

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



LA AUSENCIA DEL GEN *E2F1* INCREMENTA EL
EL EFECTO APOPTOTICO DEL TRANSGEN *p53*
HUMANO EN EL CRISTALINO

TESIS
QUE EN OPCION AL TITULO DE
BIOLOGO

PRESENTA:
HUMBERTO RODRIGUEZ ROCHA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE DEL 2001

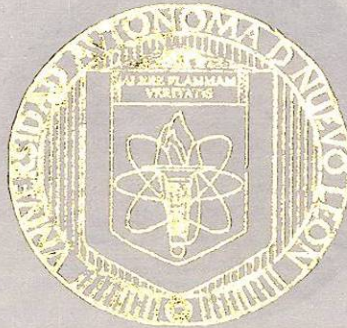


TL
QH671
.R63
2001
c.1



1080117241

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



LA AUSENCIA DEL GEN *E2F1* INCREMENTA EL
EL EFECTO APOPTOTICO DEL TRANSGEN *p53*
HUMANO EN EL CRISTALINO

TESIS
QUE EN OPCION AL TITULO DE
BIOLOGO

PRESENTA:

HUMBERTO RODRIGUEZ ROCHA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE DEL 2001





UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**LA AUSENCIA DEL GEN *E2F1* INCREMENTA EL EFECTO
APOPTOTICO DEL TRANSGEN *p53* HUMANO EN EL CRISTALINO**

TESIS

**QUE EN OPCION AL TITULO DE
BIÓLOGO**

**PRESENTA:
HUMBERTO RODRÍGUEZ ROCHA**

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

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.
DICIEMBRE DE 2001**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LA AUSENCIA DEL GEN *E2F1* INCREMENTA EL EFECTO
APOPTOTICO DEL TRANSGEN p53 HUMANO EN EL CRISTALINO

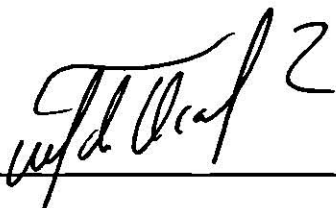
TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA:
HUMBERTO RODRÍGUEZ ROCHA

COMISION DE TESIS:

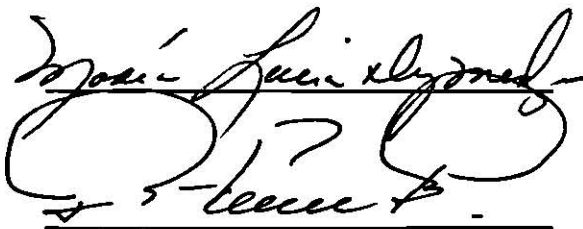
Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Presidente



M.C. Fco. Javier Álvarez Mendoza
Secretario



M.C. Maria Luisa Díaz Mendoza
Vocal



Dr. Ricardo Fuentes Pensamiento
Suplente

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

DICIEMBRE DE 2001

AGRADECIMIENTOS

A mis padres.

Maria y Humberto

Por la oportunidad y la paciencia brindada

A mis hermanos:

Martin, José de Jesús, Martha, Laura, Carmen Elda, Brenda, Jose Luis y Argenis.

Por compartir mis tristezas y mis alegrías, sobre todo por soportarme.

A Dr. Roberto Montes De Oca Luna

Por haberme permitido pertenecer a su equipo de investigación, por su apoyo, por la confianza brindada y asesoría para la realización de este trabajo . A los integrantes del comité de Tesis por su apoyo y participación.

A mis amigos y compañeros de Generación:

Roberto Mendez, Laura Maricela y Alfonso Dávila

Con los cuales comparti las aulas que fueron mi segunda casa.

A mis amigos

Sonia Irigoyen, Leonora Peña, Juan Luis Peña y Liliana Medina

Por lo gratos momentos que que compartimos durante la carrera.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio:

Aracely García, Arnulfo Villanueva, Claudio Rocha, Deyanira Quistián, Alberto Valadez, Areli Herrera, Analí Gámez, Gilberto Jaramillo, Daniel Díaz, Naima Cortez, Luis Bermúdez, Jorge Gutiérrez.

Por sus consejos brindados en el desarrollo de este trabajo y hacer más grata la estancia en el laboratorio.

Al Departamento de Histología de la Facultad de Medicina:

Dr. Julio Sepúlveda, Rosy, a la Dra Raquel.

Por sus consejos y apoyo brindado en la realización del trabajo.

Al personal del Laboratorio de Histología de la Facultad de Ciencias Biológicas, al maestro Javier Álvarez y a la maestra Elsa por el apoyo brindado, a Felipe de la cruz por el apoyo y asesoría técnica.

A todos los maestros que de alguna forma y personas que de alguna forma que durante la carrera se ocuparon de nuestra formación y nos brindaron el gusto e interés por la Biología.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Roberto Montes De Oca Luna y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra.

ÍNDICE

Capítulo	Página
AGRADECIMIENTOS	I
LOCALIZACIÓN	III
INDICE	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	4
CANCER	4
TIPOS DE MUERTE CELULAR	4
NECROSIS	4
APOPTOSIS	5
LA APOPTOSIS EN EL DESARROLLO	6
LA IMPORTANCIA DE APOPTOSIS EN TERAPIA CONTRA EL CANCER	7
Genes supresores de tumores	7
ASPECTOS GENERALES DE p53 Y E2F	8
p53	8
E2F-1	10
E2F1 Y LA APOPTOSIS	11
Interacción entre p53 y E2F	12
MODELO EXPERIMENTAL	14
El cristalino	14
El cristalino como modelo experimental	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20

Capítulo	Página
METODOLOGÍA	21
Obtención de Líneas de Ratones	21
Genotipificación	21
Técnica de aislamiento de DNA genómico	22
Técnica de PCR	22
Electroforesis en gel de agarosa	24
Análisis del tamaño del ojo y del cristalino	24
Análisis del cristalino por microscopia de campo claro	25
RESULTADOS	27
OBTENCIÓN DE LAS LÍNEAS DE RATONES	27
ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL OJO <i>IN VIVO</i>	
DE LAS LÍNEAS DE ESTUDIO	29
ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL ÓRGANO VISUAL	31
ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL CRISTALINO	32
MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO	33
DISCUSIONES	36
CONCLUSIÓN	38
LITERATURA CITADA	39

LISTA DE ABREVIATURAS

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

Tabla 1 Líneas de ratones obtenidas.	21
Tabla 2 Programa que se siguió para el PCR	23
Tabla 3 Comparación del fenotipo de los ojos de las líneas de ratones analizadas in vivo.	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Respuesta de la célula a señales extrínsecas e intrínsecas	6
Figura 2 Funciones de p53 en la progresión del ciclo celular	10
Figura 3 Estructura esquemática del cristalino	15
Figura 4 Determinación del genotipo de E2F1 mediante PCR	27
Figura 5 Determinación del genotipo del Transgen p53 mediante PCR	28
Figura 6 Análisis <i>in vivo</i> de los ojos	30
Figura 7 Efecto de la ausencia de E2F1 en el tamaño de los ojos	32
Figura 8 Efecto de la ausencia de E2F1 en el tamaño de los cristalinos	33
Figura 9 Análisis histológico del cristalino de ratón	35

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 la fase G1. Más del 50% de todos los cánceres humanos presentan mutaciones en dicho gen y el otro tanto por ciento presentan alteraciones en productos de genes que interactúan en esta vía de apoptosis. 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. E2F1 es un factor de transcripción que interviene en la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular, 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* dependiente de p53, el cual se expresa 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 y (c) daño celular apoptótico. En este modelo determinamos si el gen E2F1 intervenía en la apoptosis mediada por el transgen p53 humano. Para esto se generaron ratones transgénicos para p53 en un fondo genético con y sin E2F1, y ratones sin el transgen p53 humano en un fondo genético con y sin E2F1. Estos ratones se analizaron con los tres parámetros antes mencionados. En el supuesto que E2F1 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: Los ratones carentes de E2F1 mostraron un fenotipo similar al de los ratones silvestres. En el caso de la apoptosis mediada por p53, al eliminar E2F1 en los ratones transgénicos, estos siguieron mostrando el fenotipo característico de la apoptosis observado en los ratones transgénicos con E2F1. Sin embargo, observamos que en los ratones transgénicos sin E2F1 la apoptosis fue mucho más severa que en aquellos ratones transgénicos con E2F1. Basándonos en estos resultados, podemos concluir que E2F1 interviene como modulador en la vía de apoptosis mediada por el transgen p53 en el cristalino.

INTRODUCCIÓN

Los cambios observados en el país en los aspectos sociales, políticos y económicos han propiciado modificaciones en la conducta de la población y han alterado sus hábitos alimenticios y de comportamiento. Al exponer su organismo a un gran número de factores de riesgo que favorecen la aparición de alteraciones en la profundidad de los tejidos sometidos a los efectos de nuevos y numerosos compuestos químicos, así como la práctica de hábitos nocivos para la salud como el tabaquismo, alcoholismo y consumo de otras drogas.

