

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PARTICIPACION DE LOS GENES BLANCO DE *p53*:
p21 Y *bax*, EN LA MUERTE EMBRIONARIA CAUSADA
POR *p53* EN RATONES CARENTES DE *mdm2*.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

Por

Q. F. B. ARTURO CHAVEZ REYES

Monterrey, Nuevo León

Diciembre de 1999

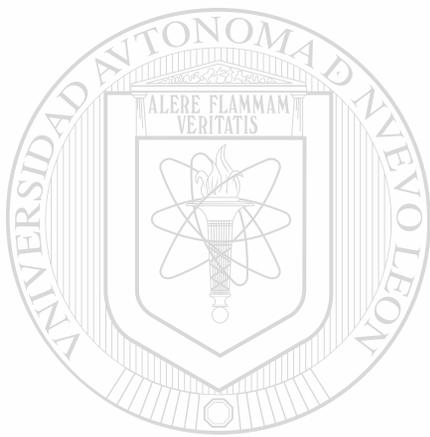
TM

RC267

.C4

1999

c.1



UANL

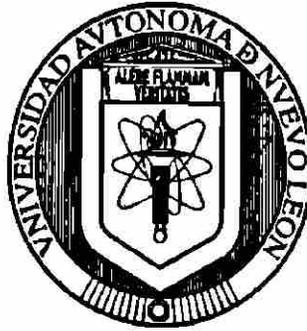
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**PARTICIPACION DE LOS GENES BLANCO DE *p53*: *p21*
Y *bax*, EN LA MUERTE EMBRIONARIA CAUSADA POR
p53 EN RATONES CARENTES DE *mdm2*.**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON®
DIPLOMADO ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA**

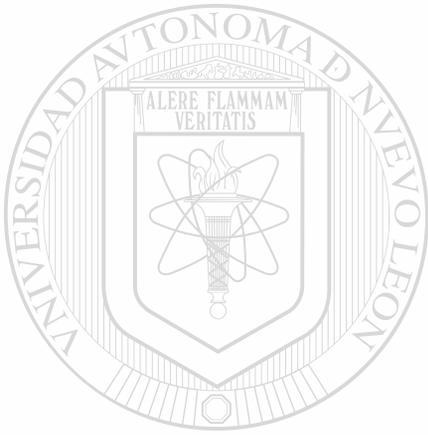
Por

Q.F.B. ARTURO CHAVEZ REYES

Monterrey, Nuevo León.

Diciembre de 1999

TM
RC267
.C4
1999



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**PARTICIPACION DE LOS GENES BLANCO DE *p53*: *p21*
Y bax, EN LA MUERTE EMBRIONARIA CAUSADA POR
p53 EN RATONES CARENTES DE *mdm2*.**

COMISION DE EXAMEN

**Dr. Roberto Montes de Oca Luna
PRESIDENTE**

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla
SECRETARIO**

**Ph.D. Gulliermina Lozano
PRIMER VOCAL**

**Dr. Reyes S. Tamez Guerra
SEGUNDO VOCAL**

**Dr. Pablo Zapata Benavides
TERCER VOCAL**

Handwritten signatures of the five members of the examination commission, each written on a horizontal line.

Monterrey, Nuevo León.

Diciembre de 1999

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**PARTICIPACION DE LOS GENES BLANCO DE *p53*: *p21*
Y *bax*, EN LA MUERTE EMBRIONARIA CAUSADA POR
p53 EN RATONES CARENTES DE *mdm2*.**

COMISION DE APROBACION DE TESIS

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Director de Tesis

Ph.D. Gulliermina Lozano
Co-Director Externo de Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Co-Director de Tesis

Dra. Julia Verde Star
Subdirectora de Postgrado

Monterrey, Nuevo León.

Diciembre de 1999



*".... O ya no entiendo lo que está
pasando o ya pasó lo que estaba
apenas entendiendo...."*

Carlos Monsiváis.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LOCALIZACION

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE LA PH.D. GUILLERMINA LOZANO EN EL DEPARTAMENTO DE GENETICA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE TEXAS EN EL CENTRO DE CANCER M.D. ANDERSON DE LA CIUDAD DE HOUSTON, TEXAS BAJO LA DIRECCION DEL DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA, LA CO-DIRECCION EXTERNA DE LA PH.D. GUILLERMINA LOZANO Y LA CO-DIRECCION INTERNA DE LA DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A mis padres:

Arturo y Nora Hilda

Gracias por todo su amor, comprensión, apoyo, esfuerzos y sacrificios que han hecho posible que haya llegado a esta etapa de mi carrera y de mi vida.

A mis hermanas:

Nora y Erika

Por el cariño y su manera tan especial de motivarme a seguir siempre adelante.

A:

Yolanda

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por estar ahí siempre.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mi abuelita:

María

Porque sé que me sigues cuidando desde donde estas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por sus enseñanzas, por brindarme la oportunidad de continuar con su línea de investigación, por todo su apoyo y asesoría durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Guillermina Lozano por darme la invaluable oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su crítica y guía durante todo este tiempo, thanks Gigi.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por apoyarme en esta aventura, por todos los consejos brindados y por la revisión del manuscrito de esta tesis.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides por introducirme al mundo de la Biología Molecular enseñándome todas las bases que hicieron posible que realizara este trabajo y por su apoyo incondicional.

A los Drs. Ricardo Gomez Flores y Edgar Mendoza Gamboa por su amistad y todo el apoyo que me han brindado siempre.

A John M. Parant por toda la ayuda y por estar siempre dispuesto a compartir conmigo sus conocimientos, gracias buddy.

A la Ms.S. Lisa L. Amelse por la ayuda técnica ofrecida durante todo el proceso de esta investigación.

Al C.P. Faustino Chávez Gutierrez por haberme apoyado toda la vida, gracias tío.

Al Biol. Mario Alberto Valdés Marroquín por ser mi hermano desde hace tanto tiempo.

A Silvia Treviño Moreno por su amistad y ayuda en todos los aspectos.

A mis compañeros del laboratorio de la Dra. Lozano: Susan, Geng, Wen, John, Betsy, Gene, Mini, Sohela, Chad, Carolyn, Jimmy, Sung-Ling, Lisa, Valerie, Joe y Sonia, por toda la ayuda y enseñanzas que me han brindado.

A todas las personas del M.D. Anderson que de alguna forma han contribuido a que pueda terminar este trabajo, especialmente al personal del departamento de Genética Molecular.

A mis amigos del laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas: José Luis, Leo, Esther, Mati, Pera, Bertha, Catarino, Aracely, Herminio, Reyes, Sabino, Gabriel y Juany porque de todos he aprendido mucho.

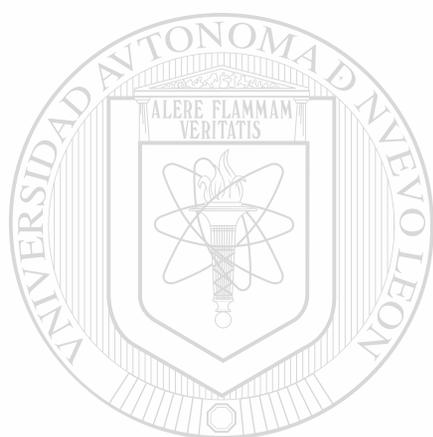
A todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron a que la realización de este trabajo fuera posible y que sin intención omito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado en mi carrera.

INDICE GENERAL

	Pag.
Localización	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Indice general	v
Indice de tablas	vii
Indice de figuras	ix
Indice de apéndices	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumen	1
Importancia	4
Introducción	5
Antecedentes	12
I. <i>p53</i>	12
II. <i>mdm2</i>	21
III. <i>p21</i>	25
IV. <i>bax</i>	28
Hipótesis	32
Objetivos	33
Diagrama de Flujo	34
Materiales y Métodos	35

Resultados	45
Discusión	72
Conclusiones	84
Apéndices	85
Bibliografía	98
Vitae	117



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1.	47
Análisis genético de ratones mutantes <i>p21/mdm2</i>.	
Tabla 2.	49
Análisis genético de ratones mutantes <i>p21/mdm2</i>.	
Tabla 3.	50
Análisis histológico y genético de embriones mutantes <i>p21/mdm2</i> de 9.5 días de gestación.	
Tabla 4.	52
Análisis histológico y genético de embriones mutantes <i>p21/mdm2</i> de 7.5 días de gestación.	
Tabla 5.	53
Análisis histológico de embriones mutantes <i>p21/mdm2</i> de 5.5 días de gestación.	
Tabla 6.	56
Análisis genético de embriones mutantes <i>p21/mdm2</i> de 3.5 días de gestación.	
Tabla 7.	57
Análisis genético de ratones mutantes <i>bax/mdm2</i>.	

Tabla 8.	59
Análisis genético de ratones mutantes <i>bax/mdm2</i>.	
Tabla 9.	60
Análisis histológico y genético de ratones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 7.5 días de gestación.	
Tabla 10.	62
Análisis histológico de ratones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 5.5 días de gestación.	
Tabla 11.	64
Análisis histológico de ratones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 6.5 días de gestación.	
Tabla 12.	67
Análisis de apoptosis <i>in situ</i> en embriones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 6.5 días de gestación.	
Tabla 13.	70
Análisis del ciclo celular <i>in situ</i> en embriones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 6.5 días de gestación.	

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1.	3
Las vías de p53.	
Figura 2.	14
Organización de la proteína p53	
Figura 3.	22
Organización de la proteína mdm2.	
Figura 4.	27
Inhibición de kinasas dependientes de ciclina por p21.	
Figura 5.	30
Modelo de las interacciones Bcl-2/Bax y la regulación de apoptosis.	
Figura 6.	46
Productos de PCR para los genes <i>mdm2</i>, <i>p21</i> y <i>bax</i>.	
Figura 7.	54
Histología de embriones mutantes <i>p21/mdm2</i> de 5.5 días de gestación.	
Figura 8.	63
Histología de embriones mutantes <i>bax/mdm2</i> de 5.5 días de gestación.	
Figura 9.	66

Histología de embriones mutantes *bax/mdm2* de 6.5 días de gestación.

Figura 10. 69

Determinación de apoptosis en embriones mutantes *bax/mdm2* de 6.5 días de gestación mediante la técnica de Tunel.

Figura 11. 71

Determinación de inhibición del crecimiento celular en embriones mutantes *bax/mdm2* de 6.5 días de gestación mediante detección inmunohistoquímica de PCNA.

Figura 12. 86

Inactivación del gen *mdm2*.

Figura 13. 87

Inactivación del gen *p21*.

Figura 14. 88

Inactivación del gen *bax*.

Figura 15. 89

Inactivación de genes en ratones. Protocolo.

INDICE DE APENDICES

	Pag
Apéndice 1.	85
Inactivación de genes en ratones.	
Apéndice 2.	90
Segregación génica.	
Apéndice 3.	91
Principio de la determinación de apoptosis por la técnica de Tunel.	
Apéndice 4.	92
Principio de la determinación de la inhibición del crecimiento celular mediante el uso del sistema Zymed para la detección inmunohistoquímica de PCNA.	
Apéndice 5.	93
Lista de reactivos, kits y buffers utilizados.	
Apéndice 6.	96
Artículo publicado.	

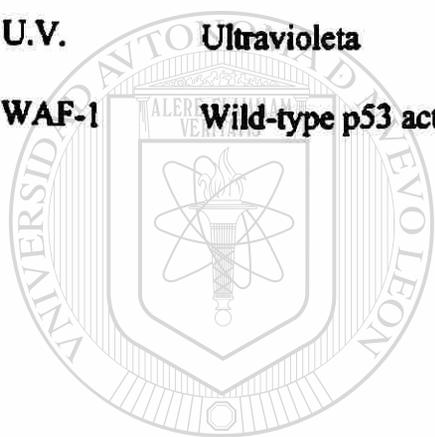
LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje, porciento.
°C	Grados centígrados
Ab	Anticuerpo
Aprox.	Aproximadamente
BrdU	5-Bromo 2'-desoxiuridina
Ca⁺²	Ión calcio
CDKs	Kinasas dependientes de ciclina
cDNA	DNA complementario o copia
Cip-1	Cdk-interacting protein, proteína de interacción con CDKs
DAB	Diamino bencidina
det.	Determinación
<hr/>	
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Mezcla de los desoxirribonucleosil trifosfatos: ATP, GTP, CTP y TTP
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
EDTA	Acido etilendiamo tetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ES	Embryo Stem, Estaminal embrionaria
Etc.	Etcétera
FERs	Fibroblastos de embrión de rata
Hg⁺²	Ión mercurio

Hr.	Hora
Hrs.	Horas
I.R.	Radiación ionizante
IGF-BP3	Insuline-like growth factor binding protein 3, proteína 3 de unión al factor de crecimiento tipo insulina
IL-3	Interleucina 3
Kb	Kilobase, 1000 pares de bases.
kDA o kD	Kilodaltones
KO	Knockout, inactivación
L5	Proteína ribosomal L5
M	Molar, concentración molar, molaridad.
MA	Massachussets
mdm	Murine double minute, doble diminuto murino
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar, concentración milimolar.
MO	Missouri
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
NaCl	Cloruro de sodio
Neo	Neomicina

ng	Nanogramo
OH	Hidroxi
ORF	Open reading frame, marco abierto de lectura
Pag.	Página
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ph.D.	Doctor en Filosofía
pH	Potencial de hidrógeno
POD	Peroxidasa
prob.	Probabilidad
Rb	Retinoblastoma
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Estreptavidina
Sdi1	Senescent cell DNA synthesis inhibitor, inhibidor de la síntesis de DNA en células senescentes.
SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundo
SLN	Señal de localización nuclear
St.	Stret, calle
SV40	Virus de simio 40
TBE	Bufer de tris, boratos y EDTA
TBP	Proteína de unión a caja TATA

TdT	Terminal desoxi-transferasa
TFII E	Factor de transcripción II E
TGF-α	Factor de crecimiento transformante α
TK	Timidina kinasa
Tris	Trizma base
Tunel	TdT-mediated dUTP nick end labeling
TX	Texas
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
U.V.	Ultravioleta
WAF-1	Wild-type p53 activated fragment 1, fragmento 1 activado por p53 silvestre



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

p53 es el gen que se encuentra más frecuentemente mutado en tumores y es considerado como “el guardián 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 cruza 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 cruza 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 las 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 lo 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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IMPORTANCIA

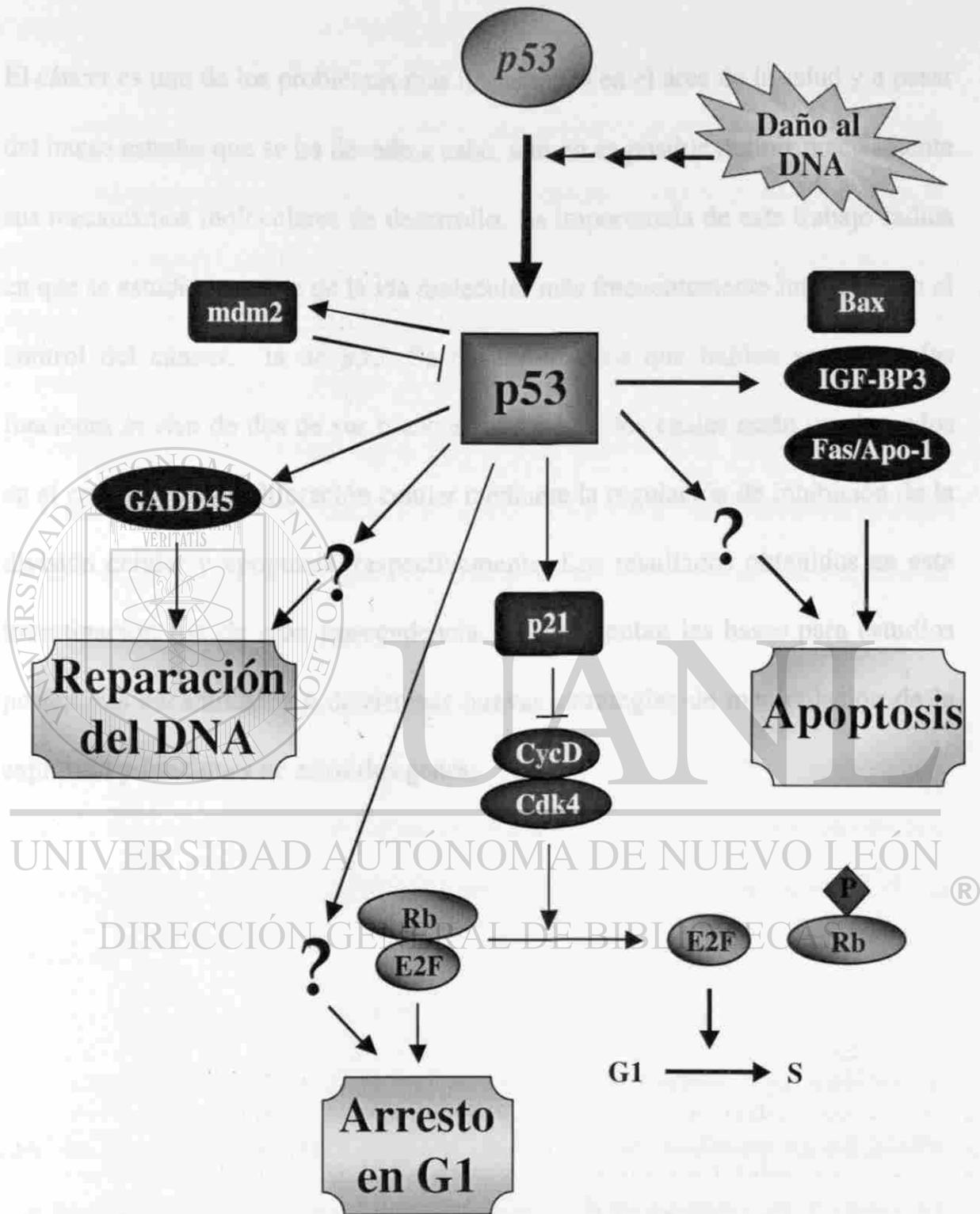


Figura 1. Las vías de p53. Las flechas (↓) representan inducción mientras que las otras líneas (⊥) representan bloqueo.

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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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 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.

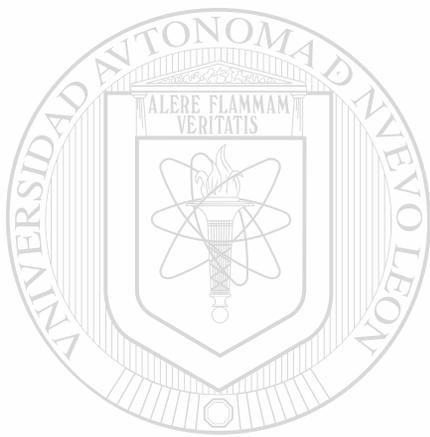
El crecimiento celular es controlado entre otros factores por los miembros de dos grandes familias de moléculas, los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los oncogenes inducen la formación de cáncer. Se encuentran en células normales y es muy probable que su oncogenicidad derive de un evento 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

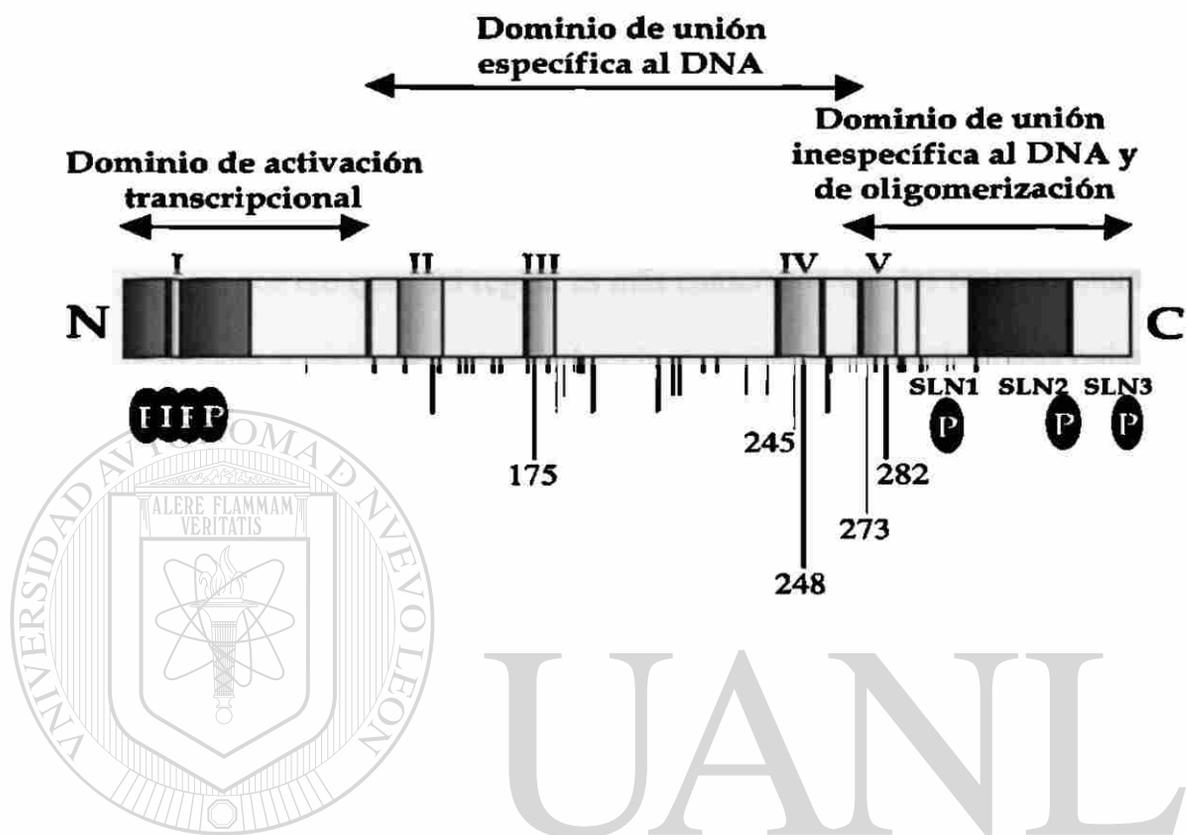


Figura 2. Estructura de la proteína p53 humana. SLN= Señal de localización nuclear; P= Sitio de fosforilación; I, II, III, IV y V: Dominios altamente conservados; N= Terminación amino; C= Terminación carboxilo; las líneas verticales indican los sitios altamente propensos a mutaciones.

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 asocie 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.

