

Bancos de embriones de ratón

Julia Fernández, DVM¹ y Dr. Lluís Montoliu²

¹ Responsable técnico del servicio de criopreservación de embriones del CNB y Nodo EMMA

² Investigador científico del CSIC, Director del nodo EMMA en España y coordinador del servicio de criopreservación de embriones del CNB

Introducción

Durante los últimos 35 años la comunidad científica internacional ha generado múltiples modelos animales, principalmente en ratón, para el estudio del genoma y enfermedades humanas. Desde la aparición de las primeras técnicas de modificación genética, a principios de los años 80, el ratón se ha convertido en la especie estrella en investigación con animales. Y esto ha sido así por su versatilidad y facilidad de estabulación y cría; por el conocimiento genético que se tiene de ella; por ser un mamífero relativamente parecido a otros, como los humanos; por su pequeño tamaño; y, principalmente, por la gran cantidad de técnicas y protocolos que permiten obtener ratones mutantes, transgénicos en definitiva, con su genoma alterado a voluntad, con objeto de entender el funcionamiento de los genes (genómica funcional), o para desarrollar un modelo que reproduzca, en su totalidad o en parte, alguna patología que nos afecte a nosotros, los humanos (biomedicina).

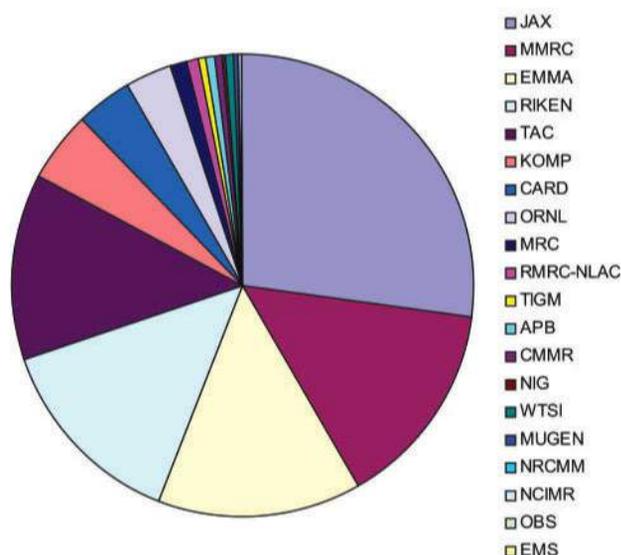
Todo el trabajo y esfuerzo que implica la obtención de cualquiera de estos ratones mutantes puede perderse si estos ratones, solamente, se mantienen como animales vivos en un núcleo de producción, en algún animalario del mundo. Los accidentes e incidentes, siempre inesperados, pueden llevarse por delante los resultados de investigación obtenidos tras años de experimentos. Por otro lado, la investigación científica también progresa mediante la validación, la reproducción de los resultados obtenidos por otros utilizando, en lo posible, los mismos reactivos, es decir, los mismos modelos animales. No parece lógico invertir en la producción de un ratón mutante que ya existe y ha sido generado, previamente, en alguna otra parte del mundo. Sin embargo, los efectos de la deriva genética pueden hacer cambiar un modelo animal, debido a la acumulación de nuevas mutaciones, al azar y de forma inadvertida. Por otro lado, frecuentemente resulta complicado compartir ratones entre instalaciones distintas, que operan bajo diferentes condiciones sanitarias, lo que convierte en necesaria una rederivación de las

líneas, habitualmente a partir de embriones. Finalmente, las nuevas normativas de bienestar animal y las legislaciones internacionales, europeas, nacionales que protegen el uso de animales en investigación, docencia y otros usos científicos obligan a todos los investigadores a razonar, explicar, presentar proyectos y obtener las correspondientes autorizaciones con objeto de: evitar su uso, en lo posible; minimizar el número de animales a utilizar, empleando solamente los necesarios para cada experimento; y mejorar los procesos de producción, mantenimiento y experimentación, teniendo siempre presente el bienestar animal.

Todas las razones anteriores justifican la existencia de los llamados bancos de embriones de ratón, o archivos, en los que se pueden criopreservar tanto embriones, como oocitos y espermatozoides de cada una de estas líneas de ratones mutantes para poder recuperarlos cuando sea necesario. Adicionalmente, la existencia de todas estas líneas de ratones mutantes, de interés en Biología y Biomedicina, en forma de material biológico congelado permite su distribución entre laboratorios y centros de investigación de forma mucho más eficiente, evitando la complejidad logística asociada al trasiego de animales vivos.

Los experimentos pioneros de Whittingham, Leibo y Mazur, publicados en 1972, demostraron que era posible congelar embriones de ratón en nitrógeno líquido para posteriormente descongelarlos, reimplantarlos en una hembra para su gestación, y finalmente obtener crías derivadas del material criopreservado. Desde entonces las técnicas de reproducción asistida y de criobiología han evolucionado formidablemente, con nuevos métodos que han aumentando progresivamente su fiabilidad y eficacia, y con contribuciones históricas de muchos centros, principalmente desde *The Jackson Laboratory (JAX)*, en EE.UU. En la actualidad, la frontera tecnológica en este campo la lidera el grupo del Dr. Naomi Nakagata, de la Universidad de Kumamoto (Japón), responsable de la División de Ingeniería Reproductiva del Centro de Recursos Animales y Desarrollo (CARD, card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/english/).

Existen diversos bancos de embriones de ratón en el mundo que operan de forma independiente, pero compartiendo y ofertando sus activos de forma conjunta a través de la iniciativa *International Mouse Strain Resource* (IMSR, www.findmice.org), alojada dentro de la gran base de datos, la *Mouse Genome Informatics* (MGI), en JAX. En la actualidad, hay casi 30.000 líneas de ratones mutantes congeladas en alguno de los 20 archivos que regularmente comparten sus bases de datos con IMSR. De ellas, más de un 25% están criopreservadas en JAX, seguido por MMRC, EMMA, RIKEN y TAC, con unas 4.000 líneas mantenidas en cada uno de estos grandes repositorios internacionales (ver gráfico).



En Europa, en los años 90, se creó el Archivo Europeo de Ratones Mutantes, conocido por sus siglas en inglés (EMMA: European Mouse Mutant Archive), hoy integrado dentro de la plataforma INFRAFRONTIER (www.infrafrontier.eu). Esta plataforma se ha financiado, principalmente, por la Unión Europea, a través de sucesivos proyectos de infraestructura, con ayuda de las instituciones nacionales y los propios centros de investigación o nodos que integran la red. En 2007, España se incorporó al consorcio EMMA a través del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), en Madrid, como miembro observador invitado, tras aportar un dossier con apoyos de muchos centros de investigación del país. El CNB cuenta con un servicio de criopreservación de embriones de ratón desde finales del 2005 (www.cnb.csic.es/~criocnb), pero además, aporta una extensa experiencia en criopreservación, a través del laboratorio de Lluís Montoliu, cuyas primeras actividades de criopreservación datan

de 1993, y de la actividad de Julia Fernández en estas técnicas en el animalario del CNB, desde 1997.

A partir de 2009, el CNB-CSIC pasó a formar parte de EMMA, como miembro de pleno derecho, ya incluido en el proyecto europeo *EMMAService*, que financió las actividades de EMMA entre 2009 y 2012. Seguidamente, la iniciativa EMMA se integró en la plataforma INFRAFRONTIER, que aúna las actividades de producción de modelos animales, criopreservación, archivo, distribución y fenotipación. En la actualidad, el proyecto INFRAFRONTIER-I3 (2013-2016) financia las actividades del archivo. El futuro de esta iniciativa es incierto, pues parece que será difícil renovar la financiación europea obtenida hasta el momento, pero existen ya soluciones y alternativas en marcha (como la empresa pública, sin ánimo de lucro, *Infrafrontier GmbH*, registrada en Alemania), que deberían permitir mantener, en lo posible, las actividades del archivo europeo de ratones mutantes.