Esta nueva "cultura" esta ligada al incremento de padecimientos no transmisibles entre ellos el cáncer, que afecta cada vez a mayor número de personas de todas las edades y se presenta cada vez con mas frecuencia en etapas más tempranas de la vida.

En la última mitad del siglo XX se comenzaron a manifestar estos cambios en la manera de enfermar y de morir de los mexicanos; a partir de 1988 las enfermedades del corazón se situaron como la primera causa de morbilidad y mortalidad con 47,905 defunciones y una tasa del 57.9 por 100,000 habitantes, siendo la enfermedad isquémica la que ocupó el primer lugar como causa de muerte.

El cáncer apareció como la segunda causa de muerte a partir de 1989, año en el que se registraron 40,628 defunciones y una tasa de 48.2 por 100,000 habitantes, siendo los tipos más frecuentes los de pulmón, estomago y cuello uterino con tasas de 6.1, 5.2 y 5.1 respectivamente. Desde entonces el cáncer es responsable del 12.0% de todas las defunciones que se registran en el país, las estadísticas muestran que alguna forma de esta enfermedad afecta más de la tercera parte de la población mundial.

El desarrollo y el mecanismo molecular en la progresión del cáncer son complicados e involucran la interacción de genes supresores de tumor, oncogenes, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, y factores angiogénicos que ayudan en la transición de una célula normal a adquirir el fenotipo de una célula maligna. El inicio y desarrollo del cáncer involucran un daño inicial causando un desorden que con frecuencia provoca una regulación negativa de los genes supresores de tumor o una inducción de los oncogenes. El crecimiento sin límite es la falla más característica de los tumores que representa una cantidad de eventos desfavorables. Primero, un cambio genético, dado por señales extrínsecas e intrínsecas, en un sitio determinado y segundo, cuando los procesos de reparación del DNA fallan o por daño a éste. La inestabilidad genómica debido a cambios acumulados, favorece la selección de células malignas con un agresivo incremento de las propiedades del crecimiento y una rápida expansión del tumor.

El cáncer es una enfermedad enteramente genética y por esto es necesario conocer sus bases moleculares y el como una célula normal se puede defender de la transformación para activar estos sistemas con una terapia génica..

ANTECEDENTES

CÁNCER

El cáncer es un trastorno del crecimiento y comportamiento celular, su causa última debe definirse a escala celular y subcelular (Cotran et al.1996). Los diferentes tipos de cáncer son causados por anomalías en la secuencia del DNA. Durante el transcurso de la vida el DNA de las células humanas está expuesto a mutágenos y sufre cambios en la replicación, resultando en cambios sutiles y progresivos en las secuencias de DNA de cada célula. Ocasionalmente, una de estas mutaciones somáticas altera la función de un gen crítico, otorgándole una ventaja de crecimiento a la célula en la cual a ocurrido y resultando en la emergencia de una expansión clonal derivada de esta célula. En suma las mutaciones en genes blanco relevantes de la célula, y consecuentemente su expansión clonal, producen células que invaden a otros tejidos y que causan metástasis. El cáncer es la enfermedad genética más común: Una de cada tres personas en el mundo occidental desarrollan cáncer, y una de cada cinco mueren por ello (Futreal et al. 2001).

TIPOS DE MUERTE CELULAR

Necrosis

Los términos necrosis y apoptosis hacen principalmente referencia a los aspectos morfológicos de las células que mueren. Una célula necrótica se hincha, explota y libera su contenido citoplásmico, lo que produce una respuesta inflamatoria al atraer células del sistema inmune. Originalmente se pensaba que todas las muertes celulares, o al menos una gran mayoría, presentaban esta morfología. Sin embargo, esta muerte está restringida a situaciones "accidentales" o agudas: heridas, infecciones, el daño inicial en infartos, etc. Su asociación con la respuesta inflamatoria la hacen fácilmente detectable.

Apoptosis

La muerte celular programada es un importante mecanismo en el desarrollo y homeostasis en tejidos adultos para la remoción de células sobrantes, infectadas, transformadas o dañadas por la activación de un programa suicida intrínseco. La muerte celular programada es conocida como apoptosis, la cual se caracteriza por mantener las membranas de la célula intactas durante el proceso de suicidio, hasta tal punto que permite que la célula adyacente cubra totalmente a la célula agonizante para que esta no libere su contenido y pueda disparar una reacción inflamatoria local. Las células apoptóticas usualmente presentan una morfología característica, como: fragmentación de la membrana en cuerpos apoptóticos, condensación nuclear y citoplásmica y división endolítica del DNA en pequeños fragmentos oligonucleosomales (Steller, 1995). Las células o sus cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos. Las señales que disparan la apoptosis pueden estar incluidas dentro de la información linaje de la célula, daño por radiaciones, infecciones virales o señales extracelulares. Las señales extrínsecas pueden suprimir o promover apoptosis y algunas promover la sobrevivencia en un tipo celular y en otras invocar la apoptosis (Steller, 1995). La invocación al programa de suicidio involucra la síntesis de RNAm específicos y su traducción. La apoptosis se puede suprimir por inhibición de la transcripción o traducción (Steller, 1995).

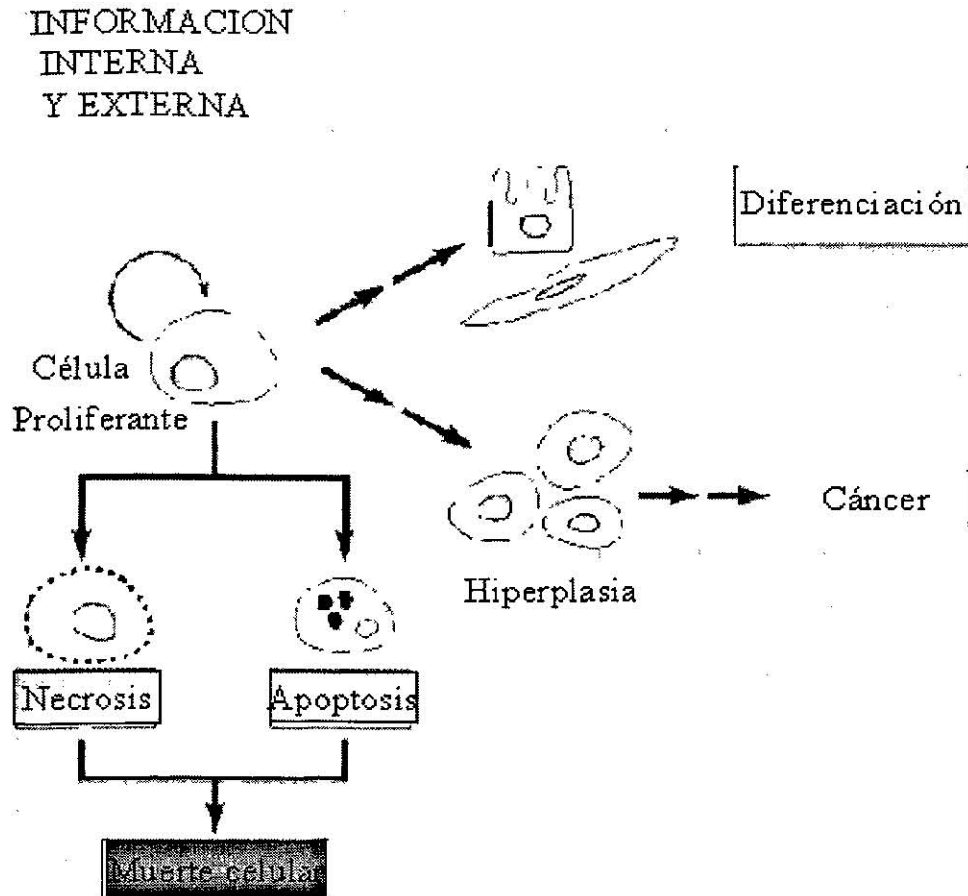


Figura 1. Respuesta de la célula a señales extrínsecas e intrínsecas

La apoptosis en el desarrollo

Las investigaciones de la muerte celular programada como un mecanismo del desarrollo se remonta a 1930. Los procesos del desarrollo que involucran a la apoptosis son:

Eliminación de órganos y tejidos transitorios. Por ejemplo en los vestigios filogenéticos (pronefros y mesonefros en los vertebrados de nivel evolutivo mas alto) en la cola y branquias de los anuros, asi como en los órganos larvales de los insectos holometábolos.

Remodelación de los tejidos. En los primordios de las extremidades de los vertebrados, son un ejemplo. Si falla la apoptosis, en la formación de los dedos, estos se quedan unidos por tejido suave. Al comparar, por ejemplo, la situación en los primordios de las patas traseras de algunas aves, esto se debe a la falla de la apoptosis en el mesodermo y ectodermo, esto permite que los digitales permanezcan unidos permanentemente (Saunders, 1966). Esta observación implica que el ectodermo provee una señal para disparar la apoptosis. Otro ejemplo es la formación de las asas del corazón durante el desarrollo del vertebrado. La reducción de células en ganglio espinal ocurre durante el desarrollo del embrión del ave (Saunders, 1982), esto tiene un preciso control espacial y cronológico.

