

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA  
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



EFFECTO DEL GEN BAX EN APOPTOSIS  
MEDIADA POR p53 EN CRISTALINO DE RATON

T E S I S

QUE EN OPCION AL TITULO DE  
BIOLOGO

PRESENTA:  
DAVID RUIZ TREJO

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA

ASESOR EXTERNO:  
M.C. GILBERTO JARAMILLO RANGEL

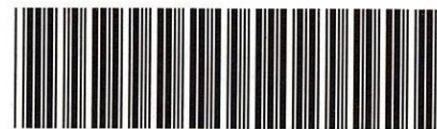
**TL**

**RC271**

**.K54**

**R8**

**c.1**



1080094984

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA**  
**LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y VIROLOGIA**



**EFFECTO DEL GEN BAX EN APOPTOSIS  
MEDIADA POR p53 EN CRISTALINO DE RATON**

## **TESIS**

**QUE EN OPCION AL TITULO DE  
BIÓLOGO**

**PRESENTA:  
DAVID RUIZ TREJO**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA**

**ASESOR EXTERNO:  
M.C. GILBERTO JARAMILLO RANGEL**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.**

**DICIEMBRE DE 2000**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**EFEECTO DEL GEN BAX EN APOPTOSIS  
MEDIADA POR p53 EN CRISTALINO DE RATON**

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL TITULO DE  
BIÓLOGO**

**PRESENTA:  
DAVID RUIZ TREJO**

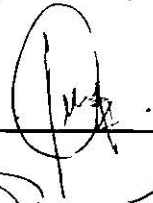
**COMISION DE TESIS:**

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



---

**Dr. Juan Manuel Alcocer González**  
Secretario



---

**Dra. Diana Reséndez Pérez**  
Vocal



---

**Dr. Mario Morales Vallarta**  
Suplente



---

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.**

**DICIEMBRE DE 2000**

*Buena es la ciencia con herencia, y provechosa para los que ven el sol.  
Porque escudo es la ciencia, y escudo es el dinero; mas la sabiduría  
excede, en que da vida a sus poseedores.*

-Eclesiastés 7:11-12

## DEDICATORIA

A Refugio y Rosalinda.

A Ana.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por haberme permitido ser parte de su grupo de investigación y por la guía brindada a lo largo de este trabajo.

Al M.C. Gilberto Jaramillo Rangel, por su constante, valiosa y sabia asesoría y amistad durante este año.

Al resto de los asesores, por sus justas y atinadas rectificaciones.

Al Biól. Julián López Reyes, por los muchos consejos brindados.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología y su personal, por las facilidades brindadas a lo largo del presente.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio: Jorge Gómez, Naima Cortéz, Luis Bermúdez, Areli Herrera, , Arnulfo Villanueva, Pablo Chávez, M.C Analí Gámez Escobedo. Aracely García, Abraham Castro, Deyanira Quistián.

A los caros amigos, los que estuvieron en las buenas y en las malas (ustedes saben quienes son).



## INDICE

Capítulo	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	1
1.-INTRODUCCION	3
2.- ANTECEDENTES	5
2.1 CANCER	5
2.2 GENES SUPRESORES DE TUMORES	5
2.3 APOPTOSIS	7
2.4 p53	12
2.5 p53 y APOPTOSIS	13
2.6 TUMORES INVOLUCRADOS CON p53	14
2.7 EL CRISTALINO	14
2.8 <i>BAX</i>	17
2.9 <i>BAX</i> Y p53	18
3.-HIPOTESIS	19
4.-OBJETIVO GENERAL	19
5.-OBJETIVOS PARTICULARES	20
6.- METODOLOGÍA	21
6.1 OBTENCION DE RATONES CON p53 Y CARENTES DE <i>BAX</i>	21
6.2 GENOTIPIFICACIONES	22
6.3 TECNICA DE AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO	22
6.4 TECNICA DE PCR	23
6.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	25
6.6 MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO Y ELECTRÓNICA	27

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
7.-RESULTADOS	30
7.1 OBTENCION DE LAS LINEAS DE RATONES	30
7.2 ANALISIS EXTERNO DE LA MICROFTLAMIA DE LOS RATONES CARENTES DE <i>BAX</i> Y NORMALES	32
7.3 ANALISIS EXTERNO DE LA MICROFTLAMIA DE LOS RATONES TRANSGENICOS CARENTES DE <i>BAX</i> Y TRANSGÉNICOS	32
7.4 ANALISIS DE LOS CRISTALINOS POR MICROS- COPIA DE CAMPO CLARO	35
7.5 ANALISIS HISTOLOGICO DE LOS CRISTALINOS DE RATONES CARENTES DE <i>BAX</i> Y NORMALES	35
7.6 ANALISIS HISTOLOGICO DE LOS CRISTALINOS DE RATONES TRANSGÉNICOS CARENTES DE <i>BAX</i> Y TRANSGÉNICOS	35
7.7 ANALISIS DE LOS CRISTALINOS POR MICROS- COPIA ELECTRÓNICA	38
7.8 ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LOS CRISTALINOS DE RATONES CARENTES DE <i>BAX</i> Y NORMALES	38
7.9 ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LOS CRISTALINOS DE RATONES TRANSGÉNICOS CARENTES DE <i>BAX</i> Y TRANSGÉNICOS	39
8.-DISCUSION	41
9.-CONCLUSION	43
10.-LITERATURA CITADA	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
μ	Micras
μg	Microgramos
μl	Microlitros
cols	Colaboradores
cm	Centímetros
DNA	Acido Desoxirribonucleico
EDTA	Acido Etilen diamino-tetra-acético
G	Número de veces la Fuerza de Gravedad
G <sub>1</sub>	Fase celular de crecimiento primario
kb	Kilobases
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
ng	Nanogramos
OsO <sub>4</sub>	Tetraóxido de Osmio
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

RNAm	Acido Ribonucleico mensajero
TAE	Tris-Acido Acético-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Regulador Tris-EDTA
Tris	Tris-hidroxi-metil aminometano
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Volts
X	Número de ampliaciones

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1.	<b>21</b>
Líneas de ratones obtenidas.	
Tabla 2.	<b>25</b>
Programa de PCR empleado.	
Tabla 3.	<b>34</b>
Comparación macroscópica de los ojos de los ojos de los ratones estudiados.	

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Respuestas celulares a señales externas e internas.	8
Figura 2. Cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis.	11
Figura 3. Genotipificación del transgen p53 humano por PCR.	30
Figura 4. Genotipificación del alelo mutado y normal de <i>bax</i> por PCR.	31
Figura 5. Aspecto <i>in vivo</i> de los ratones.	33

Figura 6.

**37**

Microscopía de campo claro de los cristalinicos de los ratones de las líneas estudiadas.

Figura 7.

**40**

Microscopía electrónica de los cristalinicos de los ratones de las líneas estudiadas.

## RESUMEN

p53 es el gen supresor de tumores más importante. Este gen lleva a cabo dicha función mediante apoptosis (muerte celular programada) o efectuando un alto de la progresión del ciclo celular en G1. Más de la mitad de todos los cánceres humanos presentan mutaciones en dicho gen. Por este motivo, el estudio detallado de los mecanismos empleados por p53 tiene grandes implicaciones en el entendimiento de la presentación y progresión del cáncer. *bax* es un gen proapoptótico de la familia de Bcl-2, el cual ha sido propuesto como integrante de la vía de apoptosis mediada por p53. En este trabajo usamos un modelo de apoptosis *in vivo* mediado por p53 el cual expresa p53 específicamente en el cristalino. En este modelo se establecieron tres parámetros indicativos de apoptosis: (a) desarrollo de microftalmia, (b) pérdida del ordenamiento celular del cristalino a nivel de microscopía de luz y (c) daño celular apoptótico observado por microscopía electrónica. Con este modelo determinamos si el gen *bax* influía en la apoptosis mediada por el transgen p53 humano. Para esto se generaron ratones transgénicos para el p53 en un fondo genético con y sin *bax*, y ratones silvestres en un fondo genético sin *bax*. Estos ratones se analizaron con los tres parámetros antes



mencionados. En el supuesto que *bax* formara parte de la vía de apoptosis de p53 se esperaba que su ausencia inhibiera o disminuyera la apoptosis. Al analizar los diferentes parámetros encontramos lo siguiente: en el caso de la apoptosis mediada por p53, al eliminar *bax* en los ratones transgénicos, éstos siguieron mostrando el fenotipo característico de apoptosis observado en los ratones transgénicos con *bax*. Por otra parte, encontramos que los ratones carentes de *bax* mostraron un fenotipo similar al de los ratones silvestres. Basándonos en estos resultados, podemos concluir que la vía de apoptosis inducida por p53 en el cristalino sigue una vía independiente de su gen blanco *bax*; de igual manera la apoptosis que se genera normalmente en el cristalino es independiente de *bax*.

