

**Estudio *in vivo* de los mecanismos de oncogénesis hematológica tras exposición a radiación ionizante utilizando un modelo de ratones deficientes en p53.**

José Antonio Casado, Cristina Bauluz, Rosa de Vidania, Almudena Real. CIEMAT<sup>‡</sup>. Madrid. Spain.  
(<sup>‡</sup> Proyecto cofinanciado por el Consejo de Seguridad Nuclear).

**Resumen.**

El desarrollo de un sistema de protección radiológica adecuado, se basa en el conocimiento de los efectos sobre la salud producidos fundamentalmente a dosis moderadas y bajas de radiación. El conocimiento de éstos efectos sigue siendo actualmente insuficiente para determinar con exactitud el riesgo para la salud derivado de dichas exposiciones. Los estudios epidemiológicos tienen serias limitaciones para abordar esta problemática. Mediante estudios con nuevos modelos experimentales se puede obtener información de interés al respecto y en concreto sobre los mecanismos de oncogénesis de radiación.

En este trabajo, se utiliza un modelo de ratones deficientes en p53, para estudiar la incidencia de cánceres hematológicos tras irradiación. Con objeto de caracterizar las poblaciones potencialmente implicadas en el desarrollo carcinogénico, se han realizado análisis de morfología celular, expresión de marcadores de superficie y contenido de DNA en células hematopoyéticas.

Los ratones con p53 alterado desarrollan fundamentalmente linfomas tras la irradiación. También se observó desarrollo de leucemias, si bien el número de ratones analizados es bajo. La metodología propuesta muestra gran potencialidad para el estudio de alteraciones celulares y moleculares implicadas en el desarrollo carcinogénico radioinducido.

**Introducción.**

El conocimiento de los riesgos para la salud derivados de la exposición a radiación es necesario para poder proteger al hombre de los efectos nocivos de ésta. El desarrollo de cáncer es el principal efecto de la exposición a dosis moderadas y bajas de radiación ionizante. A pesar de que en las últimas décadas se ha producido un gran avance en el conocimiento de la carcinogénesis y del papel de la radiación en este proceso, en la actualidad siguen existiendo incertidumbres sobre el nivel de riesgo carcinogénico derivado de la exposición a dosis bajas, en gran parte debido al reducido número de resultados concluyentes de estudios epidemiológicos para estas dosis.

Una dificultad para estimar la incidencia de cáncer radioinducido tras exposición a dosis bajas, reside en la baja probabilidad de que éstos se desarrollen y los largos períodos de latencia asociados. Asimismo, los tumores inducidos por radiación no son diferentes a los desarrollados de forma espontánea en la población.

Se han realizado multitud de estudios experimentales con objeto de aportar información de utilidad sobre los riesgos derivados de exposición a dosis bajas de radiación. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la diferente radiosensibilidad entre especies de mamíferos hace que la información cuantitativa acerca del riesgo de cáncer en humanos no pueda basarse únicamente en estudios realizados con animales. En contrapartida, los modelos experimentales permiten estudiar los mecanismos de oncogénesis de radiación, así como la forma de la curva dosis-respuesta y la influencia de diversos factores físicos y biológicos sobre la respuesta biológica a dosis bajas de radiación, aspectos difíciles de abordar en estudios epidemiológicos [1] [2].

En los últimos años, el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular y celular ha permitido diseñar modelos experimentales de ratones transgénicos y deficientes para genes relevantes en el control de la proliferación y diferenciación celular, que ofrecen diversas ventajas frente a las aproximaciones tradicionales para el estudio de los mecanismos de oncogénesis de radiación. Este es el caso de los ratones deficientes en el gen supresor de tumores p53, los cuales muestran una elevada sensibilidad al desarrollo de cánceres radioinducidos, principalmente hematopoyéticos [3] [4]. El gen p53 se encarga del control del ciclo celular e interviene en la regulación de procesos tan importantes como la apoptosis o muerte celular programada.

## Objetivo.

Utilizando el modelo experimental de ratones deficientes en p53, se estudia la inducción de alteraciones celulares y moleculares en las poblaciones hematopoyéticas de sangre periférica, médula ósea, timo y bazo, como consecuencia de la exposición a rayos-X. Se analiza la correlación entre dichas alteraciones y la aparición de cánceres hematológicos, con objeto de conocer los mecanismos de oncogénesis de radiación y caracterizar indicadores tempranos del proceso carcinogénico.

## Materiales y Métodos

Ratones hembras F1(C57BL/6xDBA) de 13 semanas, normales para p53 (p53+/+) o deficientes para el gen (heterocigotos p53+/- y homocigotos p53-/-), se irradiaron con una dosis aguda de 1 ó 4Gy de rayos-X (tasa de dosis de 1,04 Gy/min).

A distintos tiempos post-irradiación, se extrajo sangre periférica de la vena lateral de la cola de los animales de cada uno de los grupos y de ratones no irradiados, para realizar un análisis hematológico individualizado. Para ello, se utilizó un analizador hematológico Technicon H-1E de Bayer, que determina entre otros parámetros, el contenido de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, fórmula leucocitaria, contenido de peroxidasa y contenido de hemoglobina. La técnica utilizada para extraer sangre, no requiere que el animal sea sacrificado, permitiendo hacer un seguimiento durante el período de tiempo que dura el experimento y correlacionar posibles alteraciones detectadas en sangre periférica con aparición de tumores de origen hematopoyético.

Diariamente se revisó el estado general de los animales con objeto de controlar la posible aparición de tumores, o algún síntoma de enfermedad. En estos casos los animales fueron sacrificados, extrayéndoles los órganos hematopoyéticos (médula ósea, bazo, timo y sangre periférica) para su análisis. En cada uno de los órganos del ratón con tumor y de un ratón control, se realizaron los siguientes análisis, utilizando un citómetro de flujo Epics Elite ESP de Coulter: (1) Morfología de las poblaciones celulares, basándose en su tamaño y complejidad. (2) Expresión de moléculas de superficie en las células, mediante marcaje específico con anticuerpos, para caracterizar el fenotipo de las células potencialmente implicadas en el desarrollo del tumor. (3) Contenido de DNA, mediante la técnica de yoduro de propidio, determinando que proporción de células está en cada una de las etapas del ciclo celular y su ploidía (indicador de inestabilidad genética).

## Resultados.

Ninguno de los ratones p53 +/+ irradiados o controles han desarrollado tumor alguno hasta el momento (10 meses). En contraste, todos los ratones p53 -/-, tanto irradiados como control, desarrollaron linfoma de timo durante los dos primeros meses de estudio. Está descrito en la bibliografía que estos ratones desarrollan tumor desde los 3 meses de edad, lo que explicaría nuestros resultados, ya que los ratones p53-/- tenían 13 semanas de edad al inicio del experimento [3].

En los ratones p53+/- se observó una correlación entre la incidencia de tumores y la dosis de radiación administrada. Así, un 20% de los ratones irradiados con 1 Gy desarrollaron tumor, frente a un 80% en los expuestos a 4 Gy. Los tumores observados eran fundamentalmente linfomas de timo, si bien en algunos ratones irradiados con 4 Gy se detectaron síntomas leucémicos. Ningún ratón p53+/- sin irradiar ha desarrollado tumor hasta el momento (10 meses).

### Ratones que desarrollaron linfoma de timo

Los ratones p53+/- y p53-/- que desarrollaron linfoma de timo, no mostraron alteraciones significativas en ninguno de los parámetros hematológicos de sangre analizados. Sin embargo, los análisis morfológicos de tamaño y complejidad celular, mostraron la presencia de una población anómala (mayor tamaño y

complejidad), además de la población normal observada en sangre control. En timo también se observó una población celular anómala, de mayor complejidad pero sin variación de tamaño. En médula ósea y bazo de ratones con tumor, las poblaciones celulares eran equivalentes a las observadas en los órganos control.

Con objeto de caracterizar la población morfológicamente anómala observada en sangre periférica y timo, se realizaron análisis con marcadores de superficie específicos. Los marcadores analizados fueron Thy-1 (linfocitos-T) y B220 (linfocitos B) (Tabla I).

Tabla I: Proporción de linfocitos T y linfocitos B en sangre y timo de un ratón con linfoma de timo y un ratón control (% de células totales).

Órgano	Linf- T (Thy1+)		Linf- B (B220+)	
	Control	Tumor	Control	Tumor
Sangre	35	19	43	37
Timo	99	99	0	0,1

En sangre de ratones con tumor había un descenso en el contenido de linfocitos T respecto al valor control (19% y 35% respectivamente). Este descenso podría ser debido a una alteración en la funcionalidad del timo, al localizarse allí las células cancerosas, ya que se trataba de un linfoma de timo avanzado.

Los análisis de contenido de DNA en el timo de ratones con linfoma, mostraron que un 2% de las células se encontraban en fase G0/G1 del ciclo celular (83% en el timo control) y cerca del 40% en fase G2/M (11% en el timo control), lo que indicaría bien que las células están proliferando activamente, o que son células tetraploides quiescentes. En médula ósea y bazo no se observaron diferencias respecto al control.

#### Ratones con síntomas de leucemia

Alrededor de 150 días post-irradiación, se observó en dos ratones p53+/- irradiados con 4 Gy, al hacer el análisis hematológico rutinario, un contenido anormalmente alto de leucocitos en sangre y una alteración en la fórmula leucocitaria (% de neutrófilos muy alto y de linfocitos muy bajo respecto al control). Estos datos sugerían la existencia de un estado leucémico. Uno de los animales murió poco después de detectar estas alteraciones, no pudiendo ser analizado. El otro animal fue sacrificado, extrayéndole la médula ósea, sangre y bazo, en los que se analizó morfología celular (tamaño y complejidad), expresión de los marcadores de superficie Thy-1, B220 y GR-1 (específico de células mieloides) y contenido de DNA celular.

En sangre, médula ósea y bazo del ratón con síntomas de leucemia, se detectó una población celular anómala en tamaño y complejidad, respecto a las poblaciones del ratón control. Es interesante resaltar que en ratones con linfoma de timo, únicamente se detectaron poblaciones morfológicamente anómalas en sangre, mientras que la médula y el bazo no mostraban diferencias respecto a las poblaciones control.

Los resultados obtenidos en el análisis de marcadores de superficie se muestran en la Tabla II. En los tres órganos analizados del ratón con síntomas de leucemia, se observó un descenso en el % de linfocitos B respecto a los valores control. El % de células que expresan el marcador GR-1, específico de células mieloides maduras y en proceso de maduración estaba muy aumentado en los órganos hematopoyéticos del ratón con síntomas de leucemia, sugiriendo su origen mielóide. El contenido de linfocitos T estaba disminuido en la sangre y el bazo de los ratones con síntomas de leucemia, no observándose diferencias significativas respecto al control en la médula ósea.

Tabla II: Proporción de distintos tipos celulares en sangre, médula ósea y bazo de un ratón con síntomas de leucemia y un ratón control (% de células totales).

Órgano	Linf-T (Thy-1+)		Linf-B (B220+)		Mieloide (GR-1+)	
	Control	Tumor	Control	Tumor	Control	Tumor
Sangre	31	10	45	0,8	8	95
Médula ósea	5	8	9	0,1	51	93
Bazo	31	3	44	0,2	11	85

Los análisis de contenido de DNA en los órganos hematopoyéticos con síntomas de leucemia mostraron que en médula ósea y bazo había una mayor proporción de células en proliferación respecto a órganos control, mientras que en sangre periférica no se observaron diferencias significativas respecto al control en cuanto al contenido de DNA.

### Conclusiones.

A pesar de que el número de ratones analizados hasta el momento es bajo, los resultados obtenidos parecen indicar que los ratones con p53 alterado son un buen modelo experimental para el estudio de cánceres hematológicos radioinducido, ya que la incidencia observada tras irradiación es alta, no siendo los períodos de latencia extremadamente largos.

El análisis rutinario de parámetros hematológico en sangre, se presenta como una técnica con ventajas para detectar posibles estadios pre-leucémicos. El estudio citométrico de marcadores de superficie específicos de linaje celular presenta una gran potencialidad tanto para caracterizar las poblaciones celulares (linaje y estadio de maduración) implicadas en el desarrollo del tumor una vez que éste es manifiesto, como para analizar indicadores tempranos de malignidad antes de que el tumor esté en estadio avanzado de desarrollo.

En la actualidad se están realizando estudios dirigidos a profundizar en la caracterización celular de las poblaciones hematopoyéticas implicadas en el desarrollo carcinogénico tras exposición a radiación, así como alteraciones moleculares que puedan estar implicadas en dicho proceso, mediante análisis de expresión génica por Northern Blot. Se han iniciado en nuestro laboratorio estudios equivalentes a los descritos en este trabajo, pero con protocolos de irradiación fraccionada con objeto de reproducir las condiciones de irradiación crónica a dosis bajas, de interés en el contexto de protección radiológica.

### Bibliografía

- [1] COX, R., Molecular mechanisms of radiation oncogenesis, *Int. J. Rad. Biol.* 65 (1994) 57 a 64.
- [2] UNSCEAR, Models, mechanisms and uncertainties at low doses. (1997) A/AC.82/R.576
- [3] DONEHOWER, L.A., HARVEY, M., SLAGLE, B.L., MC ARTHUR, M.J., MONTGOMERY, C.A., BUTEL, J.S., BRADLEY, A., Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours, *Nature* 356 (1992) 215 a 221.
- [4] KEMP, C.J., WHELDON, T., BALMAIN, A., p53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis, *Nature Gen.* 8 (1994) 66 a 69.