El Archivo Europeo de Ratones Mutantes en España, el nodo del CNB

Cualquier investigador que haya generado un nuevo modelo animal, un nuevo ratón transgénico o mutante, una nueva combinación de genes de interés, o alguna línea de interés en un nuevo fondo genético es bienvenido e invitado a depositar estos animales en EMMA, siempre y cuando sea el propietario de la misma o, en su defecto, haya obtenido el permiso del propietario original de la misma.

El depósito de ratones en EMMA es relativamente sencillo, pero no es automático. En primer lugar el investigador solicitante debe rellenar un documento a través de la página web de la plataforma INFRAFRONTIER (www.infrafrontier.eu) aportando todos los datos de la línea que desea archivar. Dicha solicitud será evaluada por un comité externo, independiente, que decidirá el interés, relevancia y oportunidad para que los fondos públicos que financian la iniciativa EMMA sean utilizados para congelar esta línea y ponerla a disposición de la comunidad científica. Esto quiere decir que si finalmente la solicitud de criopreservación resulta aprobada, el investigador solicitante no deberá abonar ningún gasto más allá de los necesarios para transportar los ratones desde su centro al nodo EMMA que haya sido identificado como responsable de la criopreservación de la línea, normalmente el geográficamente más cercano. Existen en la actualidad 16 nodos en Europa, integrantes de EMMA/INFRAFRONTIER, ubicados en 13 países. El CNB-CSIC es uno de ellos (ver gráfico).

Los métodos de criopreservación han evolucionado mucho desde los inicios de EMMA. En la actualidad, prácticamente todas las líneas de ratones mutantes se archivan a partir de espermatozoides congelados, usando las últimas técnicas desarrolladas por el laboratorio de Nakagata. La calidad del espermatozoides congelados se valida posteriormente con oocitos de una cepa de ratón del mismo fondo genético y, los embriones resultantes, tras la fecundación *in vitro* (FIV), también se congelan. Por lo tanto, actualmente, para congelar una línea de ratones mutantes apenas se necesitan de 3 a 5 ratones machos adultos, en edad fértil. Evidentemente, si es necesario congelar una determinada línea de ratones en homocigosis, las hembras donadoras de oocitos también deberán ser de la misma cepa.



El mantenimiento indefinido del espermatozoides y los embriones congelados se realiza en tanques de nitrógeno líquido, de forma duplicada, es decir, la mitad del material se almacena en tanques de nitrógeno líquido ubicados en otro centro, distinto del que actúa como nodo EMMA. El centro asociado al CNB-CSIC para alojar la copia de seguridad de todas las líneas de ratones congeladas es el CBMSO-UAM/CSIC, situado a unos 600 metros, en el mismo Campus de Cantoblanco.

Además de espermatozoides y embriones congelados, es posible, para determinadas líneas de ratón, criopreservar oocitos o, menos

frecuentemente, tejido ovárico, usando técnicas descritas en criobiología.

La distribución de líneas congeladas en EMMA se hace bajo demanda, también a través de la página web de INFRAFRONTIER y no es gratuita. Los investigadores solicitantes deben abonar una tarifa de reposición, necesaria para garantizar su viabilidad como archivo. Actualmente las tarifas son de 1100 € para espermatozoides congelados, y 2400 € para ratones vivos si es necesario revitalizarlos primero. Además, y en función de los requisitos del depositante, determinadas líneas de ratón pueden llevar asociado un documento MTA, que protege los derechos intelectuales e industriales de los propietarios legítimos de la línea, y que el solicitante deberá aceptar y firmar antes de poder recibirla. EMMA es un archivo distribuido en diversos nodos, de manera que las más de 4.000 líneas de ratón que EMMA mantiene congeladas están distribuidas entre los nodos participantes. Por ejemplo, el CNB mantiene aproximadamente 400 de estas líneas. En función del nodo que mantenga la línea solicitada, la aplicación web pondrá automáticamente en contacto al solicitante con el centro EMMA que se encargará de remitirle los embriones, espermatozoides o ratones vivos de la línea solicitada. En el caso de ratones vivos los animales se remiten siempre de acuerdo a las recomendaciones.

