

## RESUMEN

*p53* es el gen que se encuentra más frecuentemente mutado en tumores y es considerado como “el guardian del genoma”, ya que protege a las células contra estímulos que dañan al DNA, ya sea deteniéndolas en la fase G1 del ciclo celular o conduciéndolas a una muerte celular programada (apoptosis). *p53* lleva a cabo esta función mediante la inducción de genes tales como: *p21*, *mdm2*, *bax* y otros (Figura 1). MDM2 tiene la capacidad de unirse al dominio de activación transcripcional de *p53* e inhibir sus propiedades. La ausencia del gen *mdm2* produce letalidad embrionaria en ratones y se ha encontrado que la deficiencia simultánea de *p53* rescata este fenotipo. Este resultado indica que la letalidad embrionaria era debida a una actividad desregulada de *p53*. En este trabajo planteamos la hipótesis de que la ausencia simultánea de los genes blanco de *p53*, *p21* o *bax*, rescataría el fenotipo de los ratones carentes de *mdm2*. Para probar tal hipótesis necesitábamos obtener ratones deficientes en *p21/mdm2* y *bax/mdm2* a partir de cruzas de ratones heterocigotos para *mdm2* y ratones que carezcan de los genes involucrados en estas dos vías: el gen *p21* para la inhibición de la división celular y el gen *bax* para apoptosis. A partir de dichas cruzas encontramos que ni la ausencia de *p21* ni la *bax* lograban rescatar la letalidad embrionaria. Como aún cabía la posibilidad de que se produjera un rescate parcial, procedimos a disectar embriones a diferentes etapas durante el desarrollo embrionario para su análisis. En los ratones mutantes *p21/mdm2*, no encontramos rescate parcial a los 9.5, 7.5 o 5.5 días del desarrollo. Al analizar embriones a los 3.5 días de desarrollo encontramos una relación esperada entre los posibles genotipos, incluyendo embriones carentes de ambos genes, lo cual nos indicó que la ausencia de *p21* en estos ratones no cambia el fenotipo. Por otro lado, en los ratones

mutantes *bax/mdm2*, no encontramos rescate parcial a los 7.5 días del desarrollo, pero sí a los 5.5 días. Decidimos analizar embriones de 6.5 días con la finalidad de establecer más exactamente el día de muerte de los mismos y encontramos que también a los 6.5 días se producía el rescate. Esto nos indicaba que el fenotipo de letalidad embrionaria de los ratones carentes de *mdm2* se había cambiado de entre 3.5 y 5.5 días a 6.5 días de la gestación en los ratones carentes de *bax* y *mdm2*. En otro estudio se comprobó que los embriones carentes de *mdm2* mueren debido a apoptosis y como *bax* es un inductor apoptótico surgió la duda de si estos embriones podían haber cambiado el mecanismo por el cual mueren. Para analizar esto, utilizamos la técnica de Tunel para determinar apoptosis en los embriones de 6.5 días y nos mostró que no estaban sufriendo apoptosis. El otro mecanismo por el cual estos embriones pueden morir es la inhibición del crecimiento celular. Para comprobar si esto era la causa de muerte montamos una técnica de detección inmunohistoquímica de una proteína relacionada con el ciclo celular, PCNA, y los resultados obtenidos sugieren que los embriones carentes de *bax* y *mdm2* mueren por inhibición del crecimiento celular a los 6.5 días de gestación.

# IMPORTANCIA

El cáncer es uno de los problemas más importantes en el área de la salud y a pesar del intenso estudio que se ha llevado a cabo, aún se desconocen muchos de sus mecanismos moleculares de desarrollo. La importancia de este trabajo radica en que se estudia la vía molecular más frecuentemente alterada en el control del cáncer, la de p53, y se describen algunas de sus funciones *in vivo* de dos de sus blancos, p21 y GADD45, los cuales están implicados en la alteración celular mediante la regulación de inhibición de la división celular y apoptosis, respectivamente. Los resultados obtenidos en esta investigación de gran trascendencia determinan las bases para estudios posteriores que permitan determinar nuevas estrategias de manejo de estos genes.

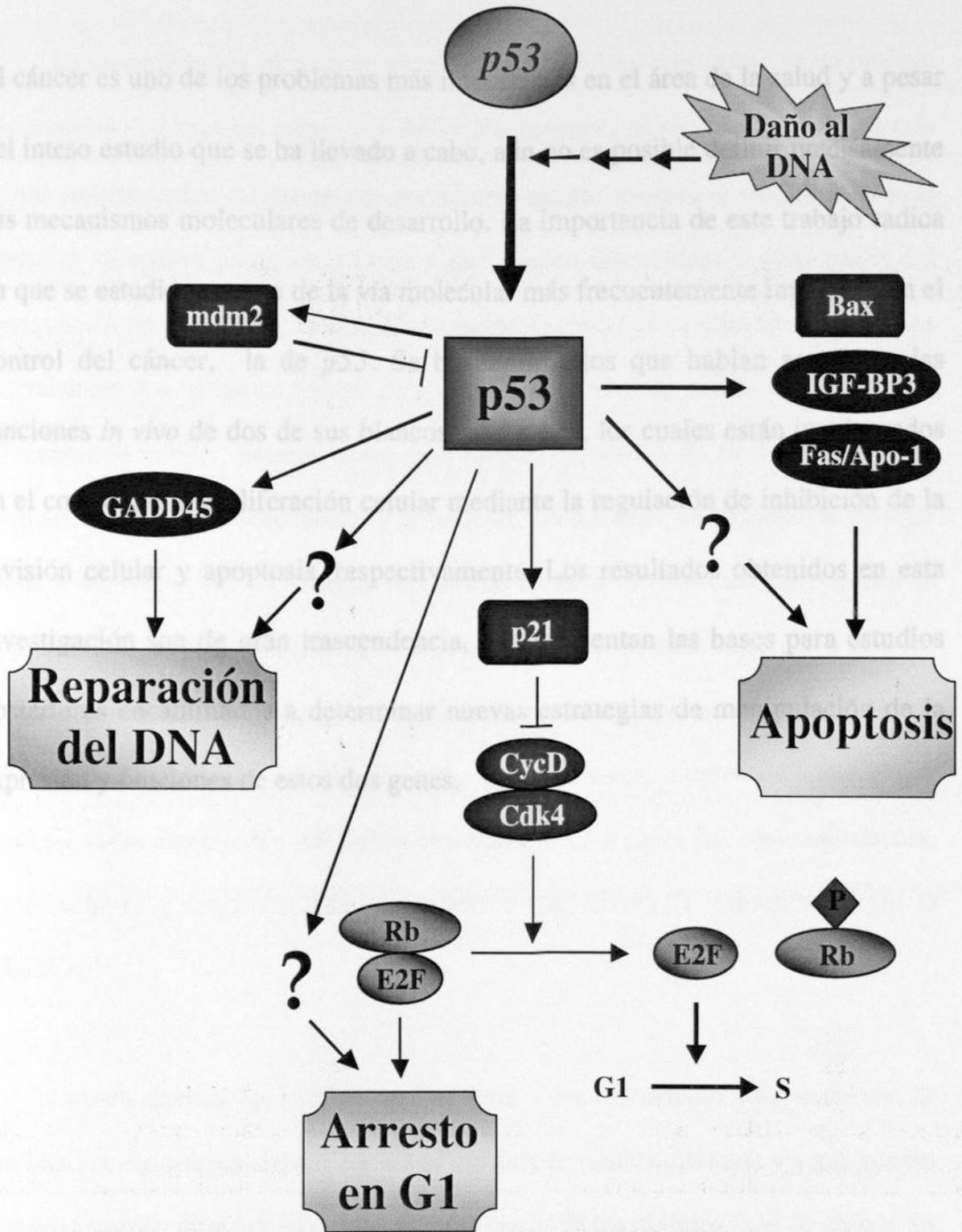


Figura 1. Las vías de p53. Las flechas (↓) representan inducción mientras que las otras líneas (⊥) representan bloqueo.

## **IMPORTANCIA**

**El cáncer es uno de los problemas más importantes en el área de la salud y a pesar del intenso estudio que se ha llevado a cabo, aún no es posible definir precisamente sus mecanismos moleculares de desarrollo. La importancia de este trabajo radica en que se estudió una parte de la vía molecular más frecuentemente implicada en el control del cáncer, la de *p53*. Se buscaron datos que hablan acerca de las funciones *in vivo* de dos de sus blancos, *p21* y *bax*, los cuales están involucrados en el control de la proliferación celular mediante la regulación e inhibición de la división celular y apoptosis, respectivamente. Los resultados obtenidos en esta investigación son de gran trascendencia, ya que sientan las bases para estudios posteriores encaminados a determinar nuevas estrategias de manipulación de la expresión y funciones de estos dos genes.**

## **INTRODUCCION**

La carcinogénesis, el paso de un célula normal a una cancerosa, es un proceso muy complejo y de muchas etapas. Por definición, cáncer es un término general para más de 100 enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal y descontrolado de células en diferentes partes del cuerpo y que pueden diseminarse a otras partes del organismo (Altman and Sarg, 1992). Clínicamente, el cáncer es un grupo muy diverso de enfermedades que varían en tiempo de aparición, velocidad de crecimiento, estado de diferenciación celular, detectabilidad diagnóstica, capacidad de invasión, potencial metastásico, respuesta a tratamientos y pronóstico. Sin embargo, en términos de biología celular y molecular, el cáncer puede representar un número relativamente pequeño de enfermedades causadas por defectos moleculares similares en función celular y que son resultado de alteraciones similares en los genes de la célula. En resumen, el cáncer es una enfermedad de expresión anormal de genes. Esta expresión anormal de genes puede deberse a varios mecanismos que dañen directamente a los genes (tal como mutaciones, translocaciones o amplificaciones de genes) o que alteren la transcripción y/o la traducción.

Existen muchos tipos diferentes de cáncer y las distinciones entre estos son de gran importancia práctica debido a que son tratados de manera diferente y a que pueden tener un desarrollo diferente en cada persona. Además de los distintos tipos de cáncer, los cánceres de un mismo tipo algunas ocasiones se comportan de diferente forma entre sí. Actualmente el cáncer es clasificado en cinco grandes grupos:

- A. **CARCINOMA.** Es un tumor canceroso que se origina en los tejidos de la superficie de los órganos. Es la forma más común de cáncer, ya que representa entre el 80% y 90% de todos los casos.
- B. **SARCOMA.** Tumor canceroso que se origina en el hueso, cartílago, músculo, tejido conectivo fibroso o tejido adiposo.
- C. **MIELOMA.** Tumor canceroso que se origina en las células plasmáticas de la médula ósea.
- D. **LINFOMA.** Tumor canceroso que es originado en el sistema linfático.
- E. **LEUCEMIA.** Cáncer originado en el tejido que forma la sangre.

Las células cancerosas causan daños en numerosas formas. Limitan a las células normales en espacio y nutrientes. Pueden formar una masa o tumor que eventualmente puede invadir y destruir tejidos normales. Se pueden diseminar viajando a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático a otras partes del cuerpo (metástasis).

A pesar de la considerable diversidad que existe entre los cánceres, el defecto básico en todas las formas de cáncer es el crecimiento y división descontrolados de las células cancerosas (Cooper, 1993). Debido a que el cuerpo completo se origina a partir de una sola célula (el huevo fertilizado), se produce un gran proceso de crecimiento y división celulares durante el desarrollo normal. La conducta de cada célula individual es programada como parte de un esquema de desarrollo determinado, en el cual cada célula crece y se divide como sea requerido para formar los tejidos y órganos del embrión en desarrollo. En el adulto, pocos tipos de células (como las células nerviosas) no son

capaces de dividirse, pero la mayoría continúan haciéndolo cuando es necesario para reemplazar células que se han perdido por daño celular o muerte.

Esta cuidadosa regulación del crecimiento y división celulares normal se pierde en las células cancerosas. Las células cancerosas continúan creciendo y dividiéndose cuando ya no deberían hacerlo. El cáncer comienza cuando una simple célula empieza a proliferar anormalmente. Esta célula alterada se divide para formar dos células que también proliferan anormalmente y que a su vez se dividen para formar otras cuatro células y así sucesivamente. Ya que cada célula cancerosa se divide exponencialmente, el número total de células cancerosas continúa incrementándose rápidamente. Bastarían 20 divisiones celulares para que a partir de una sola célula, se produjeran 1 millón de células cancerosas. Y después de otras 20 divisiones, el número de células cancerosas resultantes sería de aproximadamente 1 trillón, lo que correspondería a aproximadamente medio kilogramo de tejido. Las células que están creciendo rápidamente pueden dividirse hasta una vez diaria. Entonces una sola célula cancerosa dividiéndose a esta velocidad podría desarrollar, en poco más de un mes, un tumor de medio kilo de tamaño. Sin embargo, el tamaño de la mayoría de los tumores en el cuerpo no aumenta tan rápidamente, normalmente toma varios meses o años hasta que un tumor se desarrolle a este tamaño.

El cáncer que es detectado y tratado antes de que haya invadido órganos adyacentes o metastasisado, tiene una mayor probabilidad de ser curado. Hay cinco tipos de tratamiento para el cáncer. A principios de siglo, en los años 1900s, la CIRUGIA era el único tratamiento conocido. En los 30s, la RADIOTERAPIA o radium fué reconocida

como un tratamiento efectivo para el cáncer. La QUIMIOTERAPIA, el uso de drogas anticáncer, fué usada por primera vez en los años 50s cuando fué exitosamente tratado coriocarcinoma, un cáncer ginecológico. Los tratamientos han venido a ser más y más efectivos a medida que se han establecido combinaciones entre cirugía, radiación y quimioterapia en el tratamiento de diferentes cánceres. En los 70s y 80s se desarrolló la terapia INMUNE o BIOLÓGICA, que consiste en la activación del sistema inmunológico en contra del cáncer. Finalmente, el más reciente tipo de terapia contra el cáncer es la GENICA, en la cual se utilizan genes manipulados por ingeniería genética con la finalidad de reconstruir los procesos moleculares dañados que dieron origen al cáncer.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo occidental. En muchos casos las causas del cáncer no están claramente definidas, pero se sabe que factores tanto externos (por ejemplo, químicos en el ambiente y radiación) como internos (por ejemplo, defectos en el sistema inmune y predisposición genética) juegan un papel importante. Se ha demostrado fehacientemente que fumar es un factor causal muy importante. Varios de estos factores pueden actuar juntos para iniciar (encender la mal función genética inicial) y promover (estimular el crecimiento de las células iniciadas) la carcinogénesis. No es raro que pueden pasar de 10 a 20 años antes de que una célula neoplásica iniciada se desarrolle en un tumor clínicamente detectable.

El cáncer puede desarrollarse a cualquier edad, pero generalmente es considerado una enfermedad relacionada con el envejecimiento. En promedio, el diagnóstico de los más comunes tipos de cáncer se realiza a edades alrededor de los 67 años. Aunque el

cáncer es relativamente raro en niños, aún es la causa número uno de muerte entre los 1 y 14 años de edad. De este grupo, la leucemia es la causa de muerte más frecuente, pero también pueden presentarse otros tipos de cánceres tales como osteosarcomas, linfomas y tumores de Wilms (un cáncer de riñón).

Afortunadamente, en la actualidad cada vez más y más gente está siendo curada de cáncer. Por ejemplo, en Estados Unidos en los años 40, solamente una de cada cuatro personas diagnosticadas con cáncer vivía al menos cinco años después del tratamiento; en los 90's, este número se ha elevado al 40%. Este importante progreso es debido principalmente a mejores técnicas de diagnóstico y tratamiento, muchas de las cuales han surgido gracias al creciente conocimiento de la biología celular y molecular del cáncer.

El crecimiento celular es controlado entre otros factores por los miembros de dos grandes familias de moléculas, los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los oncogenes inducen la formación de cáncer. Se encuentran en células normales y es muy probable que su oncogenicidad derive de un evento tal como la translocación, amplificación o mutación de una secuencia nucleotídica clave. Se ha identificado un gran número de oncogenes, entre los que se encuentran *abl*, *erb*, *myc*, *ras*, *jun*, *ret*, *fos*, *sis*, *scr*, *trk* y otros. La función normal de estos genes en la célula es muy variada, algunos son factores de crecimiento, otros son receptores de factores de crecimiento, proteínas membranales o citoplásmicas con actividad kinasa, factores de transcripción, etc.

Los genes supresores de tumores son moléculas que inhiben la proliferación celular descontrolada. En el caso de los oncogenes, una simple mutación puede ser suficiente para activarlos, una segunda mutación no es crucial. Las mutaciones en oncogenes son eventos de “ganancia de función” (gain-of-function) y conllevan a un aumento en la proliferación celular y un descenso en la diferenciación. Las mutaciones de los oncogenes no parece que sean heredadas a través de línea germinal ya que su efecto dominante podría interferir con el desarrollo normal. Los oncogenes (por ejemplo, *ras* y *myc*) están mutados en una gran variedad de cánceres humanos. En contraste, las inactivaciones de los genes supresores de tumores son eventos de “pérdida de función” (loss-of-function), que usualmente requieren un evento mutacional en un alelo seguido por la pérdida o inactivación del otro alelo. Son de naturaleza recesiva y las mutaciones resultantes se pueden transmitir por línea germinal. Entre los ejemplos de genes supresores de tumores conocidos están: p53, RB, APC, DCC, NF, RET, VHL y WT1 entre otros. Sus funciones son variadas, pero algunos de ellos se encuentran en núcleo actuando como factores de transcripción, otros están en membrana y actúan en transducción de señales, adhesión celular o producción de la matriz extracelular, algunos otros están involucrados en la reparación del DNA.

En el control del crecimiento celular se produce una intrincada red de interacciones entre las funciones de los oncogenes y los genes supresores de tumores. La introducción de un gen supresor de tumores en una célula maligna que está expresando un oncogen conocido, da como resultado una represión de la malignidad de dicha célula, aún y

cuando el oncogen se continúa expresando. Por esta razón además del término gen supresor de tumores, también se utiliza el de *antioncogen*.

Otro punto importante es que ya que estos genes regulan el crecimiento celular, no solamente están implicados en la regulación de carcinogénesis, sino que también en el desarrollo normal del organismo. De ahí que se deba seguir estudiando sus funciones e implicaciones tanto en el desarrollo normal de organismos como en la carcinogénesis.

# ANTECEDENTES

## I. *p53*

La palabra “cáncer” es usada para describir un grupo de estados patológicos heterogéneos en los cuales las células se multiplican anormalmente e invaden los tejidos a su alrededor. Existen cientos de diferentes tipos de cánceres, casi uno originado a partir de cada tipo celular en el organismo de los mamíferos. La esperanza principal que ha subsistido por mucho tiempo es que la vía bioquímica alterada que controla el crecimiento, sea la misma en muchos tipos diferentes de cáncer, sin importar su heterogeneidad biológica; con lo cual se contaría con un común denominador para el entendimiento, tratamiento y prevención de esta enfermedad. La vía que involucra a *p53* cumple con este deseo, ya que al parecer, alteraciones en este gen supresor de tumores se encuentran involucradas, directa o indirectamente, en la mayoría de las neoplasias humanas. La observación de que mutaciones en *p53* ocurrían con extraordinariamente alta frecuencia en diversos tipos de cánceres humanos, ha sido confirmada y ampliada con el análisis de más de 2500 tumores y líneas celulares de tumor. Aproximadamente la mitad de las principales formas de cáncer contienen mutaciones en *p53* (Hollstein et al., 1994).

*p53* es crucial para la regulación del ciclo celular bajo condiciones de daño al DNA. Se identificó originalmente por su asociación con la oncoproteína viral antígeno T grande de SV40 (Lane, 1979). Debido a que *p53* se encontró asociada con una oncoproteína viral, en niveles elevados en células transformadas (Oren et al., 1982) y a que mostró cooperación con *ras* para transformar células (Eliyahu et al., 1984; Parada et

al., 1984), se le consideró en un principio como un oncogene. Pero subsecuentes investigaciones indicaron que p53 regula negativamente el crecimiento celular y por lo tanto, que debía ser reclasificado como un supresor de tumores.

El gen *p53* está localizado en el cromosoma 11 en el ratón y en el 17p13 en el humano (Benchimol et al., 1985; Donehower et al., 1992). Contiene 11 exones, el primero de los cuales es no codificante (Oren, 1985). Este gen se encuentra conservado entre todas las especies vertebradas analizadas, incluyendo humano, ratón, rata, mono, rana y trucha. A nivel de proteína se distinguen 5 regiones muy conservadas entre las diferentes especies, y corresponden a los siguientes aminoácidos: I, 13-17; II, 117-142; III, 171-181; IV, 234-258 y V, 270-286 de la proteína humana (figura 2). La homología en la secuencia de aminoácidos de la proteína p53 entre el humano y el ratón es de 81 %, mientras que su homología en las regiones altamente conservadas es de 99 % (Soussi et al., 1990).

La proteína p53, que consta de 390 aminoácidos en el ratón y de 393 en el humano, migra con una movilidad relativa equivalente a 53 kD en geles de poliacrilamida-SDS. Estudios de la secuencia de aminoácidos dan algunos indicios de su función. El extremo amino terminal contiene un grupo de residuos ácidos dispuestos en alfa hélice, que es un dominio común en muchos activadores transcripcionales ácidos. El extremo carboxilo contiene una región básica dispuesta en alfa hélice (Soussi et al., 1990) que está involucrada en oligomerización (Sturzbecher et al., 1992). En esta región

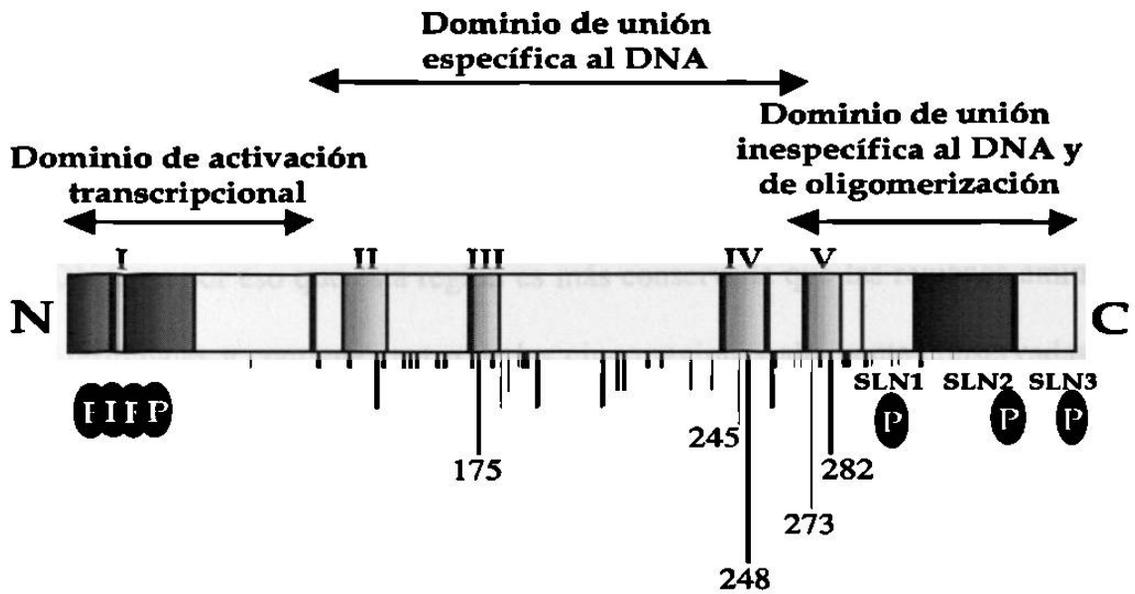


Figura 2. Estructura de la proteína p53 humana. SLN= Señal de localización nuclear; P= Sitio de fosforilación; I, II, III, IV y V: Dominios altamente conservados; N= Terminación amino; C= Terminación carboxilo; las líneas verticales indican los sitios altamente propensos a mutaciones.

también se encuentran tres señales de translocación al núcleo (Shaulsky et al., 1990), las cuales están muy conservadas en las proteínas p53 de mamíferos. Aquí también radica la capacidad de unión inespecífica al DNA (Foord et al., 1991), ya que se ha demostrado que proteínas p53 con el extremo carboxilo truncado no oligomerizan ni se pueden unir al DNA. En cuanto a la región central de la proteína, la cual es hidrofóbica, rica en prolina y conformada por laminas beta (Soussi et al., 1990), es la que le da especificidad de unión al DNA, es por eso que esta región es más conservada que las regiones amino y carboxilo terminales y contiene cuatro de las cinco regiones altamente conservadas de p53 (Soussi et al., 1990); en esta región se localizan la mayoría de las mutaciones que inactivan a p53 y que están asociadas con tumores humanos (Hollstein et al., 1991); las mutaciones en esta región cambian la conformación de la proteína de manera que ya no es reactiva a anticuerpos que reconocen a la proteína p53 en estado silvestre (Pab246) y se vuelve específica para otros anticuerpos que reconocen esta región mutada, tales como Pab240 (Gannon et al., 1990); y, se ha encontrado que mutaciones o deleciones en esta región eliminan la actividad transcripcional de p53 en algunos modelos experimentales (O'Rourke et al., 1990; Raycroft et al., 1991; Raycroft et al., 1990).

La inactivación de p53 es un evento crucial en el desarrollo de muchos tumores de orígenes diversos, y es en realidad, el gen más frecuentemente mutado en cáncer (Hollstein et al., 1991). Las alteraciones consisten normalmente de una mutación puntual en uno de los alelos y deleción o rearreglo en el otro (Baker et al., 1990). Las mutaciones puntuales a menudo ocurren en el dominio de unión específica al DNA y eliminan la capacidad de p53 de unirse al DNA y activar la transcripción de genes blanco (De

Fromentel and Soussi, 1992; Hollstein et al., 1991; Levine et al., 1991). Otros mecanismos por los cuales se puede inactivar p53 en tumores son: exclusión nuclear (Moll et al., 1992), inactivación viral y amplificación del gen *mdm2*. La unión de la proteína E6 del virus del papiloma humano induce la ubiquitinación y consecuente degradación de p53 en el desarrollo de carcinomas de ovario. La amplificación del gen *mdm2*, que ocurre en el 33 % de los sarcomas, resulta en la sobreproducción de la proteína MDM2 que inhibe las funciones de p53 (Momand et al., 1992; Oliner et al., 1992). Por lo tanto, además de las mutaciones en el gen *p53 per se*, alteraciones en otros componentes de su vía también contribuyen al desarrollo de tumores.

Mutaciones congénitas de *p53* en línea germinal están asociadas con el síndrome de Li Fraumeni (Malkin et al., 1990; Srivastava et al., 1990). Este síndrome familiar se caracteriza por una aparición temprana de múltiples tumores primarios en tejidos suaves. La herencia en la línea germinal de un alelo mutante de *p53* aumenta considerablemente la predisposición al desarrollo de estos tumores, ya que únicamente se requerirá de inactivar el único alelo silvestre. La eliminación del gen *p53* del genoma de ratones a través de recombinación homóloga produce ratones que, aunque son morfológicamente normales, desarrollan tumores a una velocidad muy elevada comparada con aquellos que aun tienen *p53* (Donehower et al., 1992). Una vez más, la ausencia de *p53* muestra que es un factor de propensión para tumorigénesis.

Estudios en cultivo de tejidos han comprobado la actividad que p53 tiene como un agente supresor de tumores. La introducción de *p53* en células cultivadas de carcinoma

colorrectal que carecen de *p53* redujo el fenotipo tumorigénico de estas células (Baker et al., 1990). En ensayos de formación de focus, *p53* redujo la transformación mediada por la combinación de varios oncogenes cooperadores (Eliyahu et al., 1984).

El mecanismo molecular por medio del cual *p53* funciona en la célula para regular su crecimiento aún no se ha definido en su totalidad. *p53* está involucrado en una variedad de procesos celulares, entre los que se incluyen: transactivación, muerte celular programada (apoptosis), ciclo celular, reparación del DNA y replicación (Friedman et al., 1990; Sturzbecher et al., 1988; Tack et al., 1989). Algunos trabajos indican que la replicación puede ser una respuesta a activadores transcripcionales (Baru et al., 1991). Se ha mostrado que *p53* inhibe la replicación inducida por el antígeno T mayor de SV40 (Bargonetti et al., 1991), y que se une a la proteína A de replicación (Dutta et al., 1993; Li and Botchan, 1993). También, algunos experimentos indican que *p53* produce una inhibición de la división celular en la etapa tardía de la fase G1 del ciclo celular, esto es, un poco antes de que la replicación, que se produce en la fase S, tome lugar (Baker et al., 1990; Chen et al., 1990).

Muchos tipos de células transformadas, como el carcinoma colorrectal (Baker et al., 1990), osteosarcoma (Chen et al., 1990), fibroblastos transformados de rata (Martinez et al., 1991), glioblastomas (Mercer et al., 1990) y leucemia mieloide crónica (Johnson et al., 1991), detienen su división cuando el *p53* silvestre es sobreexpresado. En tanto que en otros tipos de células, esta sobreexpresión las conduce a una muerte celular programada. La inducción de *p53* silvestre en células de leucemia mieloide (Yonish-

Rouach et al., 1991), linfoma de Burkitt (Ramqvist et al., 1993), eritroleucemia y cáncer de colon, lleva a las células a apoptosis tres o cuatro horas después de la expresión de *p53* (Yonish-Rouach et al., 1993). Sin embargo, la causa de que la sobreexpresión de *p53* algunas veces produzca inhibición de la división celular, mientras que otras apoptosis, aún es desconocida.

Muchos aspectos de la vía de *p53* aún necesitan ser descifrados. Normalmente las células tienen un nivel basal de la proteína *p53*, pero este se ve incrementado drásticamente cuando el DNA es dañado por agentes tales como: luz ultravioleta (U.V.), radiaciones ionizantes (I.R.) y drogas quimioterapéuticas. La generación de cortes a la cadena doble del DNA parece inducir la activación de *p53*, además, *p53* tiene afinidad por DNA de cadena sencilla y por extremos cortados. La ausencia de *p53* debida a mutaciones en el propio gen o a alteraciones en la vía de señalización que activa *p53*, permite que la célula continúe su ciclo a pesar de daños en el DNA. Esto provoca que la descendencia acumule mutaciones que la puede llevar a inmortalización y transformación.

La capacidad de desarrollar ratones carentes de *p53* demostró que *p53* no es indispensable para el crecimiento, diferenciación y desarrollo de los embriones (Donehower et al., 1992). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que el fondo genético en el cual se encuentra el gen *p53* inactivado puede influenciar significativamente el fenotipo de los ratones carentes de *p53*. Los ratones que carecen de

**p53** son susceptibles al desarrollo de tumores, aproximadamente un 75 % de ellos presentan múltiples tipos de tumores a los seis meses de edad.

Aunque no está totalmente entendido como lleva a cabo p53 su efecto en las células, es claro que la función de activar la transcripción es uno de los principales componentes de sus efectos biológicos (Crook et al., 1994; Pietenpol et al., 1994). La identificación de los blancos transcripcionales de p53 ha sido crítica para discernir las vías por las que p53 produce respuestas celulares tales como crecimiento, inhibición y muerte celulares.

Se ha identificado un gran número de genes que contienen sitios de unión y/o elementos de respuesta para p53, lo cual los convierte en potenciales genes blanco. Sin embargo, no todos ellos llenan los siguientes criterios para considerarlos como un gen responsivo real de p53 (Ko and Prives, 1996):

1. La existencia de sitios de unión de p53 que puedan ser específicamente reconocidos por p53.
2. La capacidad de estos sitios para actuar como un elemento de respuesta a p53, activando la transcripción basal (generalmente en una construcción que contenga un gen reportero) en una forma dependiente de p53.
3. La respuesta del elemento a p53 en el contexto del promotor genómico endógeno; y
4. La inducción del gen blanco después de estrés celular, tal como daño al DNA, en células que contengan p53 silvestre pero no en aquellas que contengan p53 mutados.

De acuerdo a lo anterior, existen varios genes que se consideran mediadores de la respuesta de *p53* y tienen funciones que son particularmente relevantes para las funciones biológicas de *p53*: *p21/WAF1/Cip1*, que codifica una proteína inhibidora de kinasas dependientes de ciclina (CDKs), en especial aquellas que funcionan en la fase G1 del ciclo celular; *mdm2*, que codifica una proteína que forma un complejo con *p53* e inhibe su capacidad de activación transcripcional; *GADD45*, cuyo producto interactúa con el factor de replicación y reparación PCNA e inhibe la entrada de las células a la fase S; *ciclina G*, que codifica un “nueva” ciclina, la que aún no se ha demostrado se asocia o active alguna CDK conocida; *bax*, que es regulado positivamente por *p53* y codifica una proteína que promueve apoptosis; *IGF-BP3* (Insulin-like growth factor binding protein 3), la proteína codificada por este gen, inhibe la señalización por el factor de crecimiento tipo insulina y por lo tanto, es antimitogénico, lo cual representa otra posible vía por la cual *p53* puede inhibir el crecimiento.

Otros candidatos para genes de respuesta a *p53* incluye genes que codifican para el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), trombospondina-1, *fas/APO-1*, retinoblastoma, PCNA, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), ciclina D, cretina kinasa y el propio *p53*. Estos genes generalmente no han cumplido con todos los criterios antes mencionados, por lo que, aún no está claro si son en realidad genes blanco de *p53* (Ko and Prives, 1996).

## **II. *mdm2***

El gen *mdm2* fue originalmente clonado de la línea celular murina transformada 3T3DM. Es uno de tres genes mantenidos establemente en la forma de minutos dobles (murine double minutes) responsable de la transformación de la línea celular 3T3DM (Fakharzadeh et al., 1991). Esto se confirmó al demostrarse que la sobreexpresión de *mdm2* ocasionó una transformación de las líneas celulares NIH3T3 y RAT2. Además, estas células produjeron tumores en ratones desnudos mientras que las células parentales no lo hicieron. La sobreexpresión de *mdm2* también ocasionó transformación de una línea celular normal de fibroblastos de embrión de rata (FERs) en combinación con el gen *ras* activado (Finlay, 1993). Estos datos apoyan el hecho de que el gen *mdm2* es un oncogene.

La clonación y secuenciación del gen *mdm2* indicó que tiene dominios similares a los factores de transcripción (Fakharzadeh et al., 1991). MDM2 tiene un dominio de unión a zinc llamado dedo RING (Figura 3)(Boddy et al., 1994). También cuenta con un dominio ácido entre los aminoácidos 230-301, que consta de un 37 % de residuos de ácidos aspártico y glutámico. Este dominio es capaz de activar la transcripción cuando se fusiona al dominio de unión al DNA *lexA* (Oliner et al., 1993). Además, se ha encontrado una potencial señal de localización nuclear entre los aminoácidos 178-182, para dirigir el transporte de MDM2 hacia dentro del núcleo.

Después de su identificación como un oncogene, se descubrió que MDM2 se une a p53 y que esta unión inactiva la función de activación de la transcripción de p53.

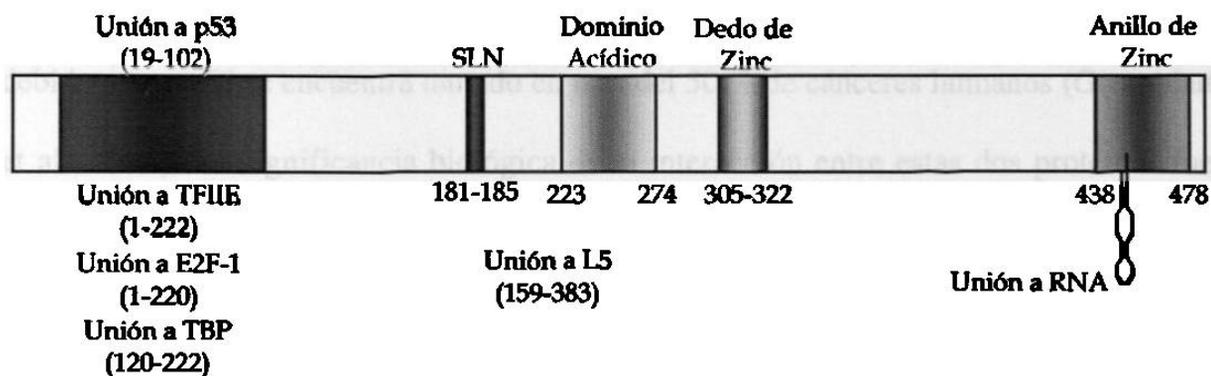


Figura 3. Organización de la proteína mdm2. SLN= Señal de localización nuclear; TFIIIE= Factor de transcripción IIE; TBP= proteína de unión a la caja TATA; L5= proteína ribosomal L5 (Lozano and Montes de Oca Luna, 1998).

Específicamente, MDM2 se une a la región amino terminal responsable de la activación transcripcional de p53 y posiblemente inhibe de esta manera su interacción con la maquinaria de transcripción (Chen et al., 1993; Haines et al., 1994; Oliner et al., 1993). Aún no se sabe si el complejo MDM2-p53 tiene alguna otra función adicional.

La interacción de MDM2 con p53 despertó mucho interés en el estudio de *mdm2* debido a que *p53* se encuentra mutado en más del 50 % de cánceres humanos (Greenblatt et al., 1994). La significancia biológica de la interacción entre estas dos proteínas fue esclarecida cuando se analizaron muestras de tumor en busca de modificaciones de *mdm2*. La clonación y localización del gen *mdm2* del humano indicó que se encuentra en el cromosoma 12q13-14, una región a menudo alterada en sarcomas (Oliner et al., 1992). El análisis de osteosarcomas y sarcomas de tejido suave reveló amplificación del gen *mdm2* en aproximadamente un tercio de los tumores (Ladanyi et al., 1993; Oliner et al., 1992). Muchos de los tumores que tenían *mdm2* amplificado, también contenían *p53* silvestre (Oliner et al., 1992). También se ha encontrado amplificación de *mdm2* en glioblastomas y carcinoma de pecho (Reifenberger et al., 1993; Sheikh et al., 1993). Otros estudios han ayudado al entendimiento de las consecuencias biológicas de la sobreexpresión de MDM2 en cultivo de tejidos y han indicado que podría cooperar con *ras* en la transformación de FERs. El análisis detallado de este *foci* reveló la presencia de *p53* silvestre, en contraste a otros estudios que reportan que la transformación por *myc* y *ras* no puede tolerar la expresión de *p53* silvestre. Esto lleva a la hipótesis de que la sobreexpresión de MDM2 causada por la amplificación del gen representa un mecanismo alternativo para inactivar la función de p53.

La relación entre MDM2 y p53 va más allá de interacciones proteína-proteína. El gen *mdm2* contiene un sitio de unión para p53, el cual, cuando es puesto junto a un promotor mínimo estimula la transcripción en un forma dependiente de p53. De hecho, la unión de p53 al gen *mdm2* estimula la transcripción de un transcripto único que produce una proteína MDM2 capaz de unirse a p53 e inactivarlo (Barak et al., 1994; Juven et al., 1993). Estos datos demuestran claramente un feedback autoregulator por medio del cual p53 y MDM2 se regulan uno a otro.

Para estudiar las interacciones de MDM2 y p53 *in vivo* se deletó el gen *mdm2* en ratones utilizando recombinación homóloga en células embrionarias estaminales (ES). Se obtuvieron ratones heterocigotos para el alelo deletado de *mdm2* y fueron fenotípicamente normales y fértiles. Sin embargo, no se identificaron mutantes homocigotos entre más de 50 crías nacidas de cruza entre heterocigotos, lo cual indicaba que los ratones deficientes en *mdm2* estaban muriendo durante la embriogénesis. Al analizar los embriones en diferentes etapas, se logró saber que mueren entre los 3.5 y 5.5 días de gestación (Montes de Oca Luna et al., 1995).

Ya que *p53*, *p21* y *mdm2* son altamente expresados en células ES, lo cual indica que se expresan de manera temprana durante el desarrollo, se pudo hipotetizar que la letalidad embrionaria observada en ratones mutantes carentes de *mdm2*, es causada por la incapacidad de regular negativamente apoptosis o inhibición de la división celular dependientes de p53. Como los ratones deficientes en *p53* son viables y fértiles, se hicieron cruza entre ratones heterocigotos para *mdm2* y para *p53*. Al analizar la

descendencia, se lograron identificar animales mutantes homocigotos para *mdm2* en un fondo genético deficiente de *p53*, pero no cuando *p53* era heterocigoto o silvestre. El rescate de la letalidad de embriones *mdm2* *-/-* en un fondo genético deficiente de *p53* sugiere una de las principales funciones de MDM2 es la de regular negativamente la actividad de *p53* (Montes de Oca Luna et al., 1995).

### III. *p21* / *WAF-1* / *Cip1*

El gen *p21*, que codifica una proteína inhibidora de CDKs (Harper and et.al., 1993; Xiong et al., 1993), es uno de los principales blancos de *p53* involucrado en el proceso de la inhibición de la división celular (el-Deiry et al., 1993). Se localiza en el cromosoma 6p21.2 del ratón y su secuencia, estructura y activación por *p53* está conservada entre los roedores. Por análisis de hibridación sustractiva se aisló un fragmento del cDNA humano de *WAF-1* (wild-type *p53* actived fragment) a partir de células que sobreexpresaban *p53* (el-Deiry et al., 1993). Las proteínas *Cip1* (Cdk-interacting protein), *p21* y *p20CAP*, que son idénticas a *WAF-1* fueron coincidentemente descubiertas en levaduras mediante la técnica “two-hybrid screening” para proteínas humanas que pudiesen interactuar con *CDK2*, o en secuenciación de péptidos y posterior clonación de una proteína que co-inmunoprecipite con ciclina D o *CDK2*. *p21* también fué aislado en un análisis funcional como un inhibidor de la síntesis de DNA en células senescentes, *Sdi1* (senescent cell DNA synthesis inhibitor) (Cox and Lane, 1995).

El gen *p21* contiene dos elementos de respuesta a p53 en su promotor, lo que lo convierte en un blanco directo de p53. Codifica una proteína de 21 kD que forma un complejo cuaternario con ciclina, CDK y PCNA en células que se encuentran dividiéndose de manera normal (Xiong et al., 1992). La estequiometría de este complejo puede variar y se ha postulado que una molécula de p21 en un complejo permite la actividad de kinasa, mientras que dos o más moléculas de p21 son inhibitorias. Este complejo cuaternario no ha sido observado en células transformadas, lo que sugiere que puede ser importante para modular el ciclo celular en células normales y que su ausencia contribuye a la progresión de neoplasias (Zhang et al., 1994).

Se ha descubierto que p21 y algunas otras proteínas pequeñas funcionan como inhibidores de los complejos ciclina/CDK. En ensayos de transfección temporal, la sobreexpresión de p21 con un marcador de selección produce un decremento en la resistencia de las colonias a drogas (Cox and Lane, 1995). p21 funciona como un supresor del crecimiento en muchas líneas celulares, pero no se le ha encontrado implicación en apoptosis y tampoco se encuentra mutada en tumores.

La regulación positiva de la expresión de *p21* por p53 en respuesta a radiación puede inhibir la actividad de ciclina E/CDK2, permitiendo la acumulación de la proteína retinoblastoma (Rb) hipofosforilada, que resulta en un bloqueo del ciclo celular en la fase G1. Además, p21 también inhibe el complejo ciclina A/CDK2 que actúa en G1/S, el complejo ciclina A/CDC2 que actúa en la fase S y en la etapa inicial de la fase G2, y se ha mostrado actividad inhibitoria en contra de complejos de ciclina D/CDKs (Figura 4). Sin

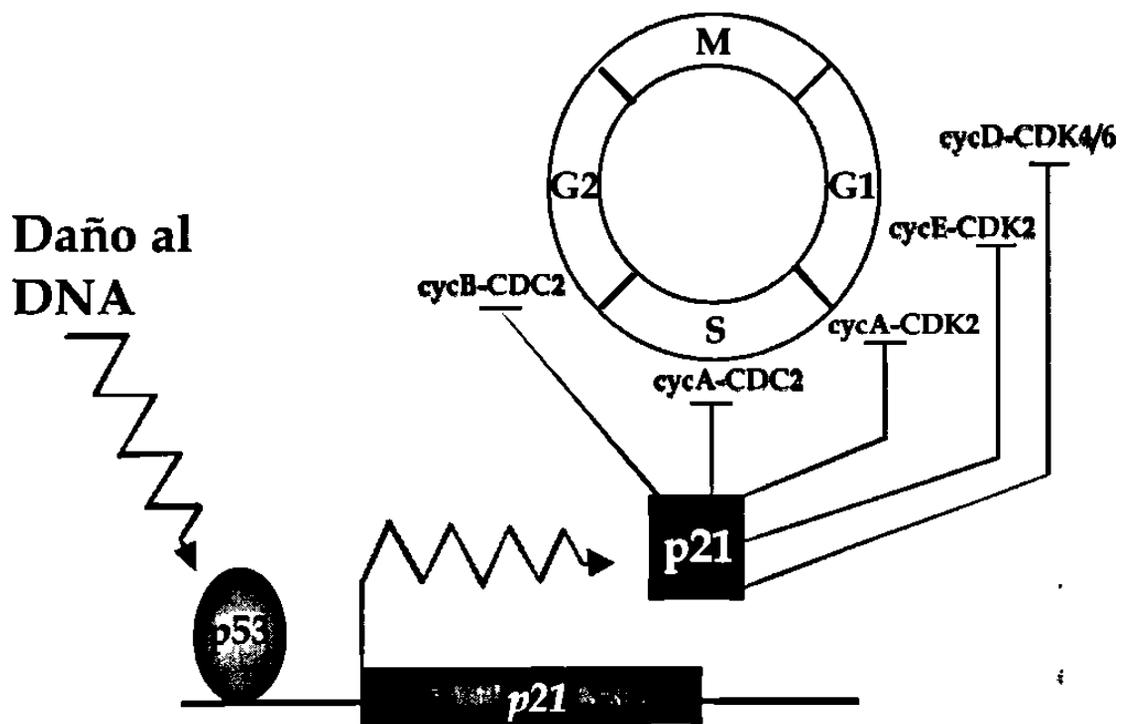


Figura 4. Inhibición de CDKs por p21. G1, S, G2 y M= Fases del ciclo celular; cyc= ciclina; CDK= kinasa dependiente de ciclina. Flechas indican inducción y las otras líneas (⊥) bloqueo.

embargo, se ha encontrado que fibroblastos deficientes en *p21* son solo parcialmente deficientes en su respuesta a daño en el DNA. La expresión de *p21* en una variedad de tejidos provenientes de ratones deficientes de *p53* sugiere que *p21* es también regulado por mecanismos independientes de *p53* (Parker et al., 1995).

Se ha logrado la generación de un ratón con una deficiencia homocigota de *p21* en línea germinal que, al igual que los ratones *p53* *-/-*, no muestran algún fenotipo especial, son viables y fértiles. Estas características los convierte en una buena herramienta para el estudio *in vivo* de las interacciones de *p21* con otros genes involucrados en la vía de *p53* (Brugarolas et al., 1995).

#### **IV. *bax***

Este gen fue identificado originalmente en experimentos de co-immunoprecipitación por su interacción con Bcl-2, el cual es un gen represor de la muerte celular programada. Con la clonación y secuenciación del gen *bax* se encontró que consiste de seis exones contenidos en una región de 4.5 kb. La información que codifica la proteína es contribuida por los seis exones. Los marcos de lectura (ORFs) de *bax* en el humano y en el ratón tienen 576 pb y presentan una homología del 89.4 %. Ambos ORFs codifican una proteína de 192 aminoácidos con un peso molecular predicho de 21.4 kD. Las proteínas Bax murina y de humano son altamente conservadas, siendo 96 % homólogas con solamente seis cambios conservativos de aminoácidos y ocho no

conservativos, localizados principalmente en la mitad amino terminal. El RNA de *bax* muestra un complejo patrón de maduración, del cual se predicen tres formas de Bax:  $\alpha$ , de 21 kD y que posiblemente contiene un segmento transmembranal;  $\beta$ , de 24 kD y localización citoplasmática; y  $\gamma$  de 4.5 kD y también citoplasmática (Oltvai et al., 1993).

Se ha encontrado una identidad del 20.8 % y una similaridad del 43.2 % entre los genes humanos de *Bcl-2* y *Bax* (p21). La mayor homología se localiza en dos dominios, BH1 y BH2, los cuales han sido implicados en la regulación de la formación de dímeros. La homología y asociación física entre Bax y Bcl-2 sugirió que Bax podría modular también la muerte celular programada. La sobreexpresión de Bax acelera la muerte apoptótica inducida por la eliminación de citocina en una línea celular dependiente de IL-3 (Oltvai et al., 1993).

La relación Bcl-2/Bax determina la susceptibilidad a muerte después de un estímulo apoptótico. Cuando Bcl-2 está en exceso, las células están protegidas. Sin embargo, cuando Bax está en exceso y predomina su homodímero, las células son susceptibles a apoptosis (Figura 5). Pueden ser varios los mecanismos por los cuales esta interacción proteína-proteína ejerza su función reguladora. Bax puede funcionar como una molécula efectora de muerte que es neutralizada por Bcl-2. En este escenario, Bcl-2 puede ser simplemente un componente inerte que disrumpe la formación de homodímeros de Bax. Por otra parte, Bcl-2 podría poseer una función bioquímica que sea opuesta a Bax. Otro posible mecanismo sería que Bcl-2 funcione como una molécula

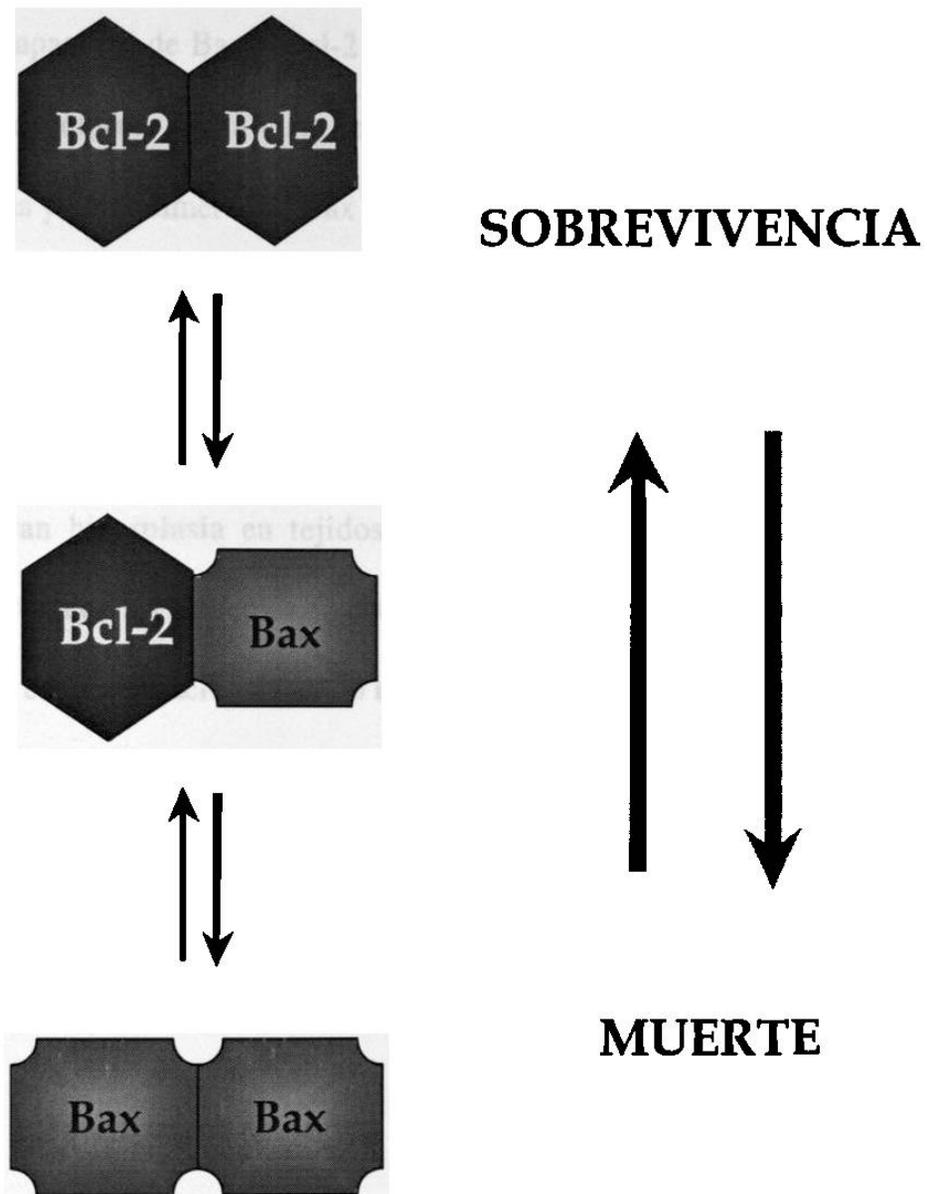


Figura 5. Modelo de las interacciones Bcl-2/Bax y la regulación de la apoptosis.

represora de muerte y que sea reprimida por una molécula Bax inerte. De cualquier manera, la capacidad de Bax y Bcl-2 para competir en la formación de dímeros sugiere una relación recíproca en la cual, monómeros u homodímeros de Bcl-2 favorecen la sobrevivencia y homodímeros de Bax favorecen la muerte (Oltvai et al., 1993).

