282: 1145-1147.