

Tinción	Número de Embriones	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
Normal	21 (1/4)	22
Anormal *	7 (3/4)	6
Total		28

\* 5 embriones mostraron tinción muy ligera y 1 fué negativo.

TABLA 13. Análisis de Ciclo Celular *in situ* en embriones mutantes

*bax/mdm2* de 6.5 días mediante inmunohistoquímica para PCNA.

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.

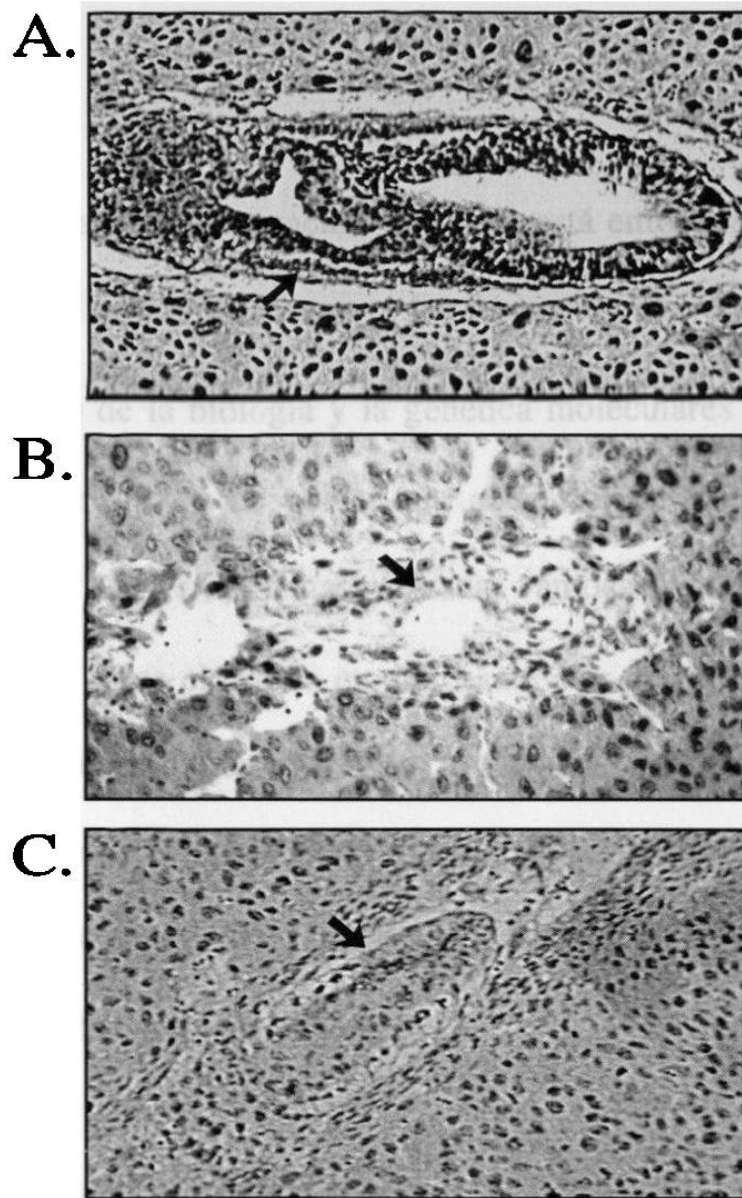


Figura 11. Determinación de inhibición de crecimiento celular en embriones mutantes *bax/mdm2* de 6.5 días de gestación. Secciones transversales de deciduas provenientes de las cruzas entre machos *bax +/- mdm2 +/-* y hembras *bax -/- mdm2 +/-*. Tinción inmunohistoquímica para PCNA. A, Tinción de un embrión normal. B, Tinción negativa de los restos de un embrión. C, Tinción débil de un embrión con apariencia anormal. Las flechas indican el lugar donde se encuentra o debería encontrarse el embrión. Para controles ver Apéndice 4.

## DISCUSION

En la actualidad la investigación científica está enfocada a la búsqueda y entendimiento de las causas del cáncer y las formas de prevenirlo. Los grandes avances en el campo de la biología y la genética moleculares han traído como resultado el descubrimiento de genes que están implicados en las vías de desarrollo del cáncer. Las herramientas utilizadas van desde sistemas bioquímicos y biológicos *in vitro*, hasta el uso de modelos animales de experimentación. Los sistemas *in vitro* han producido, y aún lo hacen, grandes cantidades de información acerca de las características de determinadas moléculas. Por otro lado, los modelos animales proveen de un sistema experimental *in vivo* para estudiar todos los aspectos de los procesos biológicos.

En el estudio del cáncer y la tumorigénesis, la disponibilidad de ratones transgénicos, que sobreexpresan un oncogen específico, y de ratones “knockout” o deficientes, con deleciones de genes supresores de tumores, ha traído como resultado una basta cantidad de información referente a los efectos de los diferentes eventos genéticos en el desarrollo del cáncer. El uso de modelos murinos nos permite determinar la importancia de la presencia del sistema sanguíneo y un sistema inmunológico intactos sobre la formación y el crecimiento de tumores. Además, el potencial metastásico de células con alteraciones genéticas

puede analizarse en un ratón, pero no *in vitro* en cultivo de tejidos (Lozano and Liu, 1998).

En el presente trabajo se hizo uso de modelos murinos previamente creados, para tratar de elucidar una parte más de las vías del gen supresor de tumores *p53*. Las alteraciones en *p53* son de los eventos moleculares más frecuentemente encontrados en neoplasias, tanto en humanos como en animales (Greenblatt et al., 1994; Hainaut et al., 1998). En condiciones fisiológicas, en células normales, la proteína *p53* se expresa a niveles muy bajos y tiene una vida media muy corta. Bajo el efecto de numerosos factores, tales como daño al DNA, hipoxia, hiperoxia, hipoglicemia, carencia de nucleótidos y activación de oncogenes, *p53* se estabiliza y se activa (el-Deiry, 1998). Las respuestas que esto puede desencadenar son: inhibición del ciclo celular en la fase G1 o G2, apoptosis, envejecimiento celular, diferenciación, reparación del DNA y antiangiogénesis (El-Deiry, 1998). Estas respuestas son mediadas por diferentes genes blanco de *p53*. *mdm2* es un regulador negativo de *p53* (Kubbutat et al., 1997) que cuando se une a él, bloquea su función como activador transcripcional e induce su degradación (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1998). *p21-WAF1* es activado por *p53* a través de sus dos elementos de respuesta en el promotor (el-Deiry et al., 1993; el-Deiry et al., 1995), inhibiendo CDKs y produciendo así un arresto del ciclo celular en la fase G1. *bax* es un gen blanco de *p53* cuya expresión es incrementada a través de un elemento de respuesta a *p53* en su promotor

(Miyashita and Reed, 1995) y produce inducción de apoptosis a nivel de liberación de citocromo C de la mitocondria (Rosse et al., 1998).

Se ha logrado la creación de ratones deficientes en *p53* por varios grupos de investigación y todos han obtenido resultados similares (Clarke et al., 1993; Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994; Tsukada et al., 1993). La ausencia de *p53* acorta considerablemente la sobrevivencia de estos ratones debido a un incremento en la predisposición al desarrollo de tumores. El espectro de tumores observado es similar en todos los casos, predominando los linfomas (Aprox. 75%) y los sarcomas (Aprox. 25%). Sin embargo, también ha quedado claro que el fondo genético de cada ratón es un factor importante en el desarrollo de ciertos tumores. Treinta y cinco por ciento de los ratones *p53* *-/-* de la cepa 129/Sv pura desarrollan tumores testiculares mientras que solo el 9% de los ratones *p53* *-/-* de la cepa 126/Sv-C57BL/6 híbrida lo hacen (Harvey et al., 1993).

La delección de *mdm2* en ratones produce letalidad embrionaria entre los 3.5 y 5.5 días de gestación (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995). La ausencia simultánea de *p53* rescata este fenotipo, demostrando que la letalidad es causada por una actividad desregulada de *p53*. El objetivo de este trabajo fué elucidar el mecanismo de letalidad dependiente de *p53* que está ocurriendo por la ausencia de *mdm2*.

Las posibilidades que estudiamos son la inhibición del ciclo celular mediada por *p21* y la apoptosis mediada por *bax*. Ratones carentes de *p21*, que son viables y fértiles (Brugarolas et al., 1995), fueron cruzados con ratones heterocigotos para un alelo mutante de *mdm2* (Montes de Oca Luna et al., 1995). No se obtuvieron ratones que fueran carentes de *p21* y *mdm2* a la vez (tablas 1 y 2). Esto indica que la ausencia de *p21* no logra imitar la ausencia de *p53* en el rescate del fenotipo letal de los embriones carentes de *mdm2*. Sin embargo, aún prevalecía la posibilidad de que se produjera un rescate parcial ya que hay reportes de que *p21* se expresa en los embriones de ratón en diferentes etapas del desarrollo, incluyendo 8.5, 9.5, 10, 13 y 15 días de gestación (Schmid et al., 1991), y que *p53* y sus genes blanco *mdm2* y *p21*, son expresados en alta cantidad en células ES obtenidas de blastocistos de 3.5 días de gestación (Montes de Oca Luna et al., 1997). Se estudiaron embriones provenientes de las cruzas de ratones carentes de *p21* y heterocigotos para *mdm2* en diferentes etapas del desarrollo. No se logró encontrar rescate parcial a 9.5, 7.5 o 5.5 días (tablas 3, 4 y 5; figura 7). La única posibilidad restante de que *p21* estuviera implicado en este sistema era que su ausencia hiciera aún más agudo el fenotipo, esto es, que la letalidad ocurriera a un tiempo más temprano en la gestación. Para analizar esta posibilidad, se revisaron blastocistos de 3.5 días de gestación provenientes de las cruzas descritas anteriormente y se encontró la presencia de embriones carentes de *p21* y *mdm2* simultáneamente en la relación esperada. Lo cual indica que la ausencia de *p21* no altera el fenotipo de letalidad embrionaria de los ratones carentes de *mdm2* y

establece que si el mecanismo de muerte seguido por los mismos es inhibición del ciclo celular, entonces debe ser independiente de *p21*.