Con la generación de un ratón deficiente en *bax* se han logrado conocer importantes aspectos de su función *in vivo*. Estos ratones presentan un fenotipo normal, pero muestran hiperplasia en tejidos linfoides. Los machos *bax* *-/-* son estériles y presentan atrofia en los testículos, en conjunto con azoospermia, lo cual podría suponer un papel de *bax* en la regulación del ciclo meiótico. En contraste, los ovarios de hembras *bax* *-/-* se presentan relativamente normales en cuanto al desarrollo de oocitos y la formación folicular. Sin embargo, se han encontrado acumulaciones de células granulosas atrofiadas, que presumiblemente fallaron en entrar en apoptosis. Este resultado establece un papel para Bax en la muerte de células granulosas (Knudson et al., 1995).

## **HIPOTESIS**

**La ausencia del gen *p21* ó *bax* rescata la letalidad embrionaria  
causada por *p53* en ratones carentes de *mdm2*.**

## OBJETIVOS

Determinar si la letalidad embrionaria causada por *p53* en ratones carentes de *mdm2* es mediada por los genes blanco de *p53*, *p21* o *bax* involucrados en las vías de inhibición de la división celular y apoptosis respectivamente.

A. Generar ratones que carezcan de los genes *mdm2/p21* y

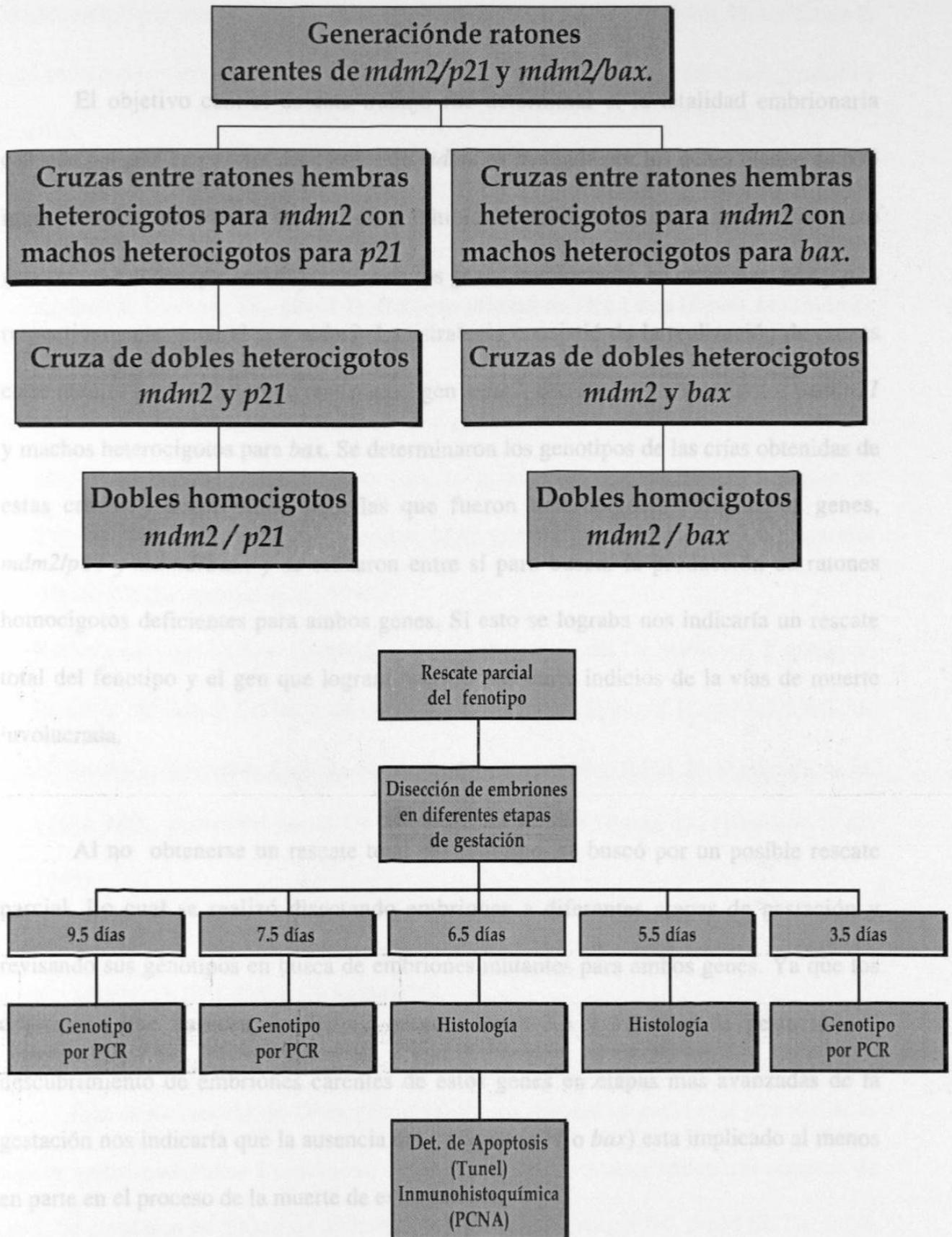
*mdm2/bax*.

B. Determinar si la ausencia del gen *p21* o *bax* rescata el fenotipo de letalidad embrionaria causada por la ausencia del gen *mdm2*.

C. Determinar la fase embrionaria en que se produce la muerte de los ratones que carecen de los genes *mdm2/p21* o *mdm2/bax*.

D. Determinar si la vía responsable de la letalidad embrionaria es apoptosis.

## DIAGRAMA DE FLUJO



## MATERIALES Y METODOS

El objetivo central de este trabajo fué determinar si la letalidad embrionaria causada por *p53* en ratones deficientes de *mdm2* es mediada por los genes blanco de *p53* implicados en las vías de apoptosis o inhibición del crecimiento celular. Para esto generamos ratones que son deficientes en los genes involucrados en estas vías, *bax* y *p21* respectivamente, y en el gen *mdm2*. La estrategia consistió de la realización de cruzas entre ratones hembra heterocigotos para el gen *mdm2*, con machos heterocigotos para *p21* y machos heterocigotos para *bax*. Se determinaron los genotipos de las crías obtenidas de estas cruzas y se eligieron aquellas que fueron heterocigotas para ambos genes, *mdm2/p21* y *mdm2/bax*, y se cruzaron entre sí para buscar la producción de ratones homocigotos deficientes para ambos genes. Si esto se lograba nos indicaría un rescate total del fenotipo y el gen que lograra hacerlo nos daría indicios de la vías de muerte involucrada.

Al no obtenerse un rescate total del fenotipo, se buscó por un posible rescate parcial. Lo cual se realizó disectando embriones a diferentes etapas de gestación y revisando sus genotipos en busca de embriones mutantes para ambos genes. Ya que los embriones que carecen de *mdm2* mueren entre 3.5 y 5.5 días de gestación, el descubrimiento de embriones carentes de estos genes en etapas mas avanzadas de la gestación nos indicaría que la ausencia del otro gen (*p21* o *bax*) esta implicado al menos en parte en el proceso de la muerte de estos ratones.

Los ratones que utilizamos en este trabajo se citan a continuación y básicamente se obtuvieron por medio de recombinación homóloga de genes (apéndice 1), mediante la cual se introduce una secuencia exógena dentro del gen silvestre, el cual queda mutado e inactivo.

1. Ratones carentes en *mdm2*. Creados en el laboratorio de la Dra Guillermina Lozano, Departamento de Genética Molecular, Universidad de Texas, Centro de Cáncer M.D. Anderson, Houston Tx., por el Dr Roberto Montes de Oca Luna (figura 11) (Montes de Oca Luna et al., 1995).
2. Ratones carentes en *p21*. Facilitados por el laboratorio del Dr Tyler Jacks, Instituto Médico Howard Hughes, Centro para la Investigación del Cáncer, Instituto de Tecnología Massachusetts, Cambridge, MA., generados por el Dr James Brugarolas (figura 12) (Brugarolas et al., 1995).
3. Ratones carentes en *bax*. Facilitados por el laboratorio del Dr Stanley J. Korsmeyer, Instituto Médico y División de Oncología Molecular Howard Hughes, Deptos. de Medicina y Patología, Escuela de Medicina de la Universidad de Washington, St. Louis, MO., generados por el Dr C. Michael Knudson (figura 13) (Knudson et al., 1995).

## **AISLAMIENTO DEL DNA GENOMICO**

Para la extracción de DNA genómico de los ratones se cortó una porción de la cola de aproximadamente 1 centímetro de largo cuando los ratones tenían tres semanas de edad. Se colocaron en 500 µl de un buffer de lisis (0.1M Tris pH 8.0, 5mM EDTA, 0.2%

SDS, 0.2M NaCl) con 15 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubaron en agitación suave a 55°C toda la noche. Se agitaron en el vortex por 1 o 2 segundos y se centrifugaron a 14000 rpm durante 6 minutos. Se tomaron 400 µl del sobrenadante y se pasaron a un tubo nuevo. Se añadió un volumen igual de isopropanol y se mezclaron por inversión hasta que se observaba precipitación del DNA. Se centrifugaron 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se le añadió 1 ml de etanol al 70%. Se agitaron, se centrifugaron 4 minutos a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se dejaron secar a temperatura ambiente o en una centrífuga con vacío y se redisolviéron en 300 µl de agua o buffer. De aquí, se utilizó 1 µl de una dilución 1:10 para realizar el PCR.

## DETERMINACION DEL GENOTIPO DE LOS RATONES

La determinación del genotipo de los ratones se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se utilizaron los siguientes juegos de oligonucleótidos iniciadores:

Para el gen *mdm2*:

*mdm04*: 5'-ATCTGAGAGCTCGTGCCCTTCG-3'

*mdm020*: 5'-TGTGGCTGGAGCATGGGTATTG-3'

*Neo3'd*: 5'-GGCGGAAAGAACCAGCTGGGGC-3'

Para el gen *p21*:

*p21UP*: 5'-AAGCCTTGATTCTGATGTGGGC-3'

*p21+21A*: 5'-GCTCCTGTGCGGAACAGGTCG-3'

*Neo18*: 5'-GTCGATCAGGATGATCTGGACG-3'

Para el gen *bax*:

*BaxI5-R*: 5'-GGGTTGACCAGAGTGGCGTAGG-3' .

*BaxE5-F*: 5'-GAGCTGATCAGAACCATCATGG-3'

*NeoR*: 5'-ACCCGCTTCCATTGCTCAGCGG-3'

Se utilizaron 100 ng de cada oligo por reacción a un volumen total de 25µl, que contenía lo siguiente:

1 µl de DNA

1 µl de cada oligo (100 ng/µl)

2.5 µl de buffer 10X para PCR

2.5 µl de dNTPs 2.5 mM

16 µl de agua

0.2 µl de Taq DNA polimerasa

Y el programa de temperaturas usado fué:

1 ciclo:

94°C durante 4 minutos

35 ciclos:

94°C durante 1 minuto

65°C durante 1 minuto

72°C durante 3 minutos

Finalmente:

72°C durante 7 minutos

Finalmente, los productos obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 0.8 % en buffer TBE 0.5X (Tris-Borato [Acido Bórico, Trizma Base] 0.045 M, EDTA 0.001 M) mediante una tinción con bromuro de etidio. El corrimiento de las muestras fué a un voltaje constante de 80 volts por un tiempo de 1.5 horas. Se revelaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

## **ANALISIS DE LOS EMBRIONES**

Al no obtenerse un rescate total del fenotipo letal, se procedió a la disección de embriones en diferentes etapas de gestación. Se llevaron a cabo cruzas entre ratones machos y hembras homocigotos mutantes para *p21* y heterocigotos para *mdm2*; y entre machos heterocigotos para *bax* y *mdm2* con hembras homocigotos mutantes para *bax* y heterocigotos para *mdm2*. En general, los embriones se obtuvieron por sacrificio y disección de la hembra preñada a diferentes días de gestación.

### **Embriones de 7.5 días.**

Las hembras fueron sacrificadas a los 7.5 días de gestación, se disectaron y se les extrajo el útero, dentro del cual se hayaban implantados los embriones. Posteriormente, los embriones contenidos dentro del saco vitelino fueron aislados de las estructuras que los contienen. Se colocaron en 50 µl de buffer de lisis (Buffer para PCR 1X , 1 mg/ml de Proteinasa K , 1% Tritón X-100) y se incubaron a 55°C durante tres horas en agitación suave. Se inactivó la proteinasa K por calentamiento a 95°C durante 5 minutos y se usaron 5 µl para determinar el genotipo por PCR.

### **Embriones de 6.5 días.**

Se sacrificaron las hembras a los 6.5 días de gestación y se les extrajeron los úteros, se cortaron las partes que contienen los embriones y se introdujeron en solución de Bouin o solución fijadora fría (10ml Formaldehído 37%, 90ml PBS 1X libre de Hg<sup>+2</sup> y Ca<sup>+2</sup>), se dejaron a 4°C durante toda la noche. Posteriormente fueron tratados como se describe en Procesamiento de Embriones para Histología. Una vez obtenidas las laminillas con las secciones de los embriones se sometieron a tinción con Hematoxilina y Eosina, o a tinción inmunohistoquímica para PCNA o detección de apoptosis (Tunel).

### **Embriones de 5.5 días.**

Mismo procedimiento utilizado con los embriones de 6.5 días, solo que a los 5.5 días de gestación y estos solo fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se analizaron al microscopio en busca de estructuras vacías, las cuales serían debidas a embriones muertos después de su implantación.

### **Embriones de 3.5 días.**

Se sacrificaron las hembras a los 3.5 días de gestación, se les extrajo el útero y se realizó un lavado interno del mismo con la ayuda de una jeringa de 1 ml. Se introdujo la aguja cerca de uno de los extremos del útero y se hizo pasar 1 ml de medio de cultivo a través de él, recolectando el líquido de lavado en una caja petri de 30 mm. Se observó la placa en un microscopio estereoscópico para localizar los blastocistos obtenidos y se recogieron con la ayuda de una microaguja. Se transfirieron a microtubos, un blastocisto por tubo, y se le añadieron 20 µl del buffer de lisis utilizado en los embriones de 7.5 días. Se incubaron por 3 horas en agitación suave a 55°C y luego 5 minutos a 95°C. Se utilizó todo el extracto para determinar el genotipo por PCR.

### **PROCESAMIENTO DE EMBRIONES PARA HISTOLOGIA**

Se sacrificó el ratón hembra en la fecha apropiada y se le removió el útero. Se disectaron los embriones con sus deciduas y se lavaron con PBS 1X frío dos veces. Se colocaron en el Fijador frío (10ml Formaldehído 37% , 90ml PBS 1X). Se fijaron por aprox. 26 hrs a 4°C, cambiando el fijador dos veces. Se deshidrataron incubándolos en etanol al 40% por 1 hr. Posteriormente en etanol al 50% por 1 hr., etanol al 70% por 2 hrs (los embriones se podían almacenar a -20°C en este paso), etanol al 80% por 30 min., etanol al 90% por 30 min., etanol al 96% por 30 min. y luego 1 hr., etanol al 100% por 30 min. y luego 1 hr. Se clarificaron sumergiéndolos en Xileno por 30 min. a temperatura ambiente. Se incubaron sumergidos en parafina (60°C) por 30 min. y luego 45 min. Se embebieron en los bloques de parafina y se cortaron secciones de 10 µm de grueso en un

microtomo. Se flotaron las secciones en agua caliente (45°C) y se colocaron en un portaobjetos. Se dejaron secar toda la noche sobre una placa caliente a 40°C.

## **TINCION DE HEMATOXILINA-EOSINA**

Para analizar la histología de los embriones se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina en las laminillas obtenidas previamente. El protocolo es el siguiente: Se remojaron las laminillas en Xilenos por 3 minutos. Posteriormente en la siguiente serie de solventes: Xilenos sumergir y sacar. Etanol al 100% sumergir y sacar, dos veces. Etanol al 95% sumergir y sacar, dos veces. Etanol al 70% sumergir y sacar, dos veces. Agua corriente hasta que se veían “limpias” (Aprox. 2 min). Sumergir en Agua destilada. Hematoxilina de Lerner 3X por 2 minutos (Filtrarla después de usar y almacenar). Agua corriente por 2 minutos. Dos sumergidas rápidas y luego sumergir lentamente en Etanol Acido (5ml de HCl concentrado en 500ml de Etanol al 70%). Agua corriente por 2 minutos (se repetía lo anterior si aún estaba muy oscuro). 5 o 6 sumergidas en Agua Amoniacal (Hidróxido de amonio al 0.25%). Agua corriente por 2 minutos. Sumergida rápida en Eosina-Y. Etanol al 70% sumergir y sacar, dos veces. Etanol al 95% sumergir y sacar, dos veces. Etanol al 100% sumergir y sacar. Etanol al 100% por 30 segundos. Xilenos por 1 minuto, dos veces. Se agrega 1 gota de Permout y se coloca el cubreobjetos. Se dejan secar las laminillas al aire.

## **DETERMINACION DE APOPTOSIS**

Para investigar el proceso de muerte que está ocurriendo en estos embriones se procedió a analizar dos posibilidades: apoptosis e inhibición del ciclo celular.

Para el análisis de apoptosis se utilizaron laminillas obtenidas de los embriones de 6.5 días de gestación y se sometieron al ensayo de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling), utilizando el kit "*In Situ Cell Death Detection, POD*". El rompimiento del DNA genómico durante la apoptosis puede dar lugar a fragmentos de DNA de doble cadena y bajo peso molecular (mono- y oligonucleosomas), así como a rompimientos de cadena sencilla (nicks) en DNAs de alto peso molecular. Estos rompimientos en las cadenas de DNA pueden ser identificados mediante el marcaje con nucleótidos modificados (fluoresceína) del grupo 3'-OH terminal en una reacción enzimática. En este kit se utiliza la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT), que cataliza la polimerización de nucleótidos en los grupos -OH de las terminales 3' de DNA en una forma independiente del templado. La fluoresceína incorporada es luego detectada por anticuerpos de borrego conjugados con peroxidasa (POD) de rábano (horse-radish). Finalmente, después de la reacción con el sustrato, las células teñidas pueden ser analizadas al microscopio de luz (Apéndice 3). Para este experimento se siguieron las instrucciones del fabricante.

## **DETERMINACION DE INHIBICION DE CICLO CELULAR**

### **(PROLIFERACION)**

Para el analisis de la inhibición del ciclo celular (proliferación) se utilizaron laminillas obtenidas de los embriones de 6.5 días de gestación y se sometieron inmuhistiquímica para PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Para este fin se utilizó el kit “ZYMED® PCNA Staining Kit” (Sistema Estravidina-Biotina para la tinción de PCNA). PCNA era conocido anteriormente con el nombre de ciclina. Es una proteína no histona, de peso molecular de 36 kDA , encontrada en el núcleo donde juega un papel en la iniciación de la proliferación celular mediante la DNA polimerasa. Los niveles de PCNA son elevados en las fases S, G2 y M del ciclo celular de células en mitosis en tejidos normales o malignos. Su expresión tiene una amplia correlación con la actividad mitótica y puede ser usada como un marcador para la proliferación celular, *in vivo* como *in vitro*. Este kit utiliza un anticuerpo monoclonal biotilado anti-PCNA (clona PC10), por lo que se elimina la necesidad de un anticuerpo secundario específico de especie, trayendo como resultado una tinción excepcionalmente limpia debido a la ausencia de background causado por la reacción cruzada con inmunoglobulinas endógenas. Utiliza estreptavidina-peroxidasa como generador de señal y diaminobencidina (DAB) como cromógeno para dar una tinción café oscuro a los núcleos que contienen PCNA (Apéndice 4).

## RESULTADOS

### GENOTIPIFICACION DE RATONES Y EMBRIONES.

En la figura 6 se muestran los productos de PCR obtenidos en la genotipificación de los ratones o embriones utilizando el sistema de tres oligonucleótidos iniciadores descrito anteriormente.

### RESCATE DE LA LETALIDAD EMBRIONARIA DE RATONES *mdm2* *-/-* MEDIANTE LA ELIMINACION SIMULTANEA DE *p21*.

Debido a que la delección de *p53* rescató la letalidad embrionaria de los ratones carentes de *mdm2*, se quiso determinar si un gen blanco de *p53*, *p21*, podría producir el mismo efecto. Para este objetivo, se cruzaron ratones heterocigotos para un alelo inactivado de *p21* (*p21* *+/-*) con hembras heterocigotas para *mdm2* (*mdm2* *+/-*). De dichas cruza se obtuvieron ratones que fueron heterocigotos tanto para *p21* como para *mdm2* (*p21* *+/-* *mdm2* *+/-*). Estos ratones fueron a su vez cruzados entre sí para determinar si los ratones carentes de ambos genes (*p21* *-/-* *mdm2* *-/-*) que se pudieran producir, eran viables. De estas cruza, únicamente 1 de 16 ratones podría carecer de ambos genes. De 26 ratones nacidos, ninguno fué carente de ambos genes. El resto de los genotipos se obtuvo en la relación esperada (Tabla 1). Para incrementar el porcentaje de ratones que se podrían esperar ser carentes de ambos genes, se cruzaron entre sí ratones

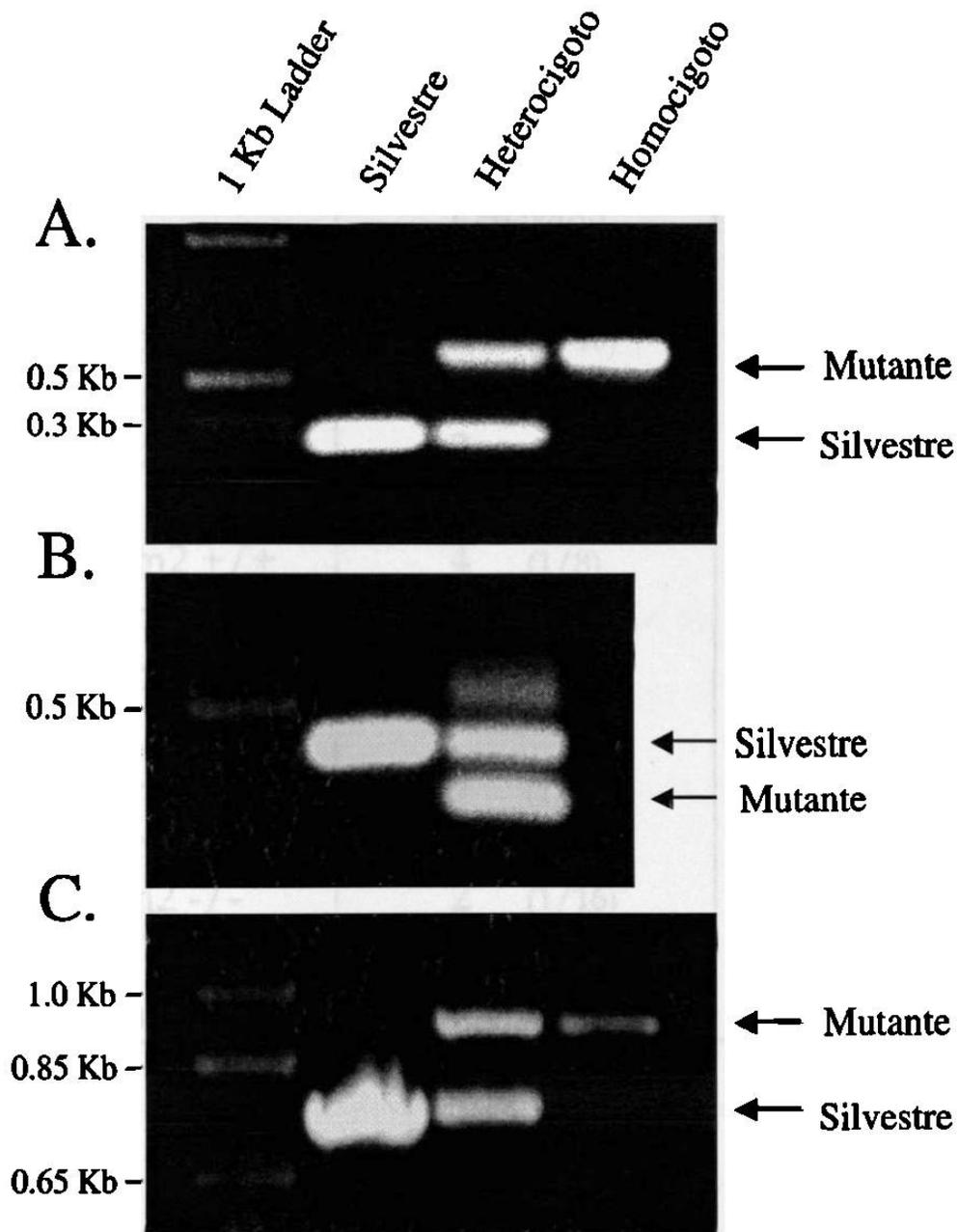


Figura 6. Productos de PCR en la genotipificación de ratones y embriones. A, para el gen *bax* B, para el gen *mdm2* C, para el gen *p21*.

Genotipo	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
p21 +/+ mdm2 +/+	2 (1/16)	3
p21 +/+ mdm2 +/-	4 (1/8)	4
p21 +/+ mdm2 -/-	2 (1/16)	0
p21 +/- mdm2 +/+	4 (1/8)	4
p21 +/- mdm2 +/-	8 (1/4)	9
p21 +/- mdm2 -/-	4 (1/8)	0
p21 -/- mdm2 +/+	2 (1/16)	4
p21 -/- mdm2 +/-	4 (1/8)	2
p21 -/- mdm2 -/-	2 (1/16)	0
<b>Total</b>		<b>26</b>

TABLA 1. Análisis Genético de ratones mutantes *p21/mdm2*. Resultados del análisis de PCR para los genes *p21* y *mdm2* de los ratones obtenidos de las cruzas entre ratones dobles heterocigotos (*p21 +/- mdm2 +/-* X *p21 +/- mdm2 +/-*). Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada genotipo.

carentes de *p21* y heterocigotos para *mdm2* (*p21* *-/-* *mdm2* *+/-*). De estas cruces, el 25% de la progenie se espera que sea carente de ambos genes. De 46 ratones nacidos, 11 (24%) fueron *p21* *-/-* *mdm2* *+/+*, 35 (76%) *p21* *-/-* *mdm2* *+/-* y ninguno fue *p21* *-/-* *mdm2* *-/-* (Tabla 2). Estos resultados indican que la delección de *p21*, a diferencia de la delección de *p53*, no rescata la letalidad de los embriones *mdm2* *-/-*.

## RESCATE PARCIAL

La ausencia de *p21* no fue suficiente para lograr que los embriones *mdm2* *-/-* vivieran hasta el nacimiento, pero aún cabía la posibilidad de un rescate parcial, esto es, que lograra que los embriones sobrevivieran más allá de los 5.5 días de gestación. Para probar esto, de nuevo se cruzaron entre sí ratones *p21* *-/-* *mdm2* *+/-* y las hembras preñadas se sacrificaron a diferentes tiempos durante la gestación para analizar los embriones.

