

El ratón CBA/N *xid* como modelo animal de inmunodeficiencia.

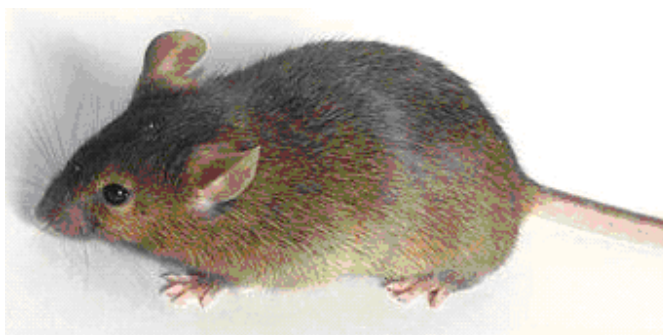
Producción y manejo.

Fabrizio Maschi*, Pilar Cagliada, Cecilia Carbone

Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias.

Universidad Nacional de La Plata - Calles 60 y 118 s/n (1900) La Plata

[*fmaschi@fcv.unlp.edu.ar](mailto:fmaschi@fcv.unlp.edu.ar)



Recibido: 26 de marzo de 2010

Aceptado: 9 de abril de 2010

RESUMEN

Uno de los hallazgos más importantes para la investigación biomédica lo constituye el descubrimiento y producción de nuevas cepas de ratones inmunodeficientes. Una de ellas es la del ratón CBA/N *xid* (*xid*: X-linked immunodeficiency) que presenta una mutación recesiva y ligada al sexo en el gen de la tirosin-kinasa de Bruton (btk), homóloga tanto en ratón como en el hombre. Por su condición de inmunodeficientes y libres de patógenos específicos (SPF), deben mantenerse en ambientes bajo barreras sanitarias estrictas. En estos animales las células B muestran defectos en su maduración y se encuentran en un número reducido en la sangre periférica. Debido a sus características se pudo probar la existencia de dos grupos de células B en los ratones normales por lo que esta cepa se utiliza en estudios sobre inmunología e inflamación. Es el modelo animal adecuado para investigaciones relacionadas con la inmunodeficiencia humana ligada al cromosoma X, HIV y terapia génica. Incorporándole el gen *nude* se utiliza como modelo para estudios de tumores humanos. Esta cepa representa una importante herramienta que se podrá utilizar en medicina experimental cuando se necesite investigar la base molecular, la fisiopatología o nuevas terapias en las enfermedades y alteraciones mencionadas.

Palabras claves: Ratones, *xid*, inmunodeficientes, linfocitos B.

SUMMARY

An important finding for the biomedical research field is the discovery and production of new immunodeficient mice strains. One of them is the CBA/N *xid* (*xid*: X-linked immunodeficiency) mouse that presents a recessive mutation in the Bruton tyrosine kinase gene (*btk*), linked to sex and homologous in humans. As immunocompromised and free of specific pathogens (SPF), they should be maintained under strict sanitary barriers environments. B cells show defects in its maturation and are found in low number in the peripheral blood. Their characteristics allow to identify two groups of B cells in normal mice; therefore, this strain is used in immunology and inflammation studies. They are a suitable animal model for X-linked immunodeficiency, HIV, and gene therapy research and also for human tumors investigations when the *nu* gene is added. These mice are an important tool in experimental medicine when they are used to perform molecular basis, pathophysiology and new therapies studies of the above mentioned diseases.

Key words: *xid*, mice, B cells, immunodeficient.

Introducción

Uno de los hallazgos más importantes para la investigación biomédica lo constituye la producción de ratones inmunodeficientes y el indiscutible impacto que han producido en este campo.

El estudio *in vivo* de tejidos humanos, en especial tumores, no hubiera sido posible si no se hubiera contado con un modelo animal de inmunodeficiencia como el ratón atímico “*nude*” (Gazaniga S. *et al* 2001; [Alvarez MJ](#) *et al* 2005, Carbone C. *et al* 2006). Sin embargo, esta no es la única cepa murina que reúne esta condición, existen otras mutaciones para inmunodeficiencia que han aportado características únicas en lo que respecta a las diferencias inmunobiológicas, entre las que se encuentra la cepa de ratones CBA/N *xid* (Clarke R. *et al* 1996).

Este ratón se originó a partir de la subcepa CBA/Hn y presenta una mutación en el gen de la tirosin-kinasa de Bruton (*btk*), recesiva y ligada al sexo (*xid*: X-linked inmunodeficiency). Esta mutación fue encontrada en el Instituto Nacional de Salud de Harwell Inglaterra, en el año 1966. El gen *Btk* fue mapeado en la región *xid* del cromosoma X de los ratones por un análisis inespecífico de retrocruza (Berning, A.K. *et al*, 1980; M. de Weers *et al* 1994). La enzima tirosin-kinasa, es importante para el desarrollo de los linfocitos B, los cuales, a pesar de estar presentes muestran una señal de actividad anormal ([Mohamed A.J.](#) *et al* 2009). En estos ratones las células B se encuentran en un número reducido en la sangre periférica con respecto a los animales inmunocompetentes y presentan defectos en su maduración; no obstante pueden producir cantidades normales de anticuerpos en respuesta a algunas proteínas antigénicas, pero tienen bajos niveles de IgM e IgG3 en suero y muestran una menor respuesta de anticuerpos a antígenos timo independientes Tipo II. (Hardy R. *et al*, 1983; Scher, I. 1982; Chen, J. 1990). Los machos homocigotas *Y/Btk xid* y las hembras homocigotas *Btk xid/Btk xid* tienen una respuesta inmune defectuosa a los antígenos Tipo II timo independientes y a los antígenos timo dependientes; pero una respuesta normal a los antígenos Tipo I timo independientes, mientras que las hembras heterocigotas presentan una respuesta inmune normal (Simth, H.R, 1983; Sprent J. *et al*, 1984; Mosier, D.E. 1985).

El descubrimiento de esta cepa permitió probar la existencia de dos grupos de células B en los ratones normales. Estos últimos presentan una población de células B maduras que se desarrollan ontogénicamente más tarde y linfocitos B inmaduros (Reid, G.K. 1985). En el caso de los CBA/N *xid* las células B son intrínsecamente anormales y a pesar de que comparten algunas de las características con las células B inmaduras de los ratones inmunocompetentes no tienen una equivalencia exacta.

Producción y mantenimiento

Los ratones CBA/N *xid* necesitan de una infraestructura adecuada para su manejo y producción como así también someterse a un programa de controles microbiológicos específicos. Por su condición de inmunodeficientes, deben mantenerse en ambientes bajo un sistema de barreras sanitarias absolutas. La categoría microbiológica es la de animales SPF (Specific Pathogen Free), esto significa que tienen su flora intestinal normal pero están libres de todos aquellos microorganismos patógenos específicos capaces de causar infecciones.

El bienestar de estos animales depende, en gran medida, del sistema de alojamiento que se elija, del diseño y control del ambiente y del entrenamiento del personal técnico. Estos factores se consideran fundamentales para su producción y mantenimiento.

El ambiente físico debe diseñarse y operarse de manera tal que permita establecer controles ambientales estrictos, brindando seguridad y confort a los animales, minimizando las posibilidades de introducción o transmisión de agentes infecciosos. Se deben mantener en habitaciones acondicionadas alojándolos en aisladores flexibles, cabinas aisladoras, estantes ventilados o micro aisladores.

Las condiciones ambientales requeridas se logran mediante un buen diseño del sistema de ventilación y presurización, del control de la temperatura y humedad relativa; parámetros macro y microambientales de extrema importancia. Las áreas destinadas para el lavado, procesamiento y esterilización de materiales e insumos deberán funcionar como una barrera efectiva entre los animales y el ambiente exterior.

Los materiales, las dimensiones y el diseño de las cajas, rejillas, comederos y bebederos que se utilicen para el alojamiento de los animales deben estar de acuerdo con lo establecido por las normativas internacionales (NCR-ILAR, 2002)

Esta cepa de ratones requiere alimento y agua de bebida estéril, temperatura ambiente en un rango entre 23 $\pm$ 1° C, humedad relativa entre el 40 y el 60 %, una ventilación entre 10 y 15 recambios de aire por hora y un fotoperíodo uniforme luz/oscuridad de 14/ 10 horas.

El manejo reproductivo de estas colonias se realiza mediante el empleo del sistema de consanguinidad para mantenimiento de una endocría utilizando apareamientos monogámicos, ya que aumenta el rendimiento reproductivo de las hembras. Se recomienda un sistema basado en un núcleo de fundación y un núcleo de expansión (Benavides F. *et al* 2003). Para confirmar la ausencia de contaminaciones los ratones CBA/N *xid* deben someterse a un programa de controles microbiológicos específicos que incluyan microorganismos oportunistas, el ambiente y los insumos.

Usos

La mutación que presenta esta cepa es homóloga tanto en ratón como en el hombre para el gen de la *Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase* por lo que estos ratones constituyen un modelo ideal para el estudio de la inmunodeficiencia humana ligada al cromosoma X, HIV y terapia génica.

