

Expresión de oncogenes en ratones transgénicos

Ángel Pellicer

Professor of Pathology

New York University School of Medicine.

El concepto de utilizar animales transgénicos proviene directamente de la necesidad de encontrar sistemas modelo para ensayar la actividad génica. En principio, se empezó utilizando la transferencia genética en células en cultivo a las cuales se les introducía por métodos físicos químicos o biológicos ADN exógeno. Los métodos puestos a punto durante los años 70, adquirieron un uso masivo durante los 80 para acomodar el continuo incremento en genes aislados a consecuencia del perfeccionamiento de las técnicas de ADN recombinante. Este banco de pruebas es exhaustivamente utilizado en la actualidad en sus varias formas de transfección transitoria o estable para analizar regulación de los promotores génicos, producción de proteínas en cantidad o para poder seguir un fenotipo determinado después de la transferencia genética a una célula indicadora adecuada.

Como existen multitud de funciones que están moduladas por la función de células adyacentes (efecto paracrino) o por células distantes de otros órganos (efecto endocrino), es claro que utilizando células en cultivo aisladas de su contexto orgánico no se podía reproducir o duplicar todos los efectos de la función génica. Para abordar este problema de una manera mas realista se necesitaba poder introducir la información genética en un organismo entero.

Para este propósito se utilizaron los avances en embriología que permitían manipular con cierta precisión los óvulos fecundados de ratón combinados con los avances en genética que permitían obtener cantidades suficientes de genes puros.

El procedimiento consiste en varios pasos que requieren mantenimiento y manipulación de ratones en diferentes fases de su ciclo biológico. En primer lugar es necesario obtener un buen número de óvulos fertilizados para lo que es menester preparar hembras con tratamiento hormonal que les permita superovular. Estos huevos son recogidos tras su fertilización sacrificando las hembras y recogiendo sus oviductos. El siguiente paso en su manipulación es introducir el ADN exógeno. Esto se hace por microinyección de picolitros de fluido conteniendo el gen de interés. El proceso requiere contar con un micromanipulador que permita esta delicada operación. Se utilizan dos micropipetas, una de un calibre adecuado para sostener el huevo con una ligera presión negativa, pero suficientemente estrecho para que el huevo no pueda entrar. La otra micropipeta tiene que tener un diámetro muy pequeño de manera que permita pinchar la membrana exterior del huevo sino seguidamente perforar la membrana nuclear y permitir la introducción del fluido conteniendo el material genético en el pronúcleo masculino.

Después de la microinyección, los huevos son mantenidos en medio de cultivo hasta el día siguiente lo que permite observar su viabilidad. Los huevos que han sufrido un trauma irreversible en la microinyección se lisan durante ese período o al menos no se dividen como hacen sus otros compañeros. El siguiente paso en el proceso es el implantar estos huevos inyectados en una hembra conveniente preparada. Para ello se les hace un tratamiento previo con hormonas que les provoca un estado de pseudoembarazo adecuado para sostener el desarrollo de los huevos inyectados. La implantación requiere una intervención quirúrgica en la que se hacen aberturas en la parte dorso-lumbar de los flancos del animal para buscar el oviducto. Una vez localizado este se introducen en cada uno de 30 a 50 huevos inyectados aparentemente viables. A pesar de este elevado número de huevos implantados el número de animales que llegan a término no suele pasar de 10 por ratón. La eficiencia del proceso varía según laboratorios, pero se considera aceptable entre el 10 y el 30% de positivos. Es decir, que de cada 10 animales que nacen, de 1 a 3 deberían llevar integrado el gen exógeno. A parte de los posibles problemas técnicos que pueden reducir la eficiencia, cabe la posibilidad de que una eficiencia reducida o nula sea debida a un efecto tóxico de la expresión del transgen, de hecho este es un caso que se presenta con alguna frecuencia como luego analizaremos.

Para caracterizar los ratones supuestamente transgénicos, es necesario demostrar que tienen el gen exógeno. Para ello la técnica más utilizada consiste en, a las tres semanas, seccionar un segmento de la cola, extraer el ADN y determinar la presencia del gen de interés por Southern blot o tras amplificación con PCR utilizando iniciadores específicos. El siguiente punto de este proceso es intentar el establecimiento de una línea transgénica estable, mediante la reproducción de la primera generación de ratones positivos (fundadores). Esto no siempre es posible debido en algunos casos a reducida fertilidad de algunos transgénicos y más frecuentemente al fenómeno del mosaïcismo. En este caso, lo que sucede es que el transgen no se ha integrado en la primera división celular y por tanto al integrarse posteriormente en solo algún blastómero sólo esta presente en los tejidos que derivan de ese blastómero (s). Así pues, es posible detectarlo en el tejido conectivo de la cola, pero que las células germinales procedan de otro blastómero y por tanto sean negativas, en ese caso será imposible la transmisión del transgen a las sucesivas generaciones y no se podrá establecer una línea estable.