### 9.5 DIAS

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos de 14 deciduas que fueron analizadas en esta etapa. Fenotípicamente, 13 deciduas contenían embriones normales y 1 estaba vacía. El genotipo encontrado fue de 7 embriones *p21* *-/-* *mdm2* *+/+*, 6 *p21* *-/-* *mdm2* *+/-* y ninguno *p21* *-/-* *mdm2* *-/-*. Estos resultados indican que no hay rescate parcial del fenotipo a los 9.5 días de gestación.

Genotipo	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
p21 -/- mdm2 +/+	11 (1/4)	11
p21 -/- mdm2 +/-	23 (1/2)	35
p21 -/- mdm2 -/-	11 (1/4)	0
Total		46

TABLA 2. Análisis Genético de ratones mutantes *p21/mdm2*. Resultados del análisis de PCR para los genes *p21* y *mdm2* de los ratones obtenidos de las cruzas entre ratones carentes de *p21* y heterocigotos para *mdm2* (*p21* -/- *mdm2* +/- X *p21* -/- *mdm2* +/-). Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada genotipo.

A.

Fenotipo	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
Normal	10-11 (3/4)	13
Anormal	3-4 (1/4)	1
Total		14

B.

Genotipo	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
p21 -/- mdm2 +/+	3 (1/4)	7
p21 -/- mdm2 +/-	6-7 (1/2)	6
p21 -/- mdm2 -/-	3 (1/4)	0
Total		13

TABLA 3. A, Análisis Histológico de embriones mutantes *p21/mdm2* de 9.5 días obtenidos de las cruzas entre ratones carentes de *p21* y heterocigotos para *mdm2* (*p21* -/- *mdm2* +/- X *p21* -/- *mdm2* +/-) B, Análisis Genético de los embriones normales que son presentados en A. Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada fenotipo o genotipo.

## 7.5 DIAS

El análisis de 42 deciduas en esta etapa de la gestación produjo los resultados que se presentan en la tabla 4. De las 42 deciduas, 35 contenían embriones normales y 7 estaban vacías. Mientras que el genotipo de los 35 embriones encontrados fué: 10 embriones *mdm2* +/+, 25 embriones *mdm2* +/- y ninguno *mdm2* -/-. El número de deciduas vacías y la ausencia de embriones *mdm2* -/- concuerdan con lo esperado y nos indica que no se ha logrado rescatar el fenotipo a los 7.5 días de gestación.

## 5.5 DIAS

Aún permanecía la posibilidad de que la ausencia de *p21* retardara la muerte de los embriones *mdm2* -/- por un período de tiempo muy corto. Para revisar si este era el caso, se cruzaron ratones *p21* -/- *mdm2* +/- entre sí, se sacrificaron las hembras preñadas a los 5.5 días de gestación, se disectaron las deciduas que contienen los embriones y se embebieron en parafina. Los resultados del análisis histológico de 25 deciduas se muestran en la tabla 5. Cinco (20%) de estas deciduas estaban vacías (Figura 7). Este número de deciduas vacías corresponde con el observado previamente en las cruces entre ratones *mdm2* +/-, que era de aproximadamente 25% (Montes de Oca Luna et al., 1995). Por lo tanto, la ausencia de *p21* no es capaz de rescatar parcialmente la letalidad de los embriones *mdm2* -/-.

**A.**

Fenotipo	Número de Embriones	
	Esperado	Observado
Normal	32 (3/4)	35
Anormal	10 (1/4)	7
Total		42

**B.**

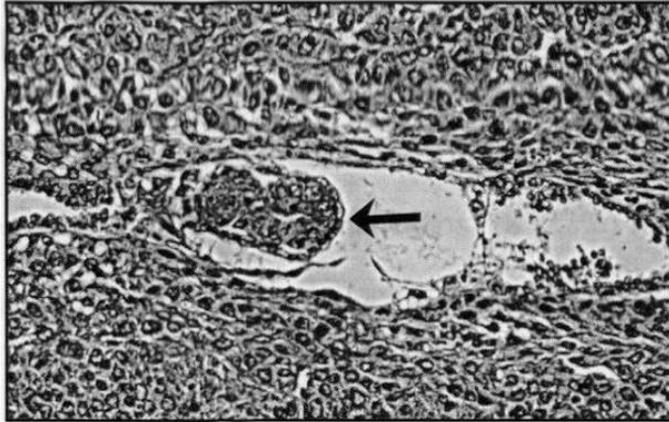
Genotipo	Número de Embriones	
	Esperado	Observado
p21 -/- mdm2 +/+	9 (1/4)	10
p21 -/- mdm2 +/-	18 (1/2)	25
p21 -/- mdm2 -/-	9 (1/4)	0
Total		35

TABLA 4. A, Análisis Histológico de embriones mutantes *p21/mdm2* de 7.5 días obtenidos de las cruces entre ratones carentes de *p21* y heterocigotos para *mdm2* (*p21* -/- *mdm2* +/- X *p21* -/- *mdm2* +/-) B, Análisis Genético de los embriones normales que son presentados en A. Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada fenotipo o genotipo.

Fenotipo	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
Normal	19 (3/4)	20
Anormal	6 (1/4)	5
Total		25

TABLA 5. Análisis Histológico de embriones mutantes *p21/mdm2* a los 5.5 días de gestación obtenidos de las cruzas entre ratones carentes de *p21* y heterocigotos para *mdm2* (*p21* *-/-* *mdm2* +/- X *p21* *-/-* *mdm2* +/-). Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada fenotipo.

A.



B.

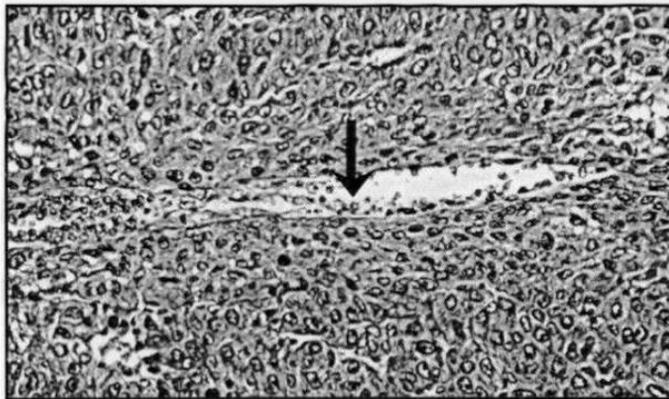


Figura 7. Histología de embriones mutantes *p21/mdm2* de 5.5 días de gestación, tinción de hematoxilina y eosina. A, Decidua con embrión normal. B, Decidua vacía. Las flechas indican el lugar donde se encuentra o debería encontrarse el embrión.

### **3.5 DIAS**

Aún restaba un posible cambio en el fenotipo de los embriones *p21* *-/-* *mdm2* *-/-*, este era que la ausencia de *p21* hiciera que los embriones murieran antes de los 5.5 días de la gestación. Para probar si esto estaba pasando, se analizaron embriones de 3.5 días de gestación (blastocistos) provenientes de las cruzas entre ratones *p21* *-/-* *mdm2* *+/-*. En la tabla 6 se muestra que de 83 blastocistos analizados, 18 (22%) fueron *mdm2* *+/+*, 43 (52%) fueron *mdm2* *+/-* y 22 (26%) fueron *mdm2* *-/-*. Con esto se demostró la presencia de embriones *p21* *-/-* *mdm2* *-/-*, lo que nos indica que *p21* no afecta el desarrollo de los embriones *mdm2* *-/-*.

### **RESCATE DE LA LETALIDAD EMBRIONARIA DE LOS RATONES *mdm2* *-/-* MEDIANTE LA ELIMINACION SIMULTANEA DE *bax*.**

La letalidad embrionaria de los ratones *mdm2* *-/-* es debida a una función descontrolada de *p53*, ya que su delección logra rescatar el fenotipo. Se detrmínó si otro gen blanco de *p53*, *bax*, era capaz de producir el mismo rescate. Para este fin se cruzaron ratones heterocigotos para un alelo inactivado de *bax* (*bax* *+/-*) con ratones heterocigotos para *mdm2* (*mdm2* *+/-*). De estas cruzas se obtuvieron ratones dobles heterocigotos, *bax* *+/-* *mdm2* *+/-*, que fueron a su vez cruzados entre sí buscando generar ratones carentes de ambos genes (*bax* *-/-* *mdm2* *-/-*). En este tipo de cruzas se esperaba que 1 de 16 ratones fuera *bax* *-/-* *mdm2* *-/-*. De 90 ratones analizados, ninguno fué carente de ambos genes (Tabla 7). Para aumentar la probabilidad de obtener ratones *bax* *-/-* *mdm*

Genotipo	Número de Embriones	
	Esperado	Observado
p21 -/- mdm2 +/+	21 (1/4)	18
p21 -/- mdm2 +/-	41 (1/2)	43
p21 -/- mdm2 -/-	21 (1/4)	22
Total		83

TABLA 6. Análisis Genético de embriones mutantes *p21/mdm2* de 3.5 días de gestación obtenidos de las cruces entre ratones carentes de *p21* y heterocigotos para *mdm2* (*p21* -/- *mdm2* +/- X *p21* -/- *mdm2* +/-). Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada genotipo.

Genotipo	Número de Embriones	
	Esperado	Observado
bax +/+ mdm2 +/+	6 (1/16)	7
bax +/+ mdm2 +/-	11 (1/8)	21
bax +/+ mdm2 -/-	6 (1/16)	0
bax +/- mdm2 +/+	11 (1/8)	10
bax +/- mdm2 +/-	22 (1/4)	31
bax +/- mdm2 -/-	11 (1/8)	0
bax -/- mdm2 +/+	6 (1/16)	7
bax -/- mdm2 +/-	11 (1/8)	14
bax -/- mdm2 -/-	6 (1/16)	0
Total		90

TABLA 7. Análisis Genético de ratones mutantes *bax/mdm2* obtenidos de las cruzas entre ratones heterocigotos para *bax* y *mdm2* (*bax* +/- *mdm2* +/- X *bax* +/- *mdm2* +/-). Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada genotipo.

-/-, se realizaron cruces entre machos doble heterocigotos (*bax +/- mdm2 +/-*) y hembras carentes de *bax* y heterocigotas para *mdm2* (*bax -/- mdm2 +/-*), aquí se esperaba que 1 de cada 8 ratones fuera *bax -/- mdm2 -/-*. De 67 ratones analizados, ninguno fué carente de *mdm2* (Tabla 8). Los resultados obtenidos demuestran que la delección de *bax* no logra rescatar el fenotipo de los embriones *mdm2 -/-*.

## **RESCATE PARCIAL**

La delección de *bax* en los ratones *mdm2 -/-* no logró salvar el fenotipo letal. El siguiente paso fué probar la posibilidad de un rescate parcial. Se cruzaron machos doble heterocigotos (*bax +/- mdm2 +/-*) con hembras carentes de *mdm2* y heterocigotas para *mdm2* (*bax -/- mdm2 +/-*). Las hembras preñadas fueron sacrificadas en diferentes etapas de la gestación y los embriones se disectaron para su análisis.

### **7.5 DIAS**

Se analizaron 55 deciduas en esta etapa y de ellas, 45 (82%) contenían embriones normales mientras que las 10 (18%) restantes estaban vacías. Se determinó el genotipo de 42 embriones encontrándose que ninguno de ellos era carente de *mdm2* (Tabla 9). Esto indica que no hay rescate parcial de la letalidad en embriones *mdm2 -/-* por la ausencia de *bax* a los 7.5 días de gestación.

Genotipo	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
bax +/- mdm2 +/+	8 (1/8)	11
bax +/- mdm2 +/-	17 (1/4)	23
bax +/- mdm2 -/-	8 (1/8)	0
bax -/- mdm2 +/+	8 (1/8)	11
bax -/- mdm2 +/-	17 (1/4)	22
bax -/- mdm2 -/-	8 (1/8)	0
Total		67

TABLA 8. Análisis Genético de ratones mutantes *bax/mdm2* obtenidos de las cruzas entre machos heterocigotos para *bax* y *mdm2* y hembras carentes de *bax* y heterocigotas para *mdm2* (*bax* +/- *mdm2* +/- X *bax* -/- *mdm2* +/-). Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada genotipo.

A.

Fenotipo	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
Normal	41 (3/4)	45*
Anormal	14 (1/4)	10
Total		55

\* 3 perdidos

B.

Genotipo	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
<i>bax</i> +/- <i>mdm2</i> +/+	5 (1/8)	6
<i>bax</i> +/- <i>mdm2</i> +/-	10 (1/4)	8
<i>bax</i> +/- <i>mdm2</i> -/-	5 (1/8)	0
<i>bax</i> -/- <i>mdm2</i> +/+	5 (1/8)	14
<i>bax</i> -/- <i>mdm2</i> +/-	10 (1/4)	14
<i>bax</i> -/- <i>mdm2</i> -/-	5 (1/8)	0
Total		42

TABLA 9. A, Análisis Histológico de embriones mutantes *bax/mdm2* de 7.5

días obtenidos de las cruzas entre machos heterocigotos para *bax* y *mdm2* y hembras carentes de *bax* y heterocigotas para *mdm2* (*bax* +/- *mdm2* +/- X *bax* -/- *mdm2* +/-) B, Análisis Genético de los embriones normales que son presentados en A. Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada fenotipo o genotipo.

