

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Laboratorio de Genética Molecular Humana



**Generación y análisis fenotípico
de ratones dKO p21^{-/-}p53^{-/-} en
fondo C57BL/6J. La importancia
de p21^{Cip1} en el desarrollo de
linfomas T**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Ernesto de la Cueva Bueno

Para optar al grado de Doctor en Ciencias

Madrid, 2008

D. José Fernández Piqueras, Catedrático de Genética de la Universidad Autónoma de Madrid y D. Juan Martín Caballero, Doctor en veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Don Ernesto de la Cueva Bueno ha realizado el trabajo de tesis doctoral que lleva por título “**Generación y análisis fenotípico de ratones dKO p21^{-/-}p53^{-/-} en fondo C57BL/6J. La importancia de p21^{Cip1} en el desarrollo de linfomas T**” bajo nuestra dirección y supervisión.

Que, una vez revisado el trabajo, consideramos que éste tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos firmamos la presente en Madrid a 10 de Enero de 2008.

José Fernández Piqueras

Catedrático de Genética

Dpto. Biología, UAM

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM-CSCI

Juan Martín Caballero

Doctor en Veterinaria

Parque de Investigación Biomédica de Barcelona

PRBB, Barcelona

Agradecimientos

Ser un estudiante tiene muchas cosas malas. Ser un estdiante tiene también algunas cosas buenas; la mejor para mí es la posibilidad de aprender. Gracias a todos los que durante estos años han compartido su saber conmigo.

El presente trabajo se inició justo después –literalmente: esa misma tarde– de la defensa de tesis por parte de Michel. Son muchas las ocasiones en que Michel me ha ayudado desde que nos conocimos allá por mil novecientos noventa y poco. Supongo que debo agradecerle también el reunir a las personas adecuadas en la misma habitación la tarde de la defensa de su tesis. Me gustaría agradecer el gesto de Manuel Serrano que cedió amablemente los modelos animales para el inicio del trabajo.

José Fernández Piqueras ha dado sentido al concepto de profesor y maestro. Juan Martín Caballero es un ejemplo de vocación y entrega. Gracias a los dos.

Como quiera que esta tesis no tiene un apartado de damnificados, me veo obligado a mencionar aquí a tres personas cuyo pH intelectual tiende a cero y que han padecido este trabajo de la mejor manera posible: con una sonrisa. Violeta, Teresa, Pilar... ¡¡¡os habeis ganado el cielo criaturas!!!.

No creo que deba extenderme mucho más, pero son muchas las personas que de una forma u otra me han ayudado en esta singladura. Todo aquel que crea que su nombre debería estar en esta página probablemente está en lo cierto y desde aquí le invito a que simplemente lo añada.

Por aquello de que los últimos serán los primeros, no puedo –¡ni quiero!– cerrar esta sección de agradecimientos sin hacer el gesto de sacar simbólicamente al ratón de laboratorio del apartado de materiales y métodos y reconocer aquí su contribución a esta tesis, y al avance de las ciencias biomédicas en general.

Dedicado a todo aquel que reconoce algún valor
en la persecución de un sueño

Madrid, 8 de Enero de 2008

Resumen

La proteína $p21^{Cip1}$ interviene en aspectos diversos de la biología celular, tanto en condiciones fisiológicas normales como alteradas. No obstante, la importancia de su participación en algunos de estos procesos, no ha sido aún suficientemente clarificada. En el presente trabajo se ha intentado profundizar en el efecto que la falta simultánea de $p21^{Cip1}$ y $p53$ –su principal activador transcripcional– tiene sobre la viabilidad y el espectro tumoral en modelos murinos. El primer objetivo fue la obtención de mutantes nulos para *Cdkn1a* ($p21^{Cip1}$) y *Trp53* así como del doble mutante en un fondo genético C57BL/6J. El análisis fenotípico demostró que la viabilidad del mutante doble estaba sensiblemente reducida en comparación con la de los mutantes sencillos, lo que sugiere la participación de ambos genes en procesos independientes o parcialmente solapados durante el desarrollo embrionario del ratón. Por otro lado, el mutante doble desarrolla tumores de forma espontánea con un período medio de latencia de 8.6 meses, que se sitúa entre los 5.9 y los 18.2 observados en los mutantes sencillos $p53^{KO}$ y $p21^{KO}$, respectivamente. Por otro lado, mientras que los sarcomas fueron los tumores observados con mayor frecuencia en el doble mutante (varios tipos) y en el mutante sencillo para $p21^{Cip1}$ (sarcoma histiocítico), el mutante sencillo para *Trp53* desarrolla fundamentalmente linfomas T. Con objeto de estudiar con mayor detalle el papel de $p21^{Cip1}$ en el desarrollo de linfomas tímicos, los distintos modelos fueron sometidos a un protocolo de inducción de estos tumores mediante irradiación γ . En esta nueva situación, los ratones nulos para *Trp53* fueron extremadamente sensibles a este tratamiento, pero, sorprendentemente, la falta simultánea de $p53$ y $p21^{Cip1}$ reduce significativamente dicha sensibilidad. Los linfomas tímicos –tanto inducidos como espontáneos– obtenidos de ratones nulos para $p53$ expresaban $p21^{Cip1}$. Los linfomas nulos para $p21^{Cip1}$ presentaban unas tasas de apoptosis más altas que los desarrollados en ratones que mantienen la integridad del gen. Estos resultados sugieren que $p21^{Cip1}$ debe proporcionar algún tipo de ventaja proliferativa a las células T del timo en un estadio neoplásico o preneoplásico, y que este gen juega un papel oncogénico en el desarrollo de los linfomas tímicos con independencia de *Trp53*.