La vía *p53/p21* es muy compleja. La información con que se cuenta actualmente es muy extensa y en algunas ocasiones contradictoria. Es claro que la inducción de la expresión de *p21* se correlaciona muy bien con la inhibición del ciclo celular que precede a la diferenciación terminal en varios tejidos de animales estudiados (Gartel et al., 1996; Parker et al., 1995). Lo mismo sucede en la diferenciación terminal y el fin de la proliferación de varios sistemas *in vitro* (Gartel et al., 1996; Michieli et al., 1994; Missero et al., 1995; Steinman et al., 1994). Un dato muy interesante es que en embriones de entre 8.5 y 10 días de gestación se ha encontrado expresión de *p53* en todas sus células, mientras que *p21* solo se expresa en aquellas que están en diferenciación, lo que demuestra que la presencia de *p53* no implica necesariamente la inducción de *p21* (Schmid et al., 1991). En embriones carentes de *p53* la expresión de *p21* es normal, lo que indica que la inducción de la transcripción de *p21* durante el desarrollo de la mayoría de los tejidos no requiere *p53* (Parker et al., 1995). En tejidos de ratones adultos la expresión de *p21* está limitada a células que están diferenciándose de manera terminal y en la mayoría de los órganos, excepto el bazo, es independiente de *p53* (Macleod et al., 1995; Parker et al., 1995).

El epitelio intestinal ha sido utilizado como un modelo para examinar el papel de p21 en la regulación de la diferenciación y proliferación celulares *in vivo*. Se han generado ratones quimeras compuestos de células *p21*<sup>-/-</sup> y *p21*<sup>+/+</sup> y al estudiar su desarrollo y diferenciación intestinal, no se detectaron diferencias en las células *p21*<sup>-/-</sup> (Brugarolas et al., 1995). Por otro lado, los ratones carentes de *p21* son capaces de desarrollarse normalmente hasta los 7 meses de edad, sus fibroblastos en cultivo no se detienen en G1 en respuesta a daño al DNA y falta de nucleótidos, pero la apoptosis en timocitos y el checkpoint para la formación del huso mitótico son normales (Deng et al., 1995). La activación transcripcional de *p21* luego de daño al DNA se ha demostrado que es dependiente de p53 en fibroblastos humanos diploides (Dulic et al., 1994) y en células humanas del epitelio de la tiroide (Namba et al., 1995), conduciendo en ambos casos a la inhibición del ciclo celular. En ratones también se encontró una dependencia de p53 en la activación transcripcional de *p21* después de radiación ionizante en la mayoría de los tejidos, exceptuando los intestinos, donde p21 se expresa altamente de forma constitutiva (Macleod et al., 1995). En algunos sistemas experimentales la inducción de *p21* es independiente de p53 (Akashi et al., 1995) y en otros, p53 es capaz de producir inhibición del ciclo celular sin inducir la expresión de p21 (Hirano et al., 1995).

Todo lo anterior nos indica que *p21* juega un papel muy importante en el control del ciclo celular y que su activación está ligada a la función de p53 en



muchos casos, pero que en otros es independiente. En nuestros experimentos se demostró que p21 no parece estar participando en el fenotipo resultante de la actividad de p53 en ausencia de mdm2. Una explicación puede ser que la inducción de p21 dependiente de p53 ha sido observada bajo condiciones de daño al DNA, lo cual no ocurre en este sistema. En estos ratones la actividad de p53 está incrementada por la ausencia de mdm2, su principal regulador negativo, sin embargo, nuestros resultados hasta ahora no son suficientes para concluir que el mecanismo de muerte que se sigue no es la inhibición del ciclo celular, ya que p53 puede producir arresto del ciclo celular por medio de otros efectores distintos a p21. También es posible que p21 si esté involucrado en esta vía, pero que al no estar éste presente, p53 active una vía alterna de inducción de inhibición del ciclo celular.

Para analizar la vía donde p53 induce apoptosis a través de bax, se cruzaron ratones heterocigotos para un alelo inactivado de *bax* (Knudson et al., 1995) con ratones heterocigotos para un alelo mutante de *mdm2* (Montes de Oca Luna et al., 1995). De estas cruzas no se logró la obtención de ratones que simultáneamente carecieran de *bax* y *mdm2* (tablas 7 y 8). Tal resultado indica que la ausencia de *bax* no es suficiente para rescatar el fenotipo letal de los embriones carentes de *mdm2*. Se ha encontrado que la sobreexpresión de p53 en células embrionarias de ratón activa la expresión de *bax* (McCurrach et al., 1997). La muerte de los embriones deficientes en *mdm2* se inicia en la etapa de blastocistos (3.5 días)

siguiendo el mecanismo de apoptosis (Lisa L. Amelse, comunicación directa). Existe la posibilidad de que p53 active *bax*, y por lo tanto, induzca apoptosis en estos embriones, haciendo posible, por consiguiente, que la ausencia de *bax* produzca un rescate parcial del fenotipo letal. Para comprobar esto, se analizaron embriones obtenidos de las cruces entre machos heterocigotos para *bax* y *mdm2* (ya que los machos carentes de *bax* son estériles (Knudson et al., 1995)) y hembras carentes de *bax* y heterocigotas para *mdm2*. En los embriones de 7.5 días de gestación no se logró detectar ninguno que careciera de *mdm2* (tabla 9). Esto indica que no se da rescate parcial en esta etapa de la gestación por la ausencia de *bax*. Posteriormente, al analizar embriones de 5.5 días por medio de histología, se encontró un rescate parcial del fenotipo representado por una disminución en el número de deciduas vacías encontradas con respecto a las esperadas (tabla 10 y figura 8). Se procedió al análisis de embriones de 6.5 días y una vez más se encontró un número menor de deciduas vacías que el esperado (tabla 11), además, algunas de estas aún presentaban restos del embrión (figura 9). Esto indica que la ausencia de *bax* rescata parcialmente la letalidad de los embriones *mdm2* *-/-*, cambiando la muerte de la etapa comprendida entre 3.5 y 5.5 días a los 6.5 días de gestación.

Como *bax* está involucrado en la inducción de apoptosis dependiente de p53 en algunos sistemas (Han et al., 1996; Miyashita et al., 1994; Selvakumaran et al., 1994; Yin et al., 1997) y como los embriones *mdm2* *-/-* mueren por apoptosis,

era probable que en los embriones *bax* *-/-* *mdm2* *-/-* este mecanismo estuviera alterado. Para comprobar esto, deciduas de 6.5 días de gestación se sometieron a determinación de apoptosis por la técnica de tunel. Ninguno de los embriones analizados presentó apoptosis extensiva, mientras que en los controles positivos y algunas áreas de los embriones donde normalmente se produce apoptosis, principalmente el área donde se forma la cavidad proamniótica (Foster et al., 1983; Theiler, 1989) si fué observada (tabla 12 y figura 10), lo que indica un cambio en el mecanismo de muerte. El otro posible mecanismo de muerte dependiente de p53 es la inhibición del ciclo celular. Para revisar si estos embriones estaban utilizando este mecanismo, deciduas de 6.5 días se sometieron a una tinción inmunohistoquímica para PCNA, una proteína cuya presencia indica crecimiento y cuya ausencia indica arresto del ciclo celular (Waseem and Lane, 1990),. Algunos de los embriones analizados mostraron bajos niveles de PCNA, mientras que en uno de ellos PCNA fué indetectable (tabla 13 y figura 11). Este resultado sugiere que posiblemente el mecanismo de muerte seguido por los embriones carentes de *mdm2* en la ausencia simultanea de *bax* sea la inhibición del ciclo celular.

Nuestros datos demuestran que *bax* juega un papel determinante en la inducción de apoptosis dependiente de p53 en el sistema estudiado. Existen datos que se contraponen con este resultado. Kundson *et al* encontraron que los timocitos derivados de ratones carentes de *bax* no entran en apoptosis luego de su exposición a radiación ionizante, demostrando una independencia de *bax* en la

apoptosis dependiente de p53 en estas células (Knudson et al., 1995). Sin embargo, hay varias diferencias entre los dos sistemas que pueden estar afectando estos resultados. Una diferencia fundamental es que se trata de dos tipos celulares distintos y con grados de diferenciación muy diferentes. En nuestro sistema se trata de células embrionarias pluripotenciales, que son muy poco diferenciadas, mientras que en el otro sistema se trata de timocitos, células con un grado de diferenciación más avanzado. Además, los timocitos fueron sometidos a cultivo de tejidos antes del ensayo en tanto que nuestras células fueron analizadas *in vivo*. Es posible que *bax* sea más activo en la inducción de apoptosis dependiente de p53 en las etapas tempranas del desarrollo y no así en etapas posteriores. P53 puede activar apoptosis por medio de otros genes, entre los cuales están: Fas/APO1 (Owen-Schaub et al., 1995), KILLER/DR5 (Wu et al., 1997), PIG (Poïyak et al., 1997), IGF-BP3 (Buckbinder et al., 1995) y PAG608 (Israeli et al., 1997), entonces, es muy probable que en los timocitos irradiados, al estar ausente *bax*, p53 utilice alguna de las vías alternas de inducción de apoptosis para asegurar la eliminación de las células defectuosas. Por otro lado es posible que estos genes alternos no se expresen en las etapas tempranas del desarrollo donde ocurre la letalidad embrionaria en nuestro sistema, y que p53 simplemente utilice un mecanismo de inducción de muerte celular diferente a la apoptosis.

Yin *et al* utilizando un sistema de ratones transgénicos demostraron que *bax* es requerido parcialmente en la apoptosis dependiente de p53 en las células

tumorales del plexo coroideo (Yin et al., 1997). McCurrach *et al* también demostraron que la mitad de la apoptosis dependiente de p53 inducida por el adenovirus E1A en fibroblastos en cultivo requiere de bax (McCurrach et al., 1997). Aunque estos dos reportes también muestran un papel de bax en la apoptosis dependiente de p53, a diferencia de nuestros datos, ambos grupos presentan una dependencia únicamente parcial. Una vez más, los motivos principales que podrían ser la causa de las diferencias observadas entre todos estos sistemas son los tipo celulares y su grado de diferenciación, así como el uso de cultivo de tejidos.

Nuestros datos también sugieren que p53 cambia su mecanismo de acción de la inducción de apoptosis al de inhibición del ciclo celular en los embriones *bax* *-/-* *mdm2* *-/-*. Este punto no está completamente claro ya que se utilizó un análisis inmunohistoquímico para PCNA y los resultados obtenidos fallaron en mostrar una ausencia total de PCNA. Únicamente un embrión fue negativo, mientras que otros presentaron bajas cantidades del antígeno. Una explicación a este problema es que la vida media de PCNA es de alrededor de 20 horas (Bravo and Macdonald-Bravo, 1987), por lo tanto, si los embriones acaban de morir, la proteína aún se encuentra ahí pero en una concentración menor. Otro problema es que no fue posible establecer el genotipo de los embriones o restos de embrión que mostraron bajos niveles de PCNA. En esta etapa del desarrollo los embriones son demasiado pequeños para ser disectados de las deciduas sin contaminación con

tejido materno, por lo que no ha sido posible realizar PCR de ellos. Una opción sería el uso de PCR *in situ*, pero debido a que los embriones fueron fijados con formaldehído es probable que el DNA no sea de buena calidad para la reacción, sin embargo aún estamos tratando de establecer la técnica y checar su factibilidad en nuestros embriones. También se pueden analizar embriones de etapas más tempranas, principalmente en la de blastocistos, para revisar el estatus de PCNA en ellos y probar si la inhibición del ciclo celular está comenzando desde entonces. Si esto resulta positivo, se podrían tomar algunas células de cada blastocisto y ponerlas en cultivo de tejidos para posteriormente analizar su genotipo y buscar una correlación entre la ausencia de *bax* y *mdm2* en un embrión con la ausencia o bajos niveles de PCNA en el mismo.

## CONCLUSIONES

1. La ausencia de *p21* no logra rescatar el fenotipo de letalidad embrionaria de los ratones carentes de *mdm2*.
2. La ausencia de *p21* no logra rescatar parcialmente la letalidad embrionaria de los ratones carentes de *mdm2* a los 9.5, 7.5 o 5.5 días de gestación.
3. La ausencia de *p21* no hace más severo el fenotipo de letalidad embrionaria de los ratones carentes de *mdm2*.
4. La ausencia de *bax* no logra rescatar el fenotipo de letalidad embrionaria de los ratones carentes de *mdm2*.
5. La ausencia de *bax* rescata parcialmente el fenotipo de letalidad embrionaria de los ratones carentes de *mdm2*, cambiando el tiempo de muerte de la etapa comprendida entre los 3.5 y 5.5 días a los 6.5 días de gestación.
6. A diferencia de los embriones carentes de *mdm2*, los embriones carentes de *bax* y *mdm2* no mueren por apoptosis, sino que al parecer lo hacen por inhibición del crecimiento celular.

# **APENDICE 1**

## **INACTIVACION DE GENES**

El proceso de inactivación de genes se inicia con la construcción del vector de recombinación conteniendo las secuencias del gen que se desea inactivar con un inserto que rompa la integridad de dicho gen, generalmente el gen de resistencia a Neomicina (figuras 11, 12 y 13) (Joyner, 1993).

Una vez obtenidas las contrucciones de DNA, estas son introducidas en células estaminales embrionarias de ratón (figura 14). Posteriormente, estas células son inyectadas dentro de blastocistos de ratón de una cepa distinta y los blastocistos son implantados en ratonas pseudopreñadas de la misma cepa que los blastocistos. Se espera que nazcan los ratones y se eligen aquellos que son químeras (mezcla de las dos cepas de ratones, que se identifica por diferente coloración en el pelo). Estas químeras son cruzadas con ratones silvestres en busca de la transmisión de la mutación en línea germinal . Si todos los ratones obtenidos de estas cruzas son de coloración oscura, significa que la mutación es transmicible por línea germinal y con esto se ha logrado una línea de ratones con un gen inactivado o “knockout” (KO).



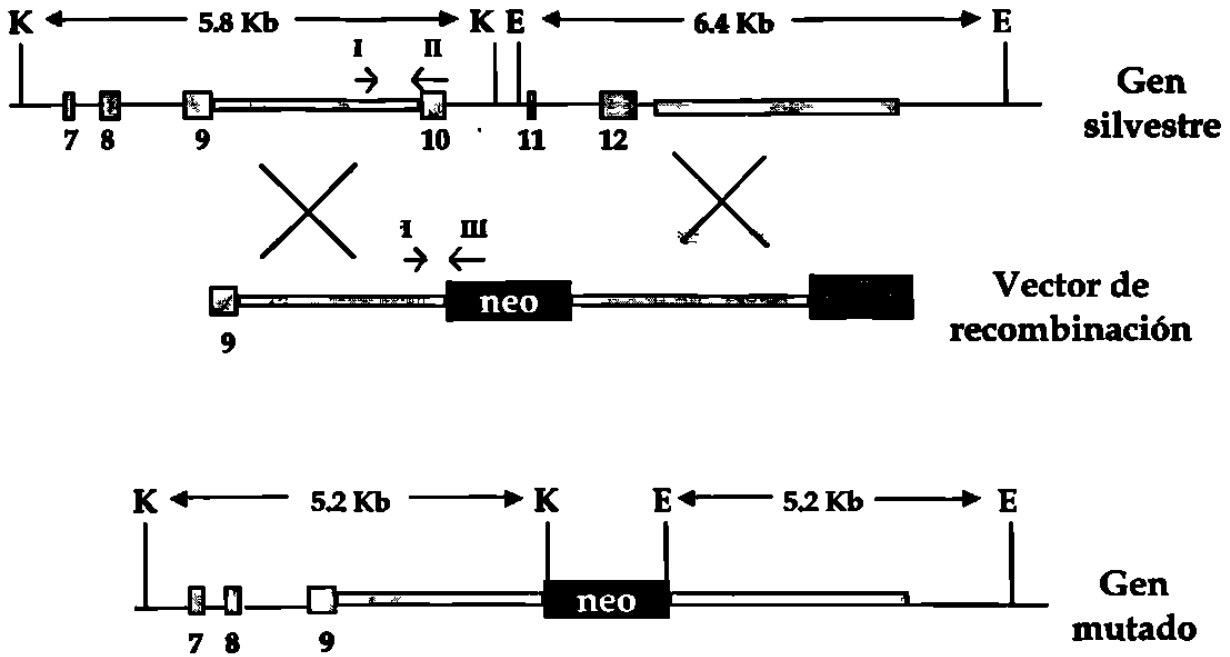


Figura 12. Inactivación del gen *mdm2*. Construcción del vector de recombinación.

Neo= cassette con el gen de resistencia a neomicina (marcador de selección positiva). Tk= gen de la timidina kinasa (marcador de selección negativa). E=*EcoRI*. K=*KpnI*.

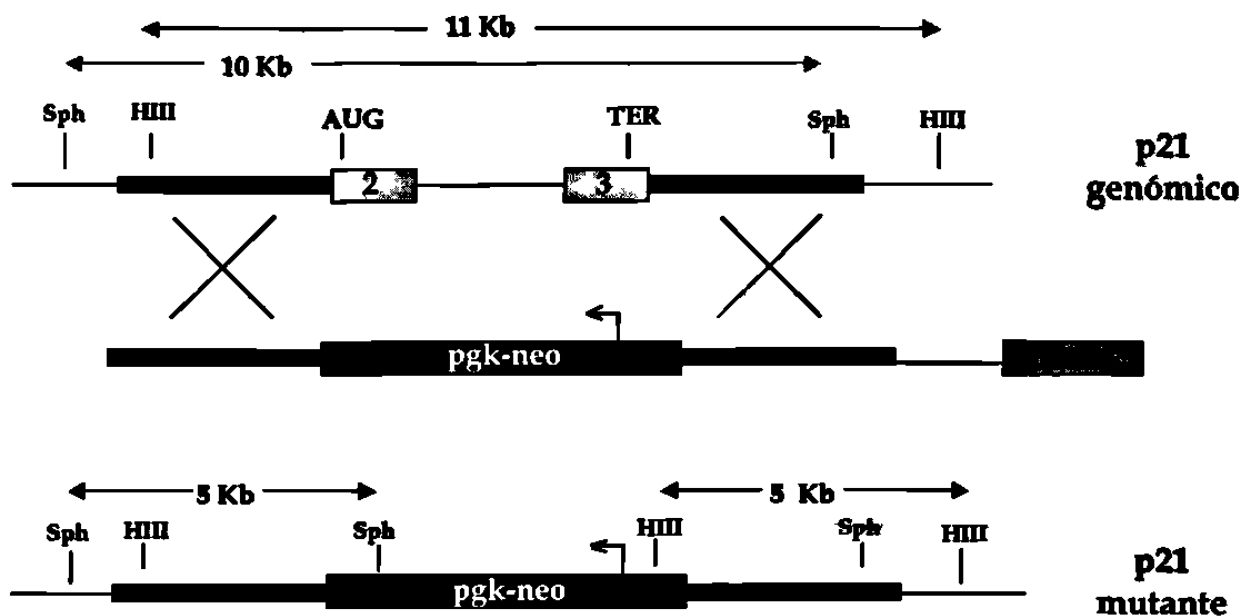


Figura 13. Inactivación del gen *p21*. Construcción del vector de recombinación.