## 5.5 DIAS

Se realizó un análisis histológico de embriones en esta etapa de la gestación. Dado que la muerte de los embriones *mdm2* *-/-* inicia en la etapa de blastocisto previo a la implantación (Lisa L. Amelse, comunicación directa) y puesto que no hay tejido embrionario a los 5.5 días de gestación, la presencia de embriones en esta etapa nos indicaría un rescate parcial. Está establecido que de las cruces entre ratones heterocigotos para *mdm2* y silvestre para *bax*, el 25% de las deciduas analizadas a esta edad están vacías (Montes de Oca Luna, et al. 1995). Y como el fenotipo de carencia de *bax* no es letal, este porcentaje no cambiaría en las cruces realizadas para este experimento, únicamente los embriones carentes de *mdm2* estarían ausentes. En la tabla 10 se muestra que de 30 deciduas analizadas, se esperaba que 8 estuvieran vacías. Sin embargo, solamente se encontraron 3 (Figura 8). Esto nos indica que la ausencia de *bax* está permitiendo a los embriones carentes de *mdm2* sobrevivir al menos hasta los 5.5 días de la gestación.

## 6.5 DIAS

Debido a que la ausencia de *bax* logró un rescate parcial del fenotipo de los embriones *mdm2* *-/-* al menos hasta los 5.5 días de la gestación y cambió la letalidad a la etapa comprendida entre 5.5 y 7.5 días en lugar de entre 3.5 y 5.5 días mostrado en los embriones *mdm2* *-/-*, se analizaron embriones de 6.5 días para determinar exactamente el tiempo en que ocurre la muerte. Se analizaron 61 deciduas (Tabla 11), de las cuales, 15 se esperaba que estuvieran vacías. Solamente 10 presentaron anomalías, siendo en 8

Fenotipo	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
Normal	22 (3/4)	27
Anormal	8 (1/4)	3
Total		30

TABLA 10. Análisis Histológico de embriones mutantes *bax/mdm2* de 5.5

días obtenidos de las cruzas entre machos heterocigotos para *bax* y *mdm2* y hembras carentes de *bax* y heterocigotas para *mdm2* (*bax +/- mdm2 +/-* X *bax -/-mdm2 +/-*). Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada fenotipo.

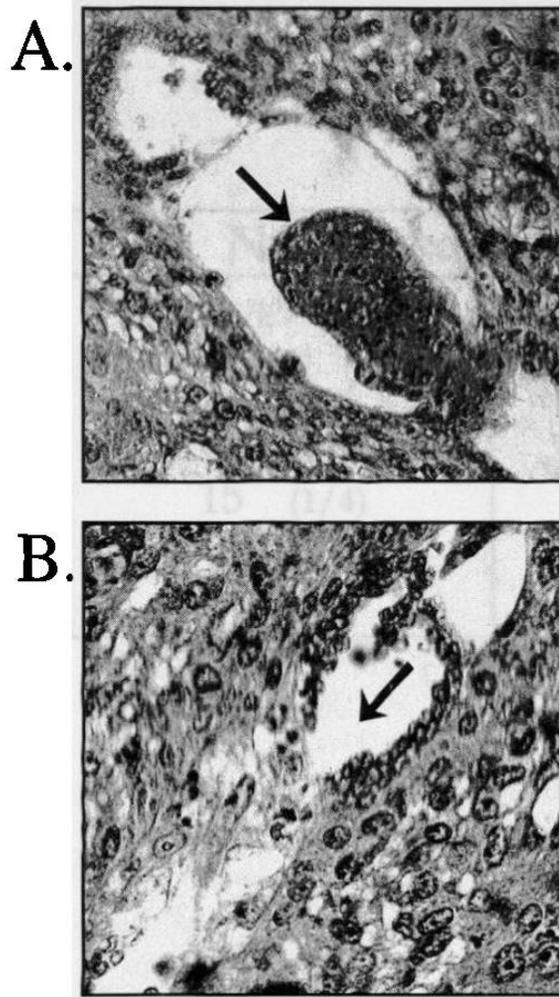


Figura 8. Análisis histológico de embriones mutantes *bax/mdm2* de 5.5 días de gestación.

Cortes transversales de deciduas obtenidas de las cruces de machos *bax +/- mdm2 +/-* y hembras *bax -/- mdm2 +/-*. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Embrión normal. B, Decidua vacía. Las flechas indican el lugar donde se encuentra o debería encontrarse el embrión.

Fenotipo	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
Normal	46 (3/4)	51
Anormal	15 (1/4)	10*
Total		61

\* 2 restos de embrión

TABLA 11. Análisis Histológico de embriones mutantes *bax/mdm2* de 6.5 días obtenidos de las cruzas entre machos heterocigotos para *bax* y *mdm2* y hembras carentes de *bax* y heterocigotas para *mdm2* (*bax +/- mdm2 +/-* X *bax -/-mdm2 +/-*). Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada fenotipo.

de ellas una ausencia total de embrión, mientras que las otras 2 mostraron restos del tejido embrionario (Figura 9). Estos resultados nos indican que la ausencia de *bax* logra producir un rescate parcial del fenotipo de letalidad embrionaria de los ratones carentes de *mdm2*, retrasando la letalidad de entre 3.5 y 5.5 días a 6.5 días de gestación.

## **MECANISMO DE LETALIDAD**

Se estableció que los embriones carentes de *bax* y *mdm2* logran sobrevivir hasta los 6.5 días de gestación. También se sabe que los embriones carentes de *mdm2* empiezan a morir a los 3.5 días de gestación por apoptosis (Lisa L. Amelse, comunicación directa). Debido a que *bax* es un gen involucrado en la inducción de apoptosis dependiente de p53, cabía la posibilidad de que el mecanismo de la letalidad en los embriones *bax* *-/-* *mdm2* *-/-* estuviera modificado.

## **APOPTOSIS**

Para comprobar si los embriones seguían muriendo por apoptosis o no, se revisaron 19 deciduas por la técnica de Tunel (Tabla 12), de estas se esperaba que 5 fueran positivas. Sin embargo, las 19 resultaron negativas para la tinción (Figura 10). Esto nos indica que los embriones *bax* *-/-* *mdm2* *-/-* no mueren por apoptosis.

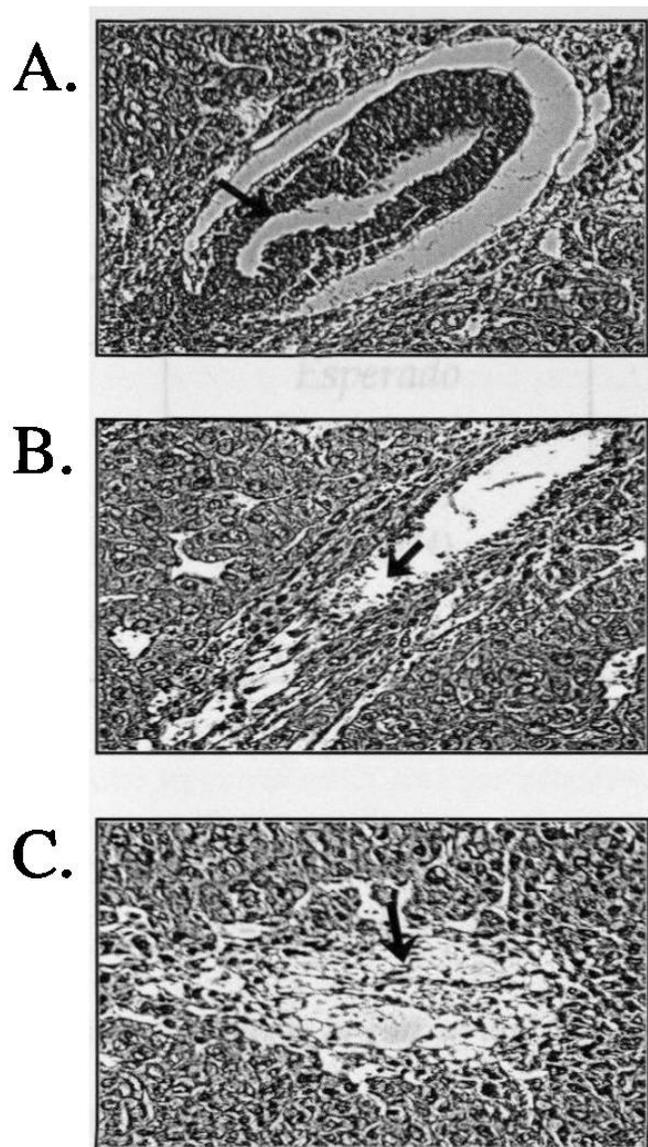


Figura 9. Análisis histológico de embriones mutantes *bax/mdm2* de 6.5 días de gestación. Cortes transversales de deciduas provenientes de las cruces entre machos *bax +/- mdm2 +/-* y hembras *bax -/- mdm2 +/-*. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Embrión normal. B, Decidua vacía. C, decidua mostrando residuos de un embrión. Las flechas indican el lugar donde se encuentra o debería encontrarse el embrión.

Tinción	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
Positiva	5 (1/4)	0
Negativa	14 (3/4)	19
Total		19

TABLA 12. Análisis de Apoptosis *in situ* en embriones mutantes *bax/mdm2* de 6.5 días mediante la técnica de Tunel. Los embriones fueron obtenidos de las cruzas entre machos heterocigotos para *bax* y *mdm2* y hembras carentes de *bax* y heterocigotas para *mdm2* (*bax +/- mdm2 +/-* X *bax -/-mdm2 +/-*). Los números entre paréntesis indican la proporción del total esperada en cada caso.

## INHIBICION DEL CRECIMIENTO CELULAR

El otro posible mecanismo de la letalidad de los embriones es la inhibición del crecimiento celular. Existen varios métodos para medir este mecanismo. Entre los mas utilizados está el de incorporación de bromo desoxi-uridina (BrdU). En este caso, las células dividiéndose normalmente incorporan la BrdU mientras que las que no están en división no lo hacen. Se intentó utilizar esta técnica pero no se logró detectar la BrdU en ninguno de los embriones analizados, probablemente debido a que en esta etapa del desarrollo aún no cuentan con sistema vascular y la BrdU inyectada en las hembras preñadas nunca logró llegar a los embriones. Entonces se optó por un segundo método, la detección inmunohistoquímica de PCNA, una proteína nuclear que se encuentra normalmente en las células en crecimiento, pero que está ausente en las células que no están dividiéndose. Se analizaron 28 deciduas (Tabla 13), de las cuales se esperaba que 7 (1/4) fueran negativas a la tinción. Se encontraron 6 con tinción anormal (Figura 11), 5 de ellas mostraron una tinción ligera y 1 fué negativa. Estos resultados indican que los embriones *bax* *-/-* *mdm2* *-/-* están muriendo por inhibición del crecimiento celular en lugar de la apoptosis mostrada en los embriones *mdm2* *-/-*.

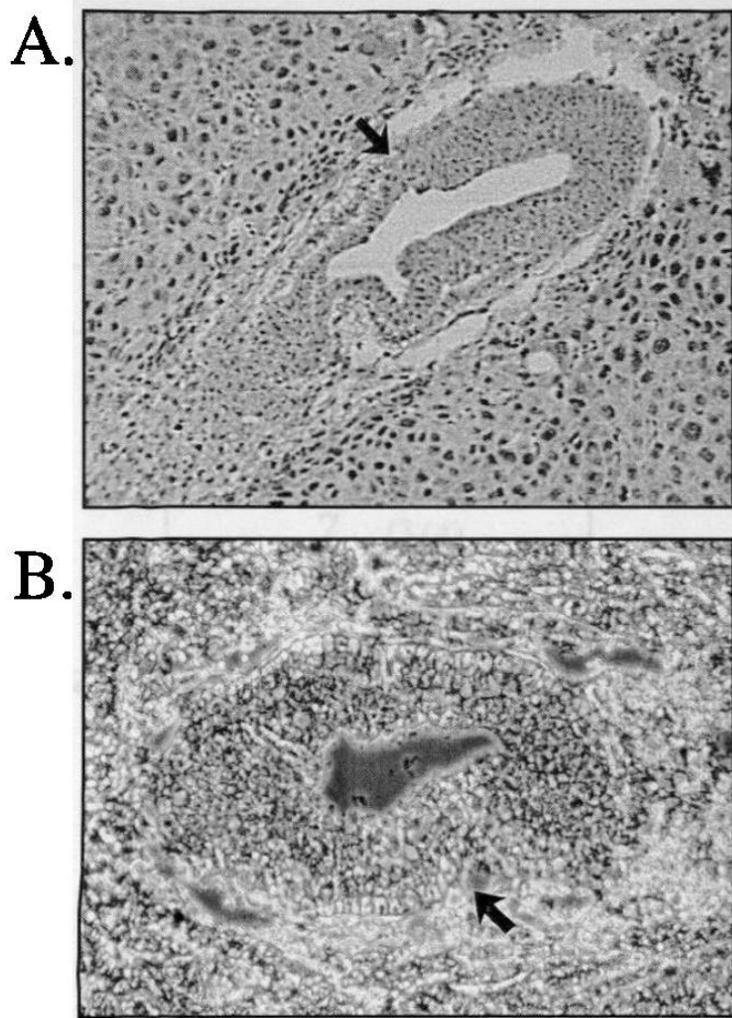


Figura 10. Determinación de apoptosis en embriones mutantes *bax/mdm2* de 6.5 días de gestación mediante la técnica de Tunel.. Cortes transversales de deciduas provenientes de las cruces de machos *bax +/- mdm2 +/-* y hembras *bax -/- mdm2 +/-*. A, Tinción negativa de un embrión normal. B, Tinción negativa de un embrión con apariencia anormal. Las flechas indican la posición del embrión. Para controles ver el Apéndice 3.