

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



**LA EXPRESION TRANSGENICA DEL GEN SUPRESOR  
DE TUMORES p53 MODIFICA EL ESPECTRO DE  
TUMORES DESARROLLADOS EN UN FONDO  
GENETICO CARENTE DE p53.**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**Por  
M.C. ARTURO CHAVEZ REYES**

**MONTERREY, N. L.**

**DICIEMBRE DEL 2001**



ARTURO CHAVEZ REYES

TD  
RC267  
.C43  
2001  
c.1

2001



1080124427

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

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



LA EXPRESION TRANSGENICA DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES p53 MODIFICA EL ESPECTRO DE TUMORES DESARROLLADOS EN UN FONDO GENETICO CARENTE DE p53.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUERIMIENTO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

Por  
M.C. ARTURO CHAVEZ REYES

MONTERREY, N. L.

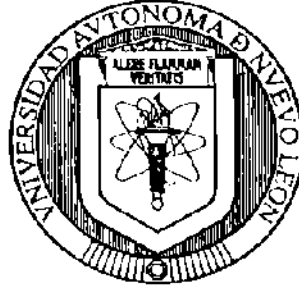
DICIEMBRE DEL 2004



TD  
RC267  
-C43  
2001



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



**LA EXPRESION TRANSGENICA DEL GEN SUPRESOR  
DE TUMORES *p53* MODIFICA EL ESPECTRO DE  
TUMORES DESARROLLADOS EN UN FONDO  
GENETICO CARENTE DE *p53*.**

**COMISION DE APROBACION DE TESIS**

Ph.D. Guillermina Lozano  
Director Externo de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Guillermina Lozano", is written over a solid horizontal line.

Dr. Roberto Montes de Oca Luna  
Director Interno de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Roberto Montes de Oca Luna", is written over a solid horizontal line.

Dra. Julia Verde Star  
Subdirectora de Postgrado

A solid horizontal line, intended for a signature, is present but remains blank.

Monterrey, N.L.

Diciembre del 2001

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



LA EXPRESION TRANSGENICA DEL GEN SUPRESOR  
DE TUMORES *p53* MODIFICA EL ESPECTRO DE  
TUMORES DESARROLLADOS EN UN FONDO  
GENETICO CARENTE DE *p53*.

COMISION DE EXAMEN

Ph.D. Guillermina Lozano  
PRESIDENTE

Dr. Roberto Montes de Oca Luna  
SECRETARIO

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
VOCAL

Dr. Ricardo A. Gómez Flores  
VOCAL

Dr. Mario R. Morales Vallarta  
VOCAL

Dr. Carlos E. Hernández Luna  
SUPLENTE

Monterrey, N.L.

Diciembre del 2001

En la senda del vivir  
no ir adelante es ir  
atrás, y el que a arar empieza  
no ha de volver la cabeza  
sino arar y proseguir.

***Lope de Vega***



## **LOCALIZACION**

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

## **DEDICATORIA**

**A mis padres:**

**Arturo y Nora Hilda**

**Gracias por estar siempre dispuestos a darme su amor, comprensión y apoyo. Por todos los sacrificios y esfuerzos por los hemos pasado para lograr llegar a este punto.**

**A mis hermanas:**

**Nora y Erika**

**Por todo su cariño, por todo el tiempo que no me ha sido posible compartir con ustedes y por su manera tan especial de motivarme a seguir siempre adelante.**

**A:**

**Yolanda**

**Por ser la principal motivación en mi vida y por todo el tiempo que ha invertido en la discusión y revisión de mi trabajo.**

**A mi abuelita:**

**Antonia**

**Por su amor y sus oraciones.**

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Guillermina Lozano por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por su crítica, guía y por aguantarme durante todo este tiempo, *thanks Gigi.*

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por introducirme al complicado mundo de la genética molecular y confiar en mí, por todo su apoyo y asesoría durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al Dr. Reyes Tamez Guerra porque gracias a ellos me inicié en la investigación científica y siempre me han brindado todo su apoyo.

A los miembros de mi comisión de examen: Dr. Ricardo Gomez Flores, Dr. Mario Morales Vallarta y Dr. Carlos Hernández Luna, muchas gracias por el apoyo y todo lo que me han enseñado durante todo este tiempo.

Al Dr. John M. Parant por todo lo que hemos compartido juntos, por su ayuda, por estar siempre dispuesto a compartir conmigo sus conocimientos y especialmente *por ser un muy buen amigo, gracias buddy.*

Al Dr. Matthew Starost por los estudios patológicos y por tener la paciencia de discutir los datos y explicarme todo tan claramente.

A la Lic. Helia Yohaina Haaz Melgarejo por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los resultados.

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

A mis compañeros del laboratorio de la Dra. Lozano: John, Susan, Geng, Caty, Patty, Lisa, Gene, Sohela, Carolyn, Joanna, Tommo, Arlette, Lin, Patrick, Jin, Mini, Chad, Shuling, Brandon, Jason, Shunbin y Janet, por toda la ayuda, críticas y enseñanzas que me han brindado.

A todas las personas del M.D. Anderson que de alguna forma han contribuído 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, Lidia, Pera, Bertha, Catarino, Aracely, Betty, Herminio, Moises, 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 y la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo brindado durante mi carrera.

# INDICE GENERAL

	Pag.
Localización	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Indice General	v
Indice de Figuras	vii
Indice de Tablas	xi
Indice de Apéndices	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	19
p53	19
mdm2	32
mdmX	41
LcK	44
Hipótesis	51
Objetivos	52
Diagrama de Flujo	53
Materiales y Métodos	54
Animales Utilizados	54



<b>Construcción del vector de expresión transgénica</b>	<b>55</b>
<b>Generación de los ratones transgénicos</b>	<b>56</b>
<b>Aislamiento de DNA genómico</b>	<b>57</b>
<b>Determinación del genotipo de los ratones</b>	<b>58</b>
<b>Secuenciación</b>	<b>61</b>
<b>Análisis de Western Blot</b>	<b>62</b>
<b>Procesamiento de Tejidos para Histología</b>	<b>63</b>
<b>Tinción de Hematoxilina y Eosina</b>	<b>64</b>
<b>Determinación de Apoptosis</b>	<b>64</b>
<b>Tinción Inmunohistoquímica</b>	<b>65</b>
<b>Resultados</b>	<b>67</b>
<b>Discusión</b>	<b>97</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>106</b>
<b>Apéndices</b>	<b>108</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>122</b>
<b>Vitae</b>	<b>156</b>

## INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Generación de ratones transgénicos.	7
Figura 2. Estructura de la proteína p53 humana.	21
Figura 3. Las vías de p53.	30
Figura 4. Organización de la proteína mdm2.	33
Figura 5. Mecanismos involucrados en la inactivación de p53 por MDM2.	35
Figura 6. Representación esquemática de la homología entre las proteínas MDM2 y MDMX.	42
Figura 7. Organización de la región promotora del gen <i>LcK</i> y su patrón de expresión.	47
Figura 8. Construcción del casete de expresión transgénica.	68
Figura 9. Caracterización del vector de expresión transgénica <i>pLcK-Hp53</i>	69

Figura 10.	70
<b>Oligonucleótidos iniciadores para la genotipificación del transgen.</b>	
Figura 11.	71
<b>Genotipificación de los ratones obtenidos de la primera microinyección.</b>	
Figura 12.	73
<b>Determinación de la expresión del transgen en diferentes órganos de ratón por Western Blot.</b>	
Figura 13.	75
<b>Genotipificación de los ratones por PCR.</b>	
Figura 14.	76
<b>Genotipificación de las nuevas líneas de ratones.</b>	
Figura 15.	77
<b>Caracterización de las nuevas líneas de ratones transgénicos</b>	
Figura 16.	79
<b>Curvas de supervivencia</b>	
Figura 17.	81
<b>Incidencia de linfomas de timo.</b>	
Figura 18A.	82
<b>Histopatología del linfoma de timo y su diseminación a corazón.</b>	

<b>Figura 18B.</b>	<b>83</b>
<b>Histopatología del linfoma de timo y su diseminación a hígado y pulmón.</b>	
<b>Figura 18C</b>	<b>84</b>
<b>Histopatología del linfoma de timo y su diseminación a riñón y glándula mamaria.</b>	
<b>Figura 19</b>	<b>85</b>
<b>Espectro de tumores en ratones <i>p53</i><sup>-/-</sup>.</b>	
<b>Figura 20A.</b>	<b>86</b>
<b>Histopatología de otros tipos de tumores encontrados en los ratones transgénicos.</b>	
<b>Hemangiosarcoma y Retinoblastoma</b>	
<b>Figura 20B.</b>	<b>87</b>
<b>Histopatología de otros tipos de tumores encontrados en los ratones transgénicos.</b>	
<b>Sarcoma y Hemangiosarcoma de Glándula Mamaria.</b>	
<b>Figura 20C.</b>	<b>88</b>
<b>Histopatología de otros tipos de tumores encontrados en los ratones transgénicos.</b>	
<b>Osteosarcoma y Adenocarcinoma.</b>	
<b>Figura 20A.</b>	<b>89</b>
<b>Histopatología de otros tipos de tumores encontrados en los ratones transgénicos.</b>	

Teratoma.	
Figura 21.	91
Hemangiosarcoma de células gigantes.	
Figura 22.	93
Análisis de Tunel para la determinación de apoptosis.	
Figura 23.	94
Tinción Inmunohistoquímica de un linfoma de timo proveniente de un ratón <i>mdm2</i> <sup>-/-</sup> <i>p53</i> <sup>-/-</sup> <i>Tg</i> <sup>+</sup> .	
Figura 24.	96
Histopatología y Tinción Inmunohistoquímica de un linfoma de timo proveniente de un ratón <i>mdm2</i> <sup>-/-</sup> <i>p53</i> <sup>-/-</sup> <i>Tg</i> <sup>+</sup> .	



## INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1.  Promotores tejido específico que se utilizan en la generación de ratones transgénicos.	14
Tabla 2.  Oncogenes que han sido expresados transgénicamente en ratones.	16
Tabla 3.  Comparación de fenotipos.	90

# INDICE DE APENDICES

	Pag.
Apéndice 1.	108
Análisis estadístico del espectro de tumores observado.	
Apéndice 2.	118
Lista de reactivos, kits y buffers utilizados.	

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento, Porcentaje
°C	Grados centígrados
AAs	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
AGP-A	$\alpha$ 1-Glicoproteína Acida
Alb	Albúmina
Aprox.	Aproximadamente
ATT	$\alpha$ 1-Antitripsina
BrdU	5-Bromo 2'-desoxiuridina
Ca	Calcio
Ca <sup>+2</sup>	Ión calcio
CDKs	Kinasas dependientes de ciclina
cDNA	DNA complementario o copia
Cip-1	Cdk-interacting protein, proteína de interacción con CDKs
CMV	Citomegalovirus
CR	Regiones Conservadas
CRP	Proteína C-reactiva
CuZn SOD	Dismutasa superoxidasa de Cobre/Zinc
Cys	Cisteína
DAB	Diamino bencidina
det.	Determinación
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Mezcla de los desoxirribonucleosil trifosfatos: ATP, GTP, CTP y TTP
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
EDTA	Acido Etilen-Diamino Treta-acético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ES	Embryo Stem, Estaminal embrionaria

Etc.	Etcétera
EtOH	Etanol
FERs	Fibroblastos de embrión de rata
GFP	Green Fluorescent Protein, Proteína Verde Fluorescente
Glu	Acido Glutámico
GPX	Glutation Peroxidasa
H&E	Hematoxilina y Eosina
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
HCl	Acido Clorhídrico
Hg	Mercurio
Hg <sup>+2</sup>	Ión mercurio
hGH	Human Growth Hormone, Hormona del Crecimiento Humano
HLA	Antígenos de histocompatibilidad
Hp53	p53 humano
Hr.	Hora
Hrs.	Horas
HSV-TK	Timidina Kinasa del Virus del Herpes Simplex
I.R.	Radiación ionizante
Ig	Inmunoglobulina
IGF-BP3	Insuline-like growth factor binding protein 3, proteína 3 de unión al factor de crecimiento tipo insulina
IL-3	Interleucina 3
IR	Radiación Ionizante
Kb	Kilobase, 1000 pares de bases.
kDA o kD	Kilodaltones
KO	Knockout, inactivación
L5	Proteína ribosomal L5
LcK	Lymphoid Cell Kinase, Kinasa de Células Linfoides
Leu	Leucina
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni

Lys	Lisina
M	Molar, concentración molar, molaridad.
MA	Massachussets
MBP	Proteína mielina básica
mdm	Murine double minute, doble diminuto murino
MDR1	Gen de Resistencia a Multidroga 1
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar, concentración milimolar.
MMPs	Metaloproteínasas de matriz
MMTV	Murine Mamary Tumors Virus, Virus de Tumores Mamarios de Ratón
M-MuLV	Virus de la Leucemia Moloney
MO	Missouri
MSV	Virus del sarcoma murino
MT	Metalotioneína
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
Neo	Neomicina
NFP	Proteína de neurofilamentos
ng	Nanogramo
NK	Natural Killer, Asesinas Naturales
NTP	Nucleotide Tri-Phosphate
OH	Hidroxi
ORF	Open reading frame, marco abierto de lectura
p53AIP1	p53-regulated Apoptosis Inducing Protein 1, Proteína 1 Inductora de Apoptosis regulada por p53
P53DINP1	p53-dependent Damage-Inducible Nuclear Protein 1, Proteína Nuclear 1 Dependiente de p53 Inducible por Daño
Pag.	Página



Pb	Pares de bases o nucleótidos
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PERP	p53 Apoptosis Effector Related to PMP-22, Efector de Apoptosis dependiente de p53 Relacionado a PMP-22
pH	Potencial de hidrógeno
Ph.D.	Doctor en Filosofía
pl	Picolitros
POD	Peroxidasa
prob.	Probabilidad
PTGF- $\beta$	p53-Induced Transforming Growth Factor $\beta$ , Factor $\beta$ de Crecimiento Transformante Inducido por p53.
Rb	Retinoblastoma
Rb	Retinoblastoma
Ren-2	Renina 2
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
SEN	Señal de Exportación Nuclear
Ser	Serina
SLN	Señal de localización nuclear
St.	Stret, calle
SV40	Virus de simio 40
TAF	Transcription Activation Factor, Factor Activador de la Transcripción
TBE	Bufer de tris, boratos y EDTA
TBP	Proteína de unión a caja TATA
TdT	Terminal desoxi-transferasa

TFIIIE	Factor de transcripción II E
Tg	Transgénico
TGF- $\alpha$	Factor de crecimiento transformante $\alpha$
TK	Timidina kinasa
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-R	Receptor de TNF
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con TNF
Tris	Trizma base
Trp	Triptófano
Tunel	TdT-mediated dUTP nick end labeling
TX	Texas
U.V.	Luz Ultravioleta
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UB	Ubiquitina
UPE	Upstream Promoter Elements, Elementos Promotores Río Arriba.
VP	Vasopresina
WAF-1	Wild-type p53 actived fragment 1, fragmento 1 activado por p53 silvestre
WAP	Proteína acídica whey.
$\alpha$ 2u-G	$\alpha$ 2u Globulina
$\beta$ 2-m	Cadena $\beta$ 2 de la microglubulina
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrómetro

TFIIIE	Factor de transcripción II E
Tg	Transgénico
TGF- $\alpha$	Factor de crecimiento transformante $\alpha$
TK	Timidina kinasa
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-R	Receptor de TNF
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con TNF
Tris	Trizma base
Trp	Triptófano
Tunel	TdT-mediated dUTP nick end labeling
TX	Texas
U.V.	Luz Ultravioleta
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UB	Ubiquitina
UPE	Upstream Promoter Elements, Elementos Promotores Río Arriba.
VP	Vasopresina
WAF-1	Wild-type p53 activated fragment 1, fragmento 1 activado por p53 silvestre
WAP	Proteína ácida whey.
$\alpha$ 2u-G	$\alpha$ 2u Globulina
$\beta$ 2-m	Cadena $\beta$ 2 de la microglubulina
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrómetro