

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Efectos de una trisomía parcial del cromosoma 17 en el
desarrollo del ratón: Análisis genético,
citogenético y molecular.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Biología para
optar al grado de *Magister Scientiae*.

GUSTAVO ADOLFO GUTIERREZ ESPELETA

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio" Costa Rica

1991

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae*.

Dr. Ramiro Barrantes Mesén



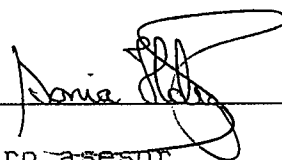
Profesor tutor

Dr. Walderico Genaroso



Miembro asesor

Ms. Sonia Hernández Barrantes



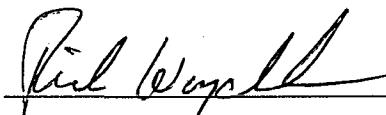
Miembro asesor

Dr. Pedro León Azofeifa



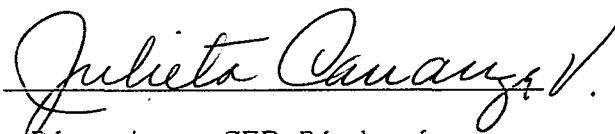
Miembro asesor

Dr. Rick Woychik



Miembro asesor

Dra. Julieta Carranza Velázquez



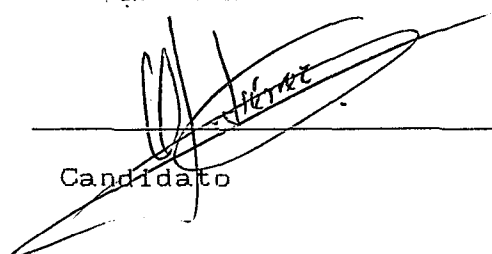
Directora SEP-Biología

Dr. Luis Camacho Naranjo

Decano SEP-UCR.

Gustavo A. Gutiérrez Espeleta

Candidato



Agradecimientos.

A Ana Sittenfeld, responsable de mi asistencia a tan prestigioso laboratorio.

A K.T.Cain, pilar fundamental en la ejecución de esta tesis. Su espíritu de trabajo y de lucha y ante todo, calidad humana, me compromete ante quienes me rodean.

A Nestor Cacheiro, quién en todo momento me brindó su experiencia y conocimiento para vencer tan difícil tarea de lograr cariotipos citogenéticos en el ratón.

A Scott Bultman, por su inagotable paciencia y capacidad de enseñanza. Su guía, fue vital en la conducción de la parte molecular de esta tesis.

Especial agradecimiento para Waldy y Rick, quienes sin importarles mi ignorancia, siempre creyeron en mí. Mi admiración y respeto por sus conocimientos, sentido humanista y entrega desinteresada que nunca estuvieron al margen durante nuestra interacción.

Al grupo de compañeros de la División de Biología del Oak Ridge National Laboratory.

A "la vida que me ha dado tanto".

A Carol, motivación de mi esfuerzo y dedicación. Eje de inspiración y sabiduría ante el desconocimiento.

A papá y mamá, quienes me heredaron su espíritu de trabajo, honestidad y responsabilidad.

A don Adrián y doña Julieta, de quienes he recibido un inmerecido apoyo y confianza.

A mis hermanos, a mi patria.

Prefacio.

Esta tesis está dividida en dos capítulos escritos de acuerdo al formato de la revista científica "Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America". Se pretende publicar los dos artículos de esta tesis en esta revista científica.

Debido a que este estudio constituye parte de un trabajo multidisciplinario, aquellas partes del estudio global que no han sido inéditas y que fueron utilizadas en esta tesis, son apoyadas por las respectivas referencias bibliográficas. En ausencia de una referencia, el lector debe asumir que se trata de un aporte original de esta tesis.

Capítulo II: Análisis molecular	41
Resumen	42
Introducción	43
Material y Métodos	46
Resultados	52
Discusión y conclusiones	59
Referencias	65
Literatura citada en la tesis completa	68

Resumen

Los análisis citogenéticos y moleculares del mutante del ratón $1s(17,1n2)1Gso$ (inducido por radiación gamma), revelan una compleja reestructuración cromosómica que comprende la inserción directa de un segmento intersticial del cromosoma 17 en la región subdistal del cromosoma 2 (lo que produce un marcador somático). Existe además, una inversión de un segmento inmediatamente proximal al sitio de inserción en el cromosoma 2, con puntos de ruptura en los loci ld (deformidad de los miembros) y a (agouti), dos genes importantes en el desarrollo del embrión.

Los homocigotos para el rearrreglo expresan los fenotipos mutantes respectivos. Cuando los heterocigotos para esta mutación se cruzaron con ratones de genotipo $a+/a+$ o con $+ld/+ld$, la proporción de nacidos vivos de tipo silvestre con respecto al mutante fue de 1:1.6 y de 1:1, respectivamente. El presente estudio analiza esta diferencia en las tasas de segregación.

Se planteó la hipótesis que uno de los segregantes (parcialmente trisómico para el cromosoma 17 $-2,2^{17};17,17-$), tenía efectos diferenciales en el desarrollo embrionario y fetal en los dos cruces. Se condujo una investigación a nivel citogenético y molecular de todas las concepciones para relacionar el desarrollo embrionario y fetal con el genotipo y para determinar la fertilidad de los machos que

sobrevivirían hasta la madurez sexual.

Los resultados confirmaron la diferencia en sobrevivencia para la trisomía parcial 17: ésta es viable en algunos casos en el fondo genético agouti (cruce N01) mientras que parece ser letal en el deformidad de los miembros (cruce N02).

Entre los animales viables del primer cruce, los ratones con el cariotipo $2,2^{17};17,17$ registraron los porcentajes más bajos de muerte en la implantación, mientras los poseedores del rearreglo balanceado $2,2^{17};17,17^{del}$ presentaron los porcentajes más altos. Los animales con cariotipo normal mostraron porcentajes normales (menor de 10% de muerte en la implantación). Con respecto al segundo cruce, aquellos animales deformes que llevaban el único cariotipo viable - $2,2^{17}; 17,17^{del}$ -, presentaron porcentajes de muerte en la implantación más altos que los animales tipo silvestre con cariotipo normal, los cuales registraron porcentajes normales.

El fenotipo de los animales con trisomía parcial del cromosoma 17 que logran sobrevivir después del estado de implantación, incluye desde retardo en el crecimiento hasta anormalidades craneofaciales.

Se encontró un 100% de correlación entre el cariotipo citogenético y el análisis molecular para los mismos cromosomas.

.Lista de Cuadros del Capítulo I.

Cuadro N ^o .	Título	Pág.
1.	Segregación de los mutantes Is1Gso cruzados con ratones C57BL10 (cruce N ^o 1).	15
2.	Segregación de los mutantes Is1Gso cruzados con ratones 1d ^{OR} /1d ^{OR} (cruce N ^o 2).	16
3.	Cariotipo citogenético parcial y análisis molecular de machos agouti y relación con el porcentaje de muerte en la implantación.	19
4.	Cariotipo citogenético parcial y análisis molecular de machos no agouti y relación con el porcentaje de muerte en la implantación.	20
5.	Cariotipo citogenético parcial y análisis molecular de machos silvestres para el locus 1d y relación con el porcentaje de muerte en la implantación.	23

Lista de cuadros del capítulo I. Continuación.

Cuadro No.	Título	Pág.
6.	Cariotipo citogenético parcial y análisis molecular de machos con deformidad de los miembros y relación con el porcentaje de muerte en la implantación.	24
7.	Asociación del fenotipo con el cariotipo de los embriones del fondo genético no agouti, analizados citogenética o molecularmente.	30
8.	Asociación del fenotipo con el cariotipo de los embriones del fondo genético deformidad de los miembros, analizados citogenética o molecularmente.	31

Lista de Figuras del Capítulo I.

Figura N ^o .	Título	Pág.
1.	Estructura de los cromosomas 2 y 17 en la mutación inducida por radiación.	6
2.	Animales heterocigotas para la mutación Is1Gso cruzados con los ratones C57BL10 (cruce N ^o 1).	7
3.	Animales heterocigotas para la mutación Is1Gso cruzados con los ratones Id ^{OR} /Id ^{OR} (cruce N ^o 2).	8
4.	Porcentajes de muerte en la implantación de machos agouti y no agouti de la F1 del cruce N ^o 1 cruzados con hembras BLH.	18
5.	Porcentajes de muerte en la implantación de machos normales y deformes de los miembros de la F1 del cruce N ^o 2 cruzados con hembras BLH.	22
6.	Número de nacidos vivos de los ratones de la F1 del cruce N ^o 1 (ambos sexos) cruzados con ratones BLH.	25

Lista de Figuras del Capítulo I. Continuación.

Figura N ^o .	Título	Pág.
7.	Números de nacidos vivos de los ratones de la F1 del cruce N ^o 2 (ambos sexos) cruzados con ratones BLH.	26
8.	Porcentajes de muerte en la implantación de los mutantes Is1Gso cruzados con ratones C57BL10 (cruce N ^o 1).	27
9.	Porcentajes de muerte en la implantación de los mutantes Is1Gso cruzados con ratones ld^{OR}/ld^{OR} (cruce N ^o 2).	28
10.	Cariotipo citogenético completo de un macho no agouti con trisomía parcial del cromosoma 17 ($2,2^{17}; 17,17$).	29

Lista de Figuras del Capítulo II.

Figura No.	Título	Pág.
1.	Estructura del ADN de todos los fragmentos silvestres y reestructurados involucrados en la mutación Is1Gso.	47
2.	Transferencia de Southern de ADN genómico digerido con la enzima de restricción BamHI de descendientes del mutante Is1Gso.	58

Efectos de una trisomía parcial del cromosoma 17 en el
desarrollo del ratón.

Capítulo I: Análisis genético y citogenético.

Resumen

La mutación en el ratón Is1Gso, es una compleja reestructuración cromosómica que comprende la inserción directa de un segmento intersticial del cromosoma 17 en la región distal del cromosoma 2 y la inversión de un segmento inmediatamente proximal al sitio de inserción en el cromosoma 2, con puntos de ruptura en los loci *ld* (deformidad de los miembros) y *a* (agouti) (20). Cuando los heterocigotos para esta mutación se cruzaron con ratones de genotipo *a +/a +* o con *+ ld/+ ld*, la proporción de nacidos vivos de tipo silvestre con respecto al mutante fue de 1:1.6 y de 1:1, respectivamente.

Se analizó esta diferencia en las tasas de segregación, donde uno de los segregantes (parcialmente trisómico para el cromosoma 17), tuvo efectos diferenciales en el desarrollo embrionario y fetal en estos cruces. Se condujo un estudio genético y citogenético para estudiar el efecto de los cuatro gametos derivados de este mutante, particularmente, la consecuencia de la trisomía parcial del cromosoma 17 en sus descendientes y, para determinar la fertilidad de los machos y hembras que sobrevivirían hasta la madurez sexual. Se correlacionó las anomalías o malformaciones fetales presentes en la descendencia del mutante con el cariotipo citogenético y el análisis molecular. Se encontró un 100% de correlación entre estas dos técnicas, para los mismos cromosomas.

Introducción

Dos inserciones por translocación habían sido descritas en el ratón: una de ellas es la translocación de Cattanach ($Is(1n7;X)1Ct$), una inserción invertida de un segmento del cromosoma 7 en el cromosoma X (3, 9, 7). La segunda inserción es $Is(7;1)40H$, una inserción no invertida diagnosticada en un macho estéril y otro semiestéril, originada por irradiación de las espermatidas del padre (15).

En este trabajo se describe un tercer tipo de inserción directa en el ratón. Consiste en la caracterización genética y citogenética de una compleja reestructuración cromosómica inducida por radiación, conocida como $Is(17,1n2)1d,a^j1Gso$, abreviada como $Is1Gso$. Esta mutación involucra una alteración estructural que afecta la expresión de los genes en los loci deformidad de los miembros ($1d$) y agouti (a) en el cromosoma 2 del ratón. Un segmento intersticial del cromosoma 17 está translocado en el extremo distal del cromosoma 2, y da como resultado un cromosoma 17 más pequeño que el normal y una forma más larga del cromosoma 2. Además, un gran segmento del nuevo cromosoma 2, inmediatamente adyacente y proximal al sitio de inserción, está invertido, de tal forma que una parte del locus $1d$ queda ligada a secuencias normalmente unidas al locus a (20).

Con la información obtenida gracias a los análisis genéticos y a las técnicas de citogenética y de biología molecular, se pudo estudiar el efecto de los diferentes

gametos derivados del mutante 1s1Gso, particularmente, el efecto de la trisomía parcial del cromosoma 17 en los descendientes de este mutante. Además, se correlacionó las anormalidades o malformaciones fetales que se desarrollaban en la descendencia del mutante con el cariotipo citogenético y el análisis molecular.

Material y Métodos

Mutagénesis.

Se utilizó una fuente de ^{137}Cs para generar radiación gamma (0.7 R/min). Machos de la F_1 del cruce C3H/R1 X 101/R1 de genotipo para el locus agouti A/A^V fueron irradiados con 300R y luego cruzados con hembras de la F_1 del cruce SEC/R1 X C57BL/E de genotipo a/a ; $+/b$; $+/c^{ch}$; $+ +/d$ se (a, no agouti; b, café; cch, chinchilla; d, atenuado; se, orejas cortas y +, silvestre). Se obtuvo así el mutante Is1Gso (Fig 1), concebido 41 semanas después de la irradiación derivado de una célula irradiada del tallo espermatogonial (20).

Animales.

Todas las reservas genéticas de ratones usadas en este estudio, así como las utilizadas en subsecuentes cruces del mutante y sus descendientes, se obtuvieron y fueron mantenidas en el Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.

Estudios de segregación para los fondos genéticos

no agouti (cruce NQ1) y deformidad de los miembros (cruce NQ2).

Para estudiar el comportamiento de los gametos del mutante Is1Gso en los fondos genéticos no agouti y deformidad de los miembros, los machos y las hembras de este mutante fueron cruzados con ratones de la cepa C57BL/10 (a/a) (Fig.2) y con ratones ld^{OR}/ld^{OR} (ld/ld) (Fig.3). Se efectuó un estudio de los individuos nacidos vivos de la progenie (F1) y se

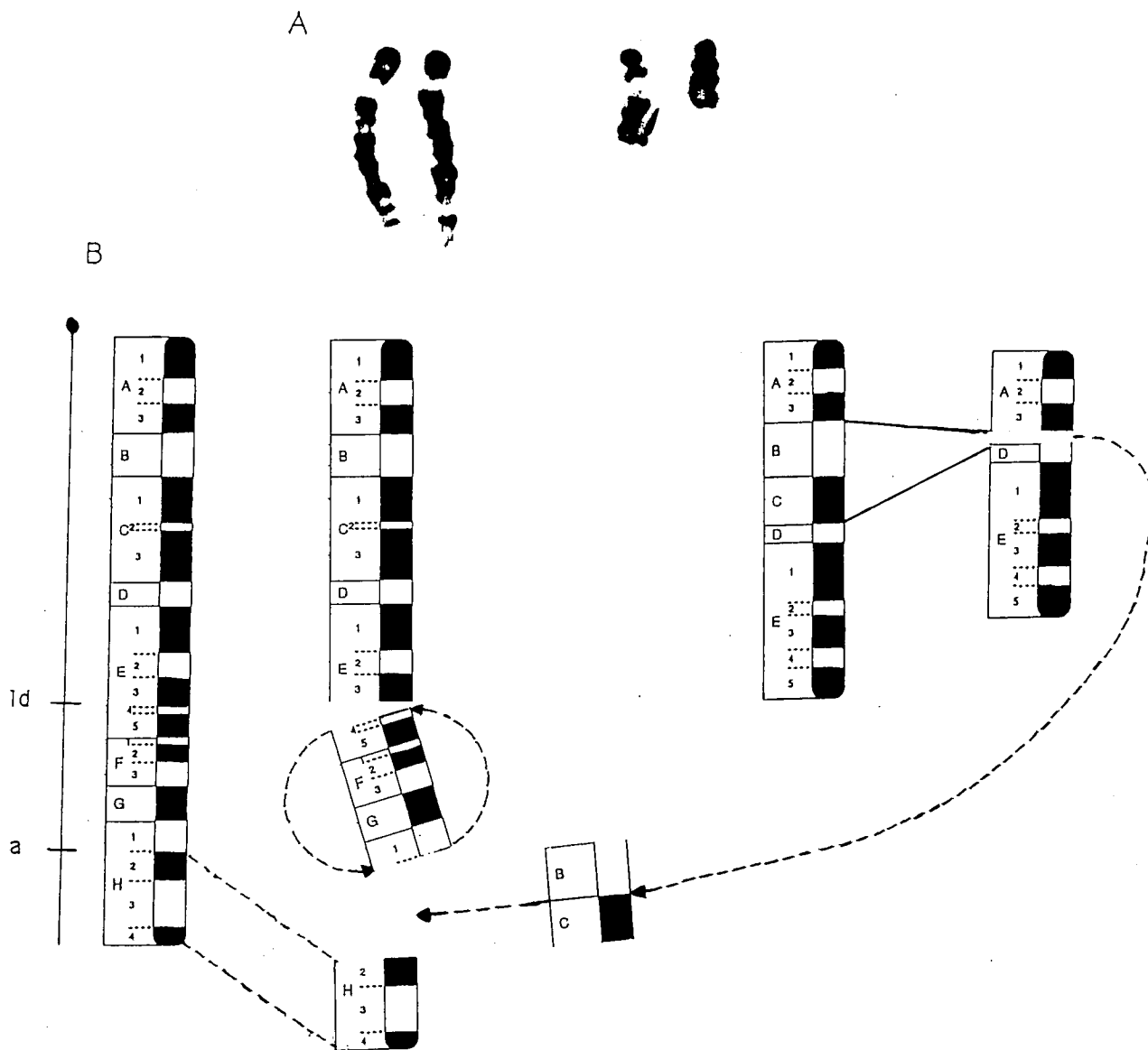


Fig.1. Estructura de los cromosomas 2 y 17 en la mutación inducida por radiación. (A) Cariotipo parcial de una metafase mitótica bandeada con Giemsa. De izquierda a derecha, cromosoma 2 normal, cromosoma 2 reestructurado (designado 2^{17}), cromosoma 17 normal y cromosoma 17 con la deleción (designado 17^{del}). (B) Diagrama de bandeado G ilustrando la reestructuración cromosómica que involucra los cromosomas 2 y 17. Las flechas curvas muestran la posición del segmento invertido 2E4-2H1 del cromosoma 2. Las líneas sólidas entre el cromosoma 17 y 17^{del} , muestran el punto de ruptura del segmento intersticial del cromosoma 17 que se integra en la región distal del cromosoma 2, inmediatamente adyacente y distal a la inversión 2E4-2H1. Las posibles posiciones de los loci *a* y *ld*, se muestran a la izquierda del diagrama en el cromosoma 2 normal.

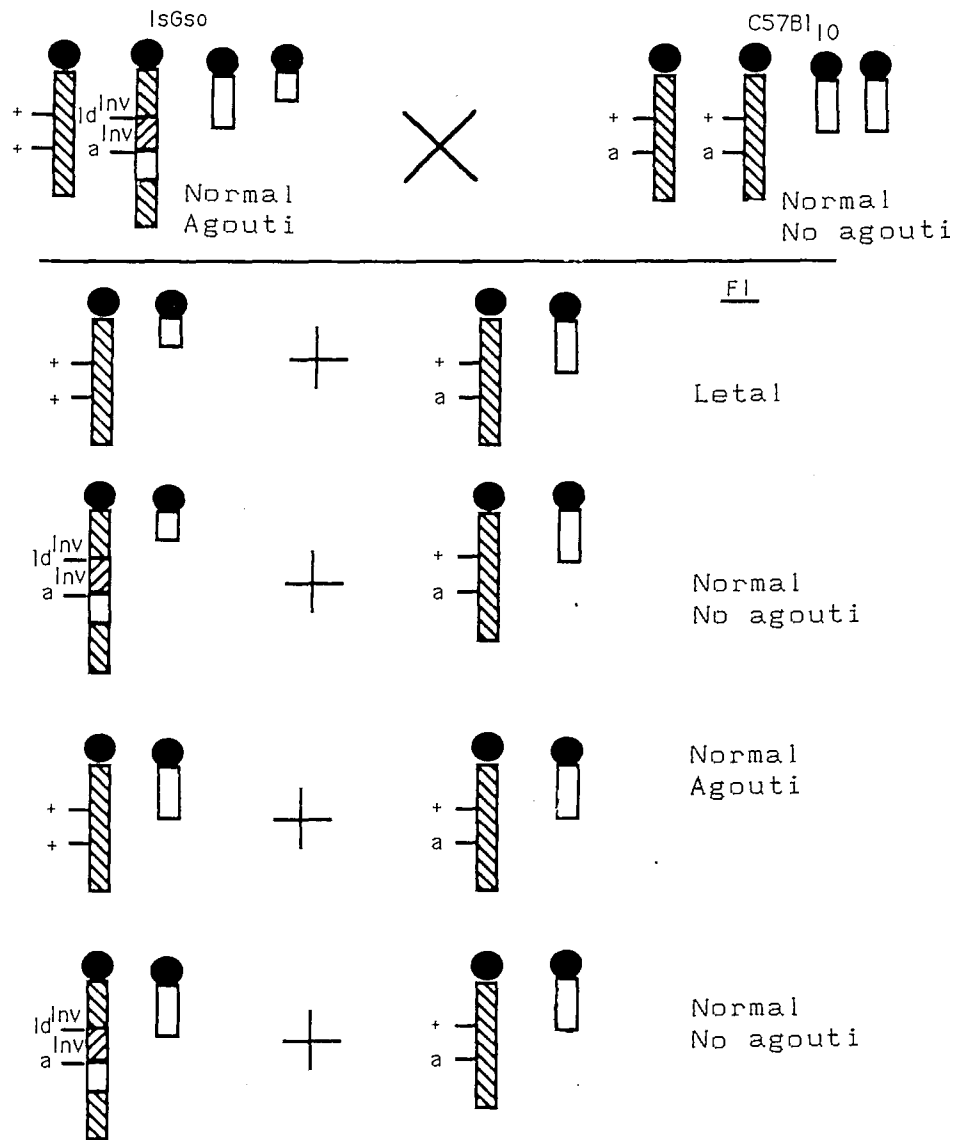


Fig.2. Animales heterocigotas para la mutación *Is1Gso* cruzados con los ratones C57BL10 (Cruce N^o1). Se indican los cuatro cigotos posibles y los fenotipos esperados en la F1.

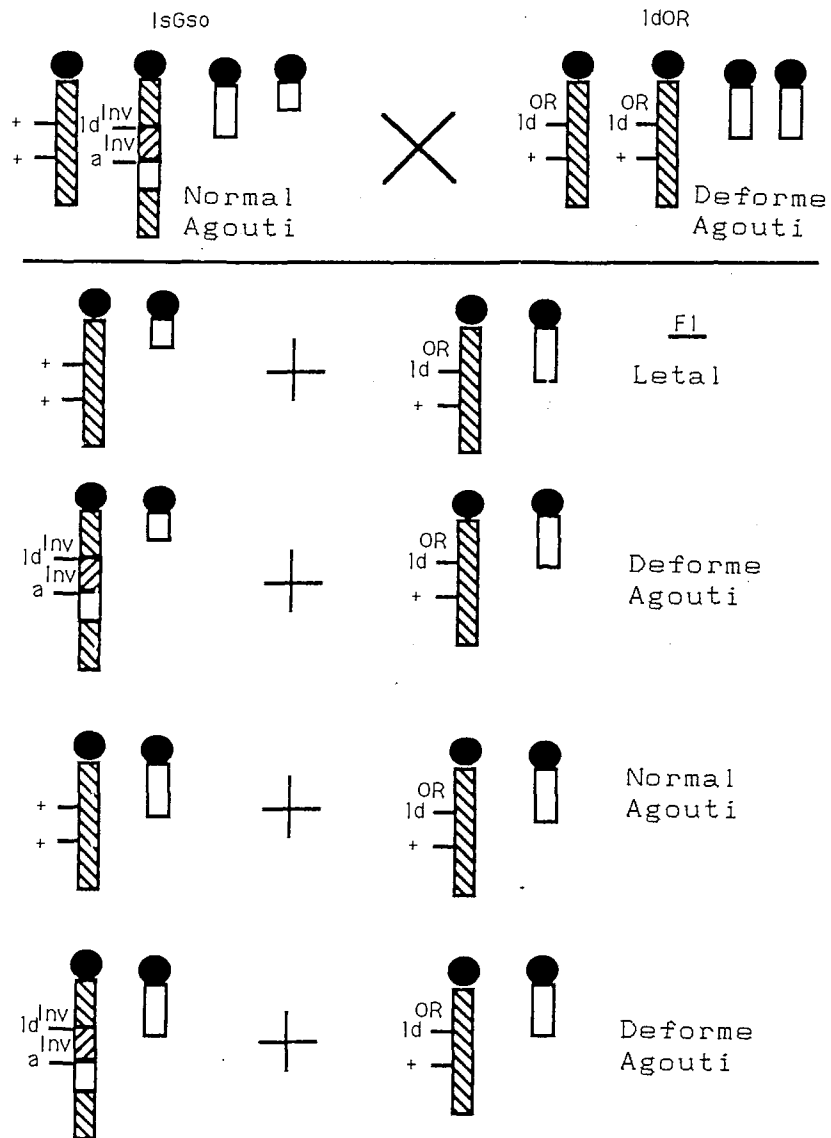


Fig.3. Animales heterocigotas para la mutación Is1Gso cruzados con los ratones ld^{OR}/ld^{OR} (Cruce NQ2). Se indican los cuatro cigotos posibles y los fenotipos esperados en la F1.

registró información para las condiciones agouti y no agouti (en el cruce NQ1) y para las condiciones miembros normales y déformes por sexo (en el cruce NQ2).

Estudios de fertilidad de los machos de las F1 de los cruces NQ1 y NQ2.

Debido a que los resultados obtenidos en los estudios de segregación no concordaron con los esperados, se realizó dos estudios de fertilidad donde los machos de las progenies (F1) obtenidas en cada estudio de segregación, fueron cruzados con 3 hembras BLH. Las hembras preñadas se sacrificaron a los 16-18 días de gestación y se registró el número de muertes, de molas y de fetos vivientes. Se calculó el porcentaje de muerte en la implantación, por división del número total de muertes (muerte temprana + muerte tardía + molas) entre el número total de implantaciones multiplicado por 100. Asimismo, se realizaron observaciones de las malformaciones encontradas en cada camada.

Estudios de fertilidad para las hembras de las F1 de los cruces NQ1 y NQ2.

Las hembras de las F1 obtenidas en cada estudio de segregación, fueron cruzadas con un macho BLH. Se dejó que el período de gestación se llevara a término y se registró el número de individuos nacidos vivos y muertos en la camada. Asimismo, se tomó nota de de las malformaciones encontradas en los descendientes.

Citogenética.

Se estudiaron cromosomas mitóticos de tejido de riñón para los adultos y del feto completo para los descendientes, para realizar los análisis citogenéticos. Se utilizó colchicina y se realizó bandeado Giemsa con tripsina. Las láminas se dejaron secar al aire. Estos procedimientos se llevaron a cabo como se describe en Pathak *et al.* (13).

Análisis de cariotipos.

Se contó el número de cromosomas presentes en la metafase en estudio. Cada cromosoma fue analizado según el patrón de bandas Giemsa para el ratón. Se concentró la atención en los cromosomas normales 2 y 17 y los anormales 2¹⁷ y 17^{del}. Se tomó la fotografía de la metafase de interés y se ordenaron los cromosomas según los criterios establecidos para el cariotipo del ratón (5).

Resultados.

Obtención del mutante y análisis genético. Entre 2870 machos de la progenie de machos irradiados de la F1 del cruce C3H/RI X 101/RI (A/A^v) cruzados con hembras de la F1 SEC/RI X C57BL/E (a/a), se encontró un macho no agouti, presumiblemente a/a^* , donde a^* representa una mutación que involucra el locus a en cualquiera de los loci A o A^v . En cruces con los ratones a/a , el mutante produjo 52 descendientes no agouti. En cruces con ratones A/A , se obtuvieron 17 descendientes y todos ellos fueron agouti. En cruces con A/a se obtuvieron 6 agouti y 10 no agouti. Estos resultados indican que a^* es recesivo a A y puede ser recesivo o equivalente a a (20).

Se observó que el mutante era parcialmente estéril debido a la muerte embrionaria de algunos de sus descendientes. En cruces con 12 hembras normales, se encontró que el 29% de las concepciones morían alrededor del tiempo de la implantación. Dentro de los hijos sobrevivientes del mutante, 19 fueron también parcialmente estériles (de nuevo, con el 29% de las concepciones que morían alrededor de la implantación), 2 fueron completamente estériles y 22 tuvieron fertilidad normal, es decir, un promedio entre 10-11 ratones (20).

Se obtuvieron los homocigotos para esta mutación, por el cruce de los machos parcialmente estériles con las hijas de machos parcialmente estériles. Tales homocigotas fueron

completamente fértiles (cualquier sexo), lo que permitió establecer una reserva homocigota (20). Sorpresivamente, estos animales homocigotas (a^*/a^*) tenían los miembros anteriores y posteriores severamente deformados. El examen del esqueleto, permitió determinar que había ausencia de al menos dos dígitos en cada extremidad, sinostosis radio ulnar, aplasia fibular completa y aplasia o hipoplasia de algunos carpeanos y muchos tarseanos. Se observó también, fusiones de algunos huesos, mal posición de la patela, y una orientación incorrecta de las extremidades posteriores. En casos extremos, algunos miembros posteriores contenían solamente un dígito (20). Además de las malformaciones esqueléticas, se observó también defectos en el riñón en algunos descendientes de los homocigotas con malformaciones en los miembros. Estos defectos consistieron básicamente en anomalías renales con varios grados de hidronefrosis e hidrouréter, defectos en el tracto urinario, lo que incluyó dilatación de uno o ambos uréteres. Un animal presentó aplasia unilateral e hipoplasia. Ninguno de los animales con miembros normales presentó defectos en el riñón (20).

Ya que los defectos de los miembros y del riñón semejaban el fenotipo de la mutación ld , se realizaron varios cruces entre los ratones que portaban la mutación inducida por radiación de este estudio y ratones de una reserva que portan el alelo ld^{OR} (20). Los resultados claramente revelaron que la nueva mutación era alélica a ld (20). Por

consiguiente, esta mutación involucró alteraciones en dos loci diferentes, *a* y *ld*, los cuales están normalmente separados por 20 cM en el mapa genético estándar.

Análisis citogenético.

El análisis citogenético reveló un rearrreglo cromosómico. La esterilidad parcial del mutante original y de algunos de sus descendientes, sugirió que la mutación se debió de haber originado por una reestructuración cromosómica. Por lo tanto, se prepararon cariotipos de cromosomas metafásicos bandeados con Giemsa de cuatro adultos heterocigotas fenotípicamente normales y de dos adultos homocigotas que expresaban tanto las condiciones no agouti así como deformidad de los miembros. Todos los cariotipos mostraron un cromosoma 2 más largo que el normal (designado 2^{17}) y un cromosoma 17 más corto (designado 17^{del}) (Fig.1.A), así como un cromosoma 2 y un 17 normales. El patrón de bandas sugirió que un segmento intersticial del cromosoma 17, que involucra las bandas 17B-17C, se integró en una región subdistal del cromosoma 2 proximal a la banda 2H2. Además, un segmento del cromosoma 2^{17} inmediatamente proximal al sitio de inserción no se asociaba con el segmento 2E4-2H1 del cromosoma 2 normal y estaba probablemente reestructurado (20) (Fig.1.B).

Estudios de segregación.

Cuando los heterocigotos para la mutación se cruzaron con las cepas de genotipo *a +/a +* (cruce N^o1) (Fig.2) o con

los ratones + ld/+ ld (cruce NQ2) (Fig.3), la proporción de nacidos vivos de tipo silvestre con respecto al mutante fue de 1:1.6 y de 1:1, respectivamente, diferente de lo esperado de 2:2 para ambos casos (Cuadro 1 y 2). Con base en estos resultados se planteó la hipótesis que uno de los segregantes ($2,2^{17};17,17$) tenía efectos diferenciales en el desarrollo embrionario y fetal en los dos cruces y que el segregante portador de la delección parcial para el cromosoma 17 ($2,2;17,17^{\text{del}}$) no era viable (Fig.2 y 3). Para comprobar esto, se procedió a efectuar dos nuevos cruces: en uno (cruce NQ3) se cruzó la F1 del cruce NQ1 con ratones BLH y en el otro (cruce NQ4) se cruzó la F1 del cruce NQ2 con ratones BLH, con el fin de obtener información a nivel citogenético y molecular de todas las concepciones y así poder relacionar el desarrollo embrionario y fetal con el genotipo, y determinar la fertilidad de los segregantes machos que sobrevivirían hasta la madurez sexual.

Los resultados confirmaron la diferencia en sobrevivencia para la trisomía parcial 17: ésta era viable en el fondo genético agouti (cruce NQ1) mientras que parecía ser letal en el deformidad de los miembros (cruce NQ2). Entre los machos viables del primer cruce, se encontraron ratones con dos diferentes cariotipos: unos con el ya mencionado $2,2^{17};17,17$ que tuvieron los porcentajes más bajos de muertes en la implantación y otros con el rearreglo balanceado $2,2^{17};17,17^{\text{del}}$, con los porcentajes de muerte en la

Cuadro 1. Segregación de los mutantes Is1Gso cruzados con ratones C57BL10 (cruce Nq1).

Transmisión por	Agouti	No Agouti
Machos	98	152
Hembras	72	120
Total	170	272
Proporción	1	1,6

Cuadro 2. Segregación de los mutantes Is1Gso cruzados con ratones $1d^{OR}/1d^{OR}$ (cruce N^o2).

Transmisión por	Normal	Deforme de los miembros
Machos	59	66
Hembras	28	23
Total	87	89
Proporción	1	1

implantación más altos. Aquellos animales con cariotipo normal (agouti) tuvieron porcentajes normales (Fig.4 y Cuadros 3 y 4). Con respecto al segundo cruce, aquellos machos deformes que portaban el único cariotipo viable ($2,2^{17};17,17^{del}$), tuvieron porcentajes de muerte en la implantación más altos que los animales tipo silvestre con cariotipo normal, los cuales tuvieron porcentajes normales (Fig.5 y Cuadros 5 y 6).

Se obtuvo información relativa al número de ratones vivos por hembra (de la hembras viables de los cruces NQ1 y NQ2), lo que permitió comparar esos valores con los de los machos (número total de fetos vivos dividido entre el número de hembras preñadas) de los cruces respectivos (Fig.6 y 7).

Se cruzaron los mutantes $Is1Gso$ (ambos sexos) con ratones C57BL10 (cruce NQ1) y con ratones $1d^{OR}/1d^{OR}$ (cruce NQ2), para estudiar su fertilidad (Fig.8 y 9).

Mediante el cariotipo citogenético (Fig.10) o análisis molecular (Capítulo II), se determinó el cariotipo de 31 y 47 fetos (seleccionados según el tipo de malformación y se tomó algunos de sus hermanos -sin anormalidades- como normales), entre la edad de 16-19 días de gestación, derivados del fondo genético no agouti y deformidad de los miembros. La correlación entre el fenotipo (tipo de malformación) y genotipo de todos los fetos estudiados mediante una o ambas técnicas se presenta en los Cuadros 7 y 8. La concordancia entre ambas técnicas se presenta en los Cuadros 3, 4, 5, y 6.

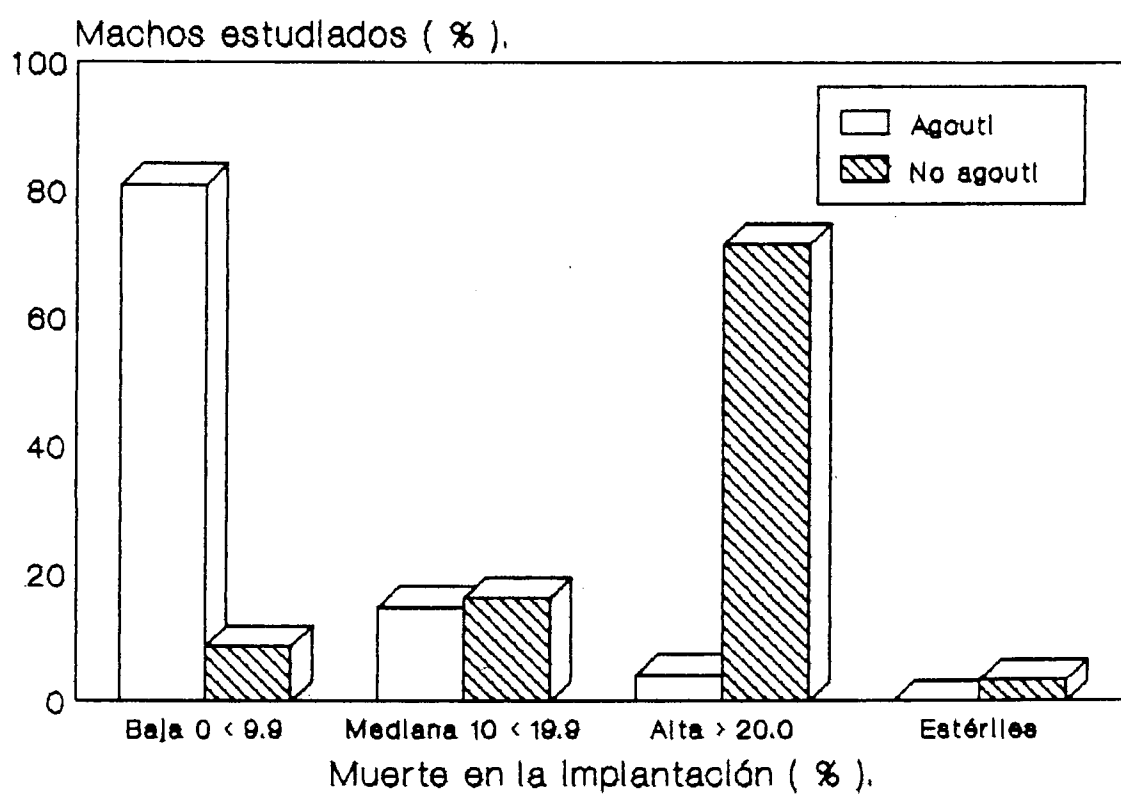


Fig.4. Porcentaje de muerte en la implantación de machos agouti y no agouti de la F1 del cruce N_g1 cruzados con hembras BLH.

Cuadro 3. Cariotipo citogenético parcial y análisis molecular de machos agouti y relación con el porcentaje de muerte en la implantación.

	Cariotipo citogenético	Análisis molecular	% M. Impl.*
1		2,2;17,17	0,00
2		2,2;17,17	0,00
3		2,2;17,17	4,10
4		2,2;17,17	5,10
5		2,2;17,17	5,60
6		2,2;17,17	7,30
7		2,2;17,17	7,80
8		2,2;17,17	8,30
9		2,2;17,17	8,33
10		2,2;17,17	8,60
11		2,2;17,17	9,70
12		2,2;17,17	9,70
13	2,2;17,17	2,2;17,17	10,00
14	2,2;17,17	2,2;17,17	10,80
15	2,2;17,17	2,2;17,17	11,10
16	2,2;17,17	2,2;17,17	11,10
17	2,2;17,17	2,2;17,17	12,10
18	2,2;17,17	2,2;17,17	18,80
19	2,2;17,17	2,2;17,17	25,00
20	2,2;17,17 + 14,14(15); 15,15(del)	2,2;17,17	65,50

* % M. Impl.: Porcentaje de muerte en la implantación.

Cuadro 4. Cariotipo citogenético parcial y análisis molecular de machos no agouti y relación con el porcentaje de muerte en la implantación.

	Cariotipo citogenético	Análisis molecular	% M. Impl.*
1		2,2 ¹⁷ ;17,17	----
2	2,2 ¹⁷ ;17,17	2,2 ¹⁷ ;17,17	2,20
3		2,2 ¹⁷ ;17,17	3,40
4	2,2 ¹⁷ ;17,17	2,2 ¹⁷ ;17,17	5,90
5	2,2 ¹⁷ ;17,17	2,2 ¹⁷ ;17,17	7,90
6		2,2 ¹⁷ ;17,17	10,00
7	2,2 ¹⁷ ;17,17	2,2 ¹⁷ ;17,17	14,90
8		2,2 ¹⁷ ;17,17	15,60
9	2,2 ¹⁷ ;17,17	2,2 ¹⁷ ;17,17	17,00
10		2,2 ¹⁷ ;17,17	17,20
11	2,2 ¹⁷ ;17,17	2,2 ¹⁷ ;17,17	18,60
12	2,2 ¹⁷ ;17,17	2,2 ¹⁷ ;17,17	19,60
13		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	23,30
14	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	26,20
15	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	26,50
16		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	26,60
17		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	26,60
18		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	27,30
19		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	27,80
20		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	28,60
21		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	29,40

* % M. Impl.: Porcentaje de muerte en la implantación.

Cuadro 4. Continuación.

	Cariotipo	Análisis	% M.
	citogenético	molecular	Impl.*
22		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	29,40
23	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	31,60
24		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	32,40
25		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	32,40
26		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	34,70
27		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	35,10
28	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	35,30
29		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	37,90
30		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	40,60
31		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	42,10
32		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	42,30
33	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	42,90
34	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	51,40
35		2,2 ¹⁷ ;17,17	Estéril

* % M. Impl.: Porcentaje de muerte en la implantación.

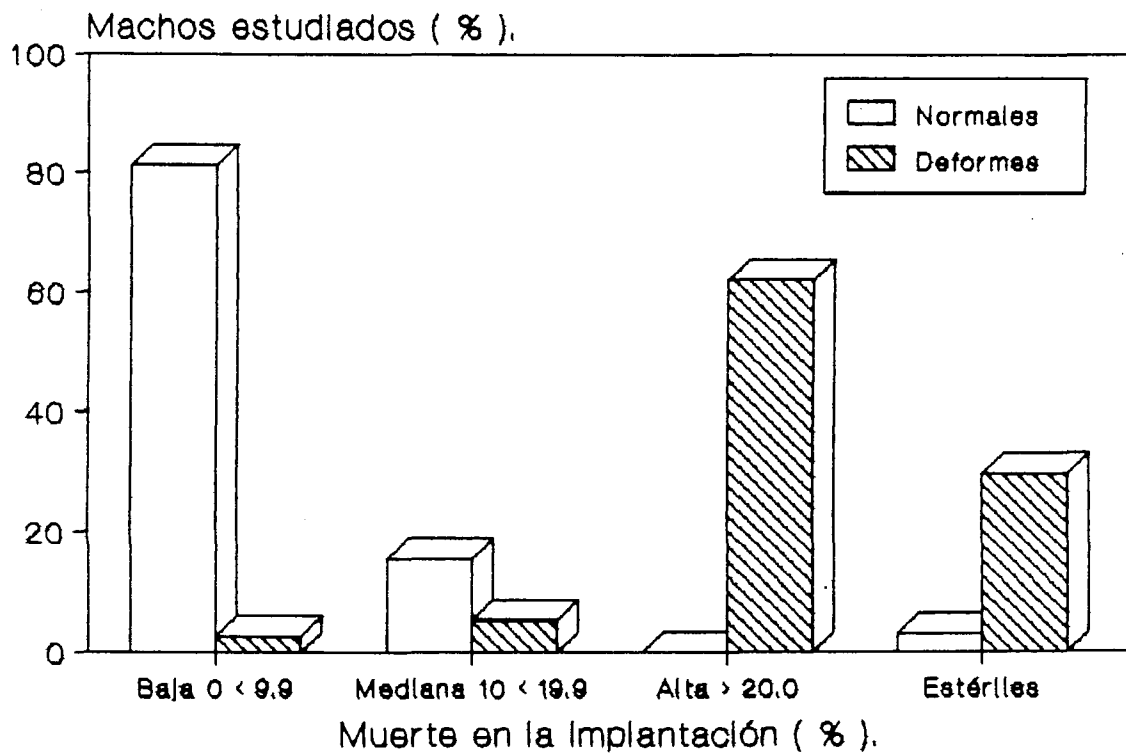


Fig.5. Porcentaje de muerte en la implantación de machos normales y deformes de los miembros de la F1 del cruce NQ2 cruzados con hembras BLH.

Cuadro 5. Cariotipo citogenético parcial y análisis molecular de machos silvestres para el locus deformidad de los miembros y relación con el porcentaje de muerte en la implantación.

	Cariotipo citogenético	Análisis molecular	% M. Impl.*
1		2,2;17,17	2,70
2		2,2;17,17	2,90
3		2,2;17,17	3,70
4		2,2;17,17	5,90
5		2,2;17,17	8,80
6	2,2;17,17	2,2;17,17	10,00
7	2,2;17,17	2,2;17,17	12,50
8	2,2;17,17	2,2;17,17	13,90
9	2,2;17,17	2,2;17,17	15,60

* % M. Impl.: Porcentaje de muerte en la implantación.

Cuadro 6. Cariotipo citogenético parcial y análisis molecular de machos con deformidad en los miembros y relación con el porcentaje de muerte en la implantación.

	Cariotipo citogenético	Análisis molecular	% M. Impl.*
1	2,2;17,17	2,2;17,17	0,00
2	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	13,20
3	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}		17,14
4		2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	20,00
5		2,2;17,17	22,90
6	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	23,10
7	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	24,30
8	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	27,30
9	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	2,2 ¹⁷ ;17,17 ^{del}	43,50

* % M. Impl.: Porcentaje de muerte en la implantación.

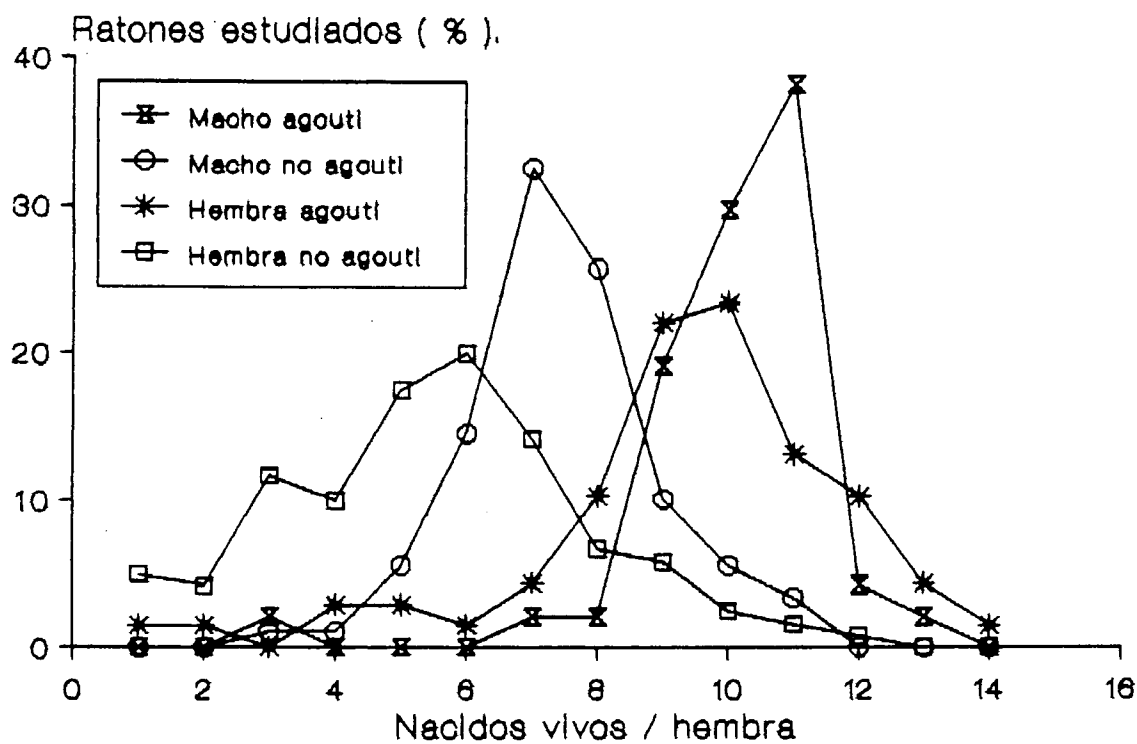


Fig.6. Número de nacidos vivos de los ratones de la F1 del cruce NQ1 (ambos sexos) cruzados con ratones BLH.

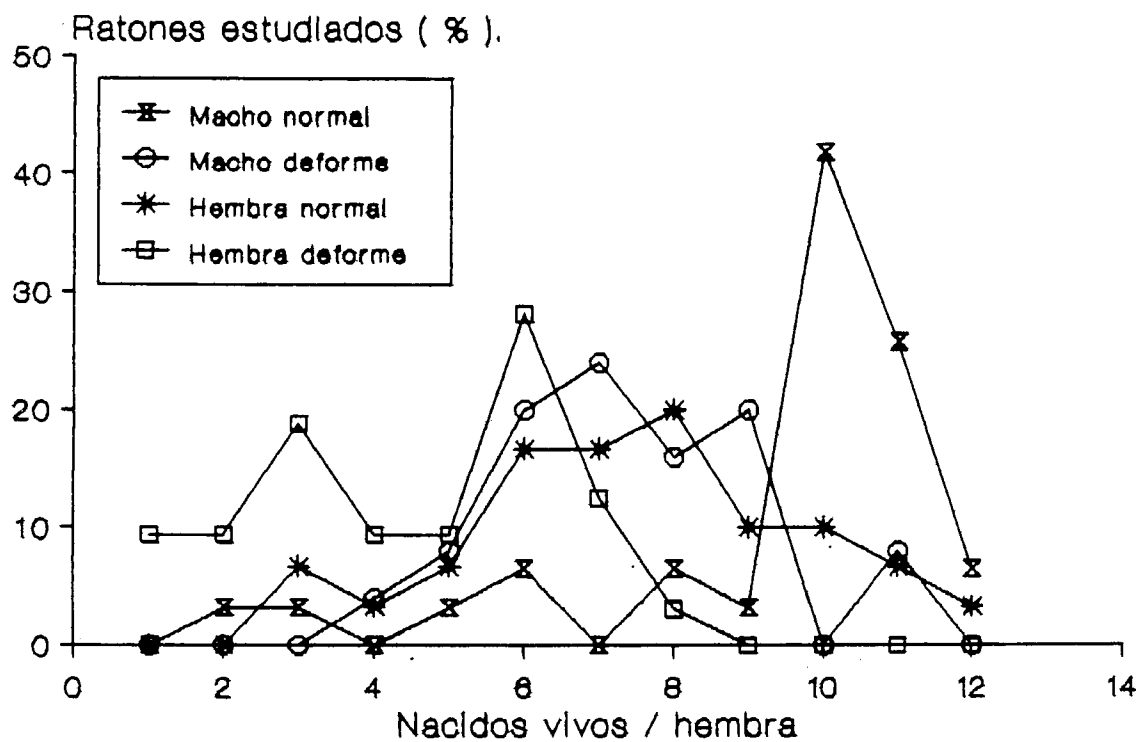


Fig.7. Número de nacidos vivos de los ratones de la F1 del cruce Nq2 (ambos sexos) cruzados con ratones BLH.

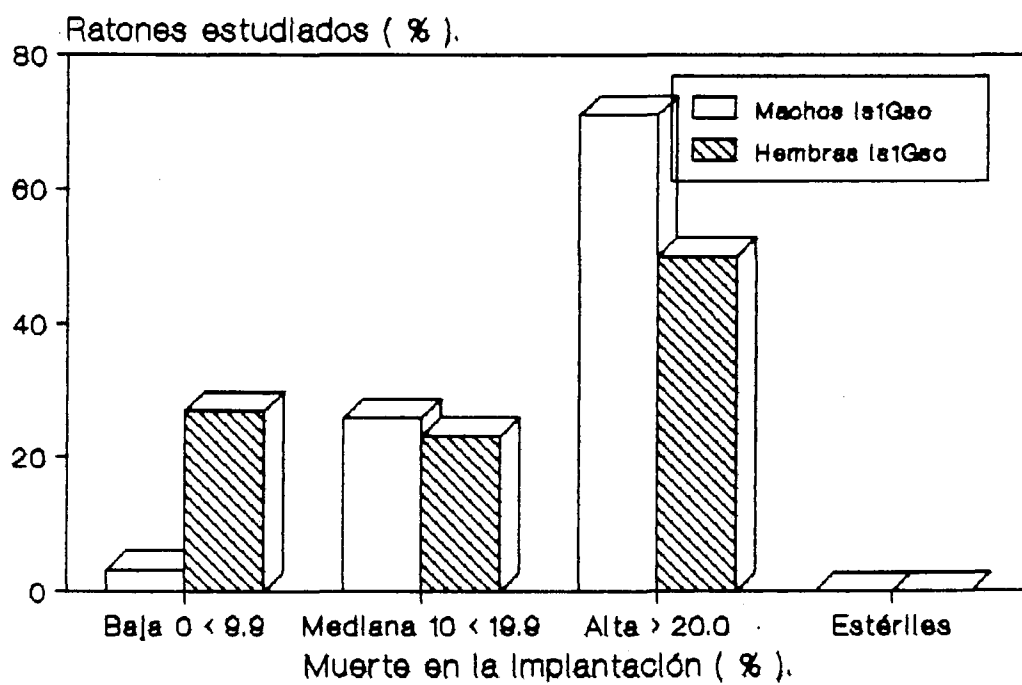


Fig.8. Porcentaje de muerte en la implantación de los mutantes Is1Gso cruzados con ratones C57BL10 (cruce NQ1).

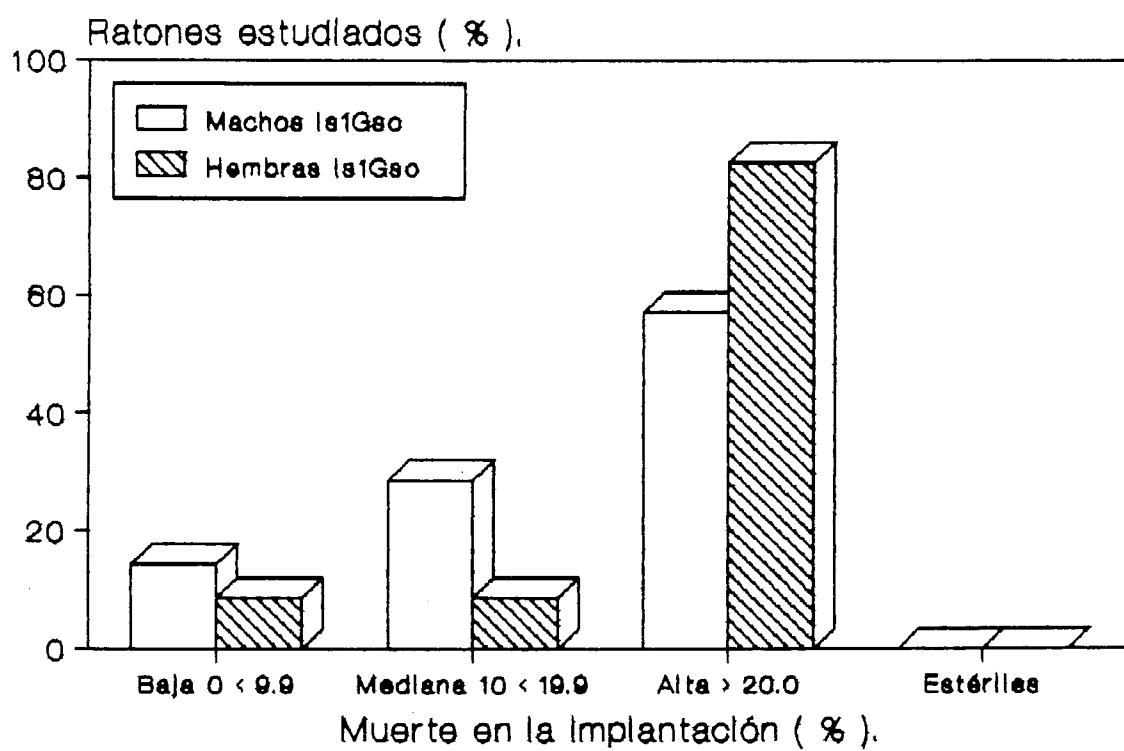


Fig.9. Porcentaje de muerte en la implantación de los mutantes Is1Gso cruzados con ratones ld^{OR}/ld^{OR} (cruce NQ2).



Fig.10. Cariotipo citogenético completo de un macho no agouti con trisomía parcial del cromosoma 17 ($2,2^{17};17,17$). Metafase mitótica bandeada con Giemsa.

Cuadro 7. Asociación del fenotipo con el cariotipo de todos los embriones del fondo genético no agouti, analizados citogenética o molecularmente.

Cariotipo	Fenotipo					
	N	E	Am	Es	R	M
2,2;17,17	13			1		
2,2(17);17,17	9	1	1		2	4
2,2(17);17,17(del)						

N. Normal
 E. Exencéfalo
 Am. Ampolla cranial
 Es. Espina bífida

R. Retardo en el crecimiento
 M. Mandíbula inferior ausente o reducida.

Cuadro 8. Asociación del fenotipo con el cariotipo de todos los embriones del fondo genético de deformidad de los miembros, analizados citogenética o molecularmente.

Cariotipo	Fenotipo		
	N	E	R
2,2;17,17	36		
2,2(17);17,17	5	3	1
2,2(17);17,17(del)	2		

N. Normal
E. Exencéfalo
R. Retardo en el crecimiento.

Discusión y Conclusiones

Un experimento de mutagénesis inducido por radiación, originó una mutación en el ratón que fue alélica a los loci *ld* y *a*. El análisis citogenético reveló que se trataba de una reestructuración cromosómica mayor, esto es, una inserción directa de un segmento intersticial del cromosoma 17 en el cromosoma 2 (inmediatamente adyacente y distal a la región invertida) y una inversión en este último cromosoma (Fig.1.B). El análisis molecular evidenció que una región en o cerca del locus *a* se había unido al locus *ld* en el alelo mutante (Capítulo II), como consecuencia de la inversión en el cromosoma 2. Con base en la evidencia del rearrreglo estructural, se designó la mutación como $Is(17;In2)ld,a^j1Gso$, que por conveniencia se abrevia $Is1Gso$ (20).

Los individuos portadores de la mutación $Is1Gso$ resultaron ser parcialmente estériles, ya que el 29% de las concepciones morían alrededor del tiempo de la implantación. Desde el trabajo clásico de Snell sobre ratones heterocigotos para reestructuraciones cromosómicas, se acepta, por lo general, que la mayoría de las aberraciones estructurales que se originan durante la gametogénesis se comportan como dominantes letales en varios mamíferos (18, 14). La esterilidad o semiesterilidad de los machos adultos se toma como una indicación de reestructuraciones cromosómicas en las células germinales (6). Cuando se cruzan los heterocigotos

semiestériles o con esterilidad parcial con ratones no afectados, se producen progenies de tamaño reducido, (la mitad de lo normal). Esto se debe a que durante la meiosis se producen gametos desbalanceados. Los cigotos resultantes por lo general mueren *in utero* en el momento de la implantación (como pequeñas molas) o sobreviven más tiempo y producen muertes más tardías o fetos con malformaciones, como por ejemplo exencefalia (12).

Si la reestructuración es desigual en términos de las longitudes intercambiadas, ésta puede conducir a la formación de cromosomas marcadores somáticos apreciablemente más largos (caso del cromosoma 2¹⁷ en Is1Gso) o más cortos (cromosoma 17^{del} en Is1Gso) que cualquier otro en un conjunto normal. La mayoría de los homocigotos para una translocación son viables y completamente fértiles (caso de los homocigotos para Is1Gso). Machos heterocigotas para ciertas translocaciones pueden sufrir de espermatogénesis defectuosa, lo que conlleva a infertilidad o completa esterilidad. Las reestructuraciones que generan cromosomas marcadores más largos y más cortos, están asociadas con fallas de apareamiento en meiosis, lo que podría ser un importante factor para generar la esterilidad del macho (2). Esta condición del macho derivada de un problema cromosómico está también asociada con una interrupción del metabolismo del ADN en paquitene (11). El fondo genético del animal puede influir en la severidad del defecto espermatogénico del macho

(8).

El mutante *Is1Gso*, heterocigota, produce regularmente una proporción de gametos cromosómicamente desbalanceados, los cuales dan como resultado cigotos con duplicaciones o deficiencias de segmentos de los cromosomas involucrados en la reestructuración.

Para estudiar el comportamiento de cada uno de los cromosomas, se realizaron dos estudios de segregación en los cuales se utilizó dos fondos genéticos diferentes: *agouti* y *deformidad de los miembros*. Debido a que las tasas obtenidas, 1:1,6 y 1:1, no concordaban con lo esperado teóricamente (dos descendientes mutantes y dos normales en cada fondo genético), se decidió realizar dos estudios de fertilidad en los cuales los animales que sobrevivían hasta la madurez sexual y que procedían de los dos cruces, se cruzaban con una reserva de constitución genética conocida, que permitía el análisis de cada uno de los cromosomas en los descendientes.

Aquellos animales que llevaran el gameto con una delección para el segmento BC del cromosoma 17 resultarían letales, por cuanto hay evidencia que los efectos de las delecciones de 17 ABCD y 17 CDE bloquean completamente el desarrollo embrionario en el estado de mórula (1); estas delecciones tienen en común las regiones CD. Se conoce que las delecciones para los segmentos proximal AB o el distal E del cromosoma 17 no afectan el desarrollo antes de la

implantación, por lo que se puede asumir que la ausencia del segmento del medio, es responsable de los efectos letales tempranos de las deleciones parciales 17 CDE y 17 ABCD, así como de la monosomía del cromosoma 17. Esto sugiere que la región CD de este cromosoma contiene genes que podrían estar involucrados en los estados iniciales de la embriogénesis del ratón. Esta región central contiene ADN para genes estructurales (19) y el desbalance para estos genes, puede ser responsable de la muerte de los embriones deficientes de la región CD en el estado inicial de la embriogénesis.

En general, deleciones cromosómicas para segmentos de considerable tamaño son inevitablemente letales durante la implantación, o poco después de esta, y la severidad del efecto depende de la presencia de ciertos genes en la región ausente.

Se había considerado que aquellos animales portadores del gameto normal o con el rearreglo balanceado sobrevivirían todo el período de gestación y después del nacimiento, y que los individuos con duplicación para el segmento intersticial del cromosoma 17 iban a tener un comportamiento desigual dependiente del fondo genético. Efectivamente, se encontró una sobrevivencia diferencial para la duplicación del segmento intersticial del cromosoma 17, la trisomía parcial era viable en el fondo genético no agouti pero resultaba letal en el fondo genético deformidad de los miembros Oak Ridge. Según los resultados obtenidos en varios

laboratorios, se ha sugerido que diferencias en el fondo genético podrían ser importantes en la determinación de la longitud de la sobrevivencia, y que depende de ese fondo genético, si los cigotos pueden ser viables de acuerdo a la cantidad del material cromosómico ganado (17).

En el grupo de machos no agouti (cariotipo desbalanceado) se encontró una mayor incidencia de muertes en la implantación comparada con la de machos agouti con cariotipo normal, en los cuales se observaron valores normales. Dentro de los primeros, se obtuvieron dos cariotipos diferentes: un cariotipo parcialmente trisómico con porcentajes bajos de muerte en la implantación y otro con el rearreglo balanceado con porcentajes más altos. En estos últimos animales, ambos cromosomas anormales tendrán posibilidad de manifestarse en la descendencia, mientras que en los trisómicos, solo un cromosoma jugará un papel negativo en la progenie. Se desconoce la causa precisa de muerte en los trisómicos, sean completos o parciales. En algunos casos, parece estar relacionada con un crecimiento embrionario y desarrollo extremadamente pobre. En otros, se ha sugerido que podría ser causada por insuficiencia placental, con una placenta incapaz de cumplir las necesidades metabólicas del feto con la reestructuración cromosómica (10). Por otra parte, los machos con deformidad de los miembros, tuvieron mayor incidencia de muerte en la implantación que los machos normales con cariotipo normal.

Los primeros, como se describió anteriormente, estuvieron representados únicamente por el cariotipo del rearrreglo balanceado.

La mayoría de las anomalías fetales que se desarrollaron tanto en la descendencia de $Is1Gso$ como en la descendencia de animales que portan la mutación $Is1Gso$, fueron causadas por la trisomía parcial del cromosoma 17. Una proporción muy alta de los embriones anormales fueron exencefalos y tenían este cariotipo. Pese a que la exencefalia es asociada comunmente con desbalance genético en reservas de translocaciones de ratón, su frecuencia y forma puede variar. Se encuentra también en trisomías numéricas. De 14 reservas de translocaciones recíprocas estudiadas en Harwell, la exencefalia se encontró en 13, amenudo asociada con otras malformaciones, tales como defectos de la cara (16). De todas las anomalías fetales que se desarrollaron en la descendencia de los portadores de la mutación $Is1Gso$ que fueron analizados citogenética o molecularmente, el 89% (en el fondo genético no agouti) y el 100% (en el fondo genético deformidad de los miembros) fueron causadas por la trisomía parcial para el cromosoma 17, aunque debe considerarse que el número de fetos no son suficientes. Sin embargo, se encontraron 9 y 5 animales con fenotipo normal pero con el cariotipo parcialmente trisómico, en los fondos genéticos no agouti y deformidad de los miembros. Por tanto, se requiere mayor análisis para establecer alguna

correlación entre la anomalía fetal y el tipo de aberración cromosómica (Cuadros 7 y 8).

El hecho que un feto mostrara el fenotipo espina bífida y que tuviera un cariotipo parcialmente normal para los cromosomas 2 y 17, puede explicarse por la ocurrencia de una mutación espontánea en la meiosis del padre que afectara a otros cromosomas no involucrados en esta reestructuración cromosómica.

Se obtuvieron dos descendientes de machos con deformidad de los miembros que tuvieron un cariotipo parcialmente normal para los cromosomas 2 y 17 y presentaron un fenotipo deforme de los miembros. Para que estos descendientes posean el fenotipo malformado, deben de ser portadores del cromosoma 2^{17} , para que la condición para el locus *Id* quede en estado homocigota. Sin embargo, los dos animales poseen los dos cromosomas 2 aparentemente normales (bajo examinación citogenética y molecular). Por ende, debe de estudiarse esta situación con detalle para poder asociarlo a algún fenómeno, como podría serlo un evento de entrecruzamiento.

Referencias

1. Baronov, V.S., Gregorova, S. & Forejt, J. (1981) H.Genetika 17, 1454-1459.
2. Boer, P. de, & Searle, A.G. (1980) J.Reprod.Fert. 60, 257-265.
3. Cattanach, B. (1961) Z. Vererbungsl. 92, 165-182.
4. Cupp, M. (1962) Mouse News Lett. 26, 51.
5. Davisson, M.T., Roderick, T.H., Hillyard, A.L. & Doolittle, D.P. (1989) Mouse News Letter 84, 15-23.
6. Dyban, A.P. & Baranov, V.S. (1987) Cytogenetics of Mammalian Embryonic Development (Oxford University Press, New York), 361 p.
7. Eicher, E. (1970) Adv. Genet. 15, 175-259.
8. Forejt, J. (1974) Nature 260, 143-145.
9. Ford, C. (1969) in K. Benirschke, Ed. Comparative Mammalian Cytogenetics (Springer-Verlag, Berlin), pp. 91-106.
10. Gropp, A. (1981) in Human Reproduction, Proceedings of Third World Congress, Berlin, Ed. Semm, K & Mettler, L. (Excerpta Medica, Amsterdam), pp. 208-216.
11. Hotta, Y., Chandley, A.C., Stern, H., Seale, A.G. & Beechey, C.V. (1979) Chromosoma 73, 287-300.
12. Kirk, K.M. & Searle, A.G. (1988) in The Cytogenetics of Mammalian autosomal rearrangements, Ed. Daniel, A. (Alan Liss, New York), pp. 739-768.

13. Pathak, S., Stock, A. & Lusby, A. (1975) *Experientia* 31, 916-918.
14. Russell, L.B. (1962) in *Progress in Medical Genetics* (Academic Press, New York), pp. 230-294.
15. Searle, A. (1974) *Genetics* 78, 173-186.
16. Searle, A.G., Beechey, C.V., Boer, P. de, Rooij, D.G. de, Evans, E.P. & Kirk, M. (1983) *Cytogenetic. Cell Genet.* 36, 617-626.
17. Searle, A.G. (1989) in *Genetic variants and strains of the laboratory mouse*, Ed. Lyon, M.F. & Searle, A.G. (Oxford University Press, New York) 2nd ed., pp.582- 599.
18. Snell, G.D. (1941) *Genetics* 26, 169.
19. Womack, J.E. (1978) in *Inbred and genetically defined strains of laboratory animals. Part I, Mouse and rat.* ed. Altman, P & Katz, D.D. (Federation of Animal Society for Experimental Biology, Bethesda), pp.96-100.
20. Woychik, R.P., Generoso, W.M., Russell, L.B., Cain, K.T., Cacheiro, N.L.A., Bultman, S.J., Selby, P.B., Dickinson, M.E., Hogan B.L.M. & Rutledge, L.C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 2588-2592.

Efectos de una trisomía parcial del cromosoma 17 en el
desarrollo del ratón.

Capítulo II: Análisis molecular.

Resumen

La mutación *Is1Gso* es una compleja reestructuración cromosómica, relacionada con 2 fenotipos controlados por los loci *ld* (deformidad de los miembros) y *a* (*agouti*) del cromosoma 2 del ratón. Mediante el uso de una sonda originalmente derivada de una mutación por inserción en un ratón transgénico que involucraba el locus *ld* (30), se logró acceso al ADN de este mutante. Así se originaron diversas sondas de ADN correspondientes a las regiones involucradas en este cambio estructural. Estas sondas, además de permitir el acceso al locus *a* por primera vez en la historia del genoma del ratón (4), fueron utilizadas para derivar mapas físicos y para clonar y caracterizar tanto los puntos de ruptura como las regiones silvestres asociadas con el mutante. De esta forma, se pudo caracterizar molecularmente los descendientes de los portadores de la mutación *Is1Gso*, para relacionar el desarrollo embrionario y fetal con el genotipo y para determinar la fertilidad de los machos y hembras que sobrevivían hasta la madurez sexual. Se encontró un 100% de concordancia entre el cariotipo citogenético y la evidencia molecular para los mismos cromosomas.

Introducción

La caracterización molecular de las mutaciones es una herramienta muy útil para correlacionar la estructura y expresión de los genes con sus funciones en el organismo. En ratones, las mutaciones obtenidas en programas de mutagénesis por radiación o por químicos son instrumentos importantes para la caracterización del genoma de los mamíferos. Muchas de estas mutaciones son alteraciones estructurales mayores de los cromosomas, tales como deleciones, inversiones o translocaciones y son particularmente útiles para el estudio de la función de los genes en el ratón (31).

Sondas de ADN procedentes de las regiones involucradas en la alteración cromosómica son utilizadas para derivar mapas físicos de estas secciones y para clonar y caracterizar los genes asociados a ellas (14).

Woychik et al. (31) describieron la caracterización citogenética y molecular de una compleja reestructuración cromosómica en el ratón inducida por radiación (1s1Gso), relacionada con dos fenotipos controlados por dos loci del cromosoma 2 (a y ld). El análisis molecular de esta mutación permitió determinar que un segmento del nuevo cromosoma 2, inmediatamente adyacente y proximal al sitio de inserción, estaba invertido, de tal forma que una parte del locus ld estaba ligada a secuencias normalmente unidas al locus a.

Estos loci, ld y a, se encuentran normalmente a una

distancia de 20 cm. El locus deformidad de los miembros (*ld*) fue descrito hace más de 30 años gracias al hallazgo de dos mutaciones espontáneas originadas independientemente, una en el Oak Ridge National Laboratory (alelo *ld^{OR}*) y la otra en The Jackson Laboratory (alelo *ld^j*) (7, 11). El efecto de este locus está asociado tanto con anomalías esqueléticas que afectan los miembros anteriores y posteriores del animal, así como con defectos del riñón (7, 32). Este locus llegó a ser accesible a nivel molecular gracias a la utilización de sondas derivadas de una mutación por inserción en un ratón transgénico en la Universidad de Harvard (alelo *ld^{TgHd}*) (30). Woychik *et al.* (30) mostraron que estos tres alelos difieren del silvestre y entre sí en las longitudes de los fragmentos de restricción, reveladas por digestión con las enzimas de restricción BamHI y BglII.

El locus *agouti* (*a*) regula la distribución de dos tipos distintos de pigmentos: feomelanina (amarillo) y eumelanina (negro o café, que depende de los alelos presentes en otros loci), por medio de los melanocitos dentro de los folículos del pelo (26). Análisis de mutaciones inducidas por radiación han revelado la presencia de genes dentro o cerca del locus *a* que regulan el desarrollo embrionario (20, 26, 27, 28).

A pesar de considerables esfuerzos en los últimos años, para investigar la genética y la biología del locus *a*, este no había podido ser caracterizado a nivel molecular ni tampoco se había podido clonar ningún otro gen regulador del

desarrollo cerca de este locus (27,28, 2). Woychik et al. (31) obtuvieron una sonda de ADN del locus a de la mutación *ls1Gso*. Ellos utilizaron la inversión en el cromosoma 2 de la mutación descrita con el fin de obtener sondas del locus *ld silvestre* para "brincar" a una región altamente ligada al locus a. Bultman et al. (4), utilizaron esta sonda y determinaron que la región representada por este fragmento estaba directamente asociada con el locus a; los segmentos de ADN clonados de esta región podrían ser útiles para la caracterización del gen (o genes) asociado (s) con la función de este locus. Así, se pudieron obtener otras sondas dentro o muy cerca de los genes asociados con esta importante región del ADN responsable del desarrollo del ratón.

En este trabajo se describe la utilización de estas sondas, originalmente obtenidas del locus *ld^{TgHd}*, para lograr acceso molecular en el ADN de los diferentes puntos de ruptura y regiones silvestres de los cromosomas 2 y 17 involucrados en esta mutación. Con esta herramienta molecular, junto con los análisis genéticos y citogenéticos, se pudo estudiar el efecto de los diferentes gametos derivados de este mutante, particularmente, el efecto de la trisomía parcial del cromosoma 17 en los descendientes del mutante *ls1Gso*. Se correlacionó además, las anormalidades o malformaciones fetales que se desarrollan en la descendencia del mutante con el cariotipo citogenético y con el análisis molecular.

Material y Métodos

Animales.

Todos los ratones utilizados en este experimento fueron cruzados y mantenidos en el Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.

Transferencia de Southern.

Se digirió 10 microgramos (μg) de ADN genómico de hígado o cola del ratón adulto o del embrión completo se digirió con enzimas de restricción, con el propósito de hacer los análisis moleculares para cada uno de los descendientes o portadores de la mutación *Is1Gso*. La electroforesis se realizó en geles de agarosa (0.8%) y se transfirió a membranas "GeneScreen" (DuPont) (1, 22). Se utilizaron sondas (fragmentos de restricción de doble banda) de hibridación marcadas radioactivamente preparadas por la técnica de "random-hexamer" (10).

Clonación de un fragmento reestructurado de 4.5 kilobases (Kb), correspondiente a la parte distal del locus *agouti* del cromosoma 2 y a una parte de la región distal del cromosoma 17 normal.

Se digirió completamente un total de 250 μg de ADN genómico de hígado de un macho *Is1Gso* heterocigota (31) con *EcoRI* y se fraccionó por tamaño en un gradiente de sucrosa de 10-40% (1, 22). Se tamizó una biblioteca de fagos EMBL4, preparada con las fracciones que contenían fragmentos de 4.5 a 5 Kb, con el fragmento D (XRB1.2 Kb) (Fig.1) como sonda,

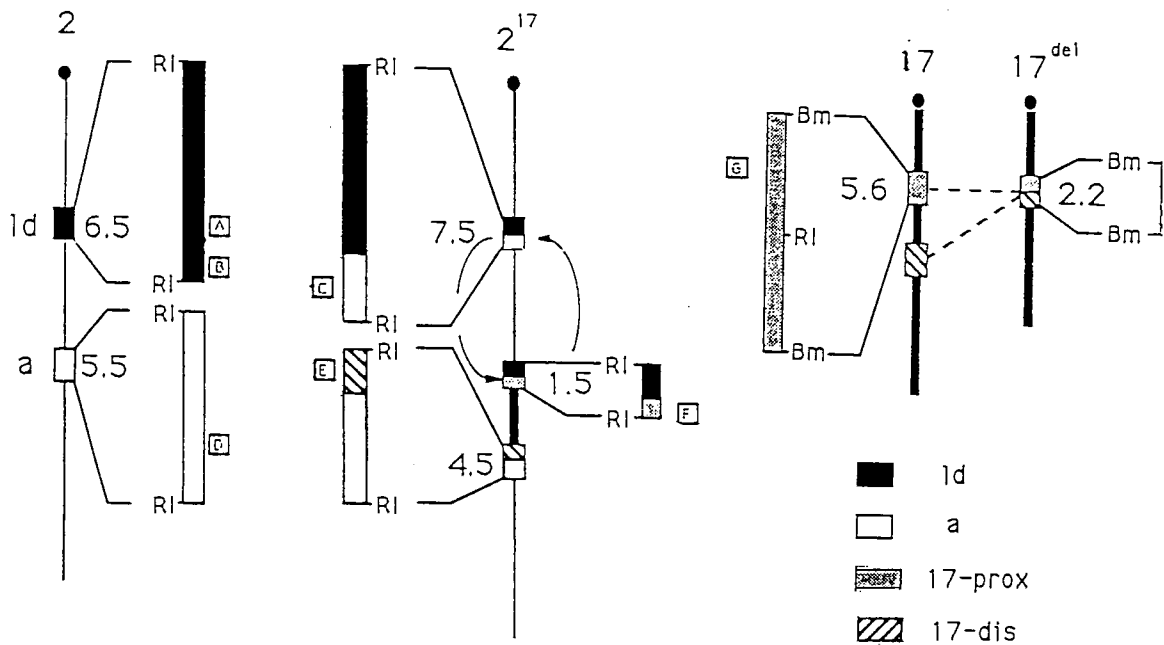


Fig.1. Estructura del ADN de todos los fragmentos silvestres y reestructurados involucrados en la mutación *Is1Gso*. En el cromosoma 2 normal, los fragmentos 6.5 y 5.5 Kb *EcoRI* corresponden a los loci *1d* y *a*, respectivamente. Los fragmentos 7.5, 1.5 y 4.5 Kb *EcoRI* son los puntos de ruptura en el cromosoma 2¹⁷. En el cromosoma 17 normal, el fragmento 5.6 Kb *BamHI* corresponde a la región proximal. El fragmento distal no fue clonado. En el cromosoma 17^{del}, el fragmento 2.2 Kb *BamHI* representa el punto de ruptura del segmento intersticial del cromosoma 17. A la par de cada uno de los fragmentos, una ampliación donde se indica las sondas utilizadas para el análisis molecular (ver el texto).

proveniente del fragmento silvestre 5.5 Kb/EcoRI del locus agouti (31, 1, 22). El fragmento de interés, 4.5 Kb/EcoRI fue luego subclonado en el vector pGEM4 (Promega); se determinó el mapa de restricción y se secuenció parcialmente (1, 22).

Subclonación de un fragmento correspondiente a una parte de la región distal del cromosoma 17 normal.

Se digirió completamente 50 µg del subclon pGEM4/4.5 Kb/EcoRI con EcoRI y BglII. Se cortó una banda 0.8 Kb/EcoRI/BamHI del gel de agarosa. Este fragmento fue luego subclonado en el vector pGEM2 (Promega) y se determinó el mapa de restricción (1, 22).

Aislamiento de fragmentos específicos para detectar la región distal del cromosoma 17 normal.

Se digirió completamente 50 µg del subclon pGEM2/0.8 Kb/EcoRI/BamHI con las enzimas EcoRI y HindIII para obtener el fragmento E de la Fig.1. Este fragmento se usó como sonda para identificar la región distal del cromosoma 17 normal en ADN genómico de heterocigotas y homocigotas para Is1Gso.

Clonación de un fragmento de 5.6 Kb, correspondiente a la región proximal del cromosoma 17 normal.

Se digirió completamente un total de 250 µg de ADN genómico de hígado de un macho Is1Gso heterocigota y de un macho homocigota para la mutación (31), con BamHI y se fraccionó por tamaño en un gradiente de sucrosa de 10-40% (1, 22). Se tamizó una biblioteca de fagos EMBL3, preparada con

las fracciones que contenían fragmentos de 5 a 6 Kb, con el fragmento F (H0.4 Kb) (Fig.1) como sonda, proveniente del fragmento reestructurado 1.5 Kb/EcoRI que representa la parte distal del locus 1d y parte de la región proximal del cromosoma 17 silvestre (31, 1, 22). El fragmento detectado, 5.6 Kb/BamHI fue luego subclonado en el vector pBS (Bluescript II Promega) y se determinó el mapa de restricción (1, 22).

Subclonación del fragmento silvestre de 2.2 Kb, correspondiente al punto proximal del cromosoma 17 normal.

Se digirió completamente 50 µg del clon pBS/5.6 Kb/BamHI con HindIII y BglII o con HindIII y PstI. Se obtuvieron varios fragmentos que luego fueron utilizados como sondas. El fragmento H2.2 Kb fue posteriormente subclonado en el vector pGEM3 (Promega) y se determinó el mapa de restricción (1, 22).

Aislamiento de dos fragmentos específicos para detectar el cromosoma 17^{del}.

Se digirió 50 µg del subclon pGEM3/2.2 Kb/HindIII con las enzimas HindIII, SstI y PstI para producir el fragmento HS1.2 Kb (la misma ubicación de la sonda G en la Fig.1) que se usó como sonda para identificar el punto de ruptura del cromosoma 17^{del} en ADN genómico de heterocigotas y homocigotas para la mutación 1s1Gso.

Clonación de un fragmento de 2.2 Kb, representante del punto de ruptura en el cromosoma 17^{del}.

Se digirió completamente un total de 250 µg de ADN genómico de hígado de un macho Is1Gso heterocigota (31) con BamHI y se fraccionó por tamaño en un gradiente de sucrosa de 10-40% (1, 22). Se tamizó una biblioteca de fagos EMBL3, preparada con las fracciones que contenían fragmentos de 2 a 2.2 Kb, con el fragmento HS1.2 Kb y posteriormente 0.7 Kb/Sau3A como sondas, provenientes del subclon pGEM3/2.2 Kb/HindIII (1, 22). El fragmento de interés, 2.2 Kb/BamHI (punto de ruptura en el cromosoma 17^{del}) fue luego subclonado en el vector pGEM3 (Promega) y se determinó el mapa de restricción (1, 22).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la construcción de una sonda que detectara el cromosoma 17^{del}.

Se utilizó el clon pGEM3/2.2 Kb/BamHI a una concentración final de 1 ng/µl. Se utilizaron los iniciadores T7 y SP6 (Promega) a las concentraciones convencionales (22, 21). La ampliación se llevó a cabo a 94 °C. por 1.30 minutos, a 45 °C. por 2.00 minutos y a 72 °C. por 3.00 minutos. El producto amplificado (2.2 Kb) se purificó y se cortó con las enzimas Sau3A, HinfI, HaeIII, Ddel, PstI, SstI y AluI. Los fragmentos obtenidos por las enzimas Sau3A (4 en total) e HinfI (3 en total) fueron probados como sondas en filtros con ADN genómico del mutante heterocigota; los mejores resultados se obtuvieron con las bandas Sau3A N°2 (sonda G en Fig.1) e HinfI N°2. Se escogió la primer banda como sonda para los futuros análisis.

Análisis de algunas secuencias de nucleótidos asociadas con esta mutación.

Para los puntos de ruptura 4.5 Kb/EcoRI y 5.6 Kb/ BamHI, fue necesario analizar sus secuencias nucleotídicas y compararlas con todas aquellas registradas en las bases de datos de secuencias de VAX/VMS - GCG Package (Genetics Computer Group, Sequence Analysis Software Package, version 6.0, 1989).

Resultados

Clonación de los diferentes puntos de ruptura y fragmentos del tipo silvestre asociados con IsIGso.

Esta mutación comprendió una inversión en el cromosoma 2 que permitió usar una sonda originalmente derivada del locus Id (sonda A, Fig.1) para "brincar" a una región estrechamente ligada al locus a, en el cromosoma 2¹⁷, punto de ruptura 7.5 Kb/EcoRI (31). Una vez clonado el punto de ruptura anterior y mediante la técnica de "caminar a través del cromosoma", se logró acceso a genes dentro o cerca del locus agouti y así se pudo obtener la sonda C (Fig.1) que a su vez, permitió el acceso a otras regiones asociadas con este locus. Fue así como, por medio de esta sonda C (Pvu-D), correspondiente al extremo distal del punto de ruptura 7.5 Kb/EcoRI del cromosoma 2¹⁷, se pudo "brincar" al cromosoma 2 normal, específicamente al punto 5.5 Kb/EcoRI, correspondiente al extremo proximal del locus agouti silvestre (4). Con la clonación de esta región, se pudo obtener el fragmento distal D (XRB1.2) (Fig.1), que fue utilizado como sonda para "brincar" de nuevo al cromosoma 2¹⁷ y lograr ingreso al punto de ruptura 4.5 Kb/EcoRI, correspondiente a la parte distal del locus agouti y a parte del punto distal del cromosoma 17 normal. Con este nuevo punto de ruptura clonado, se procedió a derivar diferentes sondas de la región más proximal con el fin de facilitar el acceso al cromosoma 17 normal, específicamente, a la región

distal involucrada en la inserción.

Al hibridar estas sondas con ADN genómico del mutante *IslGso* heterocigoto, se detectó que todas ellas producían una mancha de hibridación en los filtros, lo que indica la presencia de elementos repetitivos dentro de esa región. Por lo tanto, se procedió a subclonar esta región para ver si se obtenía una sonda que estuviera libre de elementos repetitivos.

Se obtuvo un subclon (EBO.8 Kb) que al digerirlo con diversas enzimas de restricción produjo fragmentos que no escapaban de esa región repetitiva; por esta razón, la intención de utilizar la región 4.5 Kb/*EcoRI* para obtener una sonda (sonda E en Fig.1) y lograr acceso al cromosoma 17 normal tuvo que ser abandonada y buscarse una vía alternativa, la cual consistió en utilizar el punto de ruptura 1.5 Kb/*EcoRI* en el cromosoma 2¹⁷, previamente clonado y caracterizado por medio de una sonda proveniente del locus *Id* (sonda B en Fig. 1) (Bultman y Woychik, resultados no publicados).

Se utilizó el fragmento distal F (HO.4 Kb) (Fig.1) como sonda, correspondiente a una parte de la región insertada del cromosoma 17 normal. Esta sonda detectó un fragmento 5.6 Kb/*BamHI* en ADN genómico del mutante heterocigota. Se clonó esta región y se digirió con varias enzimas de restricción con el fin de obtener algún fragmento óptimo que sirviera como sonda para "brincar" al cromosoma 17^{del}.

Debido a que los diversos fragmentos que fueron probados como sondas producían una mancha de hibridación, se procedió a subclonar un fragmento (H2.2 Kb) para continuar la búsqueda de una sonda adecuada para este objetivo. Se obtuvo así sonda (HS1.2 Kb), pero al hibridarla con filtros que contenían ADN genómico del mutante se produjo una mancha continua de hibridación, por lo que fue descartada. Para tratar de lograr una mejor sonda, se recurrió a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo cual permitió amplificar el fragmento clonado 2.2 Kb/BamHI (parte del punto de ruptura 5.6 Kb/BamHI) para luego digerirlo con enzimas de corte más frecuente (4 pares de bases) y obtener un fragmento más pequeño que fuera utilizado como sonda para lograr acceso al cromosoma 17^{del}. Fue así como se obtuvo el fragmento G (0.7 Kb/Sau3A R2) (Fig.1), que hibridó con un fragmento 2.2 Kb/BamHI correspondiente al punto de ruptura en el cromosoma 17^{del}.

Análisis de secuencias y comparación entre los diferentes puntos de ruptura con los loci silvestres.

Al comparar las secuencias de pares de bases (pb) del fragmento 6.5 Kb/EcoRI en el cromosoma 2 normal (locus 1d) con las respectivas partes de este locus en los puntos de ruptura 7.5 Kb/EcoRI y 1.5 Kb/EcoRI en el cromosoma 2¹⁷, se determinó que sólo se habían perdido 3 pb durante el proceso de formación de la reestructuración cromosómica en 1s1Gso. De la misma forma, al comparar las secuencias del fragmento

5.5 Kb/EcoRI en el cromosoma 2 normal (locus a) con las respectivas partes de este locus en los puntos de ruptura 7.5 Kb/EcoRI y 4.5 Kb/EcoRI, se determinó que solamente 29 pb se habían perdido durante la formación de dicha reestructuración. Ninguna otra alteración estructural fue detectada en estas regiones del mutante.

Una comparación análoga a la anterior no pudo llevarse a cabo con respecto al cromosoma 17, debido a que ni el punto de ruptura 2.2 Kb/BamHI en el cromosoma 17^{del} ni la región distal en el cromosoma 17 silvestre, pudieron ser secuenciados. Solo se cuenta con las secuencias del fragmento 5.6 Kb/BamHI, región proximal del cromosoma 17 normal y con las de los puntos de ruptura 1.5 Kb/EcoRI y 4.5 Kb/EcoRI en el cromosoma 2¹⁷.

Análisis por computadora y determinación de la presencia de elementos repetitivos dentro de algunos puntos de ruptura.

Cuando se intentó "brincar" del punto de ruptura 4.5 Kb/EcoRI en el cromosoma 2¹⁷ al punto distal en el cromosoma 17 silvestre, todas las sondas derivadas del punto de ruptura produjeron una mancha continua al hibridarlas con ADN genómico del mutante Is1Gso heterocigota, lo que indicó que dicha región estaba contenida dentro de algún elemento repetitivo del genoma del ratón. Se procedió entonces a comparar la secuencia de nucleótidos de esta región con todas aquellas registradas en las bases de datos de secuencias de VAX/VMS - GCG Package. La búsqueda mostró que se trataba de

un elemento repetitivo LIMd; esto es, un elemento repetitivo mayor de gran esparcimiento en el genoma del ratón.

De igual manera, cuando se intentó utilizar sondas provenientes del punto proximal del cromosoma 17 normal para detectar al cromosoma 17^{del}, se encontró que la mayoría de estas sondas producían también una mancha continua al hibridarlas con ADN genómico del mutante. Al hacer la comparación de esta secuencia con las registradas en GCG Package, se encontró que había homología con las secuencias bi de ADN repetitivo que se encuentra en todas partes en el genoma del ratón.

Utilización de las técnicas moleculares para la detección de los cromosomas involucrados en la mutación Is1Gso.

La caracterización molecular de los puntos de ruptura asociados con esta mutación, así como de algunas regiones de los cromosomas normales involucrados, permitió la detección de los 4 cromosomas involucrados: cromosoma 2 normal; 2¹⁷; 17 normal y 17^{del}.

Se digirió ADN genómico de ratones adultos descendientes de Is1Gso o de sus fetos, con la enzima de restricción BamHI (con el propósito de estandarizar todos los fragmentos de restricción en términos de una misma enzima), transferido a una membrana de Nylon y luego hibridado con los fragmentos 1.5 Kb/EcoRI y 0.7 Kb/Sau3A (sondas F y G en Fig.1). El primer fragmento, un punto de ruptura en el

cromosoma 2¹⁷, contenía información complementaria al locus Id en el cromosoma 2 normal, a la región proximal del cromosoma 17 normal y obviamente, así mismo (cromosoma 2¹⁷). De esta forma, al utilizar este fragmento como sonda, se pudo detectar la presencia o ausencia de estos 3 cromosomas (Fig.2). Por otra parte, la presencia o ausencia del cromosoma 17^{del}, detectado con la sonda 0.7 Kb/Sau3A, produjo una banda de 2.2 Kb/BamHI (Fig.2). Este cariotipo parcial obtenido por medio de técnicas moleculares fue comparado con el carioripo citogenético de 39 ratones y se encontró un 100% de concordancia, para los cuatro cromosomas en estudio (Capítulo I). Solo en un caso, las técnicas moleculares no detectaron una nueva reestructuración cromosómica que involucraba los cromosomas 14 y 15, la cual sí fue detectada por medio de las técnicas citogenéticas.

De esta forma, mediante el uso de la biología molecular, fue posible estudiar un total de 161 ratones (adultos y fetos) de una forma más rápida y económica.

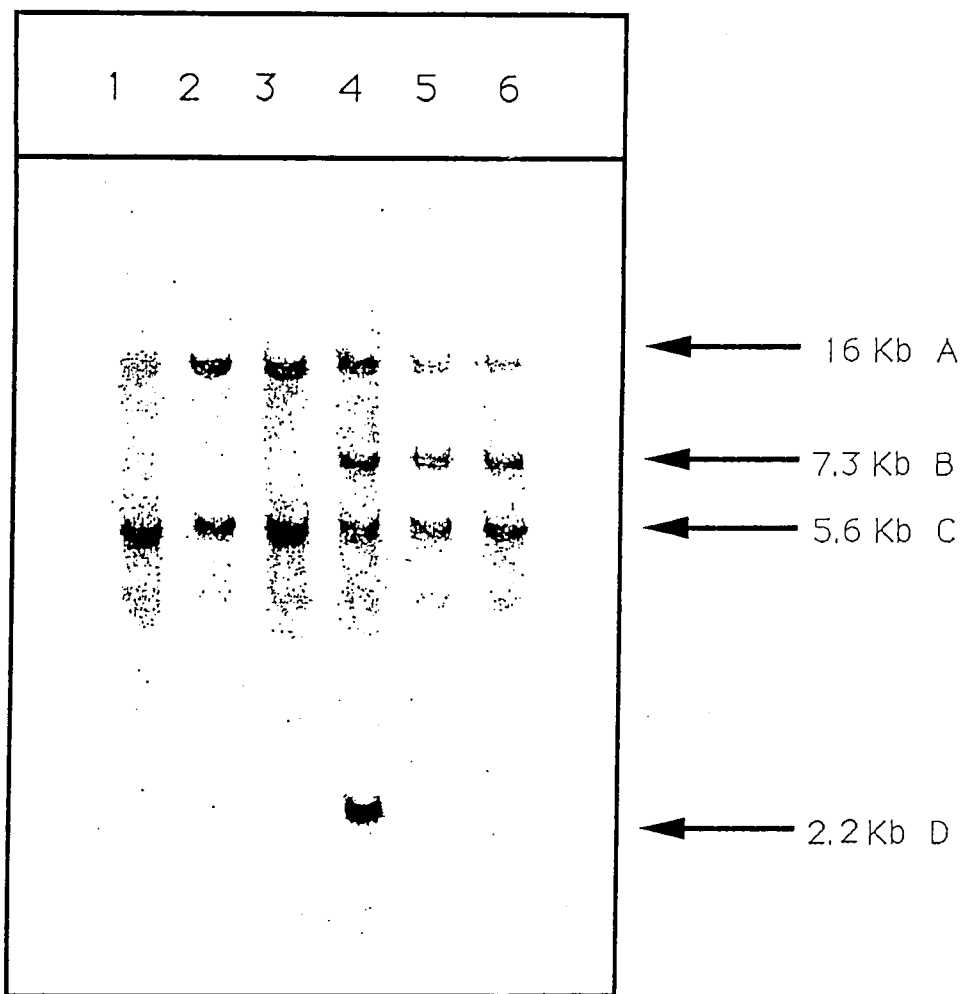


Fig.2. Transferencia de Southern de ADN genómico digerido con la enzima de restricción BamHI de descendientes del mutante IslGso. (A) Banda que detecta al cromosoma 2 normal, (B) cromosoma 2¹⁷, (C) cromosoma 17 normal y (D) cromosoma 17^{del}. Líneas 1,2 y 3 contienen los cromosomas 2,2;17,17; línea 4 los cromosomas 2,2¹⁷;17,17^{del}; líneas 5 y 6 los cromosomas 2,2¹⁷;17,17.

Discusión y Conclusiones

La caracterización molecular de las mutaciones que impliquen alteraciones estructurales mayores en los cromosomas, tales como deleciones, inversiones o translocaciones son particularmente útiles para el estudio de la función de los genes en el genoma del ratón (31).

Más de 1300 loci genéticos han sido descritos en el ratón; la mayoría de ellos han sido reconocidos por la ocurrencia de mutaciones que causan efectos visibles como por ejemplo, cambios de color, de morfología, de conducta o por el descubrimiento de diferencias entre las cepas en cuanto a estructura proteínica, actividad enzimática, determinantes antigénicos, respuestas inmunes, secuencias de ADN, etc. (12). Un claro ejemplo de una de las aplicaciones de estas reestructuraciones cromosómicas se da con las translocaciones recíprocas, que han sido usadas extensivamente para asignar grupos de ligamiento a cromosomas en el ratón (17, 18) y para asignar genes a regiones particulares de los cromosomas por: 1- mapeo de duplicación - deficiencia (8); 2- comparación de la genética y las posiciones de los puntos de ruptura citológicos (19) y 3- hibridación *in situ*; también se han utilizado para el estudio de la impresión genómica. Esto ha tomado valor a partir del descubrimiento que, cuando heterocigotas de una translocación marcada genéticamente son entrecruzadas, los cigotos formados a partir de gametos con duplicaciones y deficiencias complementarias, pueden por lo

general formar ratones perfectamente normales y viables (23). Sin embargo, cuando estas duplicaciones y deficiencias involucran ciertas regiones de los cromosomas 2, 6, 7, 8, 11, y 17 provenientes de un padre en particular, los cigotos resultantes pueden morir antes o después del nacimiento o sufrir de ciertas anormalidades (6, 29).

Se considera que genes particulares en las regiones involucradas necesitan ser impresos de alguna forma durante la maduración de la célula germinal (25). En otras palabras, conjuntos de genes diferentes importantes para el desarrollo embrionario son expresados diferencialmente en las células germinales de los machos o de las hembras (5). A modo de ejemplo, la mutación T^{hp} (una delección del cromosoma 17), se comporta como un letal prenatal en embriones heterocigotas ($T^{hp}/+$) si es heredada a través del genoma del oocito (madre), pero resulta completamente viable después del nacimiento si es transmitida a través de las espermatidas (padre). Este fenómeno, que sugiere una participación desigual de los cromosomas maternos y paternos en el control genético del desarrollo temprano, ha sido repetidamente encontrado en heterocigotas de ratones para translocaciones recíprocas o Robertsonianas (16, 24).