Se han realizado estudios en estos animales que han aportado importantes conocimientos relacionados con el desarrollo y la maduración de las células B siendo un modelo de elección para estudios inmunológicos y de inflamación que conlleven defectos en estas células.

Recientemente, se ha demostrado la importancia de esta cepa incorporándole el gen *nude* y así utilizarla como modelo para el establecimiento de líneas celulares de tumores humanos, específicamente adenocarcinomas de pulmón y su relación con metástasis ósea (Yang S. *et al*, 2009); también para el estudio de los aspectos relacionados con la endocrinología, inmunología e interacción tumor-estroma en el cáncer de mama (Clarke R. *et al* 1996).

Asimismo se utilizan para estudios de infección de patógenos como *T. cruzi*, *Leishmania* (Hoerauf A *et al* 1994, Gao W *et al* 2001).

Conclusiones

En el bioterio de la FCV-UNLP se ha estandarizado la metodología para la producción, mantenimiento y controles de la cepa de ratones CBA/N *xid* a partir de un núcleo proveniente del CEMIB/UNICAMP, Brasil (año 2008). Este hecho constituye un aporte importante para el desarrollo de investigaciones en el campo de la biomedicina en nuestro país en las que se requiera un modelo animal que reúna las características de esta cepa. En este sentido se abre la perspectiva de producir con ella otras cepas combinadas con mutaciones ligadas a la inmunodeficiencia como la del ratón *nude* existente en nuestro medio, y que podrá destinarse a estudios sobre tumores humanos.

Bibliografía

- 1) Ahmad, A. and J.J. Mond. 1986. Restoration of *in vitro* responsiveness of *xid* B cells to TNP-ficoll by 8-mercaptopguanosine. J. Immunol. 136:1223-1226.
- 2) Amsbaugh, D.F., C.T. Hansen, B. Prescott, P.W. Stashak, D.R. Barthold, and P.J. Baker. 1972. Genetic control of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide in mice. I. Evidence that an X-linked gene plays a decisive role in determining responsiveness. J. Exp. Med. 136:931-948.
- 3) Alvarez MJ, Prada F, Salvatierra E, Bravo AI, Lutzky VP, Carbone C, Pitossi FJ, Chuluyan HE, Podhajcer OL. Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. Cancer Res. 2005 Jun 15;65(12):5123-32
- 4) Benavides Fernando J., Jean-Louis Guénet. Manual de Genética de Roedores de Laboratorio, principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá. SECAL. Laboratory Animals Ltd. 2003.

- 5) Berning, A.K., E.M. Eicher, W.E. Pual, and I. Scher. 1980. Mapping the X-linked immune deficiency mutation (*xid*) on CBA/N mice. J. Immunol. 124:1875 – 1882.
- 6) Carbone Cecilia, Fabricio Maschi. El ratón *nude* (*nu/nu*) como modelo animal de inmunodeficiencia. Química Viva. 2006. 1 (5) 19 – 23.
- 7) Chen, J., A.M. Stall, Leonard A. Herzenberg, and Lenore A. Herzenberg. 1990. Differences in glycoprotein complexes associated with IgM and IgD on normal murine B cells potential enable transduction of different signals. EMBO J. 9:2117-2124.
- 8) Clayberg,C. , R.H. DeKruyff, R. Fay, B. Haber, and H. Cantor. 1985. Evidence for defects in accessory and T cell subsets in mice expressing the *xid* defect. J. Mol. Cell. Immunol. 2:61-69.
- 9) Clarke R.Vincent T. Lombardi. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. Breast Cancer Res Treat. 1996; 39(1):69-86.
- 10) Cohen, D.I., A.D. Steinberg, W.E. Paul, and M.M. Davis. 1985. Expression of an X-linked gene family (XLR) in late-stage B cells and its alteration by the *xid* mutation. Nature 314: 372-374.
- 11) Eldridge, J. H., H. Kiyono, S.M. Michalek, and J.R. Mc Ghee. 1983. Evidence for a mature B cell subpopulation in Peyer's patches of young adult *xid* mice. J. Exp. Med. 157: 789-794.
- 12) Gao W, Pereira MA. Trypanosoma cruzi trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. Eur J Immunol. 2001 May;31(5):1503-12.
- 13) Gazzaniga S, Bravo A, Goldszmid SR, Maschi F, Martinelli J, Mordoh J, Wainstok R. Inflammatory changes after cryosurgery-induced necrosis in human melanoma xenografted in nude mice. J. Invest. Dermatol. 2001 May;116(5):664-71.
- 14) Go, N.F., B.E. Castle, R. Barrett, R. Kastelein, W. Dang, T.R. Mosmann, K.W. Moore, and M. Howard. 1990. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: Unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. J. Exp. Med. 172:1625-1632.
- 15) Hardy R., K. Hayakawa, D. R. Parks, and L.A. Herzenberg. 1983. Demonstration of B cell maturation in X- linked immunodeficient mice by simultaneous three color immunofluorescence. Nature. 306:270-272.
- 16) Hoerauf A, Solbach W, Lohoff M, Rölinghoff M. The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. Int Immunol. 1994 Aug; 6 (8) : 1117-24.
- 17) Karagogeos, D., and H.H. Wortis. 1987. Thymus grafts induce B cell development in nude, X-linked immune deficient mice. Eur. J. Immunol. 17:141-144.
- 18) Kenny, J.J., G. Guelde, J.L. Claflin, and I. Sher. 1981. Altered idiotype response to phosphocholine in mice bearing an X-linked immune defect. J. Immunol. 127:1629-1633.
- 19) Kenny, J.J., A.M. Stall, D.G. Sieckmann, M.C. Lamers, F.D. Finkelman, L. Finch, and D.L. Longo. 1991. Receptor mediated elimination of phosphocholine-specific B cells in X-linked immune deficient mice. J. Immunol. 146:2568-2577.

- 20) M. de Weers, R.G.J. Mensink, M.E.M. Kraakman, R.K.B. Schuurman and R.W. Hendriks. 1994. Mutation analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene in X-linked agammaglobulinemia: identification of a mutation which affects the same codon as is altered in immunodeficient *xid* mice. Oxford JournalsLife Sciences & Medicine. Human Molecular Genetics. Vol 3. Number 1. Pp. 161-166
- 21) Mond, J.J., I. Scher, J. Gossman, S. Kessler, P.K.A. Mongini, C.T. Hansen, F.D. Finkelman, and W.E. Paul. 1982. Role of the thymus in directing the development of a subset of B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155:924-936.
- 22) Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, Christensson B, Berglöf A, Vihinen M, Nore BF, Smith CI. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev.* 2009 Mar; 228(1):58-73.
- 23) Mosier, D.E. 1985. Are *xid* B lymphocytes representative of any normal B cell population? A commentary. *J. Mol. Cell. Immunol.* 2:7
- 24) Nahm, M.H., J.W. Paslay, and J.M. Davie. 1983. Unbalanced X chromosome mosaicism in B cells of mice with X-linked immuno-deficiency. *J. Exp. Med.* 158:920-931.
- 25) National Research Council. Guía para el cuidado y Uso de los animales de Laboratorio. 2002. Institute of Laboratory Animals Resources. The National Academies Press, USA
- 26) Reid, G.K. and D.G. Osmond. 1985. B lymphocyte production in the bone marrow of mice with X-linked immunodeficiency (*xid*) *J. Immunol.* 135:2299-2302.
- 27) Scher, I. 1982. CBA/N immune defective mice: evidence of the failure of a B cell subpopulation to be expressed. *Immunol. Rev.* 64:117-136.
- 28) Scher, I. The CBA/N mouse strain: experimental model illustrating the influence of the X-chromosome on immunity. 1982. *Adv. Immunol.* 33:1 – 71.
- 29) Simth, H.R., T.M. Chused, and A. D. Steinberg. 1983. The effect of the X-Linked immune deficiency gene (*xid*) upon the Y chromosome-related disease of BXSB mice. *J.Immunol.* 131:1257-1262.
- 30) Sprent, J., and J. Bruce. 1984. Physiology of B cells in mice with X-linked immunodeficiency (*xid*). III. Disappearance of *xid* B cells in double bone marrow chimeras. *J. Exp. Med.* 160:711-723.
- 31) Wortis, H.H., L. Burkly, D. Hughes, S. Roschelle, and G. Waneck. 1982. Lack of mature B cells in nude mice with X-linked immune deficiency. *J. Exp. Med.* 155:903-913.
- 32) Yang S, Dong Q, Yao M, Shi M, Ye J, Zhao L, Su J, Gu W, Xie W, Wang K, Du Y, Li Y, Huang Y. Establishment of an experimental human lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1BM with high bone metastases potency by (99m)Tc-MDP bone scintigraphy. *Nucl Med Biol.* 2009 Apr; 36(3):313-21.

Páginas web:

http://web.ncifcrf.gov/research/animal_production_program/strain_information/01C42.asp

<http://jaxmice.jax.org/strain/001011.html>

http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/34_1_2/34_1_2Xlinked.shtml

http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=5140



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva
Número 1, año 9, abril 2010
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar