



III REUNIÓN CIENTÍFICA DA REDE DE ANIMAIS TRANSXÉNICOS DE GALICIA

Santiago de Compostela, 21 de outubro de 2015



Rede de animais transxénicos de Galicia
RATGA



III REUNIÓN CIENTÍFICA DA
REDE DE ANIMAIS
TRANSXÉNICOS DE
GALICIA
Santiago de Compostela
21 de outubro de 2015

RATGA - Rede de Animais Transxénicos de Galicia

III Reunión Científica

Edificio Docente Novoa Santos - Aula Magna - USC

Santiago de Compostela, 21 de outubro de 2006

Comité organizador

Victor M. Arce
Manuel Collado
José A. Costoya

Comité científico

Victor M. Arce
Manuel Collado
José A. Costoya
Anxo Vidal

PROGRAMA

9.30-10.00h Entrega de documentación

10-10.45h

Generación de nuevos y mejores modelos animales con los sistemas CRISPR-Cas

Lluís Montoliú

Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC

10.45-11.00h

Caracterización de la cistogénesis y búsqueda de un tratamiento para la Enfermedad Poliquística Renal Autosómica Dominante (ADPKD)

Adrián Cordido Eijo

Nefrochus

IDIS-Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS)

11.00-11.15h

Unidad de Criopreservación de la RATGA

Raquel Rey

IDIS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

11.15-11:30h

Mecanismo de acción de los Ag3 clusters para mejorar la eficacia terapéutica de fármacos que su unen al DNA

Erea Borrajo Alonso

GIO

IDIS-CIMUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

11.30-11.45h

O papel da citoquina proinflamatoria IL6 en glioma

Irene Golán Cancela

MOL

IDIS-CIMUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

11.45-12.00h

Marco legal en experimentación animal: dónde estamos y hacia dónde vamos

Anxo Vidal

CiCLOn

IDIS-CIMUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

12.00-12.30h Pausa de café

12.30-13.15h

Orthoxenografts como herramienta para el desarrollo preclínico de fármacos y de estrategias de medicina personalizada

Alberto Villanueva

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

15.30-15.45

Análisis de la capacidad tumorigénica en un modelo murino de cultivos inmortalizados de células madre neurales embrionarias

Cristina Almengló

IDIS-CIMUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

15.45-16.00h

Transgénesis, morfolinós y edición genómica en pez cebra

Pablo Cabezas

Acuigen

IDIS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

16.00-16.15h

Papel do xene Sox2 en cáncer e envellecemento

Jéssica Vilas Martínez

stemCHUS

IDIS-Complexo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS)

16.15-16.30h

Los ratones transgénicos en Oftalmología

Francisco González

IDIS-CIMUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

16.30-16.45h

Novas funcións das GCK-III en metabolismo

Cristina Iglesias García

IDIS-CIMUS-CHUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

16.45-17.00h

El Biobanco: una herramienta en investigación

Máximo Fraga

Biobanco do Complexo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS)

17.00h Reunión membros de la RATGA

RESUMOS DAS PRESENTACIÓNS

Generación de nuevos y mejores modelos animales con los sistemas CRISPR-Cas

Lluís Montoliú

Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC

La evolución de los métodos usados en la generación de animales modificados genéticamente ha ido progresando a saltos, no de forma continua. Las técnicas de microinyección iniciales, desarrolladas a principios de los años 80, o las técnicas basadas en células ES, desarrolladas a finales de los 80/principios de los 90, u otras incorporaciones más o menos relevantes, como la transferencia nuclear, desde finales de los 90, habían permitido tener una caja de herramientas genética (donde también incluiríamos los sistemas inducibles, condicionales, los lentivirus, transposones, cromosomas artificiales, transgénesis asociada a esperma, etc...) relativamente completa que parecía permitirnos realizar prácticamente cualquier modificación genómica deseada. Sin embargo, la aparición de los editores genómicos, en sus tres variantes: ZFNs, TALENs y CRISPR-Cas ha revolucionado todo el proceso, particularmente con la tercera generación de las nucleasas de edición, los sistemas CRISPR-Cas, derivados nuevamente de bacterias. El uso de estas nuevas técnicas, que esencialmente dirigen un corte de doble cadena a un sitio específico del genoma (DSB) para luego dejarlo todo en manos de los sistemas de reparación del DNA endógenos, y su extraordinaria versatilidad y eficiencia permiten en la actualidad realizar cualquier modificación genómica de forma sencilla, rápida y asequible, sin necesidad de utilizar células ES, sin necesidad de tener que sufrir los efectos de posición cromosomales debidos a la inserción azarosa de los transgenes y con la posibilidad adicional de abordar múltiples modificaciones de forma simultánea, algo impensable hasta hace un par de años. En esta charla ilustraré el uso de las herramientas CRISPR-Cas con ejemplos de mi laboratorio de delección, disrupción y edición genómica, y discutiré las ventajas, las aplicaciones y, también, las limitaciones que tienen estas nuevas técnicas.

Unidad de Criopreservación de la RATGA

Raquel Rey

IDIS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

El objetivo de la Unidad es prestar un servicio que permita a los investigadores preservar material biológico procedente de varias especies modificadas genéticamente (pez cebra y ratón). Para ello se dispondrá de un banco de tejidos y un banco de embriones de ratón que unido a un servicio de rederivas por transferencia proporciona a los investigadores la posibilidad de criopreservar y recuperar líneas de ratones modificados genéticamente.

La unidad proporcionará entre otros servicios: gestión de un banco de tejidos, gestión de un banco de embriones, criopreservación de embriones preimplantacionales y esperma de ratón de líneas modificadas genéticamente, recuperación de líneas de ratón modificadas genéticamente, rederivación mediante transferencia de líneas de ratón mejorando el status sanitario de éstas.

Su implantación permite la optimización de recursos evitando mantener animales vivos en el animalario, simplificando el intercambio entre laboratorios, manteniendo un elevado número de líneas de ratones modificados genéticamente en un espacio reducido, garantizando una disponibilidad continua de aquellas cepas utilizadas con poca frecuencia, así como su reposición de manera rápida y libre de patógenos oportunistas si es necesario realizar una rederivación, evitando problemas relacionados con su estatus sanitario.

Mecanismo de acción de los Ag3 clusters para mejorar la eficacia terapéutica de fármacos que se unen al DNA

Erea Borrajo Alonso

GIO

IDIS-CIMUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

La mayoría de los fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer que se utilizan ampliamente y con éxito hoy en día son agentes que dañan el DNA; sin embargo, una serie de mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia dificultan su efectividad, característica común a todos ellos es, en primer lugar, un defecto en la cantidad suficiente de fármaco que alcanza el DNA; y, en segundo lugar, un fracaso para lograr la muerte celular después de la formación del complejo DNA-fármaco. Los clústeres cuánticos atómicos de plata de 3 átomos (denotados aquí como Ag3 clusters) interactúan con el DNA a través de la intercalación que resulta en una profunda modificación de la conformación del DNA lo que interrumpe la unión de las proteínas de unión al DNA. Demostramos que los Ag3 clusters afectan a la interacción del DNA y las histonas resultando en la disociación de los nucleosomas. Como resultado de ello, se incrementa la accesibilidad de la cromatina favoreciendo la unión de agentes quimioterapéuticos que se dirigen al DNA. La acción potenciadora de los Ag3 clusters se ha estudiado a concentraciones que no tienen ningún efecto en la viabilidad celular, no causan daño en el DNA y no tienen ningún efecto tóxico en ratones. Además, encontramos que sólo en células que se dividen activamente la accesibilidad de la cromatina está significativamente incrementada después del tratamiento. De acuerdo con esto, mediante la utilización de un modelo ortotópico de cáncer de pulmón, los tumores, pero no los tejidos normales, mostraron aumentado el cisplatino unido al DNA después de la co-administración de los Ag3 clusters con el cisplatino. Nuestros resultados han demostrado que los Ag3 clusters son una nueva herramienta que induce una remodelación transitoria de la cromatina que facilita la accesibilidad de los fármacos de unión al DNA potenciando así su eficacia quimioterapéutica.

O papel da citoquina proinflamatoria IL6 en glioma

Irene Golán Cancela

Oncología Molecular MOL

IDIS-CIMUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

As citoquinas pro-inflamatorias, e especialmente IL6, parecen ter un papel clave no desenvolvemento e mantemento do proceso oncoxénico, sobre todo na regulación do microambiente tumoral que prepara e dá soporte ao desenvolvemento tumoral. Por tanto, o estudo do papel que estas citoquinas xogan no proceso tumoral pode ser de gran interese non só para profundar na bioloxía do tumor senón tamén para un mellor manexo deste tipo de patoloxías. Por iso, o noso estudo está orientado a comprender o papel da interleuquina 6 (IL6) no proceso oncoxénico (nun contexto de presenza/ausencia), sobre todo en gliomas de baixo grao (hiperactivación das vías de sinalización celular) e de alto grao (hiperactivación das vías de sinalización asociadas coa un desaxuste do ciclo celular), utilizando para iso un modelo animal de tumores humanos do Sistema Nervioso Central que nos permite un maior coñecemento a nivel molecular dos mecanismos e tamén nos facilita o desenvolvemento e experimentación preclínica de novas terapias que permitan unha mellor abordaxe terapéutica.

Os resultados obtidos até o momento mostran que os astrocitos *IL6^{-/-}* son máis susceptibles ao estrés replicativo inducido polo oncoxene Ras e que a citoquina exerce un certo papel protector a este nivel. Aínda queda por dilucidar se este efecto de IL6 observado a nivel celular é modulado polo efecto desta interleuquina sobre o microambiente tumoral.

Análisis de la capacidad tumorigénica en un modelo murino de cultivos inmortalizados de células madre neurales embrionarias

Cristina Almengló

IDIS-CIMUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

Nuestro principal objetivo es el desarrollo de un modelo que nos permita estudiar la relación entre capacidad regenerativa y riesgo oncogénico en células madre neurales. Para ello, utilizamos células embrionarias sometidas a un proceso de senescencia replicativa mediante el protocolo 3T3, con el objetivo de obtener líneas celulares inmortalizadas que serán caracterizada a partir de técnicas de biología celular (capacidad de formación de neuroesferas, capacidad de diferenciación, transformación) y molecular (ciclo celular, vías de señalización).

Entre los experimentos a realizar in vivo se incluye la implantación ortotópica o ectópica de células y su seguimiento mediante la observación del animal con técnicas no invasivas de imagen óptica. Para ello las células inmortalizadas fueron transfectadas con un plásmido de expresión constitutiva para la proteína de fusión mKate, proteína fluorescente cuya longitud de onda de emisión es cercana al infrarrojo.

Transgénesis, morfolidos y edición genómica en pez cebra

Pablo Cabezas

Acuigen

IDIS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

El pez cebra es un organismo modelo que se lleva utilizando para la genética del desarrollo desde la década de 1960. Desde esa época, se lleva utilizando también en estudios en biomedicina debido a sus claras ventajas frente al modelo murino, como pueden ser: un gran número de descendientes, pequeño tamaño, bajo coste de mantenimiento, líneas modificadas genéticamente y capacidad de realizar 'high-throughput screening' de fármacos.

Se presentará la biología y desarrollo del pez cebra como introducción a la especie modelo y se hará una visita virtual a las instalaciones del departamento de Genética de la USC (Facultad de Veterinaria) y las líneas de investigación que se llevan a cabo en él. También se hablará sobre tres técnicas que se están empezando a desarrollar o se han hecho en nuestro laboratorio: transgénesis, morfolidos y edición genómica mediante la técnica de CRISPR/Cas9 con pez cebra.

Papel del gen Sox2 en cáncer y envejecimiento

Jéssica Vilas Martínez

stemCHUS

IDIS-Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS)

Sox2 é un factor de transcripción cun papel no mantemento da pluripotencia das células nai embrionarias e que regula a formación de varios epiteliós durante o desenvolvemento fetal. Sox2 continúa desempeñando un papel importante en tecidos adultos como se suxire pola súa expresión nalgúns tecidos (cerebro, retina, hipófise e pulmón) en poboacións de células específicas (Driessens and Blanpain, 2011). Experimentos de trazado de liñaxe xenética e transplante demostraron que as células adultas que expresan Sox2 producen continuamente células dentro destes tecidos. Polo tanto, a expresión de Sox2 en poboacións de células adultas é importante para a rexeneración normal de tecidos e a supervivencia dos organismos (Arnold et al., 2011). Ademais disto, sábese que hai unha alta expresión de Sox2 nalgúns tumores (Annovazzi et al., 2011; Kadara et al., 2012) e que a súa descripción como oncoxene en cancro escamoso de esófago e pulmón (Bass et al., 2009) apoia o seu posible papel pro-tumoral. O noso laboratorio descubriu recentemente que o supresor tumoral Rb actúa como un represor de Sox2 durante a diferenciación cando se asocia ao enhancer SRR2 xunto cun complexo represivo p107-p130-p27-E2F4-SIN3A. Os nosos resultados mostran que o feito de non controlar adecuadamente a expresión de Sox2 en ratos deficientes para Rb resulta en tumores hipofisarios e que a eliminación parcial de células Sox2 positivas usando o modelo animal Sox2-?TK reduce o desenvolvemento do tumor hipofisário iniciado pola perda de Rb in vivo. Por outra banda, tamén empregamos o modelo animal Sox2-?TK para eliminar células Sox2 positivas en tecidos adultos e investigar o papel de Sox2 no avellentamento. Os nosos resultados máis preliminares indican que os ratos onde as células Sox2 positivas foron eliminadas presentan diferentes manifestacións típicas do avellentamento.

Los ratones transgénicos en Oftalmología

Francisco González

IDIS-CIMUS-CHUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

El ojo de raton es un modelo adecuado para evaluar técnicas de expresión génica. La posibilidad de utilizar un ojo como prueba y el contralateral como control en el mismo animal supone una enorme ventaja. La posibilidad de visualización directa del fondo de ojo mediante biomicroscopia permite controlar la evolución del experimento en un mismo animal. Su pequeño tamaño hace que la cantidad de sustancias necesarias para inocularlo sea mínima. Finalmente, existe una importante variedad de ratones con mutaciones genéticas que producen alteraciones retinianas que pueden servir de modelo para valorar técnicas de terapia génica de potencial uso en humanos que padecen enfermedades que conducen a la ceguera

Novas funcións das GCK-III en metabolismo

Cristina Iglesias García

IDIS-CIMUS-Universidade de Santiago de Compostela (USC)

Tradicionalmente relacionouse as quinasas GCK-III (SOK-1, Mst3, Mst4) con diversos mecanismos de resposta a estrés oxidativo, coa reorganización do citoesqueleto e a migración celular. Non obstante, recentemente publicouse a implicación dunha delas, SOK-1, no metabolismo da glucosa. O noso laboratorio traballa amplamente no coñecemento das funcións destas proteínas polo que decidimos a levar cabo o estudo das mesmas no ámbito metabólico.

Os primeiros estudos realizáronse con células de Hepatocarcinoma HepG2 infectadas cun lentivirus shRNA, establecendo así unha liña con baixos niveis de expresión de Mst3 e comparandoa cunha liña control infectada con lentivirus shRNAcontrol. Os resultados preliminares mostráronnos como interesante o papel de Mst3 no proceso da gluconeoxénese, o reabastecemento dos niveis de glucosa en sangue tras un período de xaxún. En concreto comprobouse o efecto de Mst3 na expresión dos encimas gluconeoxénicos G6PC e PEPCK.

Para validar o modelo in vitro realizáronse probas en ratos con niveis de Mst3 reducidos. Estes ratos foron xerados mediante o sistema “gene trap” unha forma de mutaxénese insercional especificamente deseñada para interrompirla función xénica ao producir eventos de integración intraxénica. O modelo baseouse na administración dunha dieta alta en graxa para levar os ratos a unha situación similar a diabetes tipo II na que os ratos non son capaces de regular os seus niveis de glucosa debido a resistencia a insulina. Baixo este tipo de estrés metabólico esperábase ver a importancia de Mst3 (unha proteína que se activa por estrés) na regulación dos niveis de glucosa dos ratos diabéticos. Tras a realización de tests de tolerancia a insulina, glucosa e piruvato e a análise de tecidos, observouse que os ratos deficientes para Mst3 non presentaban niveis de glucosa tan elevados despois de ser sometidos a dieta alta en graxa e que non eran capaces de formar glucosa a partir do precursor gluconeoxénico piruvato na mesma medida na que o facían os ratos wild type. Asemade, os niveis de mRNA dos xenes gluconeoxénicos G6PC e PEPCK eran significativamente inferiores no fígado dos ratos Mst3 deficientes. A importancia de Mst3 como diana no tratamento da diabetes tipo II radica en que se podería controlar farmacolóxicamente o proceso gluconeoxénico para así diminuír os niveis de glucosa basal neste tipo de pacientes.



Rede financiada pola (R2014/047)



XUNTA DE GALICIA

CONSELLERÍA DE CULTURA, EDUCACIÓN
E ORDENACIÓN UNIVERSITARIA