IMPORTANCIA DE LA APOPTOSIS EN TERAPIA

La muerte celular programada esta sujeta a una importante actividad en lo que a investigaciones se refiere. Este interés, en gran parte, se debe al potencial para comprender la oncogénesis y la posibilidad de explotar la muerte celular programada (apoptosis) como tratamiento terapéutico. Por ejemplo, la inhibición de la apoptosis contribuye a la oncogénesis por promover que las células se inmortalicen.

Oncogenes y genes supresores de tumor

Los oncogenes fueron identificados primeramente como genes de virus que causan transformación en sus células blanco. Algunas clases de oncogenes vírales tienen contrapartes celulares que están involucrados en funciones celulares normales. Los genes celulares son llamados proto-oncogenes, y en ciertos casos su mutación o activación o expresión aberrante se asocia a la

formación de tumores. Estos se clasifican en varios grupos, los cuales representan diferentes tipos de actividades que van desde proteínas transmembranales hasta factores de transcripción. La generación de un oncogen representa una ganancia de función en la cual un proto-oncogen celular se adquiere de un virus o se activa de alguna otra manera. El cambio puede involucrar la activación constitutiva de una función que generalmente esta regulada, la expresión del gen en un tipo celular donde generalmente no se expresa, o la sobreexpresión en tejido normal. Generalmente este cambio involucra cambios mutacionales en el producto proteico.

Los genes supresores de tumor se detectan en forma de deleciones (u otras mutaciones inactivadoras) 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 (Lewin, 1994).

A la fecha se han identificado 30 genes supresores de tumor y más de 100 oncogenes (Futreal et al. 2001)

ASPECTOS GENERALES DE p53 Y E2F-1

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 (mRNA) de 2.8 kb y codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kilodaltones (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 G₁, tal vez para permitir las reparaciones genómicas necesarias. Así mismo, puede causar la eliminación de las células dañadas iniciando la apoptosis. (Thut et al. 1997).

Normalmente, hay dos alelos de p53; en caso de que uno de ellos mute, 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 alelos funcionales, aunque menor que aquellos sin ningún alelo funcional.

Donehower et al. (1992), mediante procedimientos de recombinación homóloga, demostró que la inactivación de p53 en ratones induce el desarrollo de tumores a una frecuencia elevada, principalmente linfomas y sarcomas (Figura 2).

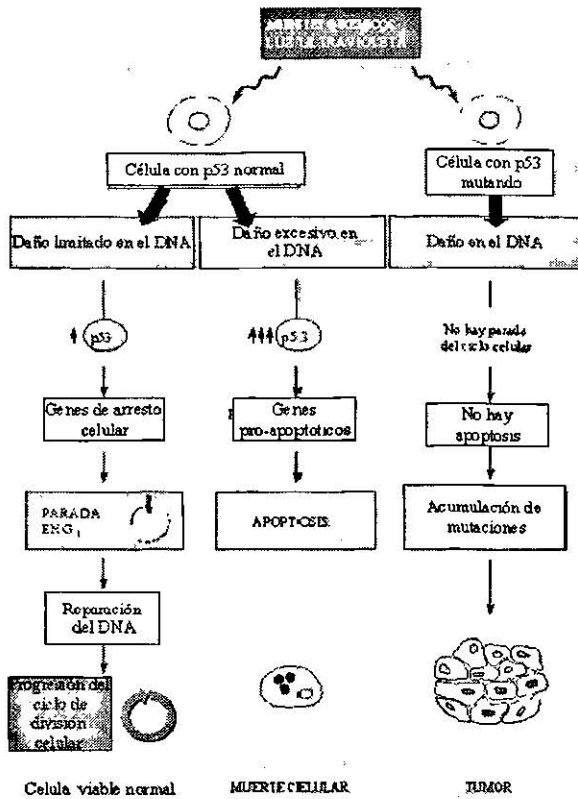


Figura 2. Funciones de p53 en la progresión del ciclo celular

E2F-1

Una gran cantidad de virus tumorales tienen la capacidad de transformar células eucarióticas a través de la unión e inactivación del producto del gen del retinoblastoma (Nevins, 1992). Se conocen varias proteínas que se unen a la proteína Retinoblastoma (Rb). Una de ellas es el factor de transcripción E2F-1 el cual originalmente se identificó como una proteína esencial para la activación del promotor adenoviral E2 dependiente de la oncoproteína E1A. Se ha descubierto en la región promotora de un gran número de genes, involucrados en la proliferación celular y en la síntesis de DNA, la secuencia que reconoce el factor de transcripción E2F. E2F-1 es expresado en una gran cantidad de líneas celulares, así como en diferentes tejidos. Helin et al. (1992) reportó un cDNA clonado al que llamó proteína 3 unida al retinoblastoma (Rbbp3) al cual ahora se le conoce como E2F-1.

Neuman et al. (1996) encontraron que el gen E2F-1 humano esta compuesto de 7 exones distribuidos en aproximadamente 11 kb. La proteína E2F-1 se une al DNA por su extremo N-terminal y posee un dominio ácido para la transactivación. Mediante la fluorescencia de la hibridación *in situ* (FISH) localizaron la posición del gen en la región 20q11.2 del genoma humano.

Zhang y Chellepan (1995) reportaron que los factores de transcripción de la familia E2F se unen al DNA como homodímeros o heterodímeros en asociación dimérica con DP1 o DP2.

E2F1 Y LA APOPTOSIS

La proteína del gen supresor de tumores pRB forma un complejo represor con el factor de transcripción E2F-1. Empleando un modelo *in vivo* en ratón con deleciones en los genes de ambas proteínas, Tsai et al. (1998) demostraron que los ratones carentes para gen supresor de tumores Rb morían a la mitad de la gestación por defectos en la eritropoiesis, en el control del ciclo celular, y en la apoptosis. Ellos demostraron también que los embriones carentes, tanto para Rb y su blanco E2F-1 mostraron una supresión significativa de apoptosis e ingreso a la fase S en ciertos tejidos, comparados con los carentes solo para Rb indicando que E2F-1 es un mediador crítico de estos efectos. Nevins (2001) resalta la importancia de la ruta de Rb/E2F en la proliferación celular, y en determinar el destino de la célula y el desarrollo de cáncer.

La proteína de gen MYC induce la transcripción de los genes E2F-1, E2F-2 y E2F-3. Usando fibroblastos embrionicos de ratón en los cuales se les realizó una deleción individual para los genes de E2F, Leone et al. (2001) mostraron que MYC induce la entrada a la fase S y que la apoptosis requiere las distintas actividades de los miembros de la familia de E2F. La capacidad de MYC para inducir la fase S se vio desfasada en la ausencia de E2F-2 o E2F-3 pero no con

E2F-1 o E2F-4. En contraste la habilidad de Myc para inducir apoptosis se vio marcadamente reducida en células a las cuales se les inactivó el gen E2F-1, pero no en las de E2F-2 o E2F-3. Los autores proponen que la inducción específica de las actividades de E2F-1 es un componente esencial en la ruta de MYC para el control de la proliferación celular.

En 1999, Pierce et al., usando como modelo un ratón transgénico que expresaba el gen E2F-1 bajo el control del promotor de la queratina 5 (K5), demostraron que el incremento de la actividad de E2F-1 puede promover tumorigénesis al cooperar con el transgen v-Ha-ras induciendo papilomas benignos, además la deficiencia de p53 inducía carcinomas espontáneos de piel. Ellos reportaron que a cierta edad los ratones transgénicos K5 E2F-1, se encuentran predispuestos a desarrollar tumores espontáneos en una variedad de tejidos que expresan K5, incluyendo piel, vagina, estomago y epitelio odontogénico. Por otro lado, encontraron que los ratones transgénicos K5 E2F-1 son resistentes al desarrollo de tumores en piel siguiendo un protocolo de carcinogénesis en dos etapas. Por lo tanto, ellos sugieren que el efecto de supresión de tumores ocurre en la etapa de promoción e involucra la inducción de la apoptosis. Con estos resultados ellos demostraron que el incremento en la actividad de E2F-1 puede promover o inhibir la tumorigénesis.

Interacción entre p53 y E2F-1

Para estudiar si E2F-1 estaba involucrado en la apoptosis dependiente de p53, Pan et al. (1998) utilizaron un modelo de apoptosis inducida por la expresión del antígeno T del virus SV40. En este modelo la carencia de p53 reduce la apoptosis en un 80%, es decir que dicha apoptosis es dependiente principalmente de p53. Al eliminar del sistema E2F1, en presencia de p53, la apoptosis se redujo en un porcentaje similar a aquella inducida por p53. Es decir que en la vía de apoptosis inducida por la expresión del antígeno T de SV40 participan tanto p53 como E2F1. A diferencia de las células normales, la proliferación de las células transformadas no se ve perjudicada por la carencia de

la proteína E2F-1, compensando el efecto de la reducción de apoptosis. Estos estudios pueden explicar la función paradójica de que E2F-1 puede actuar como un oncogen y un supresor de tumores en los modelos experimentales (Field et al., 1996).

