

5. Diseño de un modelo de cáncer gástrico en ratones SCID mediante ingeniería genética de células normales de mucosa gástrica humana: avances

Henry Bautista-Amorocho^{1,2}, Tania Liseth Pérez-Cala¹,
Jorge Alexander Silva-Sayago², Alonso Martínez¹

INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diseñar un modelo murino de cáncer gástrico (CG) es importante para investigar mecanismos biológicos de la carcinogénesis, con el fin de desarrollar tratamientos eficaces, perfeccionar técnicas quirúrgicas o identificar biomarcadores útiles en el diagnóstico temprano y pronóstico de la enfermedad. Los modelos implementados incluyen carcinógenos químicos (metil-N-nitro-N-nitroguanidina), agentes infecciosos (*Helicobacter pylori*) y biológicos (líneas celulares o xenotransplante); sin embargo, presentan desventajas como la lenta progresión de la enfermedad, baja incidencia y variabilidad en el fenotipo tumoral. Los nuevos prototipos para tumores sólidos implantan células primarias humanas o murinas modificadas por ingeniería genética para expresar genes de interés como oncogenes o genes supresores de tumor (GST) en el tejido autólogo del animal. Esta estrategia fue exitosa en glioblastoma, hepatocarcinoma y cáncer de pulmón de células pequeñas. En la tumorigénesis del CG humano hay reportados oncogenes y GST que afectan diferentes vías –de señalización, proliferación, diferenciación y apoptosis. Diseñar un modelo murino con diferentes combinaciones de estos genes permitirá evaluar sistemáticamente los estadios de la carcinogénesis y profundizar en la historia natural de la enfermedad.

OBJETIVO

Diseñar un modelo murino de CG mediante ingeniería genética utilizando células epiteliales de mucosa gástrica humana transducidas con oncogenes y GST implantadas en el estómago de ratones SCID.

¹ Grupo Bacterias & Cáncer, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

² Grupo CLINIQUES, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Santander

Correspondencia: Alonso Martínez; alonso.martinez1@udea.edu.co

Financiación: Colciencias Convenio FP44842-166-216

METODOLOGÍA

Diseño de vectores lentivirales

Cinco vectores lentivirales se diseñarán con los genes *TP53*, *CTNNB1*, *KRAS*, y *PTEN* mutados y *C-MYC* silvestre, empaquetados en células 293-T.

Diseño de líneas celulares

El aislamiento de gastrocitos por métodos enzimáticos se estandarizará a partir de tejido porcino y posteriormente se ejecutará en biopsia de tejido gástrico humano normal del antro para obtener células gástricas epiteliales (CGE). Las CGE se transformarán con dos combinaciones diferentes de oncogenes y GST i) *TP53/CTNNB1/MYC* y ii) *PTEN/KRAS1/C-MYC*, para establecer líneas celulares inmortalizadas oncogénicas. El gen *AFP* servirá como biomarcador indirecto de crecimiento tumoral.

Ensayos en ratones

Un total de 1×10^6 CGE transformadas y suspendidas en $50 \mu\text{l}$ de Matrigel se inyectarán en el fondo del estómago de ratones SCID machos de 10-15 semanas de edad. Ocho ratones se utilizarán para cada línea celular, la inyección se aplicará bajo anestesia general y se monitorearán por 12 semanas. Los animales que desarrollen neoplasias se sacrificarán y el tejido tumoral se cultivará y criopreservará.

Análisis del transcriptoma

El patrón de expresión génica se determinará en tejido primario normal, las líneas celulares inmortalizadas y el tejido tumoral obtenido del ratón. El análisis de microarreglos se realizará con el sistema Affymetrix RNA microarray con un GeneChip humano para mARNs.

Análisis proteómico

La expresión y localización de las proteínas TP53, KRAS, MYC, CTNNB1, CDH1 y PTEN se realizará por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales humanos específicos.

Caracterización histopatológica del tumor

La biopsia se clasificará histológicamente con Hematoxilina-Eosina (H-E) según Lauren por dos patólogos independientemente. La inmunohistopatología se realizará con los marcadores de proliferación (Ki67) y apoptosis (Cas-3).

RESULTADOS

Al momento se tienen construidos todos los vectores lentivirales. Un plásmido con la proteína verde fluorescente (cop-GFP) se utilizó como control positivo.

A partir de 10 g de mucosa gástrica del cerdo se obtuvo una concentración final de $3,87 \times 10^7$ CGE; con viabilidad del 98 y 97 % a los 60 y 120 min, respectivamente. En placas de seis pozos se sembraron 5×10^5 CGE/pozo, se observó confluencia del 50-70% a los 5-7 días de incubación. El fenotipo para comprobar el origen epitelial gástrico se confirmó por H-E, PAS, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. El genotipo se determinó por la expresión del gen mucina 5 (*MUC5AC*) por RT-PCR. Resultados similares se obtuvieron en aislamientos de gastrocitos de antro humano. La genotipificación de estos mostró expresión de *MUC1*, *MUC5AC* y *MUC6* por RT-PCRq.

Los ensayos preliminares de transformación de gastrocitos humano utilizando dos combinaciones de lentivirus (*TP53/C-MYC/AFP* y *TP53/CTNNB1/C-MYC/AFP*), mostraron cambios morfológicos, núcleos

picnóticos y vacuolas citoplasmáticas. Hasta el día siete se observó proliferación celular, a partir del día ocho se visualizaron cuerpos apoptóticos y para el día 15 se presentó desprendimiento total de la monocapa.

Actividades finalizadas

- Construcción de los vectores lentivirales con los oncogenes y GST para el modelo de CG murino.
- Estandarización del protocolo para aislamiento de gastrocitos en el modelo porcino y extrapolación al modelo humano.
- Realización de ensayos preliminares de inmortalización con CGE utilizando vectores lentivirales.

Trabajo por desarrollar el próximo semestre

- Inmortalización de CGE utilizando otras combinaciones de oncogenes y GST.
- Inoculación en ratones SCID con las líneas celulares inmortalizadas.
- Monitoreo y obtención del tejido tumoral desarrollado en los animales.