Una vez establecidas líneas estables hay que concentrarse en el análisis de la expresión del transgen. Ello se realiza por medio de Northern blots, ensayos de protección a RNasa e hibridación *in situ*. Es obvio que para estudiar los efectos de un gen en el ratón es necesario tener expresión del mismo. Este es el punto donde en ocasiones el proyecto encuentra dificultades imprevistas, bien debido a que la expresión es muy baja o bien a que se expresa en sitios imprevistos y que carecen de aparente significado fisiológico. Estas dificultades suelen ser debidas a integración en zonas del genoma que modifican la expresión o a la inyección de un gen con zonas reguladoras incompletas. Una vez se han superado todos estos obstáculos, se puede comenzar el experimento propiamente dicho en el que se observan posibles modificaciones en el fenotipo y cambios en la expresión génica que pueden atribuirse a la presencia del transgen.

Coetaneamente a los experimentos que sentaron las bases de la transferencia genética otro conjunto de observaciones abrieron un nuevo campo dentro de la biomedicina. Estas observaciones indicaron que la base molecular de la transformación maligna que era causada por los retrovirus animales de forma aguda era debida a la presencia en los mismos de unos genes específicos (oncogenes) que la desencadenaban. El interés fue aun mayor cuando se descubrió que estos oncogenes en apariencia viral eran en realidad de origen celular y que habían sido capturados por los virus durante los procesos de infección. Este descubrimiento revolucionó la perspectiva que se tenía del cáncer, pues si los genes causantes de la transformación maligna son en ultima instancia genes celulares, esto representa un importante avance concep-

tual en proponer que el cáncer humano puede estar causado por estos oncogenes endógenos. Al mismo tiempo presentaba la paradoja de que si todos teníamos estos genes en nuestras células como es que no todo el mundo desarrollaba cáncer. El primer paso para la comprensión de esta paradoja fue el observar que la mayoría de los oncogenes virales estaban alterados estructuralmente o en su expresión con respecto a sus homólogos celulares. Esta hipótesis vio su demostración más dramática cuando, en el estudio de tumores humanos por transferencia génica se observó que el ADN de algunos tumores humanos tenía la capacidad de transmitir el fenotipo maligno a células en cultivo. Esta posibilidad de seguir la presencia de oncogenes en diferentes procesos llevó al aislamiento de los genes responsables de este fenotipo. Los primeros en identificarse por esta técnica fueron los genes de la familia *ras*, que se habían encontrado en retrovirus animales. Cuando se secuenció el oncogén y se comparó con el gen de una célula normal se encontró que solo se diferenciaban en un nucleótido que daba lugar al cambio de un aminoácido en la proteína producto. Desde entonces se llama proto-oncogén al equivalente celular normal de un oncogén.

Es importante señalar que el método de la transferencia génica ha ayudado a identificar un buen número de oncogenes presentes en tumores humanos o animales. Algunos de ellos también han sido identificados en retrovirus animales pero en otros casos la transferencia génica ha sido el único método para su identificación. Otro abordaje que ha permitido identificar nuevos oncogenes es el de la presencia frecuente de un gen en la zona de reordenamiento cromosomal que se detecta con cierta frecuencia en tumores. Su aislamiento se ha podido realizar porque el otro gen presente en el sitio de reordenamiento es conocido como inmunoglobulinas, receptor de células T, etc.

Así pues en los últimos 15 años se han ido identificando genes que se encuentran alterados en tumores y a los que se atribuye el desencadenamiento del cáncer. Uno de los corolarios de estas observaciones es el que de la asociación del cáncer con alteraciones genéticas se puede deducir que la etiología del cáncer estará en aquellos agentes o procesos que pueden dar lugar a dichas alteraciones. Por consiguiente, los agentes mutagénicos o los procesos que resultan en mutaciones como errores de replicación o reparación van a ser la causa del cáncer.

Una característica de los oncogenes es que se comportan genéticamente como dominantes, es decir que con que uno de los dos alelos esté alterado eso parece ser suficiente para predisponer a la célula a la transformación maligna. Otras observaciones del campo de la biología celular y la citogenética parecían sugerir que debía haber otros mecanismos que jugaban un papel

en la transformación maligna. La evidencia prevenía de el análisis de híbridos entre células normales y células tumorales. Partiendo de la base de que la transformación es inducida por oncogenes dominantes, el resultado esperado en esos híbridos es su comportamiento maligno. Por el contrario, con gran frecuencia se observaba que los híbridos presentaban una reducida o abolida capacidad maligna. Cuando se hicieron estudios citogenéticos de los híbridos y sus revertientes al fenotipo maligno, se observó que al revertir a células transformadas perdían algún cromosoma específico, sugiriendo que en estos casos lo que determinaba el fenotipo maligno era la pérdida de algún gen que actuaba bloqueando la transformación. Estos estudios se vieron afianzados por la observación citogenética de que en algunos tipos de tumores es frecuente encontrar alteraciones en las regiones homólogas de un par cromosomal. Esta línea de investigación ha llevado a postular que existe un componente recesivo en la patogenia del cáncer que requiere que determinados genes sean inactivados para que el proceso maligno pueda desarrollarse. Estos genes han sido llamados genes supresores de tumores (TSGs). Debido a que se requiere su inactivación, los dos alelos tienen que estar alterados para que el efecto sea evidente.