## INTRODUCCION

El cáncer es uno de los problemas más frecuentes y graves de la medicina clínica. Las estadísticas muestran que alguna forma de esta enfermedad afecta a más de la tercera parte de la población mundial. El cáncer no es una sola enfermedad, sino un nombre aplicado a una gran variedad de tumores malignos generados por un mismo proceso básico de crecimiento descontrolado. Durante este proceso se genera una masa (tumor o neoplasia) que invade tejidos vecinos. Un tumor está compuesto por un parénquima de células proliferativas, con un estroma de tejido conectivo y vasos sanguíneos. Existen tres formas principales de tumores: sarcomas, carcinomas y enfermedades malignas hematopoyéticas y linfoides.

Las células cancerosas se definen por dos propiedades hereditarias: se reproducen desafiando las restricciones normales e invaden y colonizan territorios que normalmente son reservados para otras células. En general, las células de animales superiores normalmente se dividen sólo cuando son estimuladas por factores externos, algunos producidos generalmente por otras células. Muchos

cánceres, como otras enfermedades que muestran características de herencia multifactorial, poseen un importante componente genético en cuanto a que ciertas personas son más susceptibles de desarrollar una malignidad particular.

Los genes responsables de la aparición de cáncer son de dos tipos distintos: oncogenes y genes supresores de tumores. Los oncogenes facilitan la transformación maligna, mientras que los genes supresores de tumores bloquean el desarrollo del tumor regulando los genes que participan en el crecimiento celular (1). p53 es el supresor de tumores más importante. Mas de la mitad de todos los cánceres humanos presentan ya sea deleción o mutaciones en el gen. A p53 se le define como supresor de tumores también por el hecho de que inhibe o suprime la transformación, causada por varios oncogenes, de células en cultivo. Dos de los mecanismos mediante los cuales p53 protege a nuestro organismo en contra del desarrollo de tumores son mediante apoptosis (muerte celular programada) (2) o efectuando un alto de la progresión del ciclo celular en G1. El estudio detallado de estos mecanismo tiene grandes implicaciones en el entendimiento de la presentación y progresión del cáncer. El presente trabajo está relacionado con una de las vías de apoptosis del gen p53 *in vivo* .

## **ANTECEDENTES**

### **1. *CANCER***

La mayoría de los cánceres resultan de la interacción de factores genéticos y del medio ambiente. Entre los últimos se encuentra el humo del cigarro, algunos constituyentes de la dieta, drogas, radiación, agentes infecciosos y los residuos carcinogénicos ambientales como los de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, generados por un proceso de combustión incompleta. Estos inducen cambios en la secuencia del DNA en genes críticos involucrados en el control del crecimiento celular (entre otros), lo que eventualmente conducirá a la transformación de las células (3).

#### **1.1 *ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMOR***

Varias evidencias dieron lugar a la creencia de que el daño genético podría ser responsable de la presentación y progresión del cáncer, entre las que se incluyen: el reconocimiento de predisposición

hereditaria al cáncer, la detección de cromosomas dañados en células cancerosas, la aparente conexión entre la susceptibilidad al cáncer y la incapacidad de las células de reparar el DNA dañado, y la evidencia que relaciona el potencial mutagénico de algunas sustancias a su carcinogenicidad. Con el descubrimiento de los oncogenes, ésta creencia fue confirmada, ya que fueron identificados en un inicio como genes de virus que causan transformación en sus células blanco. Los genes que como contraparte se presentan en células normales son llamados proto-oncogenes, y en ciertos casos su mutación o activación aberrante se asocia con la formación de tumores. A la fecha se han identificado mas de 100 oncogenes. La generación de un oncogen representa una ganancia de función en la cual un proto-oncogen celular se activa inapropiadamente. El cambio puede involucrar la activación constitutiva de una función que generalmente no se expresa, o la sobreexpresión en el tejido normal. Generalmente, este cambio involucra cambios mutacionales en el producto proteico (4).

Los genes supresores de tumores se detectaron en forma de alteraciones que son tumorigénicas, es decir, se presenta una pérdida de función en genes que generalmente imponen algún control del ciclo

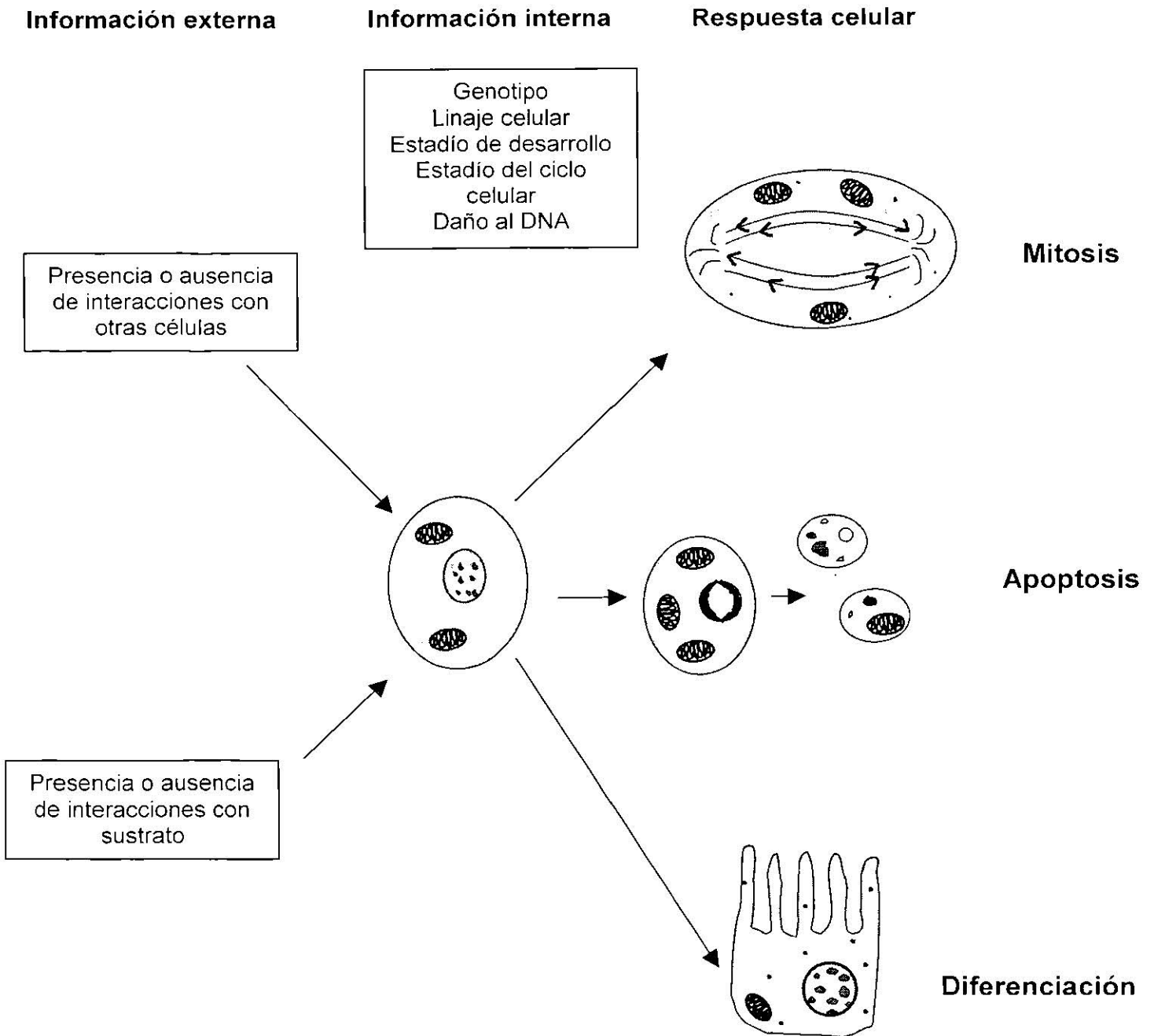
o el crecimiento celular. La evidencia más concluyente en cuanto a esta naturaleza se observa en ciertos cánceres hereditarios, en los cuales los pacientes que tienen la enfermedad desarrollan tumores que pierden ambos alelos y por lo tanto carecen de un gen activo.