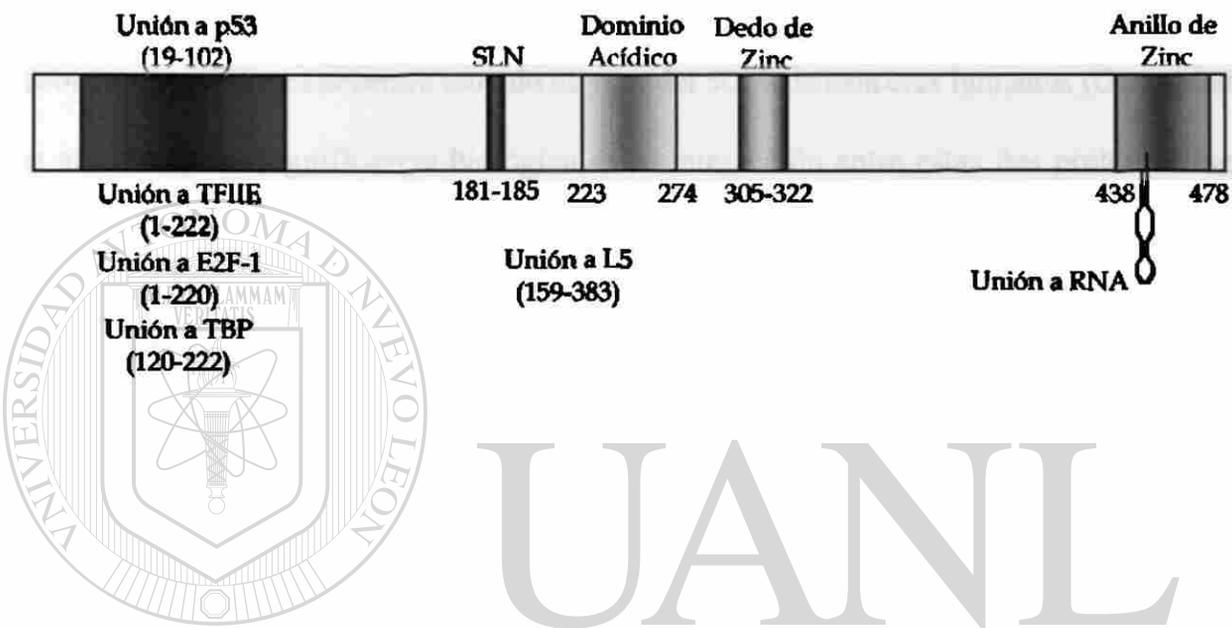
Otros candidatos para genes de respuesta a *p53* incluye genes que codifican para el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), trombospondina-1, fas/APO-1, retinoblastoma, PCNA, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), ciclina D, cretina kinasa y el propio *p53*. Estos genes generalmente 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*.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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).

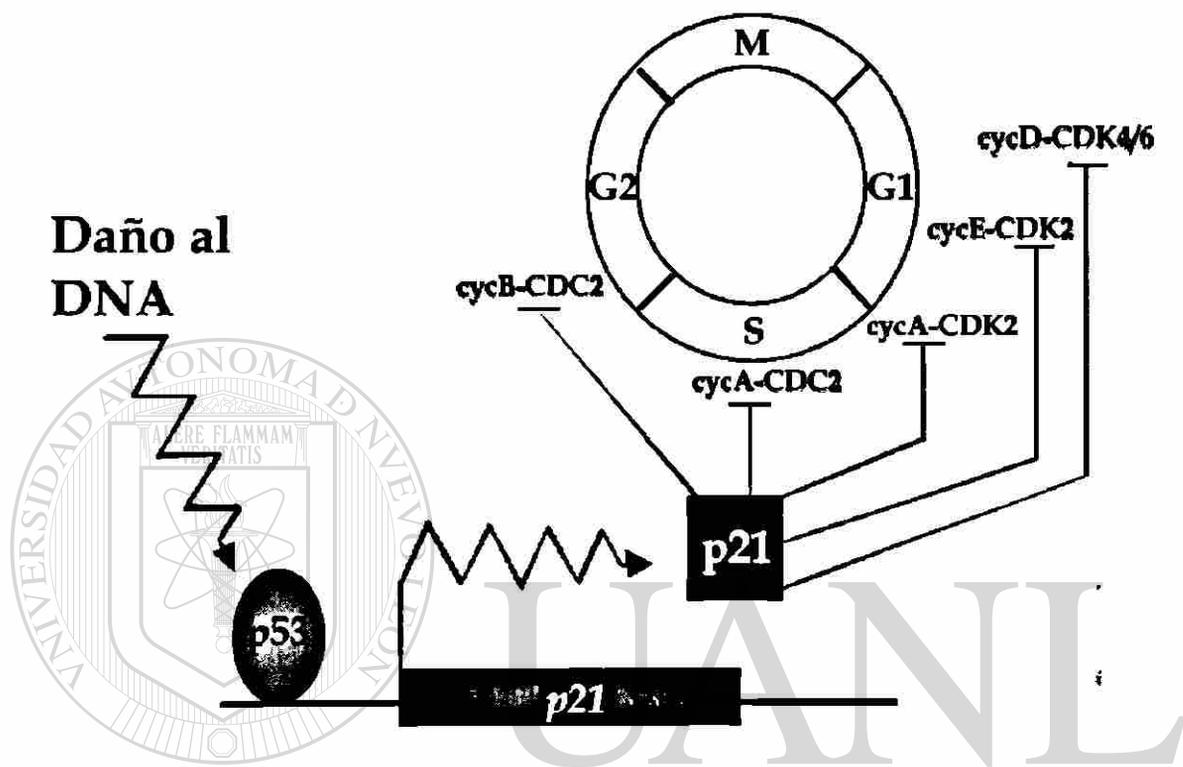
III. *p21* / *WAF-1* / *Cip1*

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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-inmunoprecipitación 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: α , de 21 kD y que posiblemente contiene un segmento transmembranal; β , de 24 kD y localización citoplasmática; y γ 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

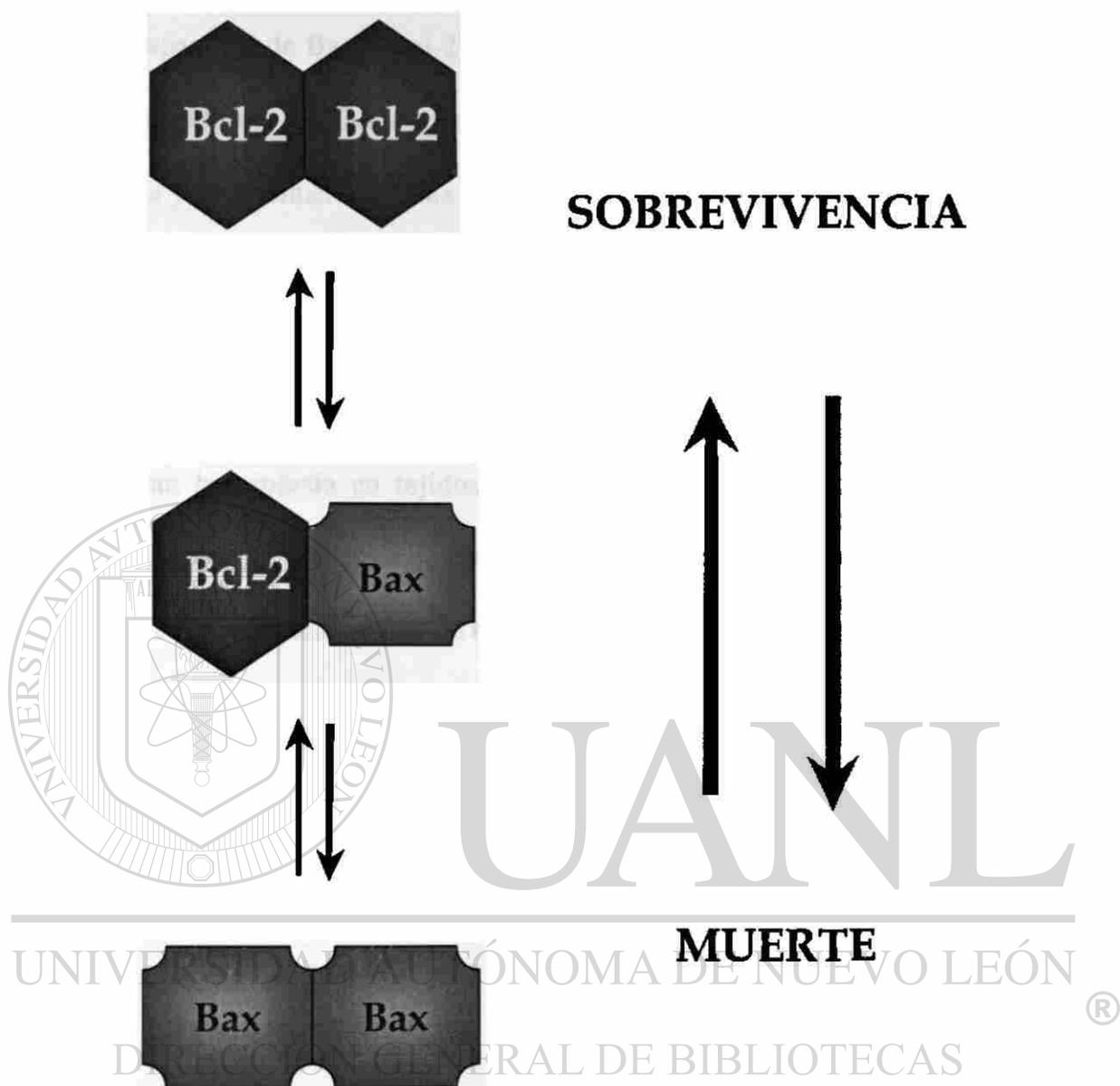


Figura 5. Modelo de las interacciones Bcl-2/Bax y la regulación de la apoptosis.

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).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



HIPOTESIS

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

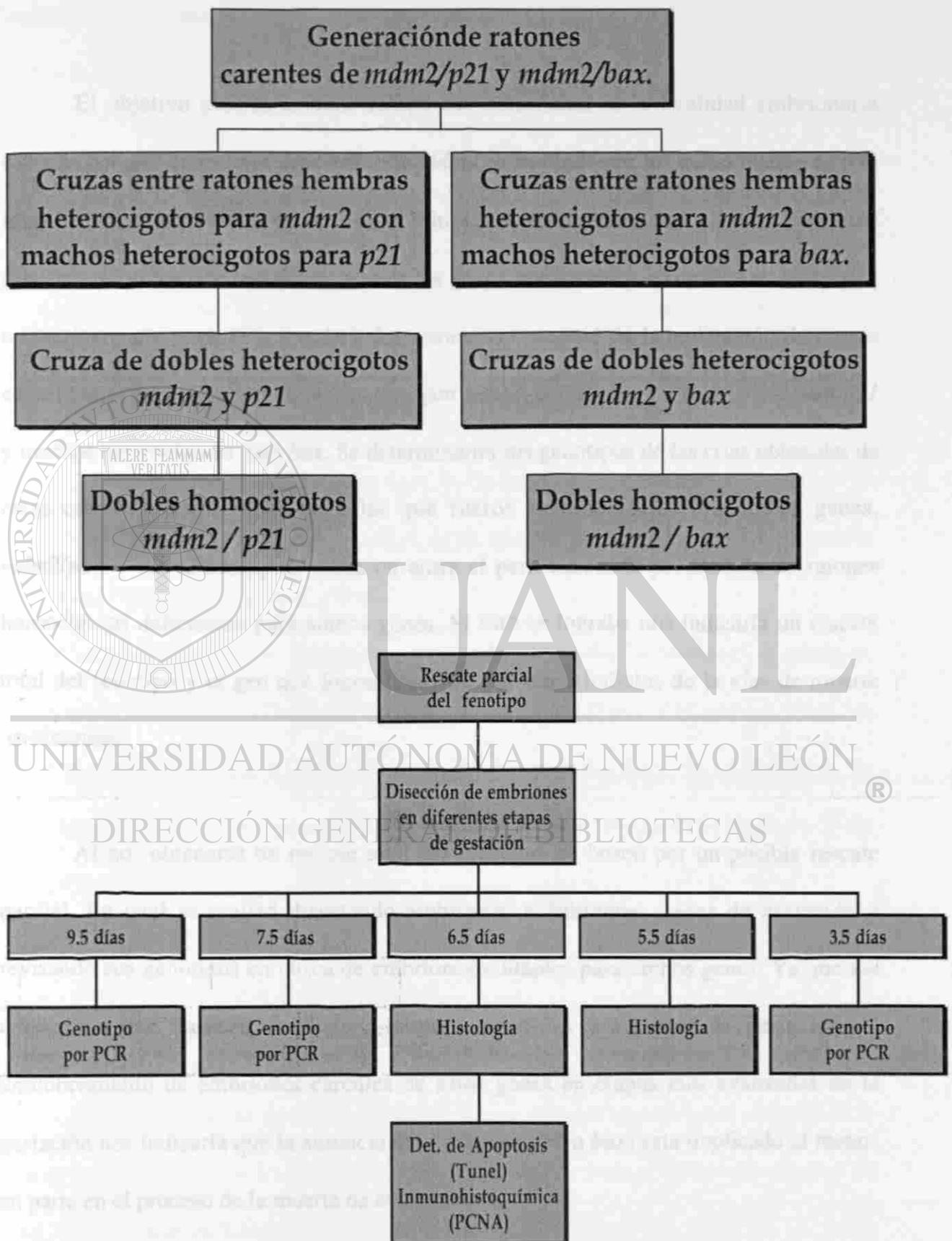
mdm2/bax.

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.

DETERMINACIÓN 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 μ l 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 μ l 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^{+2} y Ca^{+2}), 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 biotinilado 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

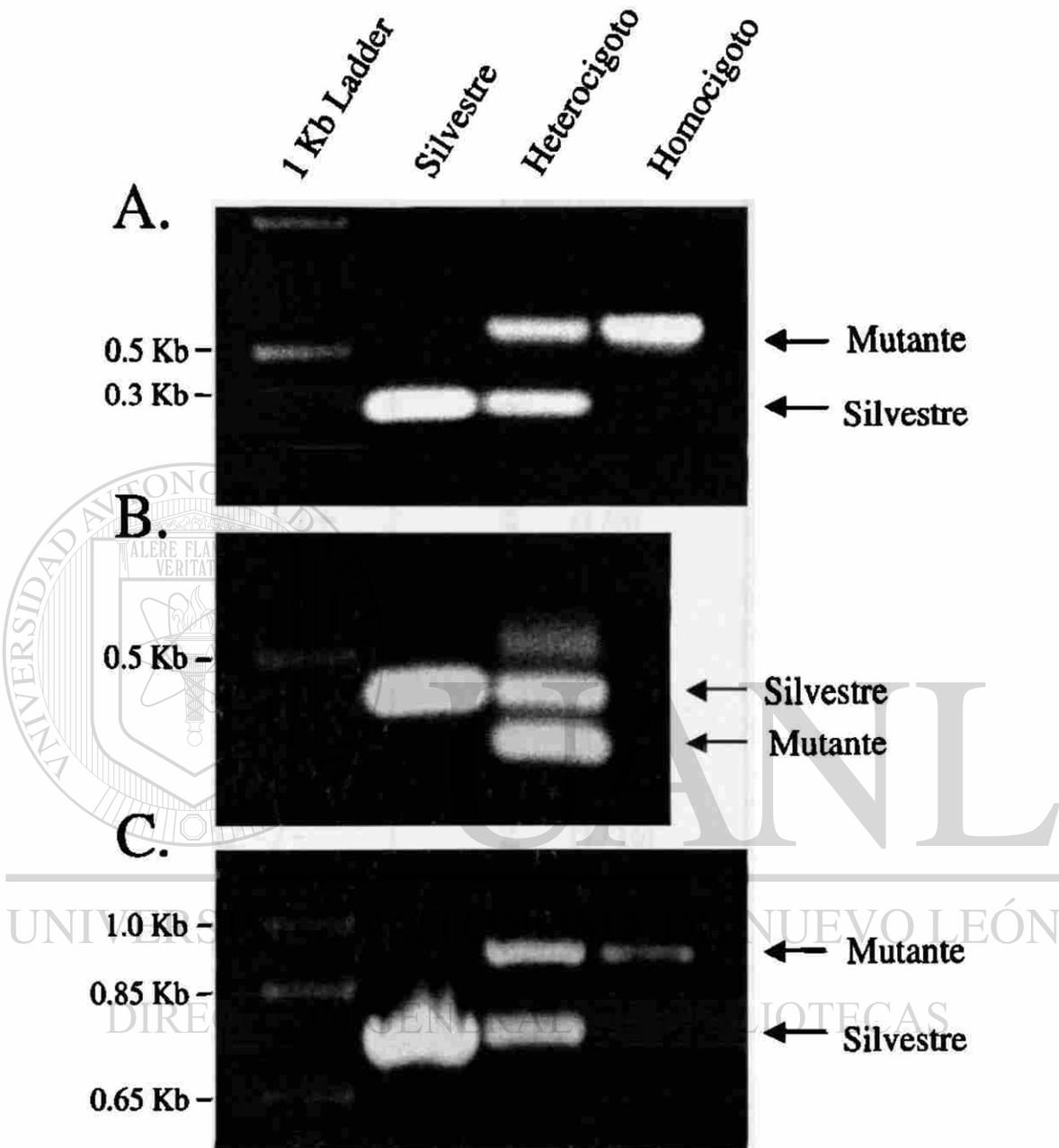


Figura 6. Productos de PCR en la genotipificación de ratones y embriones. A, para el gen *bax* B, para el gen *mdm2* C, para el gen *p21*.

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
Total		26

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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* *-/-*.

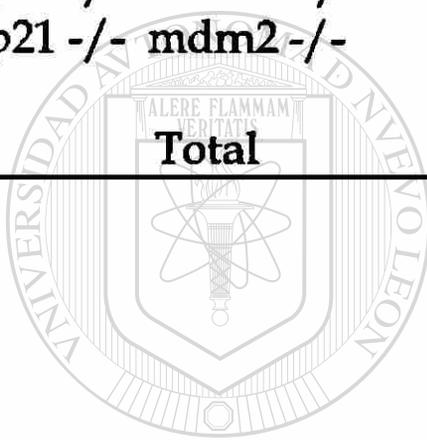
RESCATE PARCIAL

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	
	Esperado	Observado
p21 -/- mdm2 +/+	11 (1/4)	11
p21 -/- mdm2 +/-	23 (1/2)	35
p21 -/- mdm2 -/-	11 (1/4)	0
Total		46



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

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	
	Esperado	Observado
Normal	10-11 (3/4)	13
Anormal	3-4 (1/4)	1
Total		14

B.

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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	
	<i>Esperado</i>	<i>Observado</i>
Normal	32 (3/4)	35
Anormal	10 (1/4)	7
Total		42

B.

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 4. A, Análisis Histológico de embriones mutantes *p21/mdm2* de

7.5 días obtenidos de las cruces entre ratones carentes de

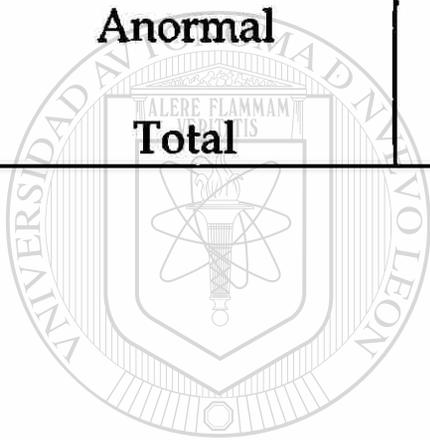
***p21* y heterocigotos para *mdm2* (*p21* -/- *mdm2* +/- X *p21* -/-**

***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	
	Esperado	Observado
Normal	19 (3/4)	20
Anormal	6 (1/4)	5
Total		25



UANL

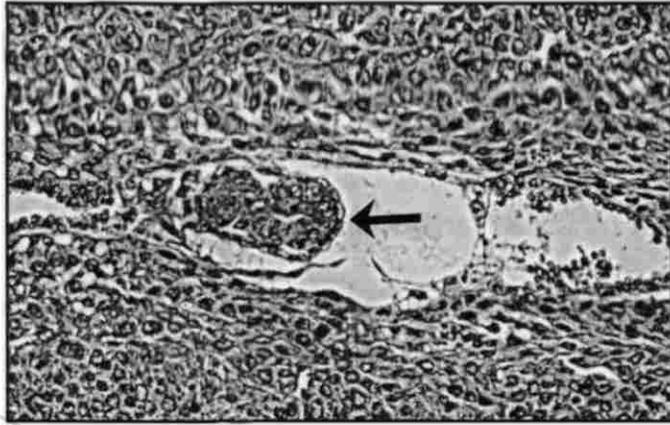
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



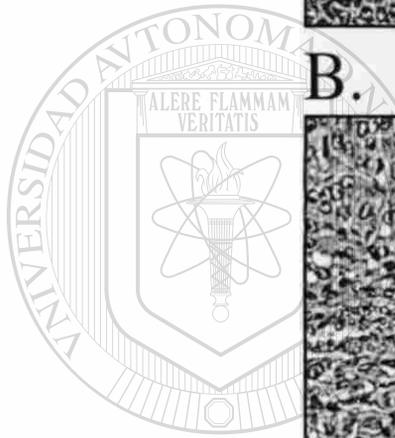
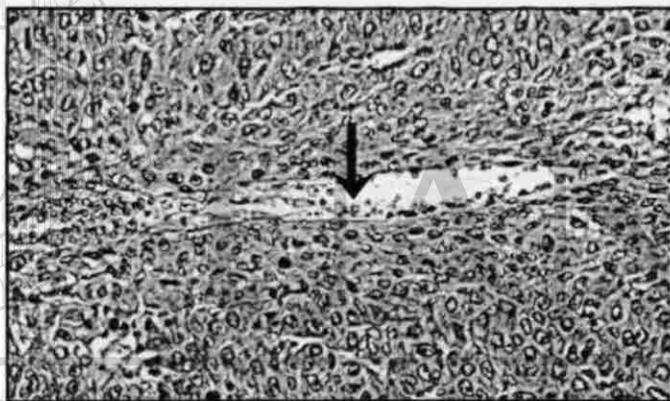
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

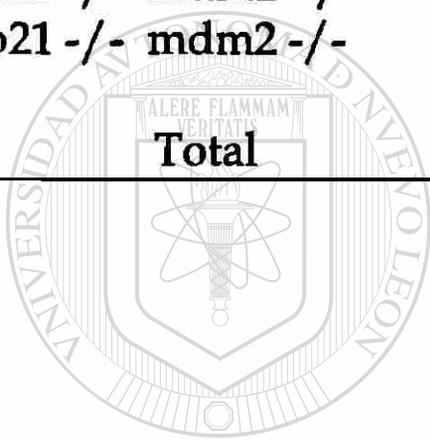
3.5 DIAS

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 determinó 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* *-/-* *mdm2*

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

TABLA 6. Análisis Genético de embriones mutantes *p21/mdm2* de 3.5 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 genotipo.

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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	
	Esperado	Observado
Normal	41 (3/4)	45*
Anormal	14 (1/4)	10
Total		55

* 3 perdidos

B.

Genotipo	Número de Embriones	
	Esperado	Observado
<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 cruzas 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 cruzas 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

6.5 DIAS DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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	
	Esperado	Observado
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 cruces 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.

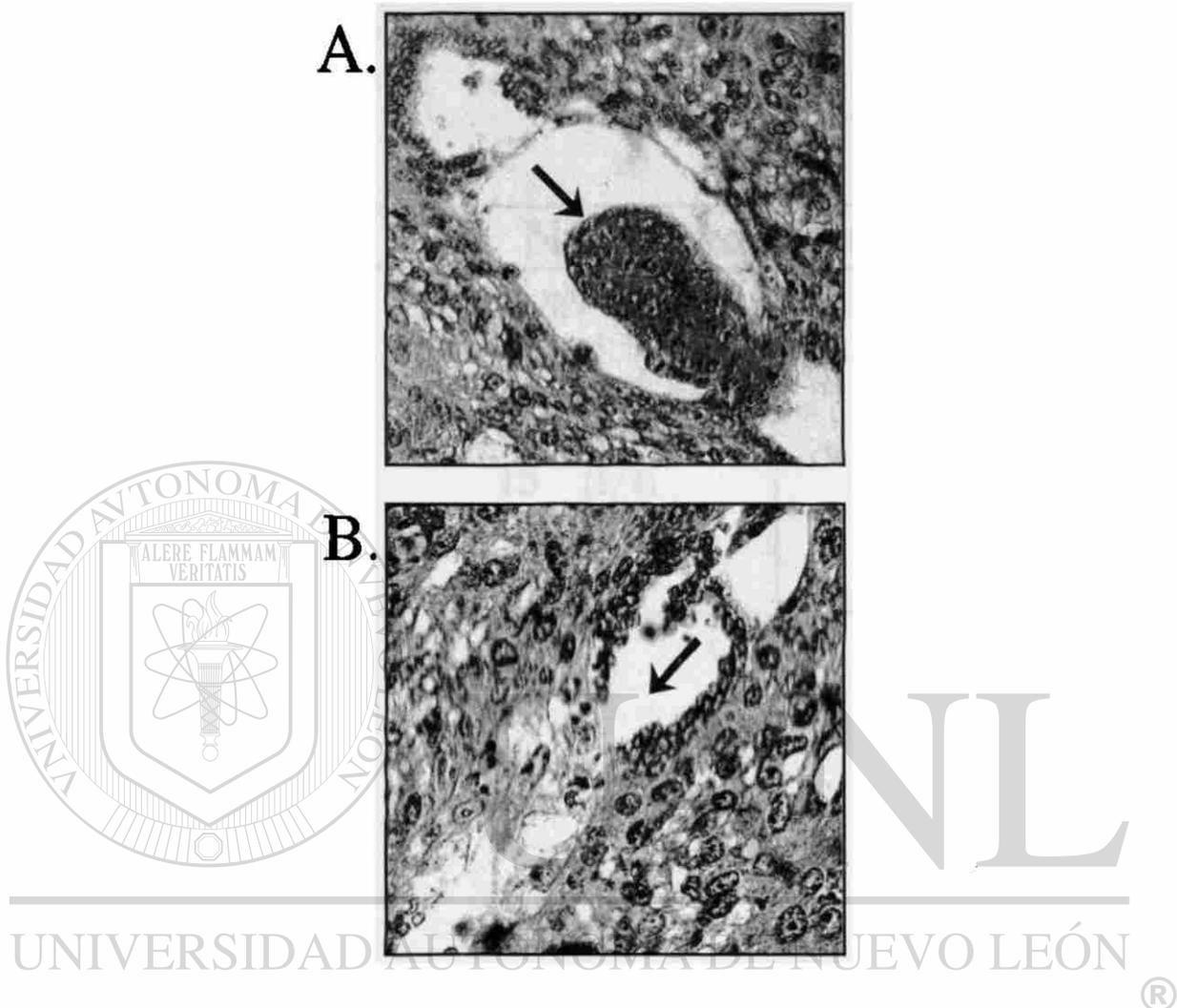


Figura 8. Análisis histológico de embriones mutantes *bax/mdm2* de 5.5 días de gestación.

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	
	Esperado	Observado
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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



APOPTOSIS DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

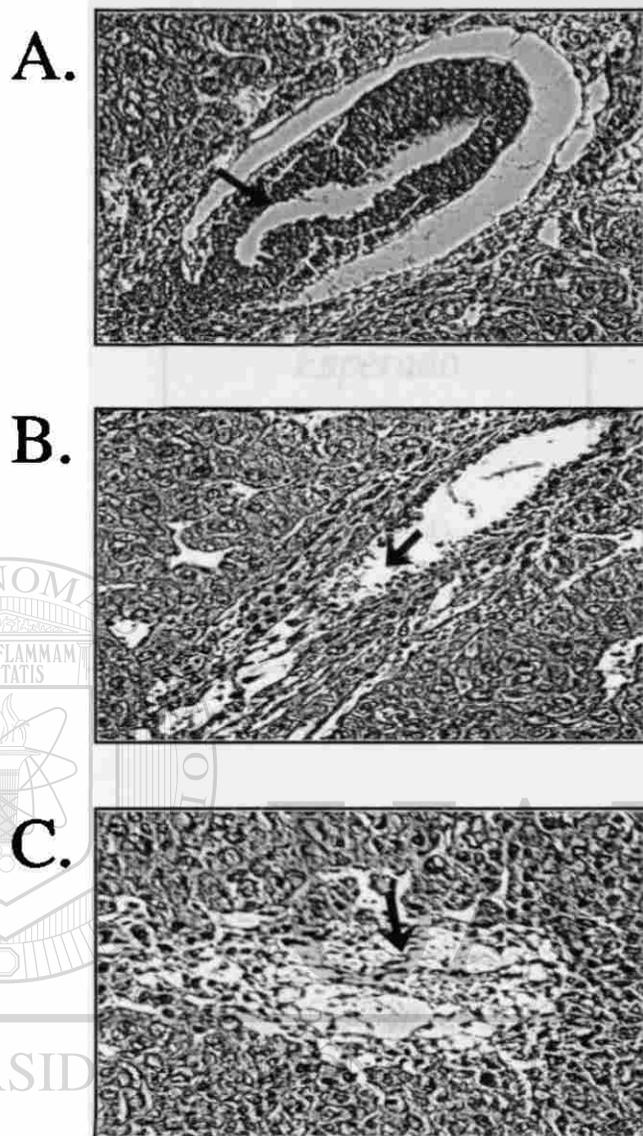


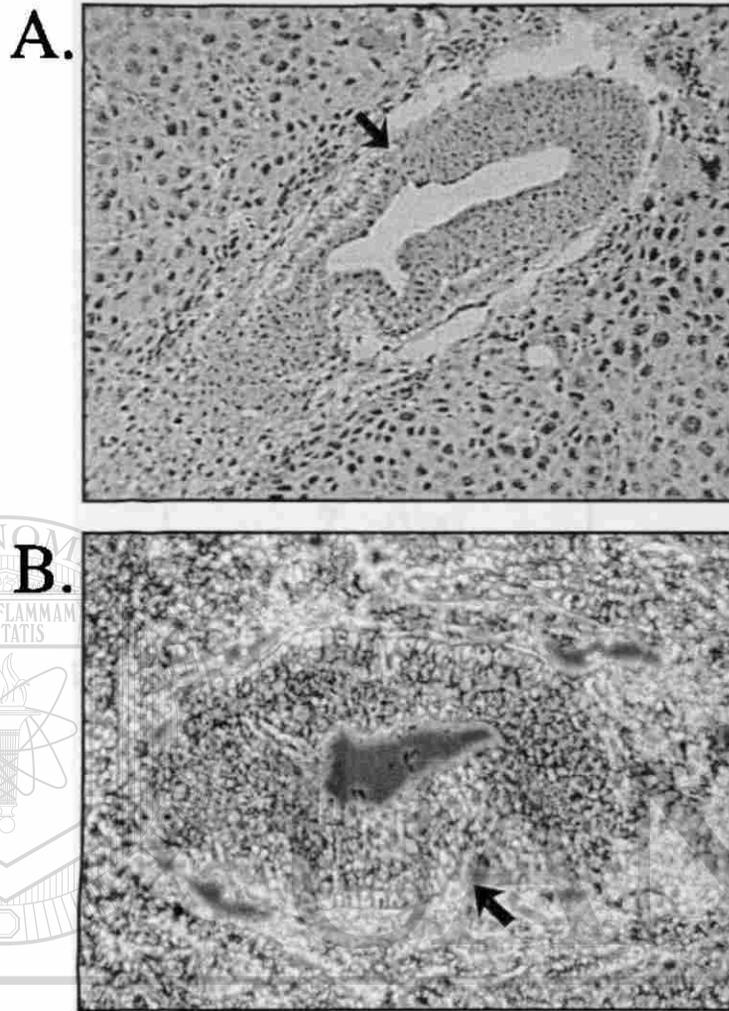
Figura 9. Análisis histológico de embriones mutantes *bax/mdm2* de 6.5 días de gestación. Cortes transversales de deciduas provenientes de las cruces entre machos *bax +/- mdm2 +/-* y hembras *bax -/- mdm2 +/-*. Tinción de hematoxilina y eosina. A, Embrión normal. B, Decidua vacía. C, decidua mostrando 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 *parabax* 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 más 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*^{-/-}.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 cruzas 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.

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 cruza 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.

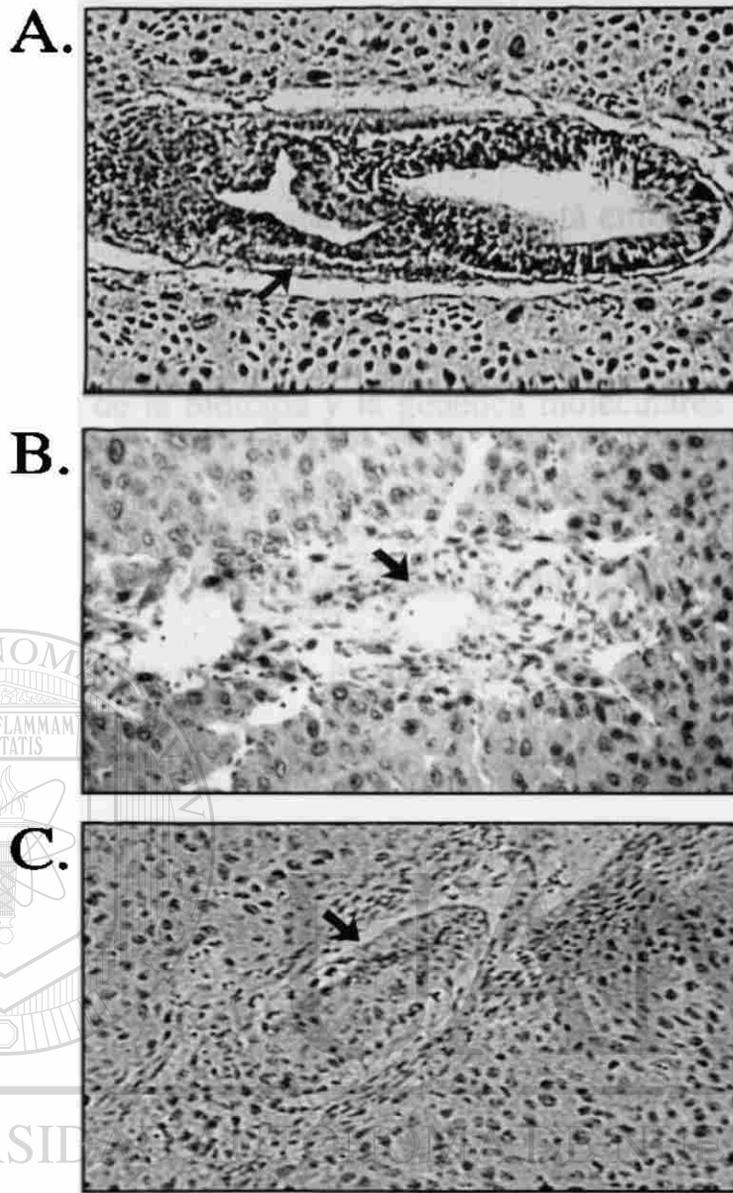


Figura 11. Determinación de inhibición de crecimiento celular en embriones mutantes *bax/mdm2* de 6.5 días de gestación. Secciones transversales de deciduas provenientes de las cruzas entre machos *bax +/- mdm2 +/-* y hembras *bax -/- mdm2 +/-*. Tinción inmunohistoquímica para PCNA. A, Tinción de un 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 fue 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*^{-/-} y *p21*^{+/+} y al estudiar su desarrollo y diferenciación intestinal, no se detectaron diferencias en las células *p21*^{-/-} (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 cruzas 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

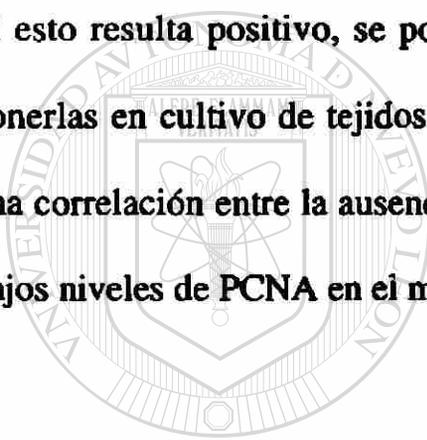
apoptosis dependiente de p53 en estas células (Knudson et al., 1995). Sin embargo, hay varias diferencias entre los dos sistemas que pueden estar afectando estos resultados. Una diferencia fundamental es que se trata de dos tipos celulares distintos y con grados de diferenciación muy diferentes. En nuestro 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 (Poiyak 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 construcciones 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 cruces son de coloración oscura, significa que la mutación es transmissible por línea germinal y con esto se ha logrado una línea de ratones con un gen inactivado o "knockout" (KO).

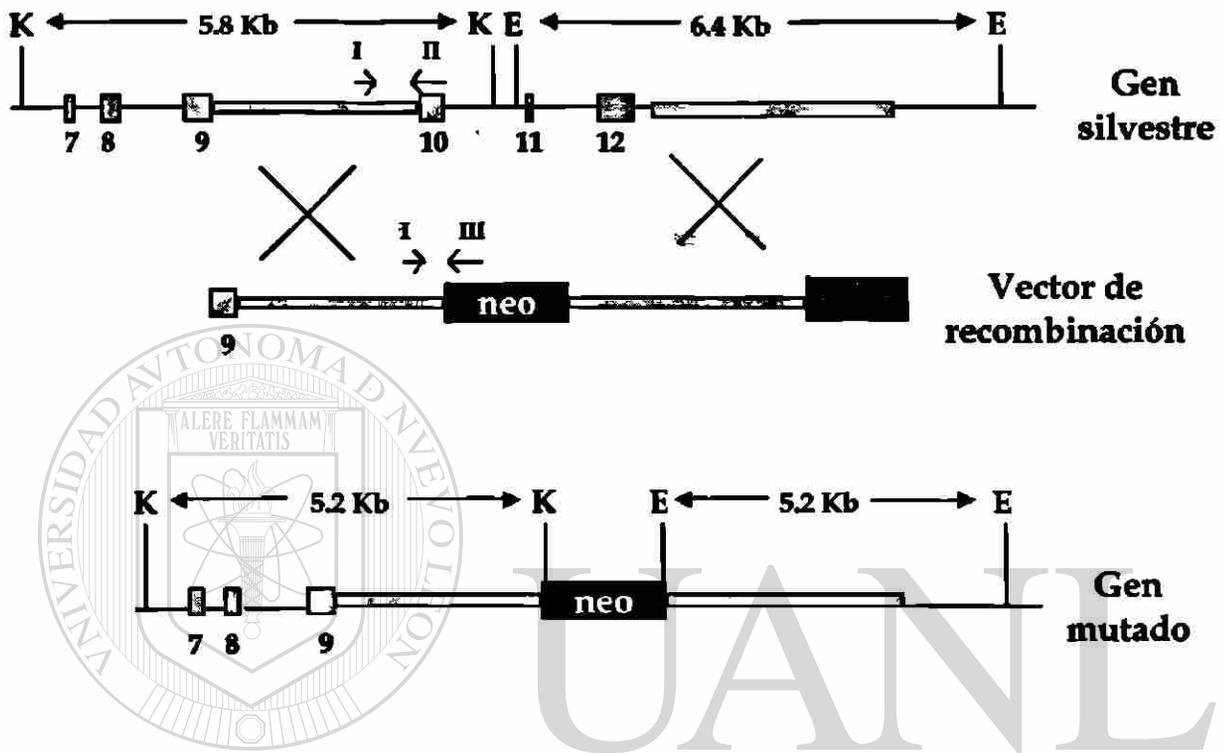


Figura 12. Inactivación del gen *mdm2*. Construcción del vector de recombinación.

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*.

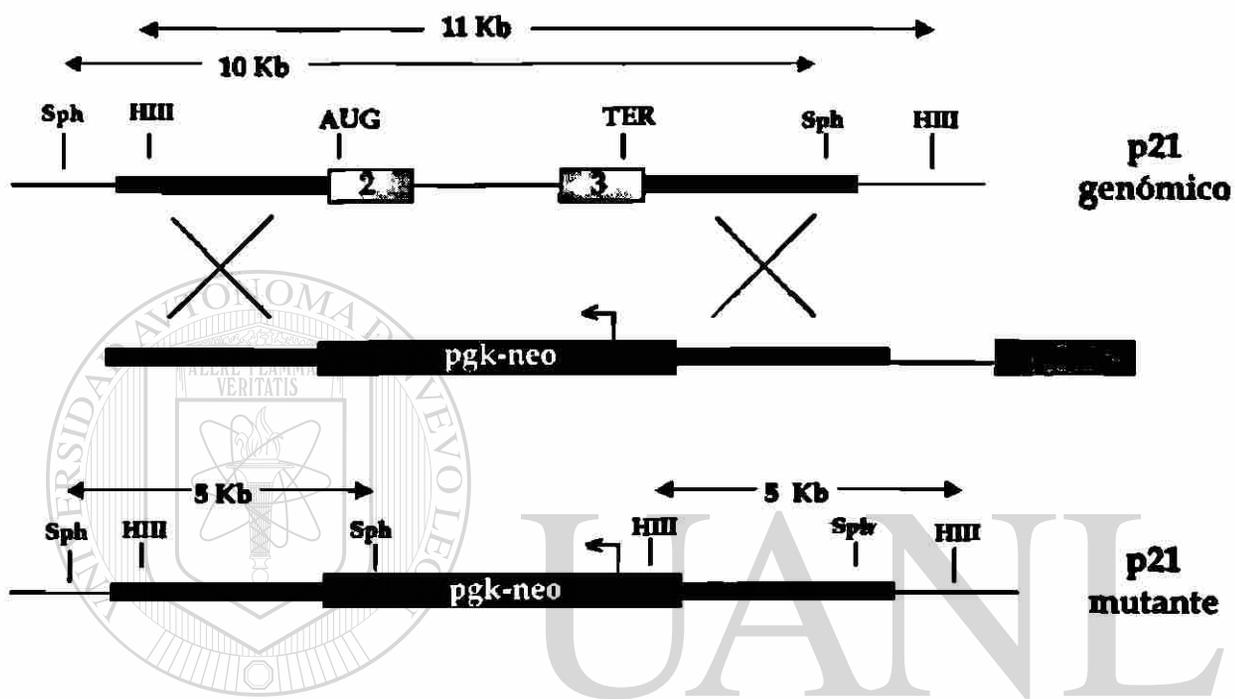
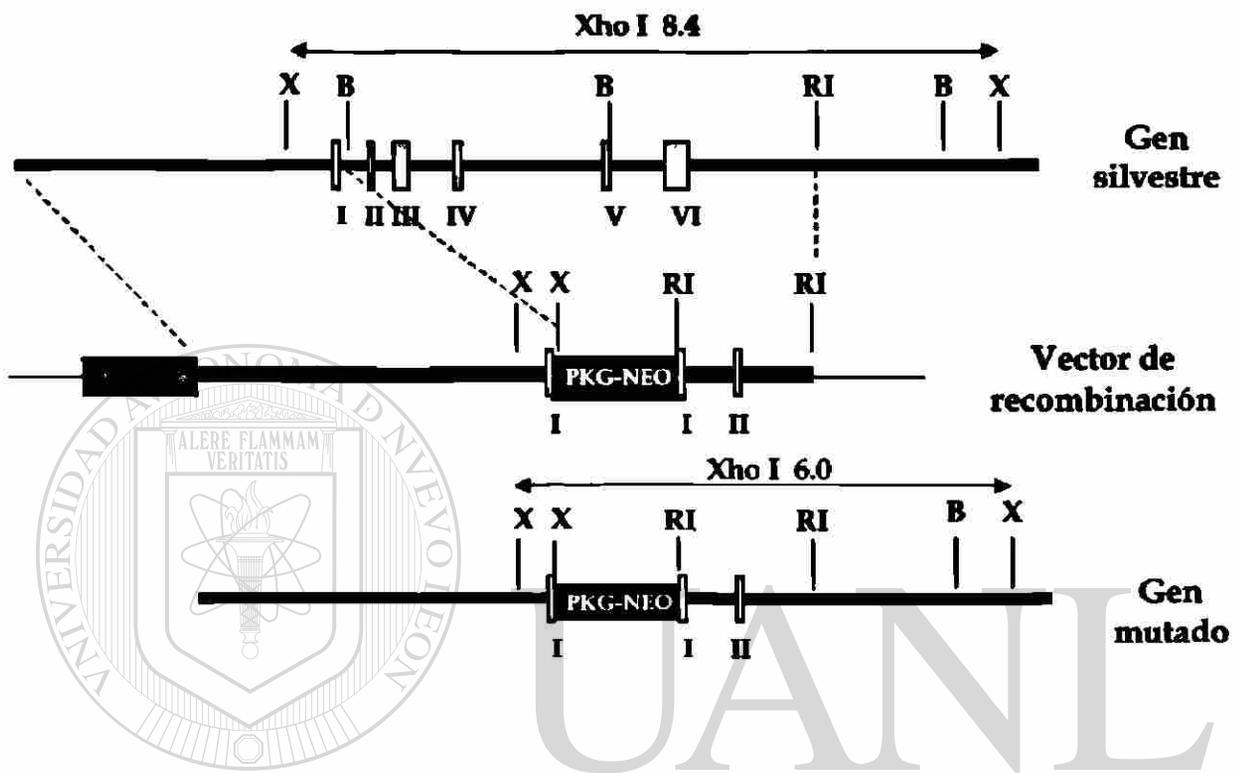


Figura 13. Inactivación del gen *p21*. Construcción del vector de recombinación.

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). HIII=*HindIII*. Sph=*SphI*.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

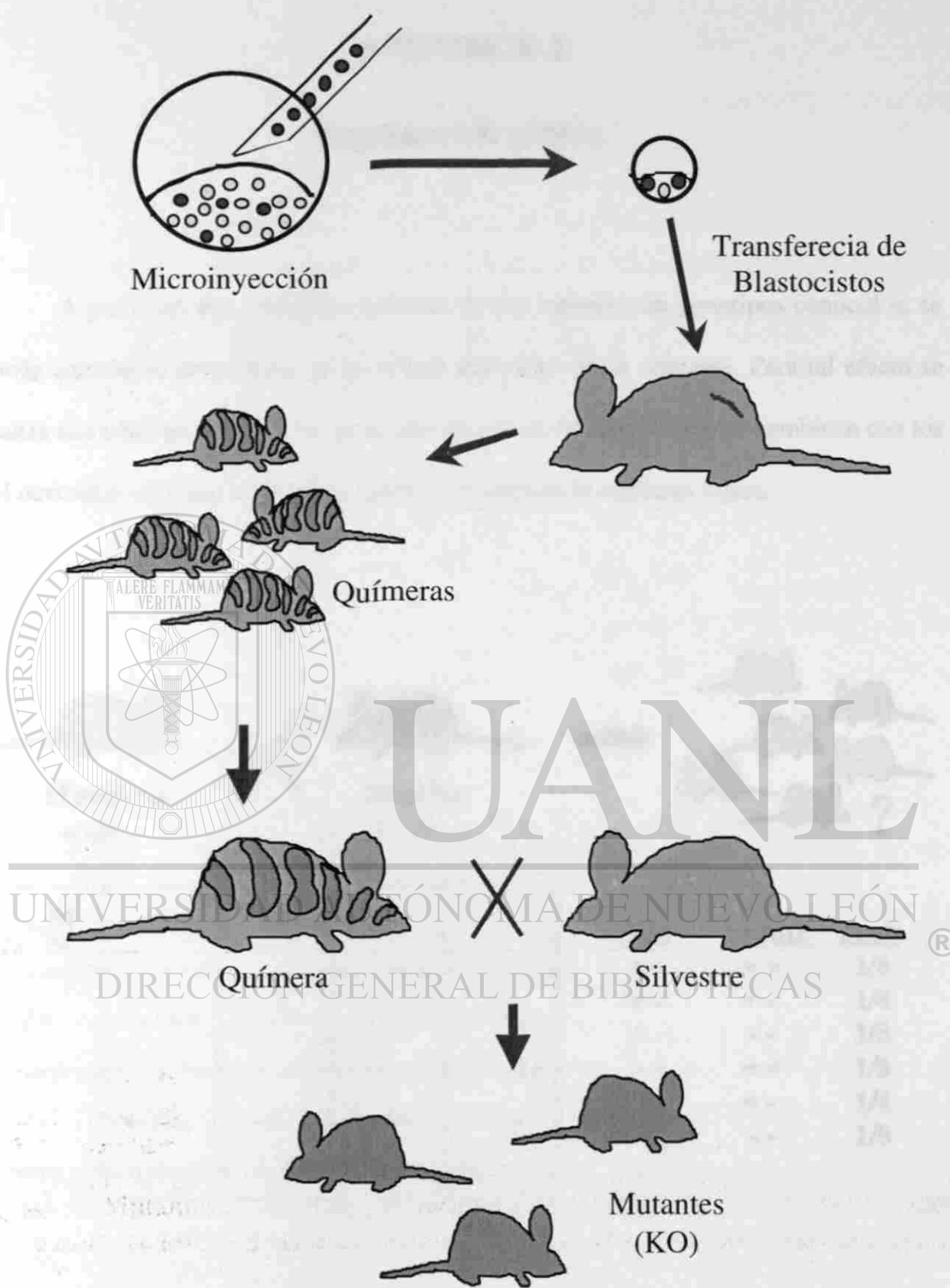
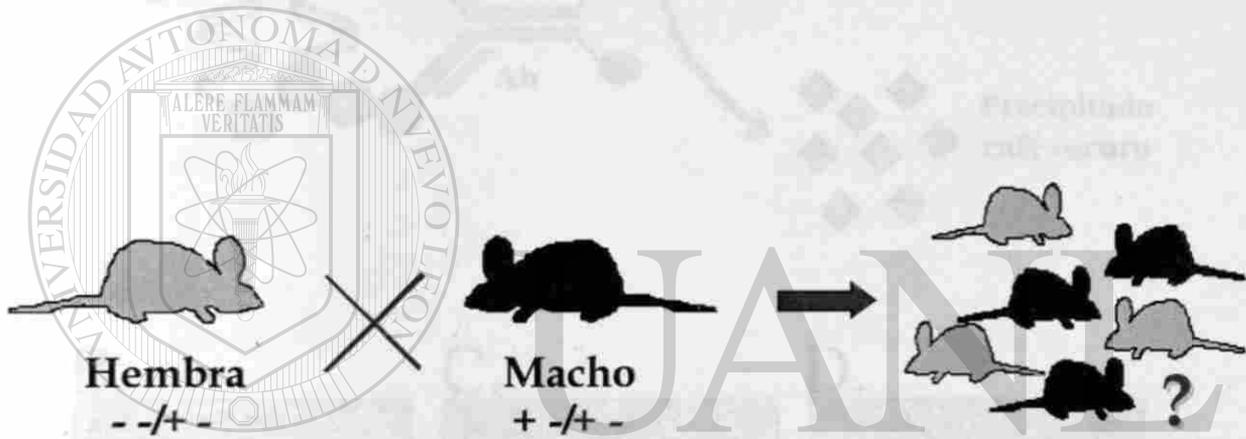


Figura 15. Inactivación de genes en ratones. Esquema del protocolo experimental utilizado en la inactivación de genes.

APENDICE 2

Segregación génica

A partir de una cruda 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 cruda como se muestra en la siguiente figura:

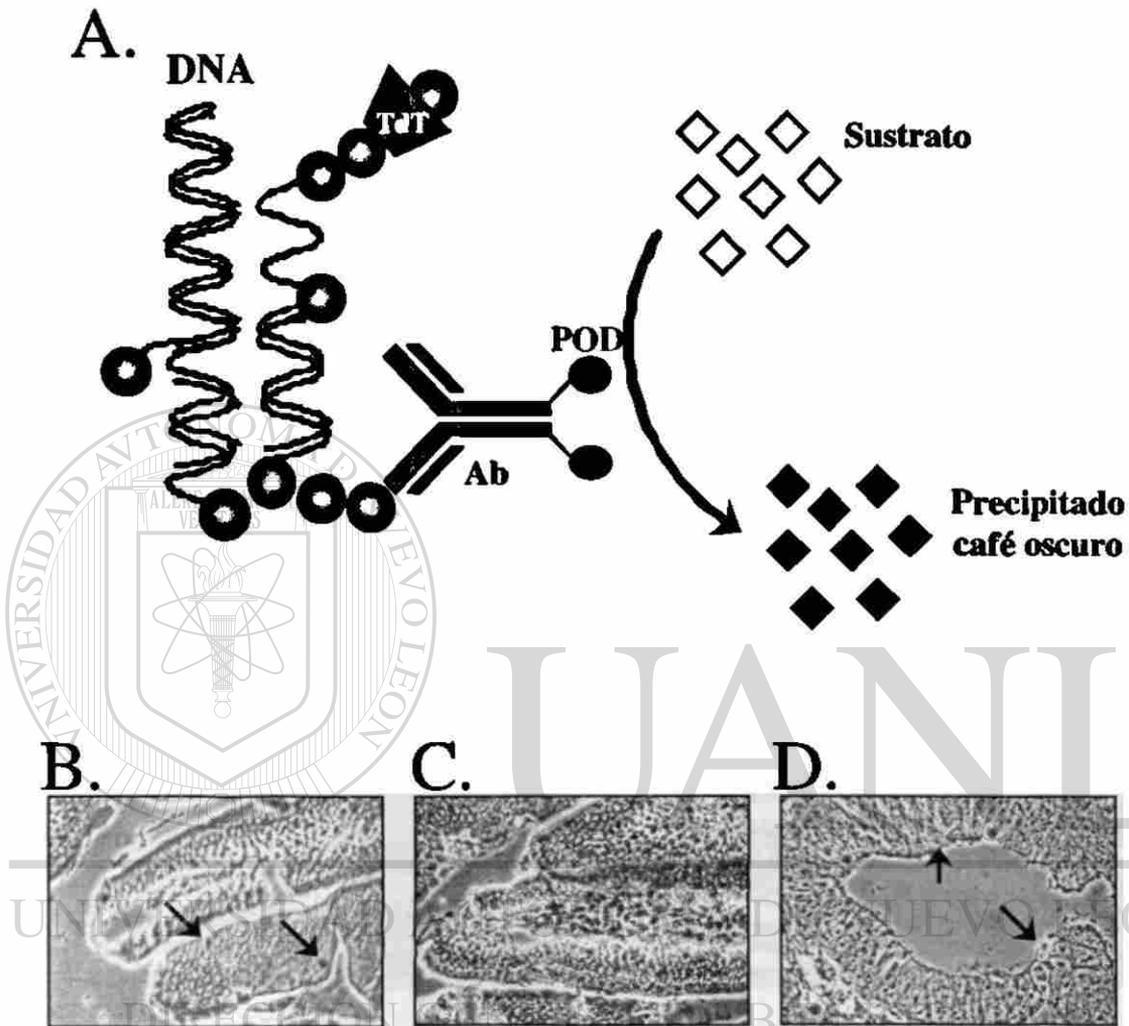


H \ M	$+/+$	$+/-$	$-/+$	$-/-$
$-/+$	$+/-++$	$+/-+-$	$--/++$	$--/+-$
$-/-$	$+/-+-$	$+/---$	$--/+-$	$--/--$

<u>bax</u>	<u>mdm2</u>	Prob. [®]
$+-$	$++$	$1/8$
$+-$	$+-$	$1/4$
$+-$	$--$	$1/8$
$--$	$++$	$1/8$
$--$	$+-$	$1/4$
$--$	$--$	$1/8$

APENDICE 3.

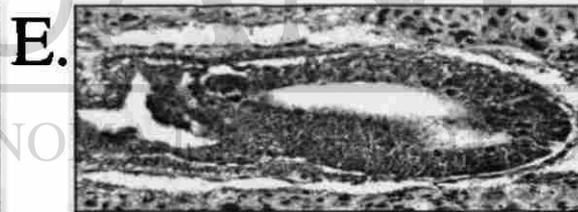
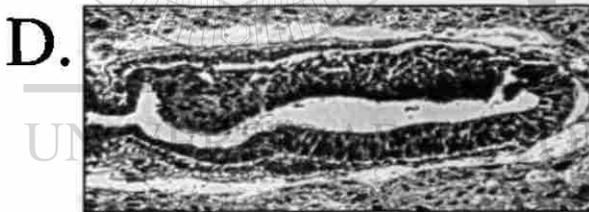
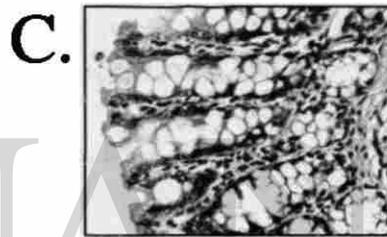
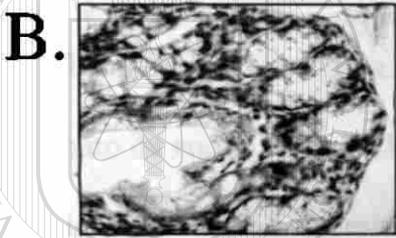
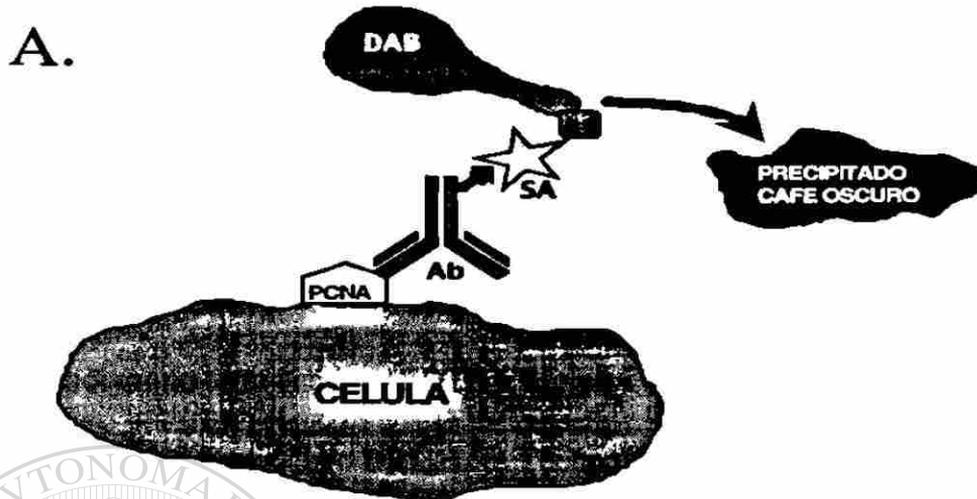
ANALISIS DE TUNEL



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.

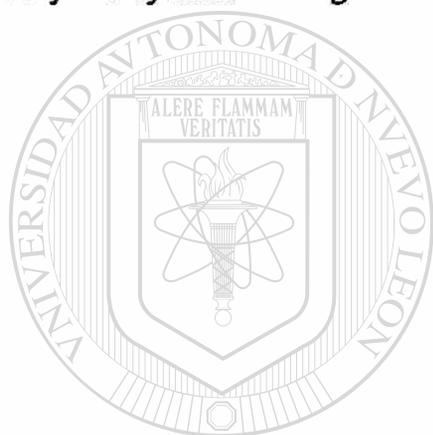
APENDICE 5

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 (NH₄OH). 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

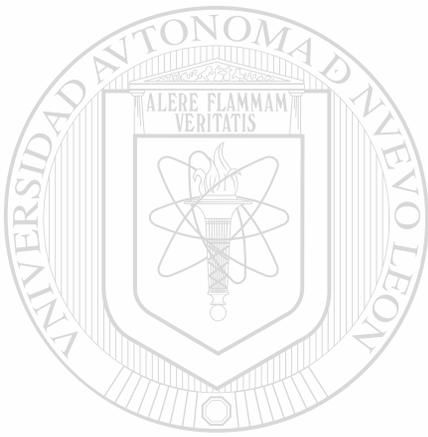


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE 6

ARTICULO PUBLICADO

(Montes de Oca Luna et al., 1997)

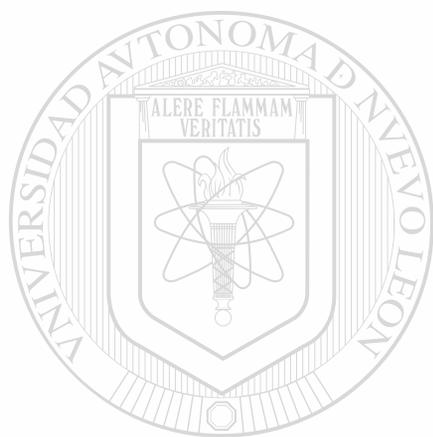


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

The MDM2 protein negatively regulates the activity of the p53 tumour suppressor by binding its transcriptional activation domain^{1,2}. 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^{6,7}.

To determine the importance of the p53 target, *p21*, in rescue of the *mdm2*^{-/-} 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*^{-/-} embryos. Mice heterozygous for *mdm2* and null for *p21* were mated with each other^{3,8}. In this cross, 25% of the mice are expected to be double null. Of 46 mice born, 11 (24%) were *mdm2*^{+/+} *p21*^{-/-}, 35 (76%) were *mdm2*^{+/-} *p21*^{-/-} and none were *mdm2*^{-/-} *p21*^{-/-}. These data indicate that the loss of *p21*, unlike the loss of *p53*, does not rescue the lethality of *mdm2*^{-/-} embryos.

The possibility remained that loss of *p21*

was insufficient to allow *mdm2*^{-/-} embryos to survive until birth, but that a partial rescue occurred. Again, *mdm2*^{+/-} *p21*^{-/-} 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*^{-/-} 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*^{-/-} *mdm2*^{+/-} 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 crosses³ (Fig. 2a,b). Thus, loss of *p21*, in contrast to *p53* deletion, did not even partly rescue the lethality of *mdm2*^{-/-} embryos.

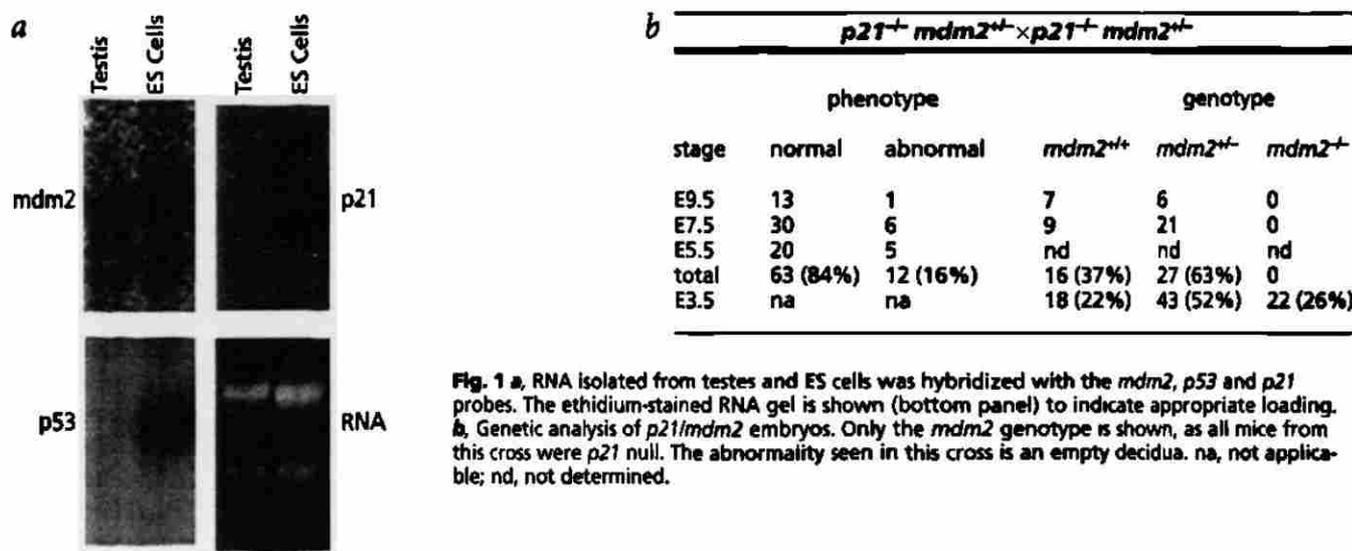


Fig. 1 a, RNA isolated from testes and ES cells was hybridized with the *mdm2*, *p53* and *p21* probes. The ethidium-stained RNA gel is shown (bottom panel) to indicate appropriate loading. **b**, Genetic analysis of *p21/mdm2* embryos. Only the *mdm2* genotype is shown, as all mice from this cross were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

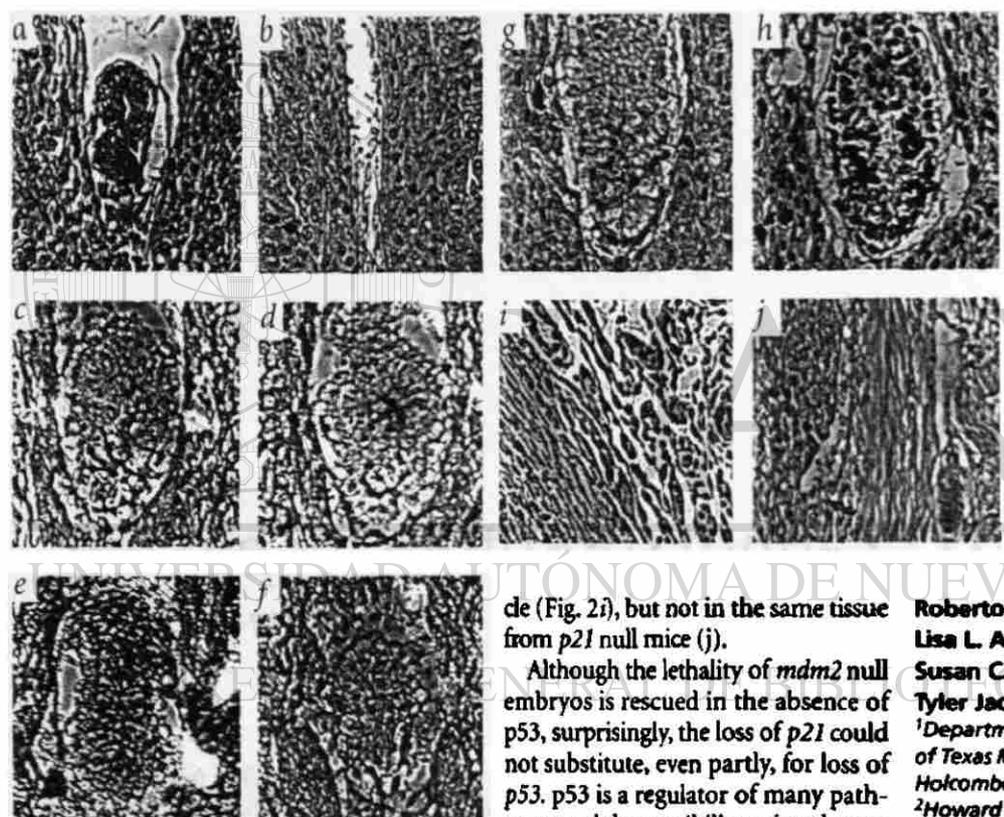


Fig. 2 The phenotype and expression of several genes were assayed in mouse embryos at 5.5 days post coitum. Deciduae from crosses between $p21^{+/+} mdm2^{+/+}$ mice were dissected, paraffin embedded and sectioned. While most embryos were normal (**a**), 20% of the embryos had an abnormal phenotype (**b**). 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**).

de (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^{12–14} and the lack of susceptibility of *p21* null mice to tumorigenesis^{8,15}. 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 Luna¹,
Lisa L. Amelise¹, Arturo Chavez-Reyes¹,
Susan C. Evans¹, James Brugarolas²,
Tyler Jacks² & Guillermina Lozano¹

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

²Howard 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^{9–11}, 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-Deiry, 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 p21^{CIP1}/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., Ludwigubbutat, 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., Millman, 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.

Selvakumar, 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 Fromentel, 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.

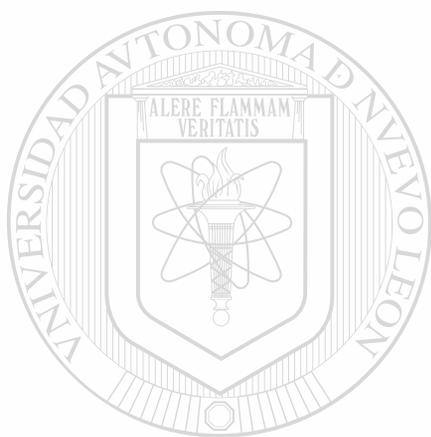
Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D. (1992). D-types cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71, 504-514.

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.



UANL

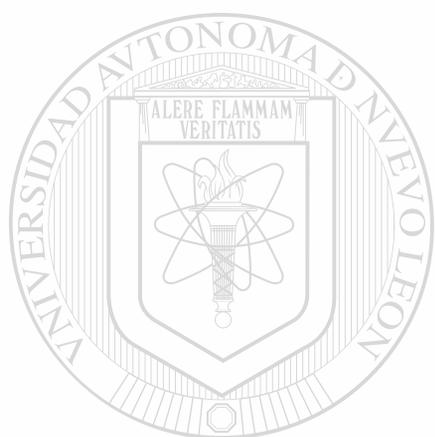
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