El descubrimiento de los oncogenes y los genes supresores de tumores ha llevado a una explosión en los estudios de el estado de estos genes en el cáncer humano y animal. En estos estudios se ha encontrado una evidente correlación entre la presencia de diferentes oncogenes y TSGs alterados en la mayoría de los tipos tumorales que se han estudiado. Además estudios *in vitro* indican que estos genes en sus diversas formas anormales tienen la capacidad de alterar el fenotipo de determinadas células en cultivo. Pero la prueba de fuego para demostrar que estos genes son importantes en el proceso de desarrollo tumoral y no la consecuencia del mismo, tiene que venir de estudios *in vivo*. Es aquí donde el uso de los animales transgénicos ha sido crucial para demostrar palmariamente que estos genes pueden estar en el origen del proceso tumoral.

En la actualidad la mayoría de los oncogenes aislados se han ensayado en este abordaje y se ha demostrado que son capaces de inducir tumores en varias condiciones. A título de ejemplo se describe el caso de los genes *ras* por su gran prevalencia en tumores humanos, alrededor del 30% en promedio. Los genes *ras* son tres: H-, K- y N-*ras* que producen una proteína de 21.000 daltons de peso molecular, de gran homología entre los tres genes pero diferente en la zona carboxiterminal. La primera dificultad que se encontró cuando se intentó obtener transgénicos con los genes *ras* bajo el control de su propio promotor fue que no apareció ningún positivo. Esto se debe a que la expresión de los oncogenes *ras* durante el desarrollo embriona-

rio parece ser letal para el embrión. La alternativa fue usar diferentes promotores para dirigir la expresión de dichos oncogenes y cuando esto se llevo a cabo se demostró que eran capaces de inducir tumores en un amplio rango de tejidos. El fenotipo tumoral que se evidencia esta en relación con la especificidad del promotor que dirige la expresión del oncogén. Así pues, se han obtenido tumores de páncreas utilizando el promotor de la elastasa, de mama con el promotor de la proteína específica de la leche WAP-1 o en la piel con los promotores de las queratinas.

Es interesante resaltar que se ha conseguido además reproducir el fenotipo tumoral de donde se había aislado el oncogén. Este es el caso de los estudios en nuestro laboratorio en donde el oncogén *N-ras*, aislado por nosotros de un linfoma de ratón, ha dado lugar a varias líneas transgénicas que tienen como su alteración primordial y mas frecuente la aparición de linfomas.

Otro punto importante que se obtiene del estudio de los oncogenes en ratones transgénicos es el que confirman la hipótesis del desarrollo tumoral como consecuencia de la acumulación de varios pasos que se suman en su efecto. En los transgénicos con oncogenes, aun en el caso de aquellos que desarrollan tumores en todos los individuos de la línea e incluso si desarrollan varios tumores, puede apreciarse que los tumores son de origen clonal, puesto que una célula en un determinado órgano comienza a proliferar dando lugar al tumor. Esto significa que, además del oncogén que esta presente en todas las células del animal, hacen falta otros eventos que ocurren de manera estocástica y por tanto no en todas las células al mismo momento. De otra manera en un transgénico todas las células del tejido diana se desarrollarían a la vez como un gran tumor que carecería de origen clonal.

Un tipo de aproximación paralelo se ha llevado a cabo para estudiar los TSGs, utilizando la técnica de los knockout o inactivación génica, en que se utiliza recombinación homóloga en células embrionarias en cultivo para inactivar un alelo. Posteriormente estas células se inyectan en blastocistos y los ratones que nacen tienen una porción de sus células derivada de la célula manipulada. Si estos ratones transmiten el alelo inactivado se tiene un ratón hemizigótico para el producto del gen en cuestión. Cruzando estos animales hemizigóticos se pueden obtener animales con los dos alelos inactivados. Cuando este tipo de experimentos se ha hecho con TSGs, en los casos que la mutación no es letal, se obtienen animales con una gran predisposición a desarrollar tumores lo que confirma la hipótesis postulada.

En conjunto puede decirse que el desarrollo de las técnicas de animales transgénicos y «knockouts» ha permitido demostrar o identificar la función de un gran numero de genes. En el caso de la oncología molecular ha repre-

sentado la demostración última de que los oncogenes y los genes supresores de tumores están involucrados directamente en la patogenia del cáncer y además ha permitido desarrollar modelos animales que van a permitir diseñar estrategias terapéuticas novedosas basadas en los conocimientos bioquímicos y genéticos acumulados en los últimos años.

Referencias

Hesketh R. The oncogene handbook. Academic Press, San Diego 1994.

Varios autores. Recessive oncogenes and tumor suppression. Ed.: W. Cavenee, N. Hastie, E. Stanbridge. Cold Spring Harbor Lab. Press, N.Y. 1989.

Varios autores. Oncogenes and the molecular origins of cancer. Ed.: R. A. Weinberg. Cold Spring Harbor Lab. Press, N.Y. 1989.