PGK-Neo= cassette con el gen de resistencia a neomicina (marcador de selección positiva). PGK-Tk= gen de la timidina kinasa (marcador de selección negativa). *HindIII*=*HindIII*. *Sph*=*SphI*.

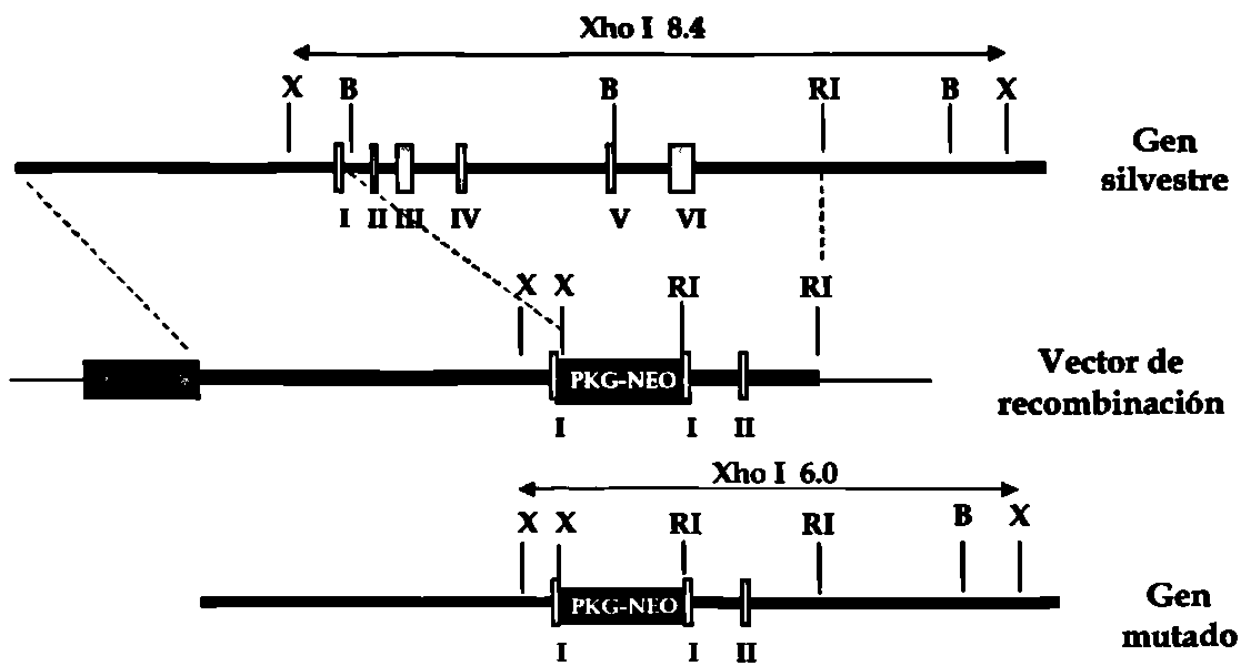


Figura 14. Inactivación del gen *bax*. Construcción del vector de recombinación.

PKG-Neo= cassette con el gen de resistencia a neomicina (marcador de selección positiva). HSP-Tk= gen de la timidina kinasa de herpes virus (marcador de selección negativa). X=XhoI. RI=EcoRI. B=BamHI.

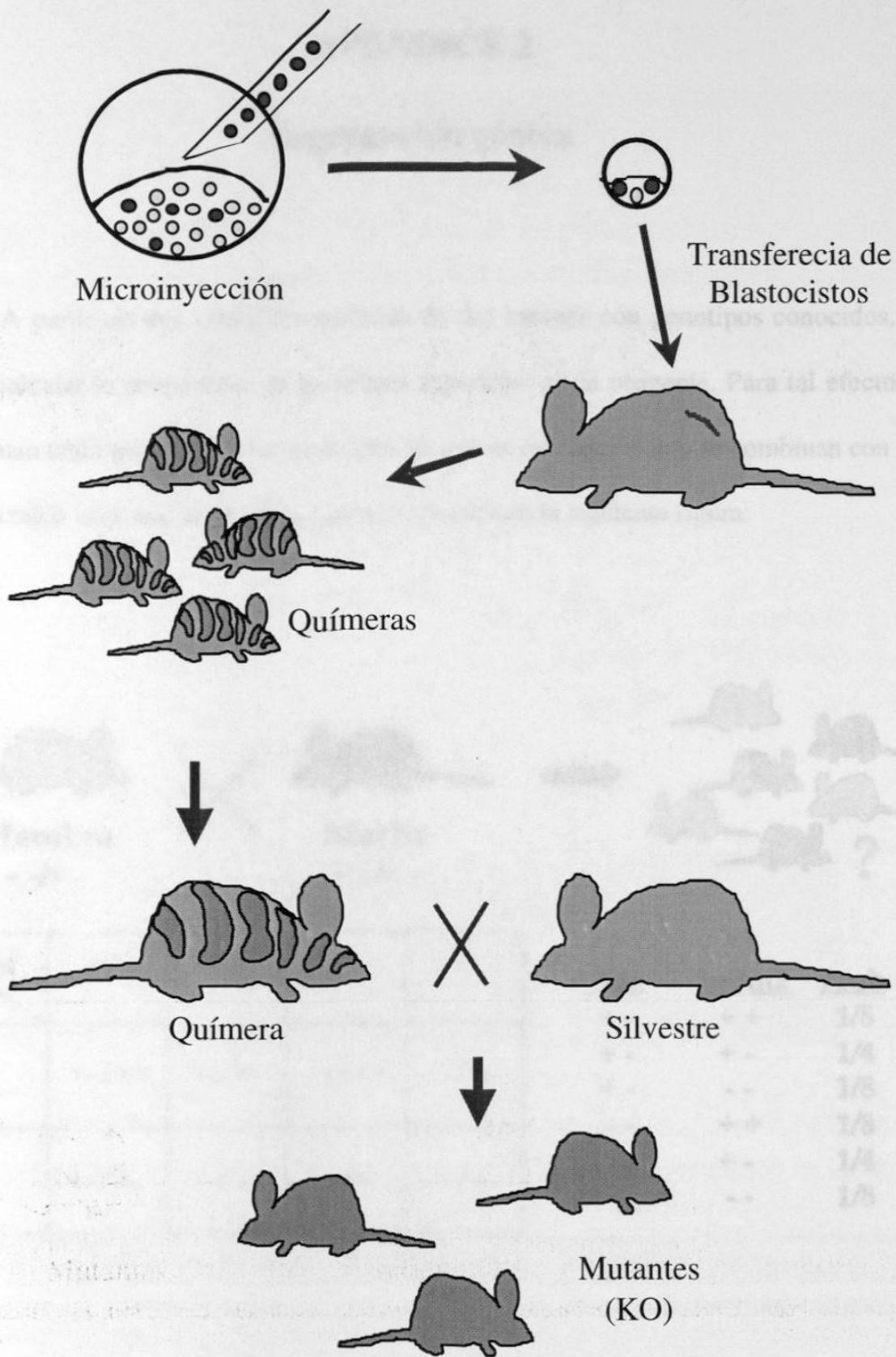
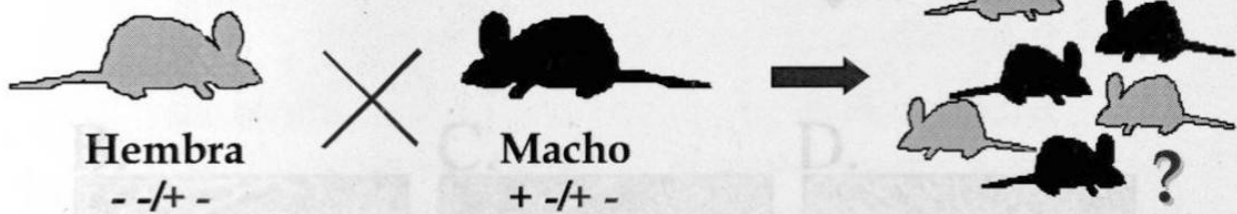


Figura 15. Inactivación de genes en ratones. Esquema del protocolo experimental utilizado en la inactivación de genes.