Hasta la fecha, se conocen aproximadamente una docena de genes supresores de tumor (3).

## ***2. APOPTOSIS***

El proceso de muerte celular programada, también conocido como apoptosis, es común en la mayoría de los eucariotes superiores, incluyendo plantas, insectos y vertebrados. En mamíferos, la apoptosis permite la emergencia de los dedos en las manos y pies, así como el desarrollo adecuado del sistema nervioso, y previene el desarrollo de cáncer (5). También, se encarga de eliminar células T y B autorreactivas, las cuales son producidas por el sistema inmune (6). Actualmente, se acepta que es un proceso dirigido genéticamente, y puede ser visto, junto con la diferenciación celular, como parte del repertorio disponible por la célula para responder a estímulos tanto externos como internos (Figura 1). Las señales externas que dan

lugar a apoptosis son probablemente tan variadas como aquellas que dan lugar a la diferenciación y proliferación (7).



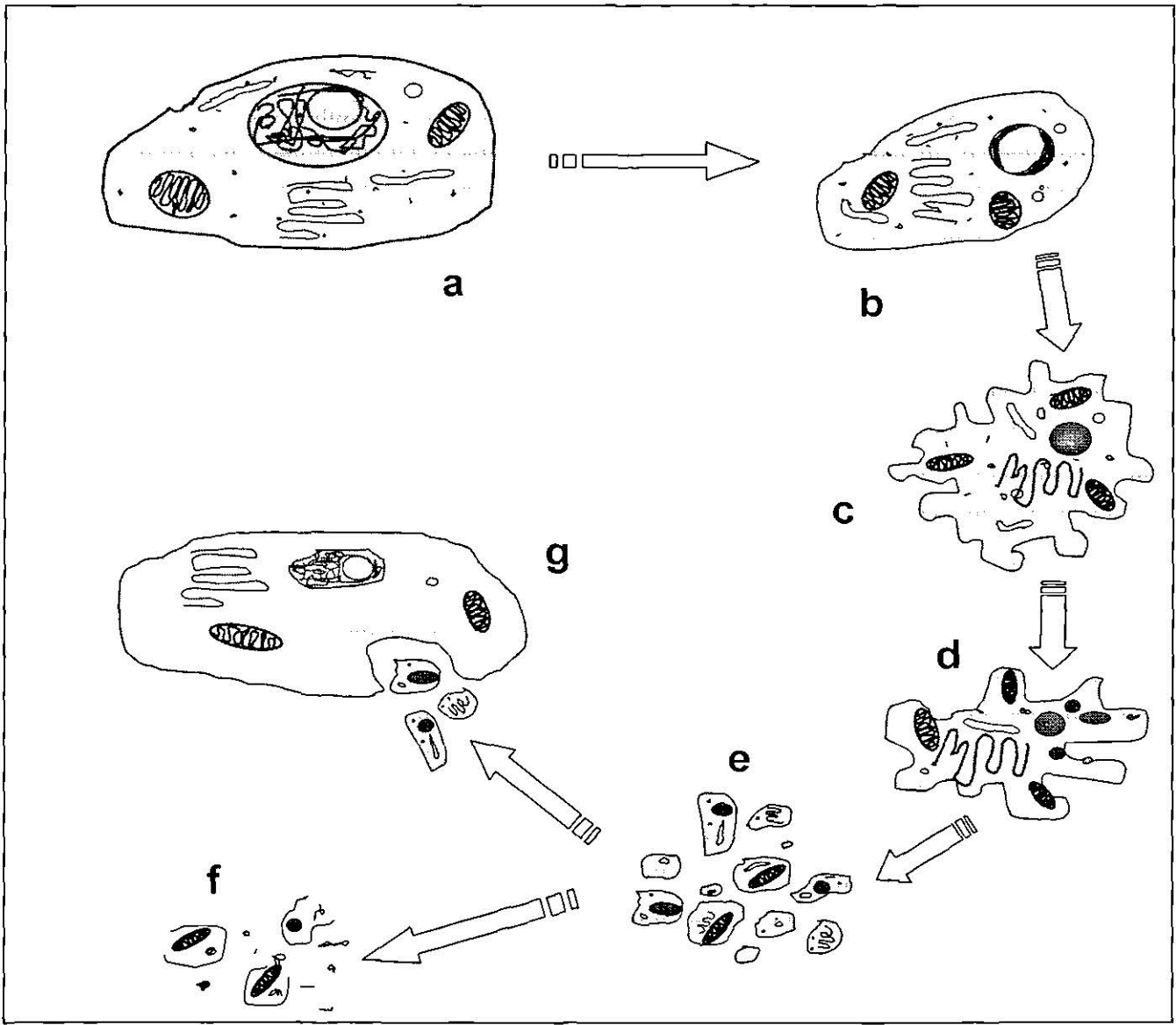
**Figura 1.** Respuestas celulares a señales externas e internas.

Desde principios de la década de los noventa, ha habido un incremento dramático en el interés que se le ha prestado al proceso mediante el cual las células de mamíferos, y, en general de eucariotes, mueren, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas investigaciones han llevado a la examinación intensa de los factores regulatorios que controlan la entrada de las células a las vías de muerte celular programada, llamada comúnmente apoptosis. A pesar de que algunos eventos nucleares como la condensación y la fragmentación del DNA, así como la pérdida de contacto de célula, el encogimiento de la célula misma, entre otros, son eventos indicativos de apoptosis (Figura 2) (8), en el proceso de apoptosis dos puntos deben ser mencionados. Primero, los eventos nucleares representan etapas tardías del proceso de apoptosis, y segundo, a pesar de que se han descrito indicadores de apoptosis, todavía hay incertidumbre acerca de la secuencia de eventos involucrados cuando una célula responde a señales que inician apoptosis y que dan como resultado la muerte celular (9).

Actualmente, ha quedado claro que muchas enfermedades se caracterizan por la desregulación de programas apoptóticos. La apoptosis es la forma fisiológica en que muchas células nucleadas mueren, como células no deseadas, lesionadas o infectadas con virus.



A la par de estas funciones de defensa, un exceso de apoptosis no regulada puede ser la causa de varias enfermedades degenerativas y autoinmunes, así como algunos cánceres, como el melanoma. De forma contraria, un nivel demasiado bajo de apoptosis puede promover la sobrevivencia y la acumulación de células anormales que pueden dar lugar a la formación de tumores (10).



**Figura 2.** Los cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis. Primero, la célula normal (a) se encoge y la cromatina condensada se colapsa en crestas alrededor de la envoltura nuclear (b). La membrana celular se empieza a hinchar y formar burbujas (c), mientras que el núcleo finalmente se colapsa (d). La formación de burbujas continúa hasta que la célula se rompe en cuerpos apoptóticos (e), los cuales se lisan in vitro (f) y son fagocitados in vivo (g).

### **3. p53**

La pérdida del control del ciclo celular y la inestabilidad genómica son características de la mayoría de las células tumorales. La activación de los proto-oncogenes que promueven el crecimiento celular, en combinación con la inactivación de los genes supresores de tumor que funcionan inhibiendo la progresión del ciclo celular, da lugar a la progresión de un tumor y finalmente a su malignidad. Uno de los principales genes supresores de tumor es p53. Este se localiza en la banda 13 del brazo corto del cromosoma 17 (17p) con un tamaño de aproximadamente 20 kilobases (kb). Este gen da lugar a un transcrito de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de 2.8 kb y codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kilodaltons (de ahí su nombre), la cual contiene 393 aminoácidos. Una de las funciones primarias de p53 es evitar la acumulación de alteraciones genéticas después de que se presenta daño en el DNA. Para cumplir con esto, p53 inhibe el crecimiento de las células dañadas mediante dos mecanismos. En respuesta al DNA dañado, p53 es capaz de mediar un alto del ciclo celular en G<sub>1</sub>, tal vez para permitir las reparaciones genómicas necesarias. Asimismo, puede causar la eliminación de las células dañadas iniciando la apoptosis (**11**).

Normalmente, hay dos alelos de p53; en caso de que uno de ellos esté mutado, el alelo que permanece sin alteración suple la función del mutado, aunque no completamente, ya que individuos que sólo tienen un alelo p53 funcional presentan mutagénesis con una frecuencia mayor que aquellos con dos copias funcionales, aunque menor que aquellos sin ninguna copia funcional.

### **3.1 p53 Y APOPTOSIS**

El p53 normal actúa como un “guardián molecular”, monitoreando la integridad del genoma. Si el DNA es dañado, se acumula p53 y se detiene la replicación, para darle tiempo extra para la reparación del DNA. Si esta reparación falla, p53 puede activar la muerte celular por apoptosis. Las células tumorales en las que p53 está inactivado por mutación no pueden llevar a cabo este arresto celular. Por lo tanto, son genéticamente menos estables, acumulan mutaciones y presentan rearrreglos cromosómicos a una frecuencia mayor, dando lugar a una rápida selección de clones malignas.

### **3.2 TUMORES INVOLUCRADOS CON ALTERACIONES A p53**

La inactivación de p53 tiene un papel muy importante en la tumorigénesis humana y se han encontrado una gran cantidad de

mutaciones en una amplia gama de tumores, incluyendo condrosarcoma (12), carcinoma gástrico (13), cáncer de senos paranasales (14), carcinoma esporádico del colon ascendente y descendente (15,16), entre otros.

#### **4. EL CRISTALINO**

El cristalino está formado por un solo tipo de células, cuyo crecimiento, diferenciación, y apoptosis, ocurren en compartimentos regionalmente distintos. El cristalino plenamente formado consiste de células fibrosas postmitóticas diferenciadas, las cuales están cubiertas anteriormente por una capa de células epiteliales inmaduras proliferantes, que ocasionalmente sufren apoptosis (17). Al pasar las células epiteliales a la región ecuatorial, éstas cambian tanto en morfología como en su actividad de sintetizar macromoléculas. Algunas características morfológicas se hacen aparentes inmediatamente, destacando el incremento en el tamaño de las células, estando éste asociado con un incremento en la masa de proteínas celulares y en las membranas de cada célula fibrosa individual (18).

La diferenciación a células fibrosas se caracteriza por un alargamiento celular, la síntesis y acumulación de grandes cantidades de proteínas citoplasmáticas, el cese de la síntesis de DNA y de división celular, así como la eventual degradación de la mayoría de los organelos unidos a membrana por medio de apoptosis, incluyendo el núcleo (17).

El cristalino de mamífero tiene una concentración de proteína de 35% de su peso húmedo, el doble que la mayoría de los tejidos. La mayoría de las proteínas solubles en agua caen en uno de los tres grupos de cristalinas descritos originalmente ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). La más grande de las cristalinas es la  $\alpha$ -cristalina, con un peso molecular mayor de  $5 \times 10^5$  Daltones. La fracción de  $\alpha$ -cristalina no es una sola proteína, sino que está compuesta de una mezcla de agregados macromoleculares de diferente tamaño de cuatro subunidades de proteínas distintas, pero muy relacionadas. Cabe señalar que la  $\alpha$ -cristalina representa aproximadamente el 35% del cristalino (18).

#### **4.1. EL CRISTALINO COMO MODELO EXPERIMENTAL**

Mahon *et al.*, en 1987 fueron los primeros en utilizar el cristalino *in vivo* para probar la tumorigenicidad de oncogenes, aprovechando

las facilidades que otorga el cristalino (accesibilidad, morfología característica, etc.) (19).

Por otro lado, Morgenbesser y cols. en 1994 examinaron los efectos de la deficiencia del gen supresor de tumores de retinoblastoma (Rb) en el desarrollo del cristalino, para lo cual emplearon un modelo murino, en el cual, o bien dejaron en estado heterocigoto a este gen, o lo suprimieron, con la finalidad de establecer la función de Rb en la apoptosis dependiente de p53 en el cristalino de ratón (20).

Por otro lado, Nakamura *et al.* Usaron como modelo el cristalino de ratón para analizar la función del gen p53 humano. Estos investigadores desarrollaron ratones transgénicos que expresaban el gen p53 humano bajo la regulación del promotor del gen de la  $\alpha$ -cristalina. La expresión de este transgen ocasionó apoptosis en células del cristalino. Las células del cristalino que se encuentran en diferenciación acumulan el producto de p53 transgénico después del nacimiento, sus núcleos muestran evidencia bioquímica de rompimiento de DNA y la conversión de dichas células a fibras elongadas es interrumpida (21).

## 5. BAX

Oltvai *et al.*, al examinar interacciones de la proteína Bcl-2 que pudieran ser parte de una vía de muerte celular en vertebrados, identificaron a *Bax*, una nueva proteína asociada a Bcl-2, cuya expresión estable es permisiva para la apoptosis, mas no necesariamente induce la muerte en células de vertebrados (22). Esta nueva proteína tiene una secuencia que es 52% similar y 28% idéntica con la secuencia de Bcl-2, sin embargo, ambos cumplen con funciones opuestas, ya que, mientras Bcl-2 actúa como inhibidor de apoptosis, *Bax* actúa como un promotor de la misma (23).

Recientemente, se ha encontrado que el gen *bax* tiene una función de supresor de tumores, y también se ha visto que tiene mutaciones en ciertos tipos de cánceres (24).

Yin y cols. mostraron el papel de *bax* en tumor de cerebro en ratones transgénicos, encontrando que, en ratones mutantes para *bax*, el crecimiento tumoral se aceleraba, mientras que la apoptosis disminuía en un 50%, indicando con esto que *bax* se requiere para una respuesta completa mediada por p53 (25).



## 5.1 BAX Y p53

McCurrach *et al.* demostraron que *bax* puede funcionar como un efector de p53 en apoptosis inducida por quimioterapia, y que contribuye a una vía de p53 que suprime la transformación oncogénica (26).

Miyashita y Reed sugieren que uno de los posibles mecanismos por los que la pérdida de p53 vuelve a las células tumorales más resistentes a la inducción de apoptosis mediada por drogas anticancer pudiera ser la pérdida de elevaciones inducidas por p53 en la expresión del gen *bax* (27).

Li y cols., al trabajar en células epiteliales de cristalino de conejo que tenían inhibida la fosfatasa protéica por la aplicación a las células de ácido okadaico, encontraron que, en éste sistema, tanto p53 como *bax* son necesarios para la activación de los programas apoptóticos en el cristalino (28).

Estudios recientes han demostrado que en algunos tejidos murinos la expresión de *bax* es elevada después de ser estimulados para apoptosis, y que puede ser directamente regulada por p53 (24).

## HIPOTESIS

*bax* es un gen blanco inducido en la vía de apoptosis mediada por p53 (27). La expresión de p53 en el cristalino induce apoptosis (21). Por lo tanto es posible que la ausencia de *bax* en el cristalino de ratón tenga un efecto sobre la apoptosis mediada por el transgen p53.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si el gen *bax* interviene en la vía de apoptosis mediada por el transgen p53 en el cristalino de ratón.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener ratones carentes de *bax*, que presenten un transgen p53 humano.
- 2.- Determinar la presencia de microftalmia en las líneas de ratones.
- 3.-Comparar histológicamente los cristalinos de los ratones de las líneas mencionadas, tanto en microscopía de campo claro como en microscopía electrónica.
- 4.-Determinar la existencia de apoptosis en las líneas de ratones a desarrollar.

## METODOLOGIA

### 1. Obtención de ratones con transgen p53 humano y carentes de *bax*.

Para cumplir con el objetivo particular 1, llevamos a cabo las cruzas necesarias de ratones desarrollados por Montes de Oca *et al.*, en 1995 (29) y por Nakamura *et al.*, en 1995 (21), de modo que obtuvimos ratones que carecían de *Bax*, y que tenían el transgen p53 humano (Tabla 1).

	LINEA 1	LINEA 2	LINEA 3	LINEA 4
<i>BAX</i>	+/+	-/-	+/+	-/-
TRANSGEN	-	-	+	+

Tabla1. Líneas de ratones obtenidas.

Estos ratones fueron mantenidos y apareados en cajas especiales, las cuales estuvieron en un bioterio con temperatura, humedad e iluminación controladas.

## **1.1. Genotipificación**

Para verificar el genotipo de los ratones, extrajimos DNA genómico de las colas de los ratones desarrollados, una vez que estos cumplieron 5 semanas de nacidos, para posteriormente realizar ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los dos genes mencionados (*bax* y transgen p53 humano).

### **1.1.1 Técnica de aislamiento de DNA genómico**

Se aisló DNA genómico de los descendientes de las cruza antes mencionadas, conforme a la siguiente técnica: se corta aproximadamente 1.5 cm de la cola de los ratones; ésta se coloca en un tubo eppendorf con 500  $\mu$ l de solución lisis y 10  $\mu$ l de proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml. Este tubo se deja incubar aproximadamente 6 horas en agitación lenta a una temperatura de 55° C, dando agitaciones periódicas en un agitador Maxi Mix. Posteriormente, se centrifuga 2 minutos a 14000 g. Se elimina aproximadamente 450  $\mu$ l de sobrenadante y se pasa a un tubo nuevo. Se añade un volumen igual de Fenol-cloroformo y se mezcla suavemente, hasta alcanzar un tono lechoso. Después, se centrifuga

12 minutos a 14000 g. La fase acuosa (superior) se separa y se pone en otro tubo. Posteriormente, se precipita el DNA añadiendo 450  $\mu$ l de isopropanol. Se centrifuga 3 minutos a 14000 g. Se elimina el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol 70%. Es importante que en este paso, la pastilla de DNA se separe del fondo. Se centrifuga 1 o 2 minutos a 14000 g y se elimina el etanol. El etanol que aún quede en el tubo se deja evaporar toda una noche. Posteriormente, se resuspende el DNA en 200  $\mu$ l de buffer TE 1X (Tris 10mM; EDTA 1mM)

### 1.1.2 Técnica de PCR

Para determinar el genotipo de los ratones, se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), para lo cual se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

a) oligonucleótidos dirigidos al p3 5'-TCCAAATACTCCACACGCAA-3'  
transgen p53 humano GE5R 5'-TCCCAAATACTCCACACGC-3'

**b)oligonucleótidos dirigidos E5F 5'-GAAGCTGATCAGAACCATCATGG-3'**

**a bax**

**NeoR 5'-ACCCGCTTCCATTGCTCAGCGG-3'**

**I5R 5'-GGGTTGACCAGAGTGGCGTAGG'-3'**

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml se preparó una mezcla de 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido, a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l, 2.5  $\mu$ l de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) a 2.5 mM, 0.25  $\mu$ l de Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l), 2.5  $\mu$ l de buffer para la enzima, así como 17  $\mu$ l de agua bidestilada esterilizada. Empleamos 1 $\mu$ l de ADN.

Esta mezcla se incubó en un termociclador, siguiendo este programa:

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Evento</b>
1	94	4	Desnaturalización
2	94	1	prolongada
3	60	1	Desnaturalización
4	72	3	Apareamiento
5		34 ciclos al paso 2	Extensión
6	72	7	Extensión prolongada

Tabla 2. Programa de PCR empleado.

El resultado de la amplificación fue interpretado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

### **1.1.3 Electroforesis en gel de agarosa**

Esta técnica tiene su fundamento en la separación de moléculas basada en su movilidad en un campo eléctrico, usando como soporte



un gel de agarosa en una solución amortiguadora. El procedimiento fue el siguiente:

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X (Tris-Acetato 0.04 mM; EDTA 0.001 M), el cual se depositó en una cámara de electroforesis, cubriéndolo con buffer TAE 1X.

Se mezclaron 13  $\mu$ l de la muestra a interpretar con 2  $\mu$ l de jugo azul 6X (Azul de Bromofenol 0.25%, Xilencianol 0.25% y Glicerol 30%). Para determinar el tamaño del producto amplificado, se utilizó un estándar de 1000 pb (100 ng/ $\mu$ l), del cual se utilizaron 3  $\mu$ l. Una vez listas las muestras, se colocaron en los carriles del gel y se llevó a cabo la electroforesis a 100 V por espacio de una hora aproximadamente. Concluida la electroforesis, se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio (2  $\mu$ g/ $\mu$ l) por 10 minutos. Una vez teñido el gel, se colocó en un transiluminador de luz UV para comparar las muestras de la amplificación con las bandas del estándar.

## **2. Microscopía de campo claro y electrónica.**

Para llevar a cabo este objetivo, se siguió una técnica previamente establecida por Jaramillo et al., a saber:

Se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. Con la ayuda de tijeras y pinzas se disecaron los ojos completos tratando de evitar en lo posible la presencia de piel y grasa peri-orbitaria. Las piezas se colocaron en Karnovsky por 30 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se hizo una abertura en la parte posterior del ojo, a nivel de la salida del nervio óptico, con una navaja de rasurar y bajo el microscopio estereoscópico. Se continuó fijando por 30 min. mas. Por último, se disecó el cristalino y se continuó fijando a las condiciones antes descritas por otros 30 min. El exceso de fijador se eliminó lavando en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4, tres veces en tiempos de 5 min. cada uno.

Con una navaja de rasurar se cortó cada cristalino hasta en ocho o diez fragmentos. Se post-fijó en  $\text{OsO}_4$  al 1% por 1.5 horas a temperatura ambiente. De nuevo, se eliminó el exceso de fijador con lavados iguales a los descritos anteriormente.

El contraste en bloque se realizó colocando las muestras en nitrato de uranilo al 1% por 30 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se hicieron lavados de la forma ya descrita.

La deshidratación se hizo en una serie graduada de etanol: 30%, 50%, 70%, 90%, 5 min. cada uno; y etanol al 100%, tres veces por 5 min. cada una.

Finalmente, se trató las muestras con una mezcla de etanol al 100% y resina Spurr suave, 1:1, durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente el procesamiento continuó, sometiendo las piezas a mezclas de resina y etanol, en las siguientes proporciones y tiempos: 2:1 por 1 hora, 3:1 por 1.5 horas, y 3:1 por 1.5 horas. Todas estas incubaciones fueron a temperatura ambiente. Por último, se dejaron durante toda la noche a 4°C en una mezcla de Spurr suave: Etanol 100%, 3:1.

Una vez transcurrido este plazo, se destaparon los frascos que contenían las muestras bajo una campana de extracción por 4 ó 5

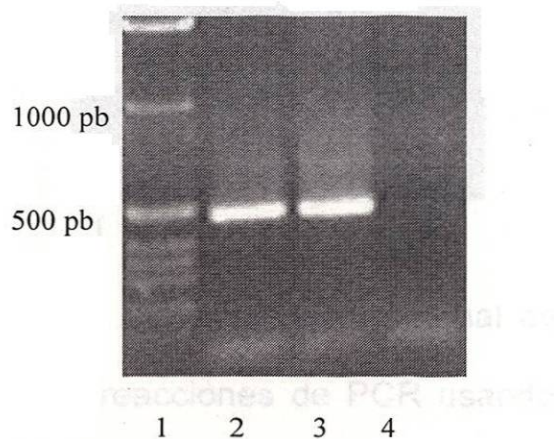
horas, a fin de que se evaporara el etanol. Por último, se les puso Spurr suave puro y se guardaban a 4°C durante una noche más.

Finalmente se incluían las piezas. Para esto, con la ayuda de un aplicador de madera cortado en uno de sus extremos a manera de cuchara, se colocó cada una de ellas en los moldes de plástico en donde previamente se había vaciado resina. Se dejaron reposar por 2 horas, y finalmente se colocaron en una estufa a 60°C durante 48-72 horas.

Una vez completada la polimerización, se obtuvieron cortes semifinos, los cuales se montaron sobre portaobjetos de vidrio, se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se observaron al microscopio de campo claro. Los cortes finos se montaron en rejillas de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.4%, y finalmente se observaron con el microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss modelo EM109.

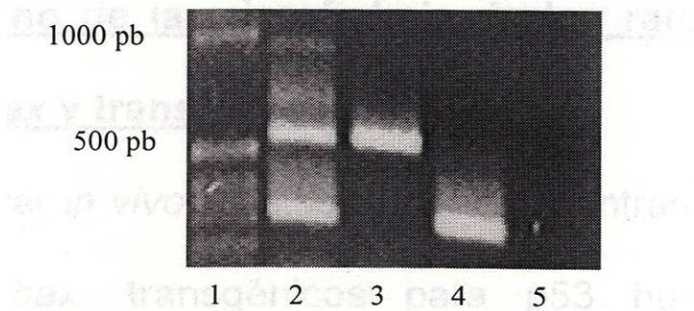
## RESULTADOS

**Obtención de las líneas de ratones.** Una vez obtenidos los ratones carentes de *bax*, estos fueron cruzados con ratones transgénicos para p53 humano. La descendencia de éstos fue sometida a ensayos de PCR para comprobar su genotipo. La presencia del transgen p53 humano, se comprobó por la obtención de un producto de 500 pares de bases (pb) en la reacción de PCR.(Figura 3).



**Figura 3.** Genotipificación del transgen p53 humano por PCR. Gel de agarosa 0.8%. Se realizaron reacciones de PCR usando DNA genómico de los ratones estudiados. En el carril 1, el marcador de peso molecular (1kb). En los carriles 2 y 3, ratones transgénicos para p53 humano. En el carril 4, ratón normal

La presencia tanto del alelo mutado de *bax*, como del alelo normal, se comprobó mediante la obtención de una banda de aproximadamente 600 pares de bases y una banda de aproximadamente 300 pares de bases, respectivamente, en la reacción de PCR (Figura 4). En la figura se observa un ratón heterocigoto (carril 2), un homocigoto mutante (carril 3) y un silvestre (carril 4).



**Figura 4.** Genotipificación del alelo mutado y normal de *bax* por PCR. Gel de agarosa 0.8%. Se realizaron reacciones de PCR usando DNA genómico de los ratones estudiados. En el carril 1, un marcador de peso molecular (1 kb). En el carril 2, un ratón heterocigoto para *bax*, presentando tanto el alelo mutado (600 pb) como el alelo normal (300 pb). En el carril 3, ratón carente de *bax* (presencia solamente del alelo mutado). En el carril 4, ratón normal (presencia solamente del alelo normal). En el carril 5, negativo de la reacción de PCR.

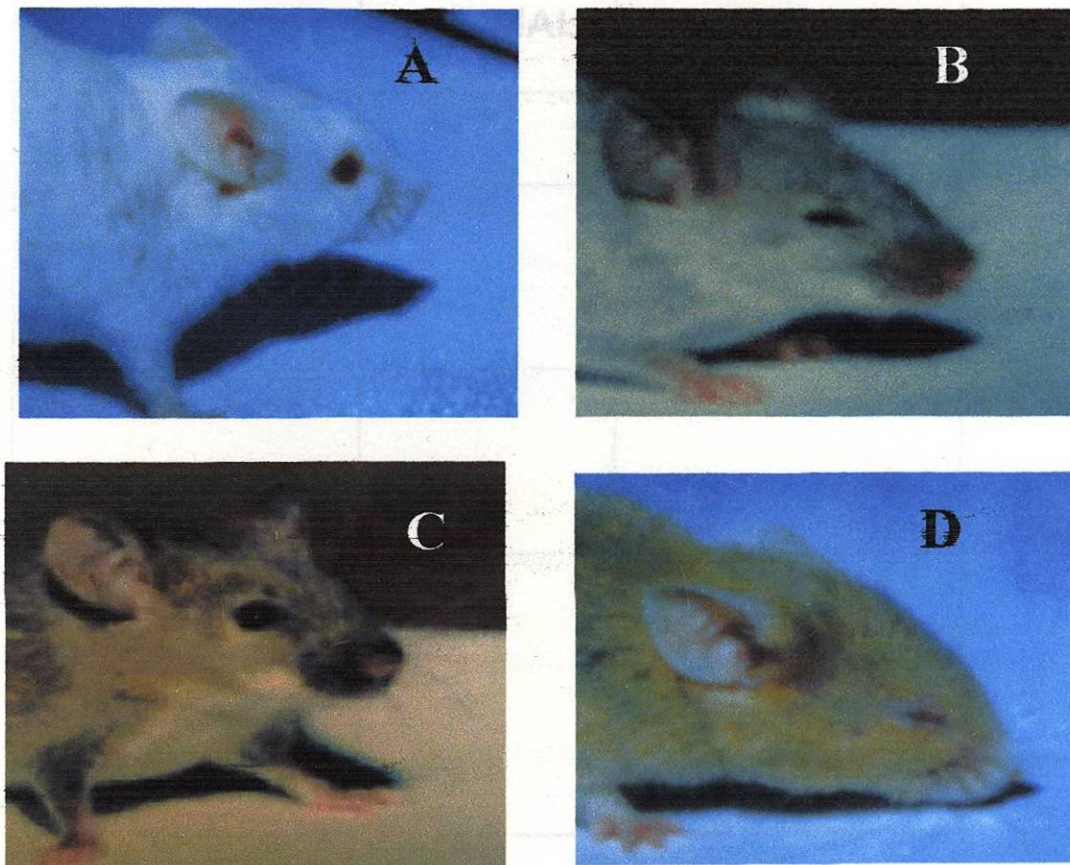
## I. DESARROLLO DE MICROFTALMIA

### **Análisis externo de la microftalmia de los ratones carentes de *bax* y normales**

Al observar *in vivo* los ratones carentes de *bax* (Figura 5C), encontramos que presentaban, externamente, un tamaño de ojo similar al de un ratón normal (Figura 5A). En la tabla 3 se puede ver esta información sintetizada.

### **Análisis externo de la microftalmia de los ratones transgénicos carentes de *bax* y transgénicos**

Al observar *in vivo* a estos ratones encontramos que los ratones carentes de *bax*, transgénicos para p53 humano presentaban microftalmia (Figura 5D); de igual manera, los ratones transgénicos para p53 humano presentaban microftalmia (Figura 5B);



**Figura 5.** Aspecto *in vivo* de los ratones. (A) Ratón normal, sin microftalmia, obsérvese el tamaño normal del ojo. (B) Ratón transgénico para p53 humano, con microftalmia. (C) Ratón carente de *bax*, nótese el tamaño similar al de los ratones normales. (D) Ratón carente de *bax* y transgénico para p53 humano, nótese la microftalmia.



LINEA	OJO NORMAL	MICROFTALMIA
NORMAL	+	-
P53 TRANSGENICO	-	+
CARENTE DE <i>BAX</i>	+	-
CARENTE DE <i>BAX</i> TRANSGENICO	-	+

Tabla 3. Comparación macroscópica de los ojos de los ratones estudiados

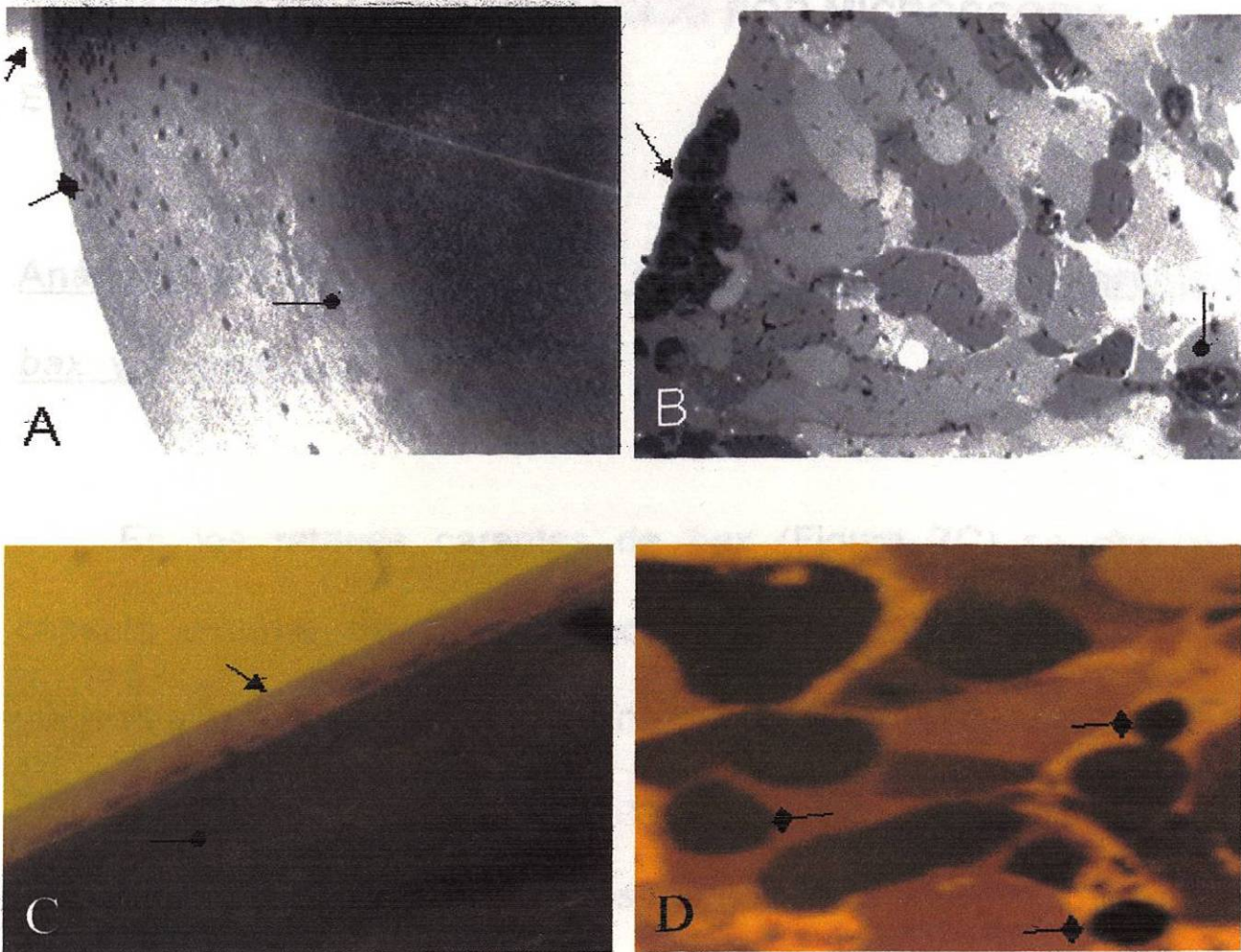
## II. ANÁLISIS DE LOS CRISTALINOS POR MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

### Análisis histológico de los cristalinos de ratones carentes de *bax* y normales.

En los ratones carentes de *bax* (Figura 6C) se aprecia una cápsula externa de tejido fibrocolagenoso, debajo de la cual se extiende una capa de células epiteliales cuboideas. En la parte media del órgano, el núcleo de dichas células se alarga y posteriormente desaparece (al igual que el resto de sus organelos), dando lugar a las células fibrosas. Estas ocupan el resto del cristalino, formando capas paralelas y altamente ordenadas. Por otra parte, en los ratones normales (Figura 6A), se observa la misma disposición estructural que en los ratones normales con *bax*.

**Análisis histológico de los cristalinos de ratones transgénicos carentes de *bax* y transgénicos.**

Al analizar en microscopía de campo claro la histología de cristalinos de ratones transgénicos carentes de *bax* (Figura 6D) encontramos que no se distingue la cápsula externa de tejido que normalmente está presente, las células epiteliales forman acúmulos y su núcleo está muy condensado (apoptótico). El interior del órgano posee una estructura altamente desordenada y se observan también núcleos apoptóticos con cromatina muy condensada. Esta condición de desorden estructural es compartida por los cristalinos de los ratones transgénicos (Figura 6B).



**Figura 6.** Microscopía de campo claro de cristalinios de ratones normales y de transgénicos para p53 humano, carentes de *bax* y carentes de *bax* transgénicos. (A) Ratón normal. Se observa, de afuera hacia dentro, una cápsula de tejido fibrocolagenoso( → ), una capa de células epiteliales ( →◆ ), y células fibrosas en la parte más interna( —● ) (200X). (B) Ratón transgénico. No se observa la cápsula externa, las células epiteliales forman acúmulos ( → )y presentan núcleos apoptóticos( —● ). (320X). (C) Ratón carente de *bax*. Se observa la cápsula que rodea al órgano ( → ), y las células fibrosas formando capas paralelas y altamente ordenadas ( —● ) ( 200X). (D) Ratón carente de *bax* transgénico. El interior del cristalino no presenta un orden definido. Se observan múltiples cuerpos apoptóticos con cromatina condensada libres( —◆ ) (200X).

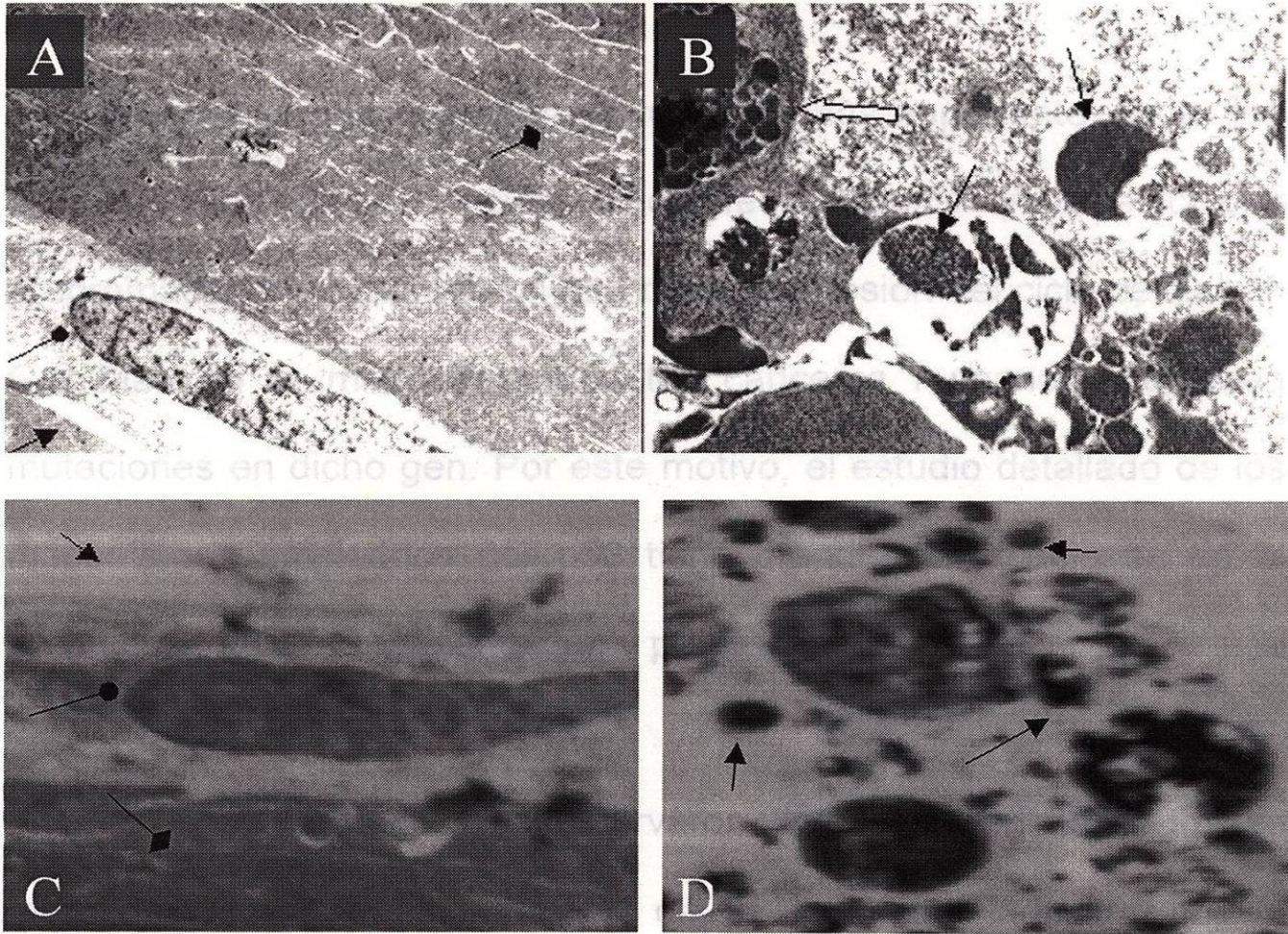
### III. ANÁLISIS DE LOS CRISTALINOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

#### Análisis ultraestructural de los cristalinos de ratones carentes de *bax* y normales

En los ratones carentes de *bax* (Figura 7C) se observa la cápsula externa de tejido fibrocolagenoso, células epiteliales con núcleos alargados de morfología normal y el acomodo ordenado de las fibras. En los ratones normales (Figura 7A), se observa la misma organización que en los ratones carentes de *bax*. Se aprecia, de afuera hacia adentro, la cápsula externa, células epiteliales con morfología normal y, en la parte más interna, las fibras.

## Análisis ultraestructural de los cristalinos de ratones transgénicos carentes de *bax* y transgénicos

Ultraestructuralmente, en los ratones transgénicos carentes de *bax* (Figura 7D) no hay un orden en el interior del órgano, observándose cuerpos apoptóticos con cromatina condensada libres, y otros ya fagocitados por una célula vecina; de igual forma, en los ratones transgénicos para p53 humano (Figura 7B), no se aprecia un orden, observándose asimismo cuerpos apoptóticos con cromatina libres.



**Figura 7.** Microscopía electrónica de cristalinos de ratones normales, transgénicos, carentes de *bax* y de carentes de *bax* transgénicos para p53 humano. (A) Ratón normal. Se observa, de afuera hacia dentro, una cápsula de tejido fibrocolagenoso(  $\longrightarrow$  ), células epiteliales con núcleos alargados de morfología normal(  $\text{---}\bullet$  ) y las células fibrosas formando capas paralelas y altamente ordenadas (  $\text{---}\blacklozenge$  ). (B) Ratón carente de *bax* transgénico. No se observa la cápsula externa ni orden definido, las células epiteliales forman acúmulos (  $\longrightarrow$  ) y se observan cuerpos apoptóticos ya fagocitados por una célula vecina (  $\implies$  ). (C) Ratón carente de *bax*, microscopía electrónica. Se observa la cápsula que rodea al órgano(  $\longrightarrow$  ), células epiteliales con núcleos alargados de morfología normal (  $\text{---}\bullet$  ), y las células fibrosas formando capas paralelas y altamente ordenadas (  $\text{---}\blacklozenge$  ) (3000X). (D) Ratón carente de *bax*, transgénico, microscopía electrónica. El interior del cristalino no presenta un orden definido. Se observan cuerpos apoptóticos con cromatina condensada libres (  $\longrightarrow$  )(7000X).

## DISCUSION

p53 es el gen supresor de tumores más importante. Este gen lleva a cabo dicha función mediante apoptosis (muerte celular programada) o efectuando un alto de la progresión del ciclo celular en G1. Más de la mitad de todos los cánceres humanos presentan mutaciones en dicho gen. Por este motivo, el estudio detallado de los mecanismos empleados por p53 tiene grandes implicaciones en el entendimiento de la presentación y progresión del cáncer.

En este trabajo se observaron las características típicas morfológicas y ultraestructurales de la apoptosis inducida por la expresión del transgen p53 humano en el cristalino de ratón (30), mismas que se analizaron en la ausencia de *bax*. Los parámetros de apoptosis previamente establecidos para este modelo de apoptosis se hicieron evidentes en este trabajo. Se observó microftalmia y cristalinos pequeños en los ratones transgénicos para p53. Estas características son las observadas previamente por Jaramillo et al. y el fenotipo correlaciona con la detección de la fragmentación nuclear detectada previamente en el cristalino por la expresión de p53 (30).



Usando este modelo demostramos que la inducción de apoptosis por p53 en el cristalino de ratón es independiente de *bax* ya que los ratones transgénicos mostraron un fenotipo similar de apoptosis en la presencia y ausencia del gen *bax*. En los ratones transgénicos sin *bax* se presentó microftalmia, desorganización celular del cristalino y daño celular apoptótico observado por microscopía electrónica.

Es importante recordar que *bax* es un gen blanco de p53 y de hecho es un gen de respuesta primaria de apoptosis inducida por p53 (27). Por tal motivo resulta notorio que p53 haya inducido apoptosis en ausencia de *bax*. Sin embargo no podemos descartar el hecho de que en un momento dado existan dos vías de apoptosis inducidas por p53 en el cristalino de ratones, una dependiente de *bax* y otra independiente del mismo, de tal manera que aún y cuando se inhibiera la vía dependiente de *bax* la otra indujera la apoptosis que se observa en los ratones transgénicos sin *bax*. También es posible que p53 active otros genes que pudieran compensar la función de *bax*.

El presente trabajo contribuye a profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción que utiliza p53 para inducir apoptosis y proteger al organismo en contra del desarrollo de tumores. Esto es de suma importancia, ya que los resultados aquí obtenidos pueden contribuir a un mejor diseño de las terapias genéticas contra el cáncer, o mejorar aquellas ya existentes.

## CONCLUSIÓN

La ausencia de *bax* no alteró la vía natural de apoptosis ni la inducida por el transgen p53 humano en el cristalino de ratón.

## LITERATURA CITADA

(1)Thompson, M. (1996). 4<sup>a</sup> edición. Genética en Medicina. MASSON, México.

(2)Lewin B. (1997). Genes VI. Oxford University Press.

(3)Perera, S.L. (1997). Environment and cancer: who are susceptible?. Science 278: 1068-1073.

(4) Bishop, J.M. (1987). The molecular genetics of cancer. Science. 235: 305-311

(5) Mastrangelo, A., Betenbaugh, M. (1998). Overcoming apoptosis: new methods for improving protein- expression systems. Trends in Biotechnology.

(6) Peter, M., Heufelder, A. Hengartner, M. (1997). Proc. Natl Acad. Sci. USA 94, 12736-12737.

(7) Williams, GT, Smith, Ch. (1993). Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*. 74: 777-779.

(8) Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284: 555-556.

(9) Dickson, A. (1998). Apoptosis regulation and its application to biotechnology  
*Trends in Biotechnology*. 16(8). 339-342.

(10) Peter, ME. (1997). Advances in apoptosis research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94 12736-12737.

(11) Thut, C.J., Goodrich J.A., Tjian R. (1997). Repression of p53-mediated transcription by Mdm-2: a dual mechanism. *Genes Dev*. 11:1974-1986.

(12) Oshiro, Y., Chaturvedi, V., Hayden, D., Nazeer, T., Johnson, M., Johnston, D., Ordóñez, N., Ayala, A., Czerniak, B. (1998). Altered

p53 is Associated with Aggressive Behavior of Chondrosarcoma.  
Cancer . 83 (11) 2324-2334.

(13) Sakaguchi, T., Watanabe, A., Sawada, H., Yamada, Y., Yamashita, J., Matsuda, M., Nakajima, M., Miwa, T., Hirao, T., Nakano, H. (1998). Prognostic Value of Cyclin E and p53 expression in gastric carcinoma. Cancer. 82 (7) 1238-1243

(14) Caruana, S., Zwiebel, N., Cocker, R., McCormick, S., Eberle, R., Lazarus, P. (1997). p53 alteration and human papilloma virus infection in paranasal sinus cancer. Cancer. 79 (7) 1320-1328

(15) Lleonart M., García-Foncillas, J., Sánchez-Prieto, R., Martín, P., Moreno, A., Salas, C., Ramón y Cajal, S. (1998). Microsatellite instability and p53 mutations in sporadic right and left colon carcinoma. Cancer. 83 (5) 889-895

(16) May P., May E. (1995). p53 and cancers. Pathol. Biol. 43(3) 165-173

(17) Dahm, R., Prescott, A., (1999). Looking into the Lens: Using Microscopes to Study the Eye's Lens. The Americas Microscopy and Analysis. *March 1999*

(18) Anderson, R.E. (1983). Biochemistry of the Eye. American Academy of Ophthalmology. Manuals Program. EUA

(19) Mahon, K., Chepelinsky, A., Khillan, J., Overbeek, P., Piatigorsky, J., Westphal, H. (1987). Oncogenesis of the Lens in Transgenic Mice. *Science* 235, 1622-1628.

(20) Morgenbesser, S., Williams, B., Jacks, T., DePinho, R. (1994). p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature*. 371 72-74.

(21) Nakamura, T., Pichel, JG., Williams-Simons, L., Westphal, H. (1995). An apoptotic defect in lens differentiation caused by human p53 is rescued by a mutant allele. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 6142-6146.

(22) Oltvai, Z. Milliman, C. Korsmeyer, S. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, *Bax*, that accelerates programmed cell death. *Cell*. Vol. 74, 609-619

(23) Hunter, J. Parslow, T. 1996. A peptide sequence from *Bax* that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271. No. 15. Pp. 8521-8524

(24) Brady, HJ., Gil-Gomez, G. (1998). *Bax*. The proapoptotic Bcl-2 family member, *Bax*. *Int J Biochem Cell Biol* 30(6):647-50.

(25) Yin 1997. *Bax* suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*. Feb 13; 385 (6617): 637-40.

(26) McCurrach, M., Connor, T., Knudson, C., Korsmeyer, S., Lowe, S. (1997). *bax*-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94 2345-2349.

(27) Miyashita, T., Reed, J. (1995). Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human *bax* Gene. *Cell* 80, 293-299.

(28) Li, DW., Fass, U., Huizar, I., Spector, A. (1998). Okadaic acid-induced lens epithelial cell apoptosis requires inhibition of phosphatase-1 and is associated with induction of gene expression including p53 and *bax*. *Eur J Biochem.* 257(2):351-61.

(29) Montes de Oca Luna, R., Wagner, D., Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in *mdm2*-deficient mice by deletion of p53. *Nature.* 378: 206-208.

(30) Jaramillo-Rangel, G., Ruiz-Trejo, D., Sepúlveda-Saavedra, J., Montes de Oca-Luna, R., (2000). Establecimiento de un modelo para el estudio *in vivo* del mecanismo de acción del gen supresor de tumores p53, utilizando el cristalino de ratones transgénicos. En preparación