La fuerte estimulación del receptor de las células T, causa la apoptosis en la selección positiva en los timocitos por muerte celular inducida por la activación TCR (TCR-AICD, por su siglas en inglés). Empleando el ensayo del TUNEL (TdT mediated dUTP nick end labeling), Lissy et al. (2000) demostró que las células que sufren un TCR-AICD inducen un gen relacionado a p53 denominado gen TP73, y que la introducción de un gen dominante negativo E2F-1 o TP73, pero no E2F-2, E2F-4, o p53, protege a las células del TCR-AICD.

Sherr (1998) menciona en su revisión que E2F-1 induce apoptosis dependiente de p53 al inducir la transcripción de ARF (CDKN2A), el cual neutraliza a MDM2 y estabiliza a p53. Irwin et al. (2000) reportó que una expresión transitoria de E2F-1 activa directamente el promotor de p73 y causa una acumulación del RNAm de p73, e incrementa los niveles de la proteína TP73, pero no afecta a TP63. Los análisis de TUNEL mostraron que la apoptosis se vio disminuída sustancialmente en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) que expresaban E2F-1 con p53 o p73 mutado, y que fue indetectable en los MEFs que tenían ambos genes inactivados (p53 y p73). Similarmente los MEFs con p53 inactivado eran mas susceptibles a la apoptosis que los doblemente inactivados después de la introducción de E2F-1 por infección retroviral. Por lo tanto ellos sugieren que E2F-1 puede inducir apoptosis de una manera independiente de p53 a través de p73.

Chen et al. (2000) demostraron que a los 15.5 días de edad del embrión, con una fuerte expresión del transgen E2F-1 o E2F-2 la proteína es detectada en las fibras celulares del cristalino, con poca o ninguna expresión en las células epiteliales. La incorporación de BrdU y los análisis de TUNEL mostraron que la sobreexpresión tanto de E2F-1 como de E2F-2 fue suficiente para causar que las

células postmitóticas reingresaran al ciclo celular y subsecuentemente la apoptosis. La expresión de ambos genes fue suficiente para inducir la transcripción de las ciclinas A2, B1 y E, así como p53 y Bax en las células fibrosas. Por lo tanto, ellos concluyeron que la expresión de E2F-1 o E2F-2 inducen a las células postmitóticas reingresar al ciclo celular, lo cual es detectado por p53 produciendo la muerte celular programada (apoptosis).

MODELO EXPERIMENTAL

El cristalino

El cristalino ofrece un modelo experimental excelente para estudiar el efecto y la interacción de los genes supresores de tumor y oncogenes. El cristalino esta constituido principalmente por capas concéntricas de células fibrosas que se van formando en el transcurso de la vida a partir de la diferenciación de células epiteliales que se encuentran en el margen ecuatorial del órgano. La diferenciación de las células se caracteriza por el alargamiento celular, la síntesis de las proteínas cristalinas y la degradación de todos los organelos rodeados por membrana, incluyendo el núcleo. Debido a que no existe el recambio celular en el cristalino, todas las células se retienen en el tejido; siendo las que se encuentran mas cercas del centro las más antiguas y las cercanas a la superficie las más recientes (Bassnet et al. 1997).

En el desarrollo normal del ratón, después de la formación de la vesícula del cristalino en el día embrionario 11.5 (E 11.5), un grupo de células se colocan en la pared posterior, salen del ciclo celular normal y se alargan en una dirección anterior dentro de la vesícula. En el día E 14.5, el alargamiento es completo, lo que resulta en el cristalino que consiste de células fibrosas postmitóticas diferenciadas, cubiertas anteriormente por una capa de células epiteliales inmaduras y proliferantes (Morgenbesser et al. 1994).

El cristalino de los mamíferos 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 (α , β y γ). La más grande de las cristalinas es la α -cristalina, con un peso molecular mayor de 5×10^5 Daltons. La fracción de α -cristalina no es una sola proteína, si no 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 α -cristalina representa aproximadamente el 35% de las proteínas del cristalino (Anderson, 1983).

Por lo que se menciona anteriormente el cristalino provee un sistema ideal para el estudio del proceso de interacción de genes supresores de tumor y oncogenes en un modelo *in vivo*. Aprovechando las facilidades que otorga el cristalino (accesibilidad, morfología característica, etc.) y no pone en riesgo la vida del individuo (Figura 3).

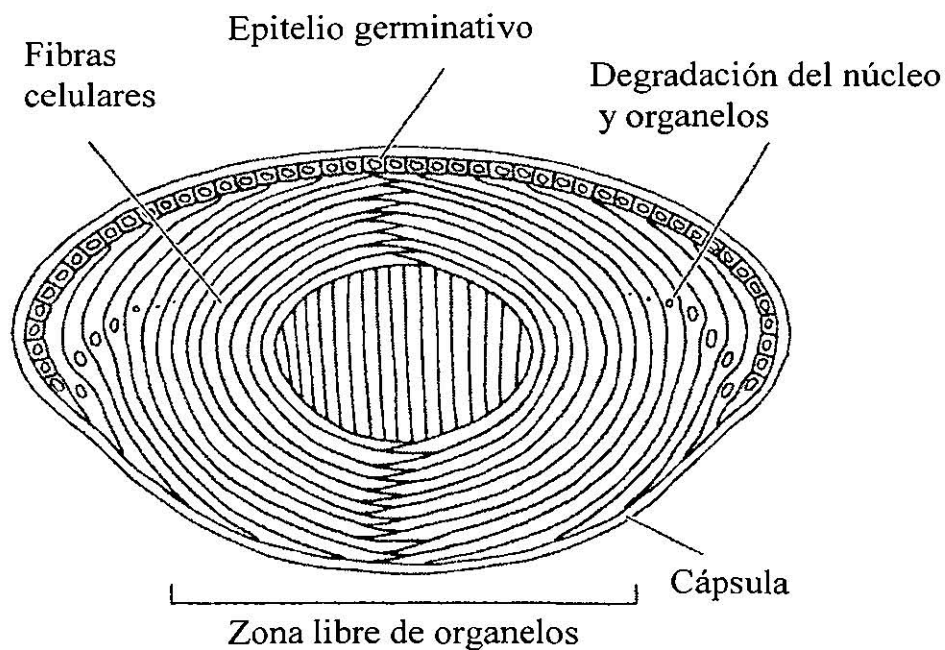


Figura 3. Estructura esquemática del cristalino.

El cristalino como modelo experimental

Mahon et al. (1987) fueron los primeros en utilizar el cristalino *in vivo* para probar la tumorigenicidad del oncogene antígeno T del virus SV40. Para esto construyeron un gen híbrido compuesto por el promotor de la alpha-cristalina fusionado a la secuencia codificante del antígeno T del SV40 y observaron que se desarrollaban tumores en el cristalino de estos ratones transgénicos.

Por otro lado, Morgenbesser et al. (1994) examinaron los efectos de la deficiencia del gen supresor de tumores de retinoblastoma (Rb) en el desarrollo del cristalino. Para esto 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. demostrando que la pérdida de función de Rb esta asociada con la proliferación no controlada, expresión desfasada de marcadores de diferenciación y una apoptosis inadecuada en las fibras celulares del cristalino. Mostraron que la apoptosis ectopica en el cristalino deficiente de Rb es dependiente de p53, por que los embriones carentes Rb/p53 presentaron una supresión completa de este efecto.

Además, Nakamura et al. (1995) desarrolló ratones transgénicos que expresaban específicamente en el cristalino el gen p53 humano bajo la regulación del promotor del gen de la α -cristalina. Estos ratones mostraron apoptosis en el cristalino y microftalmia.

Otros investigadores, como son McCaffrey et al. (1999) expresaron la oncoproteína E7 dirigida al cristalino y encontraron que al formarse el complejo E7/pRb se interrumpía la diferenciación e inducía la proliferación celular, y apoptosis.

Jaramillo et al (2001) observaron que los ratones con el transgen p53 humano homocigotos presentaron microftalmia y los ratones hemicigotos no

presentaron diferencias con los ratones silvestres. Al aplicar su modelo de estudio de interacción entre p53 y MDM2, los ratones carentes de MDM2 (línea control) presentaron características fenotípicas, histológicas y ultra estructurales semejantes a los ratones normales, por lo que concluyeron que MDM2 es un regulador negativo de p53 en células diferenciadas.

JUSTIFICACIÓN

E2F1 tiene propiedades paradójicas, ya que por un lado puede actuar como gen supresor de tumores (*in vitro* se ha demostrado que el producto del gen E2F-1 causa apoptosis dependiente de p53, además, la delección homocigota para E2F-1 *in vivo* induce el desarrollo de diferentes tumores) y por otro actuar como un oncogen (Yamasaki et al. 1996, Field et al. 1996, Pierce et al. 1999 y Chen et al. 2000).

Estas propiedades contrastantes pueden deberse en parte a la combinación de diferentes señales que existen en las células de los diferentes tejidos, es decir, que el efecto de la ausencia o sobre expresión de E2F1 dependerá del tipo celular involucrado.

No existen reportes *in vivo* sobre la importancia de E2F1 en la apoptosis inducida por p53. En el presente trabajo se utilizó un modelo de apoptosis en el cristalino de ratón, dependiente de p53, con el propósito de obtener evidencias *in vivo* de la participación de E2F1 en la vía de apoptosis de p53.

HIPÓTESIS

Ho: E2F-1 no es parte de la vía de apoptosis mediada por el transgen p53 en el cristalino de ratón.

Ha: E2F-1 es parte de la vía de apoptosis mediada por el transgen p53 en el cristalino de ratón.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que tiene la ausencia del gen E2F1 en la apoptosis mediada por un transgen p53 humano, en el cristalino de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener líneas de ratones que expresen el transgen p53 humano en un fondo genético carente de E2F1.
2. Analizar el tamaño de los ojos y de los cristalinos en los ratones transgénicos para p53 en la presencia y ausencia de E2F-1.
3. Analizar al microscopio de campo claro la ocurrencia de apoptosis.

METODOLOGÍA

Obtención de Líneas de Ratones.

Para cumplir con el objetivo específico 1, llevamos a cabo las cruzas necesarias de ratones “knock-out” (E2F1 +/-) desarrollados por Yamasaki et al. (1996) con los ratones transgénicos desarrollados por Nakamura et al. (1995) de modo que obtuvimos ratones que carecían de E2F-1 y que tenían el transgen p53 humano (Tabla 1).

Tabla 1. Líneas de ratones obtenidas.

	LINEA 1	LINEA 2	LINEA 3	LINEA 4
E2F-1	+/+	-/-	+/+	-/-
transgen p53	-/-	-/-	+/+	+/+

Estos ratones fueron mantenidos y apareados en cajas especiales, estuvieron en un bioterio donde las condiciones fueron controladas para su óptimo desarrollo: alimentación, temperatura, humedad e iluminación adecuadas.

Genotipificación

Para verificar el genotipo de los ratones, se extrajo DNA genómico de las colas de los ratones desarrollados, una vez que se cumplieron 5 semanas de nacidos, para posteriormente realizar ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los dos genes mencionados (E2F-1 y transgen p53).

Técnica de aislamiento de DNA genómico

Se aisló DNA genómico de los descendientes de las cruzas 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 ml de solución lisis y 10 ml 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 vortex Maxi Mix. Posteriormente, se centrifuga 2 minutos a 14000 rpm. Se elimina aproximadamente 450 ml 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 rpm. La fase acuosa (superior) se separa y se pone en otro tubo. Posteriormente, se precipita el DNA añadiendo 450 ml de isopropanol. Se centrifuga 3 minutos a 14000 rpm. 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 rpm y se elimina el etanol. Los restos de etanol que aun presente la muestra se deja evaporar por un período aproximado de 10 a 12 horas. Posteriormente, se resuspende el DNA en 200 ml de buffer TE (Tris 10mM;EDTA 1mM)

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) transgen p53 humano p3 5'-TCCAAATACTCCACACGCAA-3'
 GE5R 5'-TCCCAAATACTCCACACGC-3'

b) E2F-1 L31 5'-GCTGGAATGGTGTCTCAGCACAGCG-3'
 L26 5'-TCCAAGAATCATATCCAGTGGCT-3
 L28 5'-CTACCCGGTAGAATTGACCTGCA-3'

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

Esta mezcla se incubó en un Termociclador, siguiendo este programa

Tabla 2. Programa que se siguió para el PCR

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

NOTA: La amplificación que se obtuvo como resultado de la reacción de PCR fue interpretada mediante la electroforesis en el gel de agarosa al 0.8%.

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 a seguir fué 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 μ l de la muestra a interpretar con 2 μ 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/ μ l), del cual se utilizaron 3 μ 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 μ g/ μ 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.

Análisis del tamaño del ojo y del cristalino

EL objetivo 2 se llevó a cabo sacrificando al ratón a los dos meses de edad por dislocación cervical y se realizó la extracción del ojo, el cual se midió y posteriormente se disectó el cristalino para proceder a la medición directa, utilizando un Vernier marca Mitutoyo modelo Digimatic Caliper 700-113 (MyCAL Lite).

Análisis del cristalino por microscopia de campo claro.

Con el fin de cumplir con el objetivo particular 3 se siguió una técnica previamente establecida por Jaramillo et al. (2001) para obtener los cortes histológicos semifinos de los cristalinos estudiados, se llevó a cabo la siguiente metodología :

Se sacrificaron los ratones por dislocación cervical, utilizando un estuche de disección y se realizó la disección de los ojos completos del ratón tratando de evitar la presencia de piel y tejido adiposo peri-orbitario. Las piezas se colocaron por 30 minutos en Karnovsky, siendo esta una solución fijadora. Al pasar este tiempo, se hizo una abertura al ojo, en la parte posterior al nivel del nervio óptico con una navaja de rasurar y bajo el microscopio estereoscópico. Se continuó fijando por otros 30 minutos en Karnovsky, después de transcurrido este tiempo se extrajo el cristalino y se dejó fijando nuevamente por 30 minutos en esta misma solución, al terminar el exceso de solución fijadora se eliminó con tres lavados en un buffer de cacodilato de sodio al 0.1 M, y pH 7.4 con una duración 5 minutos cada uno.

Se post-fijo en tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% por 1.5 horas a temperatura ambiente. El exceso del fijador se eliminó con lavados como se describe en el párrafo anterior.

El contraste en bloque se realizó colocando las muestras en nitrato de uranilo al 1% por 30 minutos a temperatura ambiente. Al transcurrir dicho período, se realizaron los lavados en la forma descrita anteriormente.

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

Posteriormente, las muestras se trataron con una mezcla de etanol al 100% y resina Spurr suave (1:1), durante toda la noche a una temperatura de 4°C.

Continuando con el proceso, se sometieron las muestras a mezclas de resina y etanol absoluto, con 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 mezclas se dejaron incubando a temperatura ambiente. Las piezas se dejan en una mezcla de resina-etanol absoluto (3:1) incubándose toda la noche a 4°C.

Una vez que ha transcurrido el tiempo, se destaparon los frascos que contenían las muestras, bajo una campana de extracción por 4 o 5 horas, con el objetivo de que se evaporara el etanol. Finalmente, el Spurr suave residual era reemplazado por Spurr suave puro y se guardaban las piezas a 4°C durante una noche más.

Por ultimo se incluían las piezas en pequeños bloques. Para esto, con la ayuda de un aplicador de madera cortado en uno de sus extremos a manera de cuchara, se colocaba cada una de ellas en los moldes de plástico en donde previamente se había vaciado resina. Se dejaban reposar por 2 horas, y finalmente se colocaban 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.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE LAS LINEAS DE RATONES

Puesto que requeríamos de obtener ratones que expresaran el transgen p53 humano en el cristalino en un fondo genético carente de E2F1, se realizaron diferentes cruzas entre ratones carentes de E2F1 y ratones transgénicos para obtener los genotipos deseados.

Primeramente se obtuvieron los diferentes genotipos de E2F1. Se realizaron cruzas entre ratones heterocigotos E2F1 donde obtuvimos como descendencia, $\frac{1}{4}$ de ratones silvestres homocigotos (+/+); $\frac{2}{4}$ de ratones heterocigotos y $\frac{1}{4}$ de ratones carentes homocigotos. Esto concuerda con lo esperado de acuerdo a los principios Mendelianos. El genotipo se determinó por medio del PCR, donde la presencia del alelo mutante de E2F1 correspondió a un producto aproximado de 167 pb y el alelo silvestre a un producto de aproximadamente 392 pb, en la reacción de PCR (Figura 4).

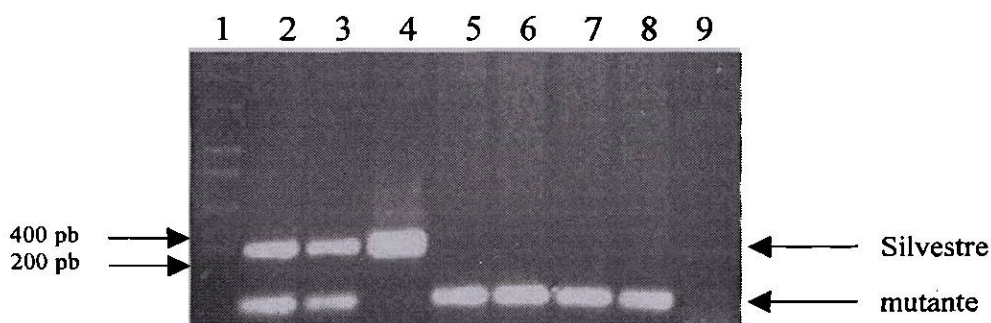


Figura 4. Determinación del genotipo de E2F1 mediante PCR. Se aisló DNA genómico de la cola de ratones y se amplificó utilizando los oligos correspondientes. Alelo silvestre (392 pb) y alelo mutante (167 pb). Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 y 3, E2F1 +/-; carril 4, E2F1 +/+; carriles 5- 8, E2F1 -/- y carril 9, control negativo. Productos de PCR analizados en gel de agarosa al 1%.

La descendencia de ratones homocigotos, tanto silvestres como carentes E2F1 se cruzaron con ratones transgénicos para p53 humano. A la progenie de estas cruza se les determinó la presencia del transgen p53 humano, el cual se amplifica como un producto de 500 pb en una reacción de PCR. En la Figura 5 se muestran varios ratones transgénicos que amplifican dicha banda. Los ratones obtenidos mostraron diferentes combinaciones de genotipos los cuales se cruzaron entre sí y se les determinó su genotipo. De esta manera se identificaron ratones, provenientes de las cruza, que tuviesen los genotipos deseados: (1) E2F1 $-/-$; (2) E2F1 $-/-$, Transgénico-p53 y (3) Transgénico p53 humano.

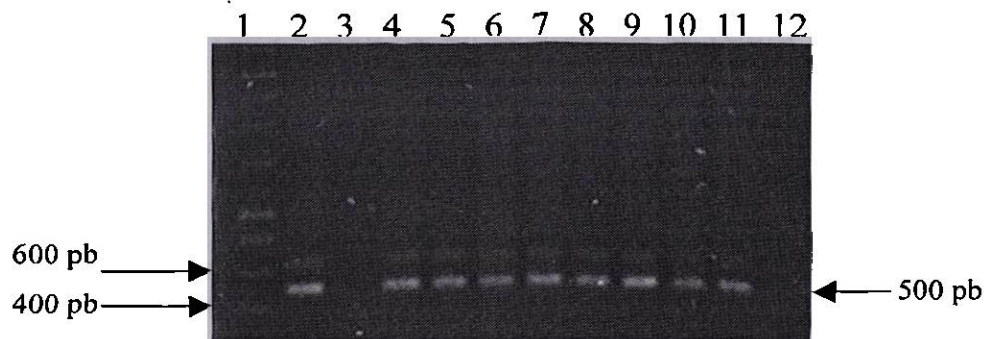


Figura 5. Determinación del genotipo del Transgen p53 mediante PCR. Se aisló DNA genómico de la cola de ratones y se amplificó utilizando los oligos correspondientes. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2,4-11, ratones transgénicos; carril 3, ratón sin transgen y carril 12, control negativo de la reacción de PCR. La reacción de PCR de los ratones transgénicos es un producto de 500 pb. Gel de agarosa al 0.8%.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL OJO *IN VIVO* DE LAS LÍNEAS DE ESTUDIO.

Puesto que la expresión del transgen p53 humano en el cristalino de ratón induce microftalmia como resultado de la apoptosis, primeramente analizamos este fenotipo en las diferentes líneas de ratones. Esperabamos que si E2F1 era parte de esta vía de apoptosis, los ratones transgénicos para p53 deberían de mostrar un fenotipo de microftalmia menos severo. Al observar *in vivo* los ojos de ratones carentes E2F1 (Figura 6b), que fue una de nuestras líneas control, sus características fenotípicas fueron semejantes a los ratones silvestres para E2F1 (Figura 6a). Por el contrario, los ratones transgénicos para el p53 humano (Figura 6c) mostraron sus rasgos típicos de microftalmia, y al eliminar E2F1 de este fondo genético (E2F1^{-/-}, transgénico p53), los ratones mostraron una microftalmia similar (Figura 6d). Es decir que aparentemente la ausencia de E2F1 no revertió, ni parcialmente, la apoptosis inducida por el transgen p53. Estos resultados se sintetizan en la Tabla 3.

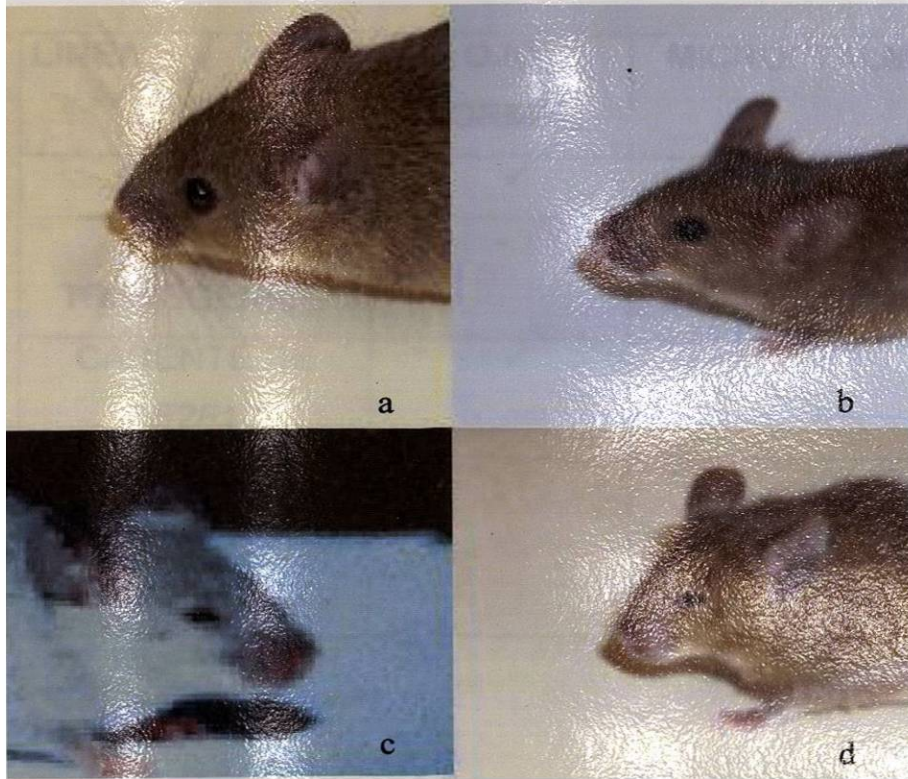


Figura 6. Análisis *in vivo* de los ojos. (a) ratón silvestre y (b) ratón carente de E2F1, en ambos ratones el ojo se observa de tamaño normal; (c) ratón transgénico homocigoto y (d) ratón carente de E2F1 y transgénico homocigoto. Nótese el tamaño del ojo, se observa microftalmia en las dos últimas líneas.

Tabla 3. Comparación del fenotipo de los ojos de las líneas de ratones analizadas in vivo.

LINEA	OJO NORMAL	MICROFTALMIA
NORMAL	✓	-
P53 TRANSGENICO	-	✓
CARENTE DE <i>E2F1</i>	✓	-
CARENTE DE <i>E2F1</i> / TRANSGENICO	-	✓

ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL ÓRGANO VISUAL

Para comprobar con precisión que efectivamente no había una diferencia en el tamaño de los ojos, los disectamos y medimos con un vernier. Se tomó como referencia el tamaño de los ojos de los ratones silvestres y el tamaño de los ojos del resto de las líneas se representó como un porcentaje relativo al tamaño normal (100%). Estos ratones silvestres poseían un órgano visual con un tamaño promedio de 3 milímetros (100%). El ratón carente de E2F1 no mostró ninguna variación significativa, ya que su tamaño fue similar. Por el contrario el ratón transgénico expresando p53 humano en el cristalino, como era de esperarse, mostró un tamaño de ojo menor equivalente al 83.33% con respecto al control, mientras que los ojos del ratón transgénico p53 en un fondo carente de E2F1

(E2F1-/-,transgénico p53) mostró un tamaño promedio del 66.66% con respecto al control (Figura 7).

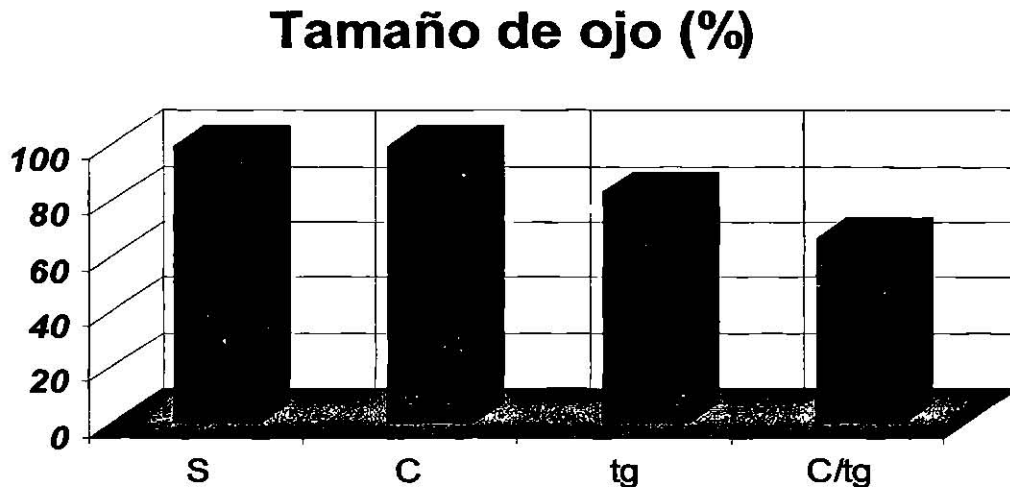


Figura 7. Efecto de la ausencia de E2F1 en el tamaño de los ojos. Los ojos se disectaron y se midieron con un vernier. Se analizaron los ojos de ratones normales (S) (3.0 mm = 100%); carentes para E2F-1 (C); los ratones transgénicos para p53 humano (Tg), y ratones transgénicos para p53 humano pero carentes de E2F-1 (C/Tg). Los resultados es una media de 7 individuos por cada genotipo analizado. Se grafica el porcentaje relativo en tamaño de los ojos con relación al control (S=100%).

ANALISIS MACROSCOPICO DEL CRISTALINO

Puesto que p53 induce apoptosis en las células del cristalino es de esperarse que éste se reduzca en tamaño y/o cambie su morfología. Por tal razón, de igual manera como se midió el tamaño de los ojos, también se realizó el mismo análisis en el cristalino de los mismos. El cristalino de los ratones normales mostraron un tamaño promedio de 2.4 milímetros, cuya medida se tomó como el 100% y se utilizó como base para el cálculo de porcentajes de tamaño de cristalino de las demás líneas con relación al control. El tamaño del cristalino de los ratones carentes E2F1 no mostraron un cambio significativo en tamaño con respecto al control; sin embargo, al analizar a los ratones transgénicos se notó un

cambio considerable, como era de esperarse por la acción de la apoptosis, ya que sus cristalinos mostraron en promedio un tamaño del 54.16% con respecto al de los controles. Por el contrario, sorprendentemente en contra de lo esperado, los ratones Transgénicos carentes de E2F1 mostraron un tamaño de cristalino únicamente del 25% con relación al control (Figura 8).

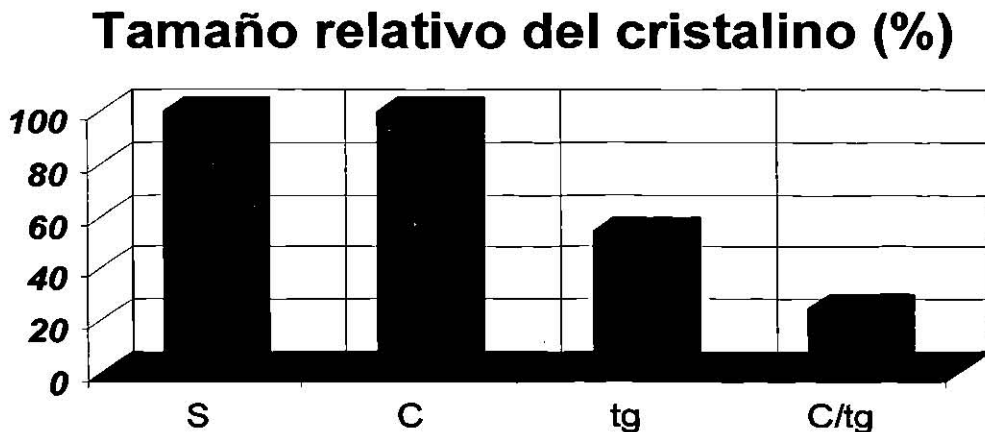


Figura 8. Efecto de la ausencia de E2F1 en el tamaño de los cristalinos. Los cristalinos se disectaron y se midieron con un vernier. Se analizaron los cristalinos de ratones normales (S) 2.4 mm = 100%; carentes para E2F-1 (C); ratones transgénicos para p53 humano (Tg), y ratones transgénicos para p53 humano carentes de E2F-1 (C/tg). Se grafica el porcentaje relativo en tamaño de los cristalinos con relación al control (S=100%).

MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

Puesto que en este modelo el transgen p53 humano induce apoptosis en las células del cristalino analizamos el efecto sobre la integridad celular y del cristalino en su totalidad bajo microscopía de campo claro. Al analizar los cristalinos de los ratones silvestres en el ámbito de microscopía de luz se logró observar sus estructuras características: la cápsula, la zona de células epiteliales hacia la periferia y más hacia adentro las fibras celulares (Figura 9A). De igual manera, los cristalinos de ratones carentes de E2F1 (-/-) mostraron un patrón

similar (Figura 9B). Los ratones Transgénicos (que expresan el p53 humano) mostraron cambios estructurales en el cristalino como son: desorden celular, falta de la cápsula de fibras de colágena, pérdida de la diferenciación de las células en forma de fibras y acúmulo de células epiteliales con núcleos apoptóticos muy condensados (Figura 9C). Al analizar los cristalinos de los ratones transgénicos para p53 en un fondo carente de E2F1 (Figura 9D) se observó el mismo patrón característico de la apoptosis de los ratones Transgenicos con E2F1 silvestre (Figura 9C).

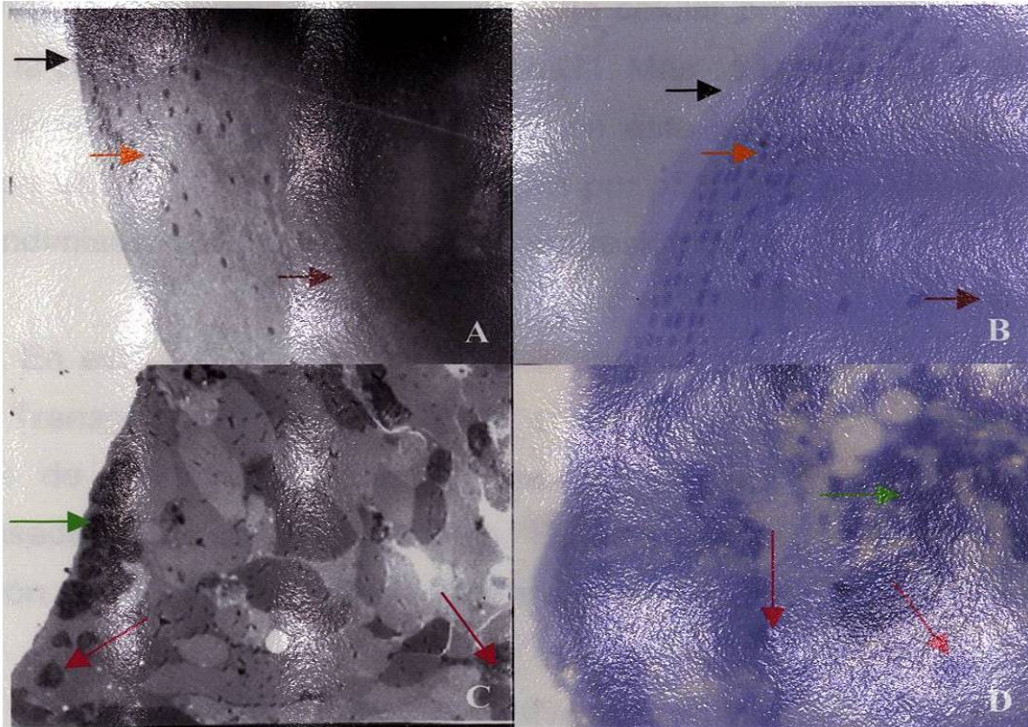


Figura 8. Análisis histológico del cristalino de ratón. Se disectaron los cristalinos y se procesaron para su análisis en microscopía de luz. (A) Ratón normal y (B) ratón carente para E2F-1: se observa la cápsula externa, compuesta de fibras de colágena (→), a continuación se observa una capa de células epiteliales (→) y más hacia adentro las fibras celulares (→) (320X). (C) Ratón Transgénico (320X) y (D) Ratón Transgénico carente de E2F-1 (400X): no se observa en ambos la cápsula externa, las células epiteliales forman acúmulos (→) y presentan núcleos apoptóticos (→).

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 tipos de cáncer humano presentan mutaciones en este gen. Por tal 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 observamos las características de la apoptosis inducida por el Transgén p53 humano en el cristalino, como son el desorden celular, pérdida de la diferenciación de las células en forma de fibra, núcleos condensados y cuerpos apoptóticos. Es interesante como el incremento en la expresión de p53 humano altera la diferenciación celular.

En el presente trabajo se obtuvieron ratones positivos para el transgen p53 humano tanto en un fondo genético silvestre como en uno carente de E2F1. Los ratones homocigotos para el Transgén desarrollan microftalmia (Jaramillo et al., 2001). Esto se debe a que el regulador negativo de p53, la proteína codificada por el gen MDM2, no es suficiente para regular el gen p53 endógeno y el producto del transgén p53 homocigoto; solo cuando este último se encuentra en estado hemicigoto el individuo presenta un fenotipo normal o cataratas.

Empleando el cristalino como modelo en la inducción de apoptosis mediada por la expresión del transgen p53 humano demostramos que E2F1 interviene en la apoptosis mediada por p53, de tal manera que al estar ausente E2F1 esta es más severa. Estos resultados sugieren que existe una ruta de regulación negativa a nivel del cristalino por parte de E2F1 hacia p53, es decir que la presencia de E2F1 disminuye el efecto apoptótico de p53.

En estudios realizados anteriormente se ha determinado que E2F1 es un gen que induce apoptosis (Yamasaki et al. 1996, Field et al. 1996) dependiente de p53 (Kowalik et al. 1995, Sherr 1998). Por esto resulta notorio que la apoptosis inducida por la expresión del transgen p53 en el cristalino, éste sea más afectado en los ratones con un fondo genético carente de E2F1 (E2F1 $-/-$). Al menos en este modelo, la presencia E2F1 desempeña un papel negativo en la inducción de apoptosis dependiente de p53.

El producto del gen E2F1, como se menciona en el parrafo anterior, dependiendo del tipo celular, puede causar *apoptosis* (cuando es sobre expresado o cuando su regulador negativo no es funcional) (Chen et al 1999 y , Tsai et al. 1998) o inducir *proliferacion celular* (Pierce et al. 1999). En nuestro caso particular nuestros resultados nos indican que al sobre expresar p53 en el cristalino en la presencia de E2F1 la apoptosis se ve disminuida por lo que sus cristalinicos son de mayor tamaño que en la ausencia de E2F1. Es decir que en el cristalino el comportamiento de E2F1 es el de contrarrestar la acción de p53 mas que de colaborar con él para la inducción de apoptosis. Esto puede deberse a la presencia o niveles de expresión de ciertos factores especificos en el cristalino que modulen la apoptosis de p53, como por ejemplo ARF y mdm2.

Sin duda, el presente trabajo es una nueva aportación en la función que E2F1 pudiese tener en modular la apoptosis mediada por p53. Este resultado abre una nueva interrogante en las terapias génicas dependientes de p53 ¿podría la ausencia de E2F1 hacer más efectiva la terapia génica mediada por p53 en ciertos tipos celulares?.

CONCLUSIÓN

La ausencia del gen E2F1 incrementó el efecto apoptótico de p53 en el modelo *in vivo* de apoptosis en el cristalino dependiente de p53 humano.

Se rechaza la hipótesis nula.

Ho: E2F-1 no es parte de la vía de apoptosis mediada por el transgen p53 en el cristalino de ratón.

LITERATURA CITADA

1. **Anderson, R.E.** Biochemistry of the Eye.. American Academy of Ophthalmology. Manuals Program. EUA. 1983.
2. **Bassnet, S.; Mataic, D.** Chromatin degradation in differentiating fiber cells of the eye lens. *J Cell Biol* 137: 37-40, 1997.
3. **Chen, Q.; Hung, F.C.; Fromm, L.; Overbeek, P.A.** Induction of cell cycle entry and cell death in postmitotic lens fiber cells by overexpression of E2F1 or E2F2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;41(13):4223-31. 2000.
4. **Cotran, R. S.; Kumar, V.; Robbins, S. T.** **Robbins: Patología estructural y funcional.** 5a. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996.
5. **De la Rosa E. J.; Díaz, B.; Sánchez, N.:** Muerte celular programada: Un proceso clave en fisiología y patología. *Ciencia al Día Internacional* 3 (3). 1-13, 2000
6. **Donehower, L. A.; Harvey, M.; Slagle, B. L.; McArthur, M. J.; Montgomery, C. A., Jr.; Butel, J.S.; Bradley, A. :** Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356. 215-221, 1992.
7. **Field, S. J.; Tsai, F.-Y.; Kuo, F.; Zubiaga, A. M.; Kaelin, W. G., Jr.; Livingston, D. M.; Orkin, S. H.; Greenberg, M. E.** E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85: 549-561, 1996.
8. **Futreal, P.A.; Kasprzyk, A.; Birney, E.; Mullikin, J.C.; Wooster, R.; Stratton, M.R.** Cancer and genomics. *Nature* 409: 850-852, 2001.

9. **Helin, K.; Lees, J. A.; Vidal, M.; Dyson, A.; Harlow, E.; Fattaey, A.** A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell* 70: 337-350, 1992.
10. **Irwin, M.; Marin, M. C.; Phillips, A. C.; Seelan, R. S.; Smith, D. I.; Liu, W.; Flores, E. R.; Tsai, K. Y.; Jacks, T.; Vousden, K. H.; Kaelin, W. G., Jr.** : Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 407: 645-648, 2000.
11. **Jaramillo-Rangel, G.; Chávez-Reyes, A.; Saucedo-Cárdenas, O.; Sepúlveda-Saavedra, J.**: La ausencia del oncogen MDM2 potencia el efecto apoptotico del transgen p53. *Memorias XIX Congreso Nacional de Investigacion Biomedica* , Monterrey, N.L. México.
12. **Leone, G.; Sears, R.; Huang, E.; Rempel, R.; Nuckolls, F.; Park, C.-H.; Giangrande, P.; Wu, L.; Saavedra, H. I.; Field, S. J.; Thompson, M. A.; Yang, H.; Fujiwara, Y.; Greenberg, M. E.; Orkin, S.; Smith, C.; Nevins, J. R.** Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. *Molec. Cell* 8: 105-113, 2001.
13. **Lewin, B.** *Genes V.* Oxford University Press. 1994.
14. **Lissy, N. A.; Davis, P. K.; Irwin, M.; Kaelin, W. G.; Dowdy, S. F.**: A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature* 407: 642-645, 2000.
15. **Mahon KA, Chepelinsky AB, Khillan JS, Overbeek PA, Piatigorsky J, Westphal H.** Oncogenesis of the lens in transgenic mice. *Science* 235: 1622-1628, 1987.

16. **McCaffrey, J.; Yamasaki, L.; Dyson, N. J. ; Harlow, E. ; Griep, A. E. :** Disruption of Retinoblastoma protein family function by Human Papillomavirus typo 16 E7 oncoprotein inhibits lens development in part through E2F1. *Molec. Cell Biol.*, 19: 6458-6468, 1999.
17. **Morgenbesser, S.D.; Williams, B.O.; Jaks, T.; DePinho, R.A.** p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* 371: 72-74 1994.
18. **Nakamura, T.; Pichel, J. G.; Williams-Simons, L.; Westphal, H.:** An apoptotic defect in lens differentiation caused by human p53 is rescued by a mutant allele. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 6142-6146, 1995.
19. **Neuman, E.; Sellers, W. R.; McNeil, J. A.; Lawrence, J. B.; Kaelin. W. G., Jr.:** Structure and partial genomic sequence of the human E2F-1 gene. *Gene* 173: 163-169, 1996.
20. **Nevins, J. R.:** E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258: 424-429, 1992.
21. **Nevins, J. R.:** The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum. Molec. Genet.* 10: 699-703, 2001.
22. **Pan, H.; Yin, C.; Dyson, N. J.; Harlow, E.; Yamasaki, L.; Van Dyke, T.:** Key roles for E2F1 in signaling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors. *Molec. Cell* 2:283-292, 1998.
23. **Pierce, A. M.; Schneider-Broussard, R.; Gimenez-ContiK, I. B.; Russel, J. L.; Conti, C. J.; Johnson, D. G.:** E2F-1 has both oncogenic and tumor-suppressive propierties in a transgenic model. *Molec. Cell. Biol.* 19: 6408-6414, 1999.

24. **Saenz Robles, M. T.; Symonds, H.; Chen, J.; Van Dyke, T.** : Induction versus progression of brain tumor development: differential functions for the pRB- and p53-targeting domains of simian virus 40 T antigen. *Molec. Cell. Biol.* 14: 2686-2698, 1994.
25. **Saunders, J.W.** Death in Embryonic System. *Science* 154: 604-612. 1966.
26. **Saunders, J.W., Jr.** Development Biology. Macmillan. New York. 1982.
27. **Sherr, C. J.:** Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.* 12: 2984-2991, 1998. Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 264: 1445-1449
28. **Steller, H.** Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 264: 1445-1449, 1995.
29. **Tsai, K. Y.; Hu, Y.; Macleod, K. F.; Crowley, D.; Yamasaki, L.; Jacks, T.:** Mutation of E2F-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Molec. Cell.* 2: 293-304, 1998.
30. **Thut, C.J.; Goodrich J.A.; Tjian R.:** Repression of p53-mediated transcription by Mdm-2: a dual mechanism. *Genes Dev.* 11:1974-1986, 1997.
31. **Yamasaki, L.; Jacks, T.; Bronson, R.; Goillot, E.; Harlow, E.; Dyson, N. J.:** Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* 85: 537-548, 1996.
32. **Zhang, Y.; Chellappan, S. P.:** Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F. *Oncogene* 10: 2085-2093, 1995.