Los investigadores que depositan sus líneas de ratón en EMMA (o en cualquier otro archivo) contribuyen con ello al progreso adecuado del conocimiento científico, potencian el uso de sus resultados científicos, fomentándose las colaboraciones científicas, y ayudan a reducir el número de animales utilizados en biomedicina, evitando que otros investigadores deban generar y caracterizar, de nuevo, la misma línea de ratones mutantes. Adicionalmente, los resultados que se obtienen son fácilmente comparables con los anteriormente obtenidos con los mismos ratones por el laboratorio productor y/o por otros laboratorios usuarios.

Finalmente, con objeto de garantizar la confidencialidad de líneas de ratones mutantes que todavía no hayan sido publicadas y cuyos investigadores propietarios no deseen compartir mientras terminan su caracterización inicial y las publicaciones correspondientes, el archivo EMMA permite depositar ratones con una moratoria de publicación de hasta 2 años. Esto quiere decir que el investigador depositante tendrá la seguridad de tener sus ratones adecuadamente criopreservados tras ser remitidos a EMMA y de que estos ratones no serán públicos (no

aparecerán en la base de datos de EMMA ni en IMSR) hasta que no hayan pasado los 2 años de confidencialidad.

Conclusión

¿Por qué se deben depositar las líneas de ratones mutantes en un banco de embriones? ¿qué beneficios tiene la utilización de archivos de ratones mutantes?

- Es la mejor forma de almacenar indefinidamente cepas de ratón criopreservadas de manera segura.
- Proporciona una manera fácil de archivar y compartir, entre la comunidad científica internacional, las variantes genéticas asociadas a cepas transgénicas y mutantes generadas por los investigadores o alojadas en los animalarios.
- Permite recuperar las líneas de ratón en cualquier momento, y en particular en caso de desastres de cualquier tipo, con garantías, ya que se mantienen copias de seguridad del material criopreservado en ubicaciones físicamente distintas.
- Evita que otros investigadores deban producir una cepa equivalente, con el consiguiente ahorro de animales, tiempo y dinero.
- Aporta el valor añadido que representa poder utilizar los mismos modelos animales ya previamente utilizados por otros colegas, lo que permite validar los resultados publicados y discutir los nuevos resultados de forma científicamente correcta.
- Las líneas de ratón criopreservadas se pueden recuperar rápidamente y obtener las cepas libres de patógenos oportunistas (SOPF), si una rederivación embrionaria fuera necesaria.
- Permite eliminar cepas de ratones mutantes de los animalarios cuando éstas han dejado de usarse de forma rutinaria en la experimentación animal, con el consiguiente ahorro de animales, espacio, dinero y trabajo asociado para el mantenimiento de las mismas. Los bancos de embriones contribuyen de forma muy importante al respeto y cumplimiento de las normativas y recomendaciones de bienestar animal, a las 3Rs.
- Disminuye el tiempo y el coste para la distribución de modelos animales a otros investigadores. La distribución y difusión de nuevas líneas y de las ya existentes queda ampliamente facilitada por su disponibilidad en forma de material biológico congelado en los bancos de embriones.
- La creación de un banco con líneas genéticamente valiosas, de interés en biomedicina, facilita el intercambio internacional de las líneas de ratón, y permite disponer de una gran variedad de ellas, con un bajo coste de mantenimiento de las mismas.
- Añade valor a los modelos animales generados por los investigadores, que aparecen inscritos en las bases de datos internacionales y, por lo tanto, son accesibles, localizables, por cualquier otro investigador de cualquier lugar del mundo, favoreciéndose las colaboraciones científicas y el progreso del conocimiento.