## APENDICE 2

### Segregación génica

A partir de una cruce determinada de dos ratones con genotipos conocidos, se puede calcular la proporción de genotipos esperados en la progenie. Para tal efecto se realiza una tabla que incluya los genotipos de interés en cada ratón y se combinan con los del otro ratón utilizado en la cruce como se muestra en la siguiente figura:

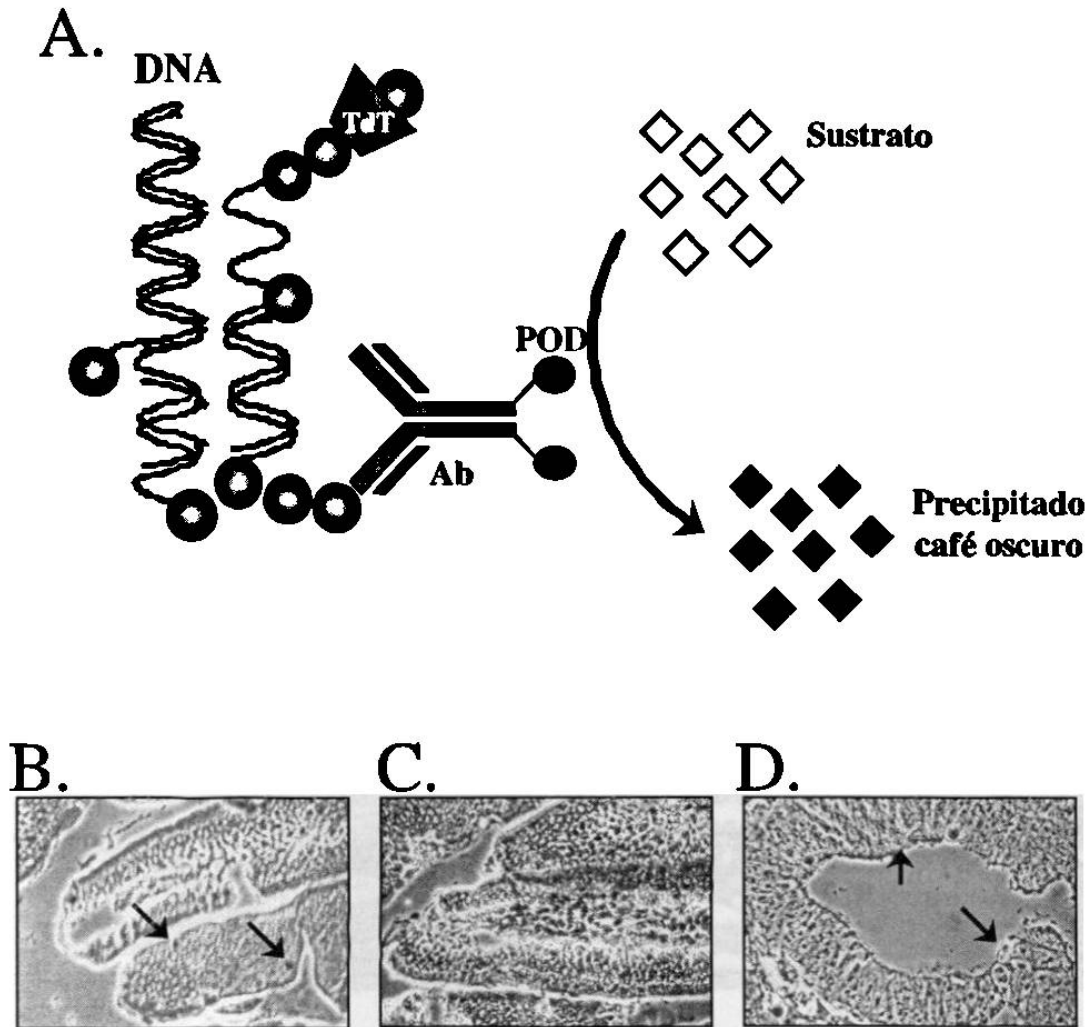


	<b>M</b>	<b>+/+</b>	<b>+/-</b>	<b>-/+</b>	<b>-/-</b>
<b>H</b>					
	<b>-/+</b>	<b>+ -/+</b>	<b>+ -/+</b>	<b>- -/+</b>	<b>- -/+</b>
	<b>-/-</b>	<b>+ -/+</b>	<b>+ -/-</b>	<b>- -/+</b>	<b>- -/-</b>

<u>bax</u>	<u>mdm2</u>	<u>Prob.</u>
+-	++	1/8
+-	+-	1/4
+-	--	1/8
--	++	1/8
--	+-	1/4
--	--	1/8

### APENDICE 3.

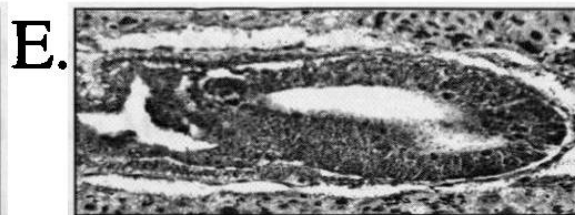
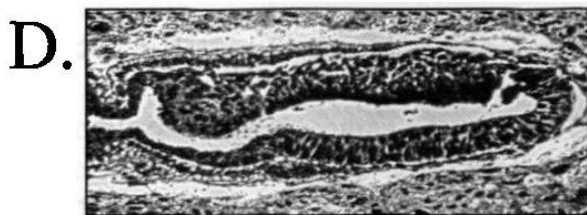
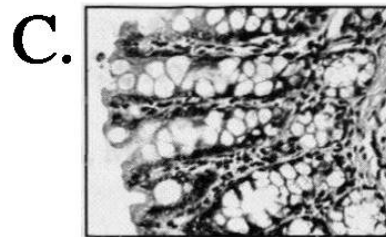
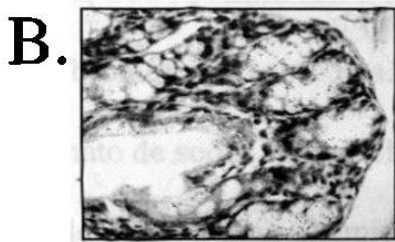
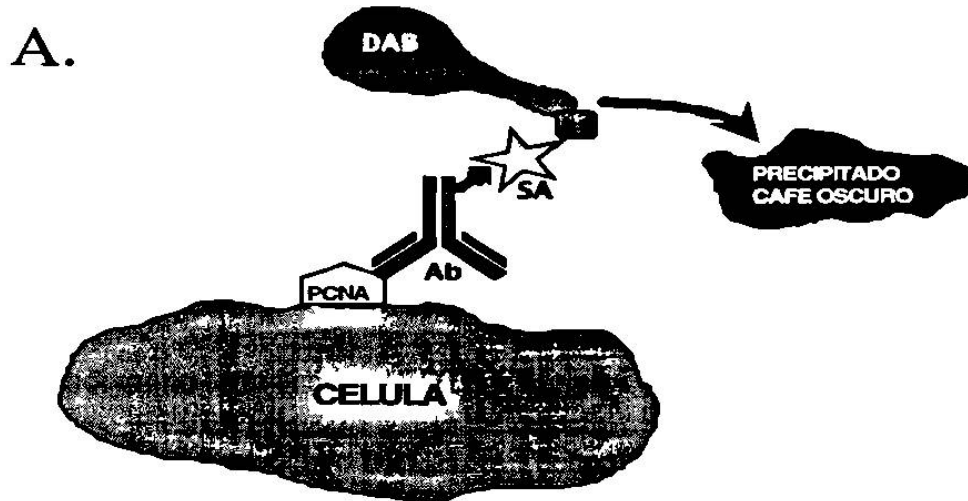
## ANALISIS DE TUNEL



El panel A muestra el principio en el que se basa la determinación de apoptosis mediante la técnica de Tunel. B, Control positivo: intestino de ratón. C, Control negativo: intestino de ratón sin anticuerpo. D, Control positivo: embrión de ratón silvestre de 6.5 días de gestación. Las flechas indican las células con tinción positiva. Ab= anticuerpo. TdT= Terminal-desoxinucleotidil Transferasa. POD= peroxidasa.

## APENDICE 4.

### INMUNOHISTOQUIMICA PARA PCNA.



El panel A muestra el principio en el que se basa la determinación de la inhibición de crecimiento celular mediante el uso del sistema Zymed para la detección inmunohistoquímica de PCNA. B, Control positivo pre-teñido incluido en el kit, intestino de ratón. C, Control positivo, intestino de ratón. D, Control positivo, embrión de ratón de 6.5 días de gestación proveniente de padres silvestres. E, Control negativo, mismo embrión que en D pero sin anticuerpo. Ab= anticuerpo. DAB= Diaminobenzidina. SA= estreptoavidina.

## **APENDICE 5**

### **LISTA DE REACTIVOS, SISTEMAS Y BUFFERS.**

1. Acido bórico. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
2. Acido cítrico monohidratado. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
3. Acido clorhídrico (HCl). Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.
4. Acido etilendiamino tetra-acético (EDTA). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
5. Agarosa grado ultrapuro. Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
6. AmpliTaq DNA polimerasa. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.
7. Azul de bromofenol, sal sódica. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
8. Bicarbonato de sodio. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
9. Borato de sodio. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
10. BrdU, 5-Bromo 2'-desoxiuridina. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
11. Bromuro de etidio. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
12. Buffer de PCR 1X. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.
13. Cloruro de sodio (NaCl). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
14. DAB (3, 3'-Diaminobenzidina). Vector Labs, Burlingame, CA.
15. Dodecil sulfato de sodio (SDS, CMS Chempure Ultra). Curtin Matheson Scientific, Inc. Houston, TX.
16. Eosina Y Accustain, solución alcohólica. Sigma Diagnostics, St. Louis, MO.
17. Etanol absoluto. AAPER. Alcohol and Chemical, Co. Shelbyville, KY.
18. Fenol ultrapuro. Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
19. Formaldehído. Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.



20. Fosfato de sodio, monobásico y monohidratado. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
21. Hematoxilina modificada de Harris, con ácido acético y libre de mercurio. Fisher Scientifics, Fair Lawn, NJ.
22. HEPES. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
23. Hidróxido de sodio (NaOH). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
24. Hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH). Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
25. Isopropanol (2-propanol, Optima). Fisher Scientifics, Fair Lawn, NJ.
26. Kit para detección de apoptosis: In Situ cell death detection kit POD. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.
27. Kit para detección inmunohistoquímica de PCNA: PCNA staining kit. Zymed Laboratories, San Francisco, CA.
28. Marcador de Peso Molecular para DNA, 1 Kb Plus DNA Ladder. Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
29. Medio de cultivo DMEM. . Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
30. Metanol, grado HPLC. Fisher Scientifics, Fair Lawn, NJ.
31. Parafina. Fisher Scientifics, Fair Lawn, NJ.
32. Permout (β-Pinene Polymer, SP15-100, Toluene Solution). Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.
33. Peroxido de hidrógeno, solución 30% peso/peso. Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
34. Portaobjetos Superfrost Plus. Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.
35. Proteínasa K. USB, Cleveland, OH.
36. Solución fijadora de Bouin. PolySciences, Inc., Warrington, PA.

37. **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS), libre de magnesio (+2) y libre de calcio.**  
Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
38. **Suero fetal de bovino (FCS).** HyClone Laboratories. Logan, UT.
39. **Tritón X-100.** Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
40. **Trizma Base.** Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
41. **Tween 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate).** Sigma Chemicals, St. Louis, MO.
42. **Xilenos, grado reactivo.** Stephens Scientifics, Kalamazoo, MI.
43. **Xylene cyanole FF.** Sigma Chemicals, St. Louis, MO.

## **APENDICE 6**

### **ARTICULO PUBLICADO**

**(Montes de Oca Luna et al., 1997)**

## Deletion of *p21* cannot substitute for *p53* loss in rescue of *mdm2* null lethality

The MDM2 protein negatively regulates the activity of the p53 tumour suppressor by binding its transcriptional activation domain<sup>1,2</sup>. In fact, the early embryonic lethality seen in *mdm2* null embryos is due to an inability to inactivate p53, and is completely rescued by the absence of p53 (refs 3,4). Because the MDM2/p53 interaction is critical to the survival in this *in vivo* model, it is ideal for studying the p53 pathway, specifically the contribution of downstream effectors of p53. One of the genes activated by p53 is *p21* (ref. 5). *p21* is the only known p53 target that binds and inhibits the function of the cyclin-cyclin-dependent kinase complexes and thus halts cell-cycle progression<sup>6,7</sup>.

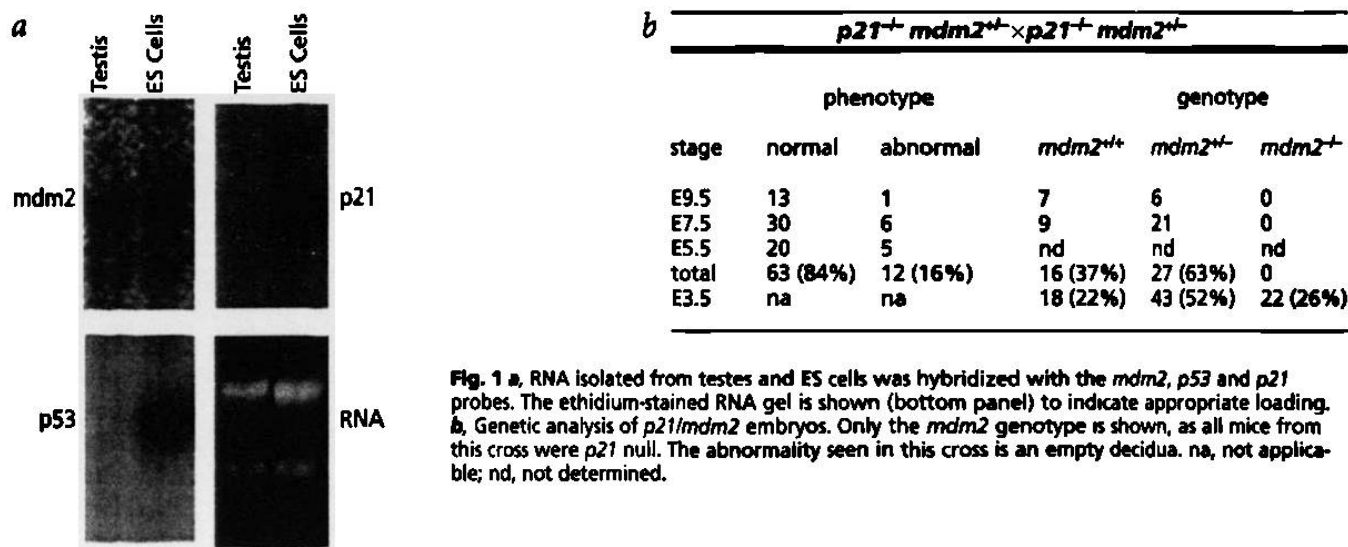
To determine the importance of the p53 target, *p21*, in rescue of the *mdm2*<sup>-/-</sup> lethality, we first asked whether these genes were expressed in early development.

Northern analysis using RNA from embryonic stem cells obtained from 3.5-day blastocysts revealed that *p53* and its effectors, *mdm2* and *p21*, were highly expressed in these cells (Fig. 1a). Thus, these components of the p53 pathway were present early in development.

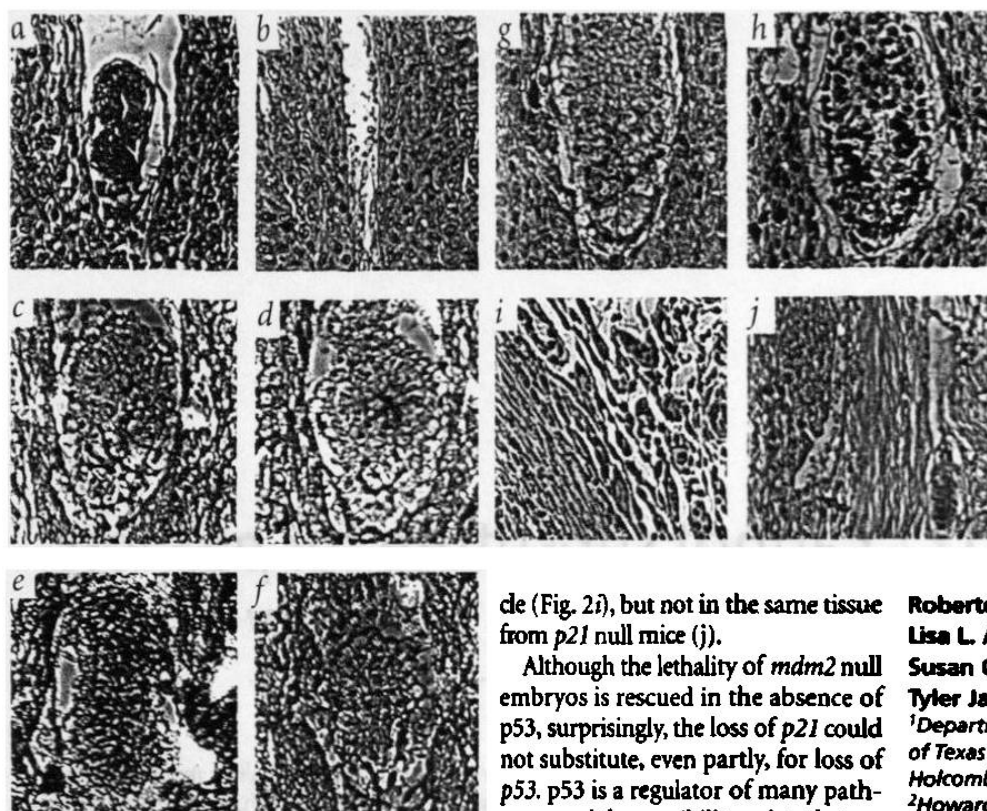
To examine *p21* as an effector of p53 function *in vivo*, we asked whether deletion of *p21* could substitute for deletion of *p53* in the rescue of *mdm2*<sup>-/-</sup> embryos. Mice heterozygous for *mdm2* and null for *p21* were mated with each other<sup>3,8</sup>. In this cross, 25% of the mice are expected to be double null. Of 46 mice born, 11 (24%) were *mdm2*<sup>+/+</sup> *p21*<sup>-/-</sup>, 35 (76%) were *mdm2*<sup>+/-</sup> *p21*<sup>-/-</sup> and none were *mdm2*<sup>-/-</sup> *p21*<sup>-/-</sup>. These data indicate that the loss of *p21*, unlike the loss of *p53*, does not rescue the lethality of *mdm2*<sup>-/-</sup> embryos.

The possibility remained that loss of *p21*

was insufficient to allow *mdm2*<sup>-/-</sup> embryos to survive until birth, but that a partial rescue occurred. Again, *mdm2*<sup>+/+</sup> *p21*<sup>-/-</sup> mice were mated with each other, and pregnant females were examined during gestation. Genotyping of embryos at days 9.5 and 7.5 of gestation did not yield any double null embryos (Fig. 1b). To address the possibility that rescue of *mdm2*<sup>-/-</sup> lethality at 5.5 days of development by loss of *p21* delayed death by a very short time, the deciduae containing embryos from a cross between *p21*<sup>-/-</sup> *mdm2*<sup>+/+</sup> mice were dissected at 5.5 days of gestation and paraffin embedded. Of 25 deciduae sectioned, five (20%) showed lack of embryo development reminiscent of the empty deciduae seen in *mdm2* heterozygous crosses<sup>3</sup> (Fig. 2a,b). Thus, loss of *p21*, in contrast to *p53* deletion, did not even partly rescue the lethality of *mdm2*<sup>-/-</sup> embryos.



**Fig. 1 a**, RNA isolated from testes and ES cells was hybridized with the *mdm2*, *p53* and *p21* probes. The ethidium-stained RNA gel is shown (bottom panel) to indicate appropriate loading. **b**, Genetic analysis of *p21*/*mdm2* embryos. Only the *mdm2* genotype is shown, as all mice from this cross were *p21* null. The abnormality seen in this cross is an empty decidua. na, not applicable; nd, not determined.



**Fig. 2** The phenotype and expression of several genes were assayed in mouse embryos at 5.5 days post coitum. Deciduae from crosses between *p21*<sup>+/+</sup> *mdm2*<sup>+/+</sup> mice were dissected, paraffin embedded and sectioned. While most embryos were normal (**a**), 20% of the embryos had an abnormal phenotype (**b**). To assay for *p21* induction by *p53*, normal embryos were treated with 5.0 Gy of ionizing radiation and hybridized *in situ* with anti-sense (**c**) and sense (**d**) *p21* probes. As a control for induction of the *p53* pathway, *in situ* hybridization with antisense (**e**) and sense (**f**) *mdm2* probes was performed on irradiated embryos. Anti-*p21* (**g**) and anti-*mdm2* antibodies (**h**) were used to detect protein. As controls, anti-*p21* antibodies were also used on uteri of normal (**i**) and *p21* null mice (**j**).

cle (Fig. 2i), but not in the same tissue from *p21* null mice (j).

Although the lethality of *mdm2* null embryos is rescued in the absence of *p53*, surprisingly, the loss of *p21* could not substitute, even partly, for loss of *p53*. *p53* is a regulator of many pathways, and the possibility exists that no single target can affect the functions of *p53*—a possibility supported by the lack of mutations in *p21* in human tumours<sup>12–14</sup> and the lack of susceptibility of *p21* null mice to tumorigenesis<sup>8,15</sup>. However, the lack of *p21* induction by *p53* in wild-type embryos at 5.5 days of development indicates that *p21* is not part of this pathway. Thus, we have unveiled an *in vivo* situation in which the ability of *p53* to exert its effects is not dependent on activation of *p21*.

#### Acknowledgements

We thank S. Elledge for the *p21* plasmid and W. Harper for the murine-specific *p21* antibody. This study was supported by grants CA47296 and DAMD17-96-1-6222 to G.L. and CA16672 to the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center.

Roberto Montes de Oca Luna<sup>1</sup>,  
Lisa L. Amelise<sup>1</sup>, Arturo Chavez-Reyes<sup>1</sup>,  
Susan C. Evans<sup>1</sup>, James Brugarolas<sup>2</sup>,  
Tyler Jacks<sup>2</sup> & Guillermina Lozano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Genetics, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd., Houston, Texas 77030, USA.

<sup>2</sup>Howard Hughes Medical Institute, Center for Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02142, USA. Correspondence to be addressed to G.L.

We further examined the ability of *p53* to activate transcription in this system. We analysed induction of *p53* protein, and *p21* and *mdm2* mRNAs in embryos at 5.5 days of development after irradiation with 5.0 Gy. In embryos, *p53* was induced by 100 minutes (data not shown), with no induction of *p21* mRNA (Fig. 2c,d). In contrast, another transcriptional target of *p53*, the *mdm2* gene<sup>9–11</sup>, was induced by gamma radiation in both the embryo and surrounding maternal tissue of the decidua (Fig. 2e,f, respectively). Anti-*p21* and -*mdm2* antibodies were used to detect protein. The *p21* antibody did not detect protein, whereas MDM2 was clearly produced in these embryos (Fig. 2g,h, respectively). As controls, the *p21* antibody was able to detect *p21* in uterine mus-

- Chen, J., Marechal, V. & Levine, A.J. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4107–4114 (1993).
- Oliner, J.D. et al. *Nature* **362**, 857–860 (1993).
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S. & Lozano, G. *Nature* **378**, 203–206 (1995).
- Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A. & Bradley, A. *Nature* **378**, 206–208 (1995).
- El-Diery, W.S. et al. *Cell* **75**, 817–825 (1993).
- Harper, W.J., Adams, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S.J. *Cell* **75**, 805–816 (1993).
- Xiong, Y. et al. *Nature* **366**, 701–704 (1993).
- Brugarolas, J. et al. *Nature* **377**, 552–557 (1995).
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. & Oren, M. *EMBO J.* **12**, 461–468 (1993).
- Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D.L. & Oren, M. *Oncogene* **8**, 3411–3416 (1993).
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. & Levine, A.J. *Genes Dev.* **7**, 1126–1132 (1993).
- Shiohara, M. et al. *Blood* **84**, 3781–3784 (1994).
- Li, Y.-J., Laurent-Pug, Salmon, R.J., Thomas, G. & Hamel, R. *Oncogene* **10**, 599–601 (1995).
- Gao, X. et al. *Oncogene* **11**, 1395–1398 (1995).
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. & Leder, P. *Cell* **82**, 675–684 (1996).

## BIBLIOGRAFIA

Akashi, M., Hachiya, M., Osawa, Y., Spirin, K., Suzuki, G., and Koeffler, H. P. (1995). Irradiation induces WAF1 expression through a p53-independent pathway in KG-1 cells. *Journal of Biological Chemistry* 270, 19181-7.

Altman, R., and Sarg, M. (1992). *The Cancer Dictionary* (New York: Facts on File).

Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K., and Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249, 912-5.

Barak, Y., Gottlieb, E., Juven-Gershon, T., and Oren, M. (1994). Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 8, 1739-49.

Bargonetti, J., Friedman, P. N., Kern, S. E., Vogelstein, B., and Prives, C. (1991). Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 65, 1083-91.

Baru, M., Shlissel, M., and Manor, H. (1991). The yeast GAL4 protein transactivates the polyomavirus origin of DNA replication in mouse cells. *Journal of Virology* 65, 3496-3503.

Benchimol, S., Lamb, P., Crawford, L. V., Sheer, D., Shows, T. B., Bruns, G. A., and Peacock, J. (1985). Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* *11*, 505-10.

Boddy, M. N., Freemont, P. S., and Borden, K. L. (1994). The p53-associated protein MDM2 contains a newly characterized zinc-binding domain called the RING finger. *Trends Biochem Sci* *19*, 198-9.

Bravo, R., and Macdonald-Bravo, H. (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *Journal of Cell Biology* *105*, 1549-54.

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* *377*, 552-7.

Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B. R., and Kley, N. (1995). Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* *377*, 646-9.

Chen, J., Marechal, V., and Levine, A. J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* *13*, 4107-14.

Chen, P. L., Chen, Y. M., Bookstein, R., and Lee, W. H. (1990). Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250, 1576-80.

Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L., and Wyllie, A. H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways [see comments]. *Nature* 362, 849-52.

Cooper, G. M. (1993). *The Cancer Book. A guide to understanding the causes, prevention, and treatment of cancer.* (Boston: Jones and Bartlett Publishers).

Cox, L. S., and Lane, D. P. (1995). Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays* 17, 501-8.

Crook, T., Marston, N. J., Sara, E. A., and Vousden, K. H. (1994). Transcriptional activation by p53 correlates with suppression of growth but not transformation. *Cell* 79, 817-27.

De Fromental, C. C., and Soussi, T. (1992). Tp53 tumor supresor p53: a model for investigating human mutagenesis. *Genes, Chrom. Cancer* 4, 1-15.



Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-84.

Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-21.

Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Reed, S. I. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76, 1013-23.

Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C., and Winchester, E. (1993). Inhibition of DNA replication factor RPA by p53 [see comments]. *Nature* 365, 79-82.

el-Deiry, W. S. (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Seminars in Cancer Biology* 8, 345-57.

El-Deiry, W. S. (1998). Review: the p53 pathway and cancer therapy. *The Cancer Journal* 11, 229-236.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-25.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J. D., Velculescu, V. E., Burrell, M., Hill, D. E., Healy, E., Rees, J. L., and Hamilton, S. R. (1995). Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Research* 55, 2910-9.

Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646-9.

Fakharzadeh, S. S., Trusko, S. P., and George, D. L. (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO Journal* 10, 1565-1569.

Finlay, C. A. (1993). The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Molecular & Cellular Biology* 13, 301-6.

Foord, O. S., Bhattacharya, P., Reich, Z., and Rotter, V. (1991). A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. *Nucleic Acids Res* 19, 5191-8.

Foster, H. L., Small, J. D., and Fox, J. G. (1983). *The Mouse in Biomedical Research*, Volume 3 (Orlando: Academic Press).

Friedman, P. N., Kern, S. E., Vogelstein, B., and Prives, C. (1990). Wild-type, but not mutant, human p53 proteins inhibit the replication activities of simian virus 40 large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9275-9.

Gannon, J. V., Greaves, R., Iggo, R., and Lane, D. P. (1990). Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *Embo J* 9, 1595-602.

Gartel, A. L., Serfas, M. S., Gartel, M., Goufman, E., Wu, G. S., el-Deiry, W. S., and Tyner, A. L. (1996). p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Experimental Cell Research* 227, 171-81.

Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., and Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 54, 4855-78.

Hainaut, P., Hernandez, T., Robinson, A., Rodriguez-Tome, P., Flores, T., Hollstein, M., Harris, C. C., and Montesano, R. (1998). IARC Database of p53 gene mutations in

human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Research* 26, 205-13.

Haines, D. S., Landers, J. E., Engle, L. J., and George, D. L. (1994). Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. *Mol Cell Biol* 14, 1171-8.

Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D., and White, E. (1996). The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes & Development* 10, 461-77.

Harper, J. W., and et.al. (1993). The p21 cdk-interacting protein Cip-1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.

Harvey, M., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Bradley, A., and Donehower, L. A. (1993). Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB Journal* 7, 938-43.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-9.

Hirano, Y., Yamato, K., and Tsuchida, N. (1995). A temperature sensitive mutant of the human p53, Val138, arrests rat cell growth without induced expression of cipl/waf1/sdi1 after temperature shift-down. *Oncogene* 10, 1879-85.

Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., and Harris, C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22, 3551-5.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.

Israeli, D., Tessler, E., Haupt, Y., Elkeles, A., Wilder, S., Amson, R., Telerman, A., and Oren, M. (1997). A novel p53-inducible gene, PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis. *EMBO Journal* 16, 4384-92.

Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T., and Weinberg, R. A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current Biology* 4, 1-7.

Johnson, P., Gray, D., Mowat, M., and Benchimol, S. (1991). Expression of wild-type p53 is not compatible with continued growth of p53-negative tumor cells. *Mol Cell Biol* 11, 1-11.

Jones, S. N., Roe, A. E., Donehower, L. A., and Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206-8.

Joyner, A. L. e. (1993). *Gene Targeting, a practical approach*, 1st. Edition, D. R. a. B. D. Hames, ed. (New York: Oxford University Press).

Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D. L., and Oren, M. (1993). Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene* 8, 3411-6.

Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96-9.

Ko, L. J., and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10, 1054-72.

Kubbutat, M., Ludwigkubbutat, R., Ashcroft, M., and Vousden, K. (1998). Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Molecular & Cellular Biology*. 18, 5690-5698.

Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.

Ladanyi, M., Cha, C., Lewis, R., Jhanwar, S. C., Huvos, A. G., and Healey, J. H. (1993). MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 53, 16-8.

Lane, D. P. a. C., L.V. (1979). T antigen es bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.

Levine, A. J., Momand, J., and Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-6.

Li, R., and Botchan, M. R. (1993). The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* 73, 1207-21.

Lozano, G., and Liu, G. (1998). Mouse models dissect the role of p53 in cancer and development. *Seminars in Cancer Biology* 8, 337-44.

Lozano, G., and Montes de Oca Luna, R. (1998). MDM2 function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1377, M55-9.

Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes & Development* 9, 935-44.

Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Jr., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A., and et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms [see comments]. *Science* 250, 1233-8.

Martinez, J., Georgoff, I., and Levine, A. J. (1991). Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev* 5, 151-9.

McCurrach, M. E., Connor, T. M., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., and Lowe, S. W. (1997). bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2345-9.

Mercer, W. E., Shields, M. T., Amin, M., Sauve, G. J., Appella, E., Romano, J. W., and Ullrich, S. J. (1990). Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6166-70.

Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J. H., Mercer, W. E., and Givol, D. (1994). Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Research* 54, 3391-5.

Missero, C., Calautti, E., Eckner, R., Chin, J., Tsai, L. H., Livingston, D. M., and Dotto, G. P. (1995). Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated



p300 protein in terminal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5451-5.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-805.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-9.

Moll, U. M., Riou, G., and Levine, A. J. (1992). Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7262-6.

Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-45.

Montes de Oca Luna, R., Amelse, L. L., Chavez-Reyes, A., Evans, S. C., Brugarolas, J., Jacks, T., and Lozano, G. (1997). Deletion of p21 cannot substitute for p53 loss in rescue of mdm2 null lethality [letter]. *Nat Genet* 16, 336-7.

Montes de Oca Luna, R., Wagner, D. S., and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203-6.

Namba, H., Hara, T., Tukazaki, T., Migita, K., Ishikawa, N., Ito, K., Nagataki, S., and Yamashita, S. (1995). Radiation-induced G1 arrest is selectively mediated by the p53-WAF1/Cip1 pathway in human thyroid cells. *Cancer Research* 55, 2075-80.

O'Rourke, R. W., Miller, C. W., Kato, G. J., Simon, K. J., Chen, D. L., Dang, C. V., and Koeffler, H. P. (1990). A potential transcriptional activation element in the p53 protein. *Oncogene* 5, 1829-32.

Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., and Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas [see comments]. *Nature* 358, 80-3.

Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362, 857-60.

Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-19.

Oren, M. (1985). The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 823, 67-78.

Oren, M., Reich, N. C., and Levine, A. J. (1982). Regulation of the cellular p53 tumor antigen in teratocarcinoma cells and their differentiated progeny. *Mol Cell Biol* 2, 443-9.

Owen-Schaub, L. B., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Deisseroth, A. B., Zhang, W. W., and Kruzel, E. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Molecular & Cellular Biology* 15, 3032-40.

Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D., and Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312, 649-51.

Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A. T., Bradley, A., Olson, E. N., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells [see comments]. *Science* 267, 1024-7.

Pietenpol, J. A., Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W. S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1994). Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1998-2002.

Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis [see comments]. *Nature* 389, 300-5.

Ramqvist, T., Magnusson, K. P., Wang, Y., Szekely, L., Klein, G., and Wiman, K. G. (1993). Wild-type p53 induces apoptosis in a Burkitt lymphoma (BL) line that carries mutant p53. *Oncogene* 8, 1495-500.

Raycroft, L., Schmidt, J. R., Yoas, K., Hao, M. M., and Lozano, G. (1991). Analysis of p53 mutants for transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 11, 6067-74.

Raycroft, L., Wu, H. Y., and Lozano, G. (1990). Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 249, 1049-51.

Reifenberger, G., Liu, L., Ichimura, K., Schmidt, E. E., and Collins, V. P. (1993). Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 53, 2736-9.

Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., and Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [see comments]. *Nature* 391, 496-9.

Schmid, P., Lorenz, A., Hameister, H., and Montenarh, M. (1991). Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development* 113, 857-65.

Selvakumaran, M., Lin, H. K., Miyashita, T., Wang, H. G., Krajewski, S., Reed, J. C., Hoffman, B., and Liebermann, D. (1994). Immediate early up-regulation of bax

expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 9, 1791-8.

Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 10, 6565-77.

Sheikh, M. S., Shao, Z. M., Hussain, A., and Fontana, J. A. (1993). The p53-binding protein MDM2 gene is differentially expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res* 53, 3226-8.

Soussi, T., Caron de Fromental, C., and May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5, 945-52.

Srivastava, S., Zou, Z. Q., Pirollo, K., Blattner, W., and Chang, E. H. (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome [see comments]. *Nature* 348, 747-9.

Steinman, R. A., Hoffman, B., Iro, A., Guillouf, C., Liebermann, D. A., and el-Houseini, M. E. (1994). Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 9, 3389-96.

Sturzbecher, H. W., Brain, R., Addison, C., Rudge, K., Remm, M., Grimaldi, M., Keenan, E., and Jenkins, J. R. (1992). A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene* 7, 1513-23.

Sturzbecher, H. W., Brain, R., Maimets, T., Addison, C., Rudge, K., and Jenkins, J. R. (1988). Mouse p53 blocks SV40 DNA replication in vitro and downregulates T antigen DNA helicase activity. *Oncogene* 3, 405-13.

Tack, L. C., Wright, J. H., Deb, S. P., and Tegtmeyer, P. (1989). The p53 complex from monkey cells modulates the biochemical activities of simian virus 40 large T antigen. *J Virol* 63, 1310-7.

Theiler, K. (1989). *The House Mouse: atlas of embryonic development* (New York: Springer-Verlag).

Tsukada, T., Tomooka, Y., Takai, S., Ueda, Y., Nishikawa, S., Yagi, T., Tokunaga, T., Takeda, N., Suda, Y., and Abe, S. (1993). Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene* 8, 3313-22.

Waseem, N. H., and Lane, D. P. (1990). Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *Journal of Cell Science* 96, 121-9.

Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G., and el-Deiry, W. S. (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene [letter]. *Nature Genetics* 17, 141-3.

Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [see comments]. *Nature* 366, 701-4.

Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D. (1992). D-types cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71, 504-514.

Yin, C., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., and Van Dyke, T. (1997). Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 385, 637-40.

Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., Kimchi, A., May, E., Lawrence, J. J., May, P., and Oren, M. (1993). p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol* 13, 1415-23.

Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-7.

Zhang, H., Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 8, 1750-8.



## **VITAE**

**Arturo Chávez Reyes nació en Montemorelos, Nuevo León, México el 21 de Julio de 1970. Es el primero de tres hijos y único varón de Arturo Chávez y Nora Hilda Reyes. Después de completar sus estudios intermedios en la Escuela Preparatoria No. 6 de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en Montemorelos, N.L., ingresó a la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL en Monterrey, N.L. Obtuvo su grado de Químico Farmacéutico Biólogo con la distinción de Título Honorífico en 1992. Realizó su servicio social en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL en 1991. En 1992 se unió al grupo de investigación del Dr. Reyes Tamez Guerra en el mismo laboratorio, realizando trabajo clínico en pacientes inmunocomprometidos y participando en actividades académicas en la licenciatura de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. En 1993 ingresó al Programa de Excelencia de Postgrado en la Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunobiología en la División de Postgrado de la misma facultad. En 1996 se unió al grupo de investigación de la Dra. Guillermina Lozano en el departamento de Genética Molecular del Centro de Cancer M.D. Anderson de la Universidad de Texas en Houston, Texas, EUA.**



DONATIVO