Un experimento de mutagénesis inducido por radiación hecho por Generoso y colaboradores en el Oak Ridge National Laboratory (31), produjo una mutación en el ratón que fue alélica a los loci ld (deformidad de los miembros) y a

(agouti). Basados en los hallazgos citogenéticos y moleculares, se propuso que un segmento intersticial del cromosoma 2¹⁷ no se asociaba a las bandas 2E4-2H1 lo que indica que estaba invertido, con puntos de ruptura en el ADN e interrupciones de las secuencias en los loci *Id* y *a*. Existe evidencia que un segmento intersticial del cromosoma 17 se había integrado en el punto inmediatamente adyacente y distal a la región invertida del cromosoma 2¹⁷ (31). Esta inversión en el cromosoma 2¹⁷, permitió "brincar" desde la región clonada del locus *Id* en el cromosoma 2 normal (por medio de una sonda originalmente derivada del locus *Id*^{H1}) a una región cercanamente ligada al locus *a*, en el cromosoma 2¹⁷ (fragmento 7.5 kb EcoRI) (31). Esto fue de gran utilidad ya que 1. se obtuvieron diversas sondas moleculares para iniciar el estudio de la biología molecular del gen (s) situado (s) en el locus *a*, máxime que la caracterización de la estructura molecular de este locus ha sido el foco de atención por parte de muchos investigadores en los últimos años. Bultman et al. (4) utilizaron una de esas sondas para estudiar una región de ADN que portaba cambios estructurales en varias mutaciones del locus *a*, e identificaron alteraciones específicas en la secuencia del ADN en dos mutaciones viables, *Is1Gso* y *a*^{5HNU}, que estaban contenidas casi en el mismo sitio en el ADN. Esa misma región estaba ausente en varias mutaciones letales, lo que evidenciaba que esa región contenía al menos una porción del gen (s) del locus *a*. 2. Se pudo caracterizar

todos los puntos de ruptura y regiones silvestres asociadas con Is1Gso. Con base en esto, se llevó a cabo un análisis molecular en varios animales relacionados con este mutante, y se encontró una alta concordancia entre este tipo de análisis y el cariotipo citogenético por medio de bandas G. El uso de sondas de ADN detectó la presencia o ausencia de fragmentos de restricción correspondientes a los cromosomas del animal, los cuales eran también detectados por las técnicas de bandeo cromosómico. Debe mencionarse que, de todos los casos analizados citogenética y molecularmente, solo uno no fue detectado por las técnicas moleculares (Capítulo 1). Esto se debió a que las sondas que se utilizaban eran específicas para los diversos puntos de ruptura asociados con la mutación Is1Gso, y en este caso, se presentaba una nueva reestructuración cromosómica que involucraba los cromosomas 14 y 15, que no podían ser detectados estas sondas.

Las secuencias analizadas y el hecho que sólo se perdieron 29 pares de bases durante la formación de la reestructuración del locus a, sin que ninguna otra alteración estructural fuera detectada, apoyan la predicción que un gen asociado con la función del locus a fue interrumpido por el rompimiento del ADN en el sitio distal de la inversión del mutante Is1Gso (4).

La presencia de familias de ADN repetitivo es un rasgo general de genomas eucarióticos y estas secuencias podrían

representar un 30% del total del ADN en mamíferos. Experimentos clásicos de reasociación del ADN han revelado que no todas las secuencias de ADN están representadas igualmente en el genoma eucariótico (3).

Hay consenso que en el genoma del ratón, las secuencias de ADN se clasifican en tres clases: 1. Una clase altamente repetitiva compuesta en su totalidad por secuencias sateliticas centroméricas las cuales constituyen el 10% del genoma; 2. Una clase moderadamente repetitiva que comprende numerosas familias, cada una con cientos o miles de miembros en localizaciones dispersas que constituyen en total el 20% del genoma y; 3. El componente de copia única el cual constituye el 70% restante del genoma e incluye la mayoría de los genes (13).

Muchas secuencias de ADN altamente repetitivo se han identificado en primates, roedores y otros mamíferos. L1Md es un elemento repetitivo mayor de gran dispersión en el genoma del ratón (9). Cuando se digiere un ADN genómico con las enzimas EcoRI o BamHI, y se realiza una electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio, se puede observar una mancha de ADN que representa un continuo de fragmentos de ADN de tamaños diferentes, que corresponden a la ubicación de estas secuencias, en el genoma del ratón (15). Esto significa, que tanto la parte proximal del punto de ruptura 4.5 Kb/EcoRI en el cromosoma 2¹⁷ como la región proximal del cromosoma 17 normal están contenidas dentro de

este tipo de secuencias, por cuanto al ser utilizadas ciertas regiones de ellas como sondas, producen una mancha de ADN continuo al hibridarlas con ADN genómico de ratón.

Correlación de las anomalías fetales con aneuploidía parcial en los fetos en desarrollo.

Se observaron anomalías craneofaciales reproducibles en los fetos y muerte prenatal en algunos de los descendientes de los animales que portan la mutación $1s1Gso$, además de los defectos de los miembros y del color del pelaje. Debido a que esta mutación involucra una alteración cromosómica mayor, es posible que estos últimos defectos sean causados por condiciones de aneuploidía parcial asociadas con la herencia de gametos desbalanceados. En lugar de estudiar esta posibilidad por medio del análisis de muchos descendientes con procedimientos citogenéticos convencionales, se desarrolló un procedimiento alternativo que permitió establecer un "cariotipo molecular parcial" de cada feto. En este caso, en lugar de observar cromosomas bandeados, se determinó la presencia o ausencia de los cromosomas 2^{17} , 17^{del} o 2 y 17 normales en cada feto por medio de las técnicas de transferencia de Southern de ADN genómico y se examinó la presencia o ausencia de los fragmentos de restricción que cosegregan con cada uno de los cuatro tipos de cromosomas involucrados en la mutación $1s1Gso$ (Fig.2).

Referencias.

1. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York).
2. Barsh, G. & Epstein, C. (1989) *Genetics* 121, 811-818.
3. Britten, R.J., & Kohne, P.E. (1968) *Science* 161, 529-540.
4. Bultman, S.J., Russell, L.B., Gutiérrez-Espeleta, G.A. & Woychik, R.P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8062-8066.
5. Cattanaach, B.M. & Kirk, M. (1985) *Nature* 315, 496-498.
6. Cattanaach, B.M. (1986) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 97, 137-150.
7. Cupp, M. (1962) *Mouse News Lett.* 26, 51.
8. Epstein, C.J. (1985) *Trends Genet.* 1, 129-134.
9. Fanning, T.G. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 5073-5091.
10. Feinberg, A. & Vogelstein, B. (1984) *Anal. Biochem.* 137-266.
11. Green, M.C. (1968) in *Biology of the Laboratory Mouse*, Ed. Green, E. (Dover, New York), 2nd ed., pp. 87-150.
12. Green, M.C. (1989) in *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Ed. Lyon, M.F. and Searle, A.G. (Oxford University Press, New York), 2nd Ed., pp.12.
13. Hastie N.D. (1989) in *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Ed. Lyon, M.F. and Searle, A.G. (Oxford University Press, New York), 2nd Ed., pp.559.

14. Johnson, D.K., Hand, R.E., Jr., & Rinchik, E.M. (1989)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 896-900.
15. Loeb, D.D., Padgett, R.W., Hardies, S.C., Shehee, W.R.,
Comer, M.B., Edgell, M.H. & Hutchison, C.A. (1986)
Molecular and Cellular Biology 6(1), 168-182.
16. Lyon, M.F. & Glenister, P.H. (1977) Genet. Res. 29, 83-93.
17. Miller, D.A. & Miller, O. (1972) Science 178, 949-955.
18. Miller, O. & Miller, D.A. (1975) Ann. Rev. Genet. 9, 285-
303.
19. Nesbitt, M.N. & Francke U. (1973) Chromosoma (Berl) 41,
145-158.
20. Russell, L. (1989) Mutat. Res. 212, 23-32.
21. Saiki, R.K. (1990) in PCR Protocols: A Guide to Methods
and Applications, ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H.,
Sninsky, J.J. & White, T.J. (Academic Press, San Diego),
pp.13-20.
22. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989).
Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring
Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY) 2nd Ed.
23. Searle, A.G., Ford, C.F. & Beechey C.V. (1971) Genet.
Res. 18, 215-235.
24. Searle, A. & Beechey, C.V. (1978) Cytogenet. Cell Genet.
20, 282-303.
25. Searle, A. (1989) in Genetic Variants and Strains of the
Laboratory Mouse (Oxford University Press, New York) 2nd
ed., pp. 582-616.

26. Silvers, W. (1979) in *The Coat Colors of Mice* (Springer, New York), pp. 6-44.
27. Siracusa, L., Russell, L., Eicher, E., Corrow, D., Copeland, N. & Jenkins, N. (1987) *Genetics* 117, 93-100.
28. Siracusa, L., Russell, L., Jenkins, N. & Copeland, N. (1987) *Genetics* 117, 85-92.
29. Snow, M.H.L. (1973) *Nature* 244, 513-414.
30. Woychik, R., Stewart, T., Davis, L., D'Eustachio, P. & Leder, P. (1985) *Nature (London)* 318, 36-40.
31. Woychik, R., Generoso W., Russell L., Cain K., Cacheiro N., Bultman S., Selby P., Dickinson M., Hogan B. & Rutledge, J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2588-2592.
32. Zeller, R., Jackson-Grusby, L. & Leder, P. (1989) *Genes Dev.* 3, 1481-1492.

Literatura citada en la tesis completa

- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. (1988) Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York).
- Baronov, V.S., Gregorova, S. & Forejt, J. (1981) H.Genetika 17, 1454-1459.
- Barsh, G & Epstein, C. (1989) Genetics 121, 811-818.
- Boer, P. de, & Searle, A.G. (1980) J.Reprod.Fert. 60, 257-265.
- Britten, R.J., & Kohne, P.E. (1968) Science 161, 529-540.
- Bultman, S.J., Russell, L.B., Gutiérrez-Espeleta, G.A. & Woychik, R.P. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8062-8066.
- Cattanach, B.M. (1961) Z. Vererbungsl. 92, 165-182.
- Cattanach, B.M. & Kirk, M. (1985) Nature 315, 496-498.
- Cattanach, B.M. (1986) J. Embryol. Exp. Morphol. 97, 137-150.
- Cupp, M. (1962) Mouse News Lett. 26, 51.
- Davisson, M.T., Roderick, T.H., Hillyard, A.L. & Doolittle, D.P. (1989) Mouse News Letter 84, 15-23.
- Dyban, A.P. & Baranov, V.S. (1987) Cytogenetics of Mammalian Embryonic Development (Oxford University Press, New York) 361 p.
- Eicher, E. (1970) Adv. Genet. 15, 175-259.
- Epstein, C.J. (1985) Trends Genet. 1, 129-134.
- Fanning, T.G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 5073-5091.

- Feinberg, A. & Vogelstein, B. (1984) *Anal. Biochem.* 137-266.
- Ford, C. (1969) in K. Benirschke, ed. *Comparative Mammalian Cytogenetics* (Springer-Verlag, Berlin), pp. 91-106.
- Forejt, J. (1974) *Nature* 260, 143-145.
- Green, M.C. (1968) in *Biology of the Laboratory Mouse*, Ed. Green, E. (Dover, New York), 2nd ed., pp. 87-150.
- Green, M.C. (1989) in *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Ed. Lyon, M.F. and Searle, A.G. (Oxford University Press, New York), 2nd Ed., p.12.
- Gropp, A. (1981) in *Human Reproduction, Proceedings of Third World Congress, Berlin*, ed. Semm, K & Mettler, L. (Excerpta Medica, Amsterdam), pp. 208-216.
- Hastie N.D. (1989) in *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Ed. Lyon, M.F. and Searle, A.G. (Oxford University Press, New York), 2nd ed., p.559.
- Hotta, Y., Chandley, A.C., Stern, H., Seale, A.G. & Beechey, C.V. (1979) *Chromosoma* 73, 287-300.
- Johnson, D.K., Hand, R.E., Jr., & Rinchik, E.M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 896-900.
- Kirk, K.M. & Searle, A.G. (1988) in *The Cytogenetics of Mammalian autosomal rearrangements*, Ed. Daniel, A. (Alan Liss, New York), pp. 739-768.

- Loeb, D.D., Padgett, R.W., Hardies, S.C., Shehee, W.R., Comer, M.B., Edgell, M.H. & Hutchison, C.A. (1986) *Molecular and Celular Biology* 6(1), 168-182.
- Lyon, M.F. & Glenister, P.H. (1977) *Genet.Res.* 29, 83-93.
- Miller, D.A. & Miller, O. (1972) *Science* 178, 949-955.
- Miller, O. & Miller, D.A. (1975) *Ann. Rev. Genet.* 9, 285-303.
- Nesbitt, M.N. & Francke U. (1973) *Chromosoma (Berl)* 41, 145-158.
- Pathak, S., Stock, A. & Lusby, A. (1975) *Experientia* 31, 916-918.
- Russell, L.B. (1962) in *Progress in Medical Genetics* (Academic Press, New York), pp. 230-294.
- Russell, L.B. (1989) *Mutat. Res.* 212, 23-32.
- Saiki, R.K. (1990) in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (Academic Press, San Diego), pp.13-20.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY) 2nd Ed.
- Searle, A.G., Ford, C.F. & Beechey C.V. (1971) *Genet. Res.* 18, 215-235.
- Searle, A. (1974) *Genetics* 78, 173-186.

- Searle, A. & Beechey, C.V. (1978) *Cytogenet. Cell Genet.* 20, 282-303.
- Searle, A.G., Beechey, C.V., Boer, P. de, Rooij, D.G. de, Evans, E.P. & Kirk, M. (1983) *Cytogenetic. Cell Genet.* 36, 617-626.
- Searle, A.G. (1989) in *Genetic variants and strains of the laboratory mouse*, Ed. Lyon, M.F. & Searle, A.G. (Oxford University Press, New York) 2nd ed., pp.582-616.
- Silvers, W. (1979) in *The Coat Colors of Mice* (Springer, New York), pp. 6-44.
- Siracusa, L., Russell, L., Eicher, E., Corrow, D., Copeland, N. & Jenkins, N. (1987) *Genetics* 117, 93-100.
- Siracusa, L., Russell, L., Jenkins, N. & Copeland, N. (1987) *Genetics* 117, 85-92.
- Snell, G.D. (1941) *Genetics* 26, 169.
- Snow, M.H.L. (1973) *Nature* 244, 513-414.
- Womack, J.E. (1978) in *Inbred and genetically defined strains of laboratory animals. Part I, Mouse and rat.* Ed. Altman, P & Katz, D.D. (Federation of Animal Society for Experimental Biology, Bethesda), pp.96-100.
- Woychik, R., Stewart, T., Davis, L., D'Eustachio, P. & Leder, P. (1985). *Nature (London)* 318, 36-40.
- Woychik, R.P., Generoso, W.M., Russell, L.B., Cain, K.T., Cacheiro, N.L.A., Bultman, S.J., Selby, P.B., Dickinson, M.E., Hogan B.L.M. & Rutledge, L.C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 2588-2592.

- Zeller, R., Jackson-Grusby, L. & Leder, P. (1989). *Genes Dev.* 3, 1481-1492.