Summary

$p21^{Cip1}$ is a protein with a relevant role in multiple cell biology processes in both normal physiological and altered situations. However, its role in some of these processes is not well understood yet. This work attempts to clarify the role that deficiency in both $p21^{Cip1}$ and $p53$ –its main transcriptional activator– has on mouse viability and tumor spectrum. In order to achieve this, single nullizygous mutant mice for $p21^{Cip1}$ and $Trp53$, as well as the double mutant on a C57BL/6J genetic background have been obtained. The viability of double mutant mice was impaired and severely reduced compared with single mutants. This indicates that the two genes should be participating in independent (or only partially overlapped) pathways during mouse embryonic development. Double mutant mice developed spontaneous tumors with an average latency period of 8.6 months which is intermediate between $Trp53$ -deficient (5.9 months) and $p21^{Cip1}$ -deficient mice (18.2 months). While sarcoma was the most frequent tumor in double mutants (several types of sarcoma) and $p21^{Cip1}$ -deficient mice (hystiocitic sarcoma), $Trp53$ -deficient mice developed mainly T-cell lymphomas. In order to better understand the role of $p21^{Cip1}$ in thymic lymphoma development, mice were subjected to a γ -radiation tumor-induction protocol. As expected, $Trp53$ -deficient mice were extremely sensitive to γ -radiation treatment. Surprisingly, simultaneous lack of $p21^{Cip1}$ and $Trp53$ significantly reduced γ -radiation sensitivity. Another interesting finding was that both spontaneous and induced thymic lymphomas expressed $p21^{Cip1}$ protein. $p21^{Cip1}$ -deficient lymphomas showed a higher apoptotic rate than the ones with wild type $p21^{Cip1}$. These results suggest that $p21^{Cip1}$ gives thymic T cells some sort of proliferative advantage at a pre-neoplastic or early neoplastic stage. $p21^{Cip1}$ gene plays an oncogenic role in the development of thymic lymphomas, a role which is independent of $Trp53$ status.

Índice

Prólogo	1
----------------	----------

Abreviaturas más utilizadas	3
------------------------------------	----------

1. Introducción

1.1. El cáncer	5
El ciclo de división celular	5
El cáncer	8
Tipos de cáncer	9
Neoplasias del sistema hematopoyético	10
Neoplasias del sistema hematopoyético en el ratón	11
El timo. Linfomas tímicos	13
1.2. Modelos animales para el estudio del cáncer	16
Modelos animales	16
Importancia del fondo genético en modelos de ratón	18
Modelos de ratón mutantes para <i>Trp53</i>	20
Modelos de ratón mutantes para <i>p21^{Cip1}</i>	22
Modelos de ratón para el estudio de linfomas tímicos	22
1.3. p53 y p21^{Cip1}: su vía de supresión tumoral	25
El supresor de tumores <i>Trp53</i>	25
Funciones de p53	25
La proteína p21 ^{Cip1}	30
Funciones de p21 ^{Cip1}	31

Regulación de la expresión de $p21^{Cip1}$	36
Interacción con otras vías de supresión tumoral	39

2. Objetivos

2.1. Antecedentes e hipótesis	43
2.2. Objetivos	44

3. Materiales y métodos

3.1. Modelos animales	47
3.1.1. Ratones nulos para $p21^{Cip1}$	47
3.1.2. Ratones nulos para $Trp53$	47
3.1.3. Ratones nulos para $p21^{Cip1}$ y $Trp53$	47
3.2. Análisis genético	48
3.2.1. Extracción de ADN	48
3.2.2. Determinación genotípica del alelo $p21^{Cip1}$	49
3.2.3. Determinación genotípica del alelo $Trp53$	50
3.2.4. Condiciones de la reacción de amplificación	50
3.2.5. Análisis electroforético	51
3.3. Estudios <i>in vivo</i>	51
3.3.1. Manejo y control de los ratones	51
3.3.2. Determinación del punto final y toma de muestras	52
3.3.3. Caracterización fenotípica	53

3.4. Estudio histopatológico	54
3.4.1. Caracterización histopatológica e iconografía	54
3.4.2. Técnicas inmunohistoquímicas	54
3.4.3. Anticuerpos utilizados	56
3.5. Estudios <i>in vitro</i> (MEFs)	57
3.5.1. Fibroblastos embrionarios murinos (MEFs)	57
3.5.2. Tratamientos con radiación γ	58
3.5.3. Medida de la proliferación celular <i>in vitro</i>	58
3.5.4. Proliferación celular sin adhesión a sustrato	58
3.5.5. Ensayo de formación de colonias	59
3.5.6. Formación de tumores en trasplantes <i>in vivo</i>	60
3.5.7. Inestabilidad cromosómica en MEFs	60
3.6. Análisis de proteínas	61
3.6.1. Extracción de proteínas	61
3.6.2. Cuantificación de proteínas	62
3.6.3. Western blot	62
3.7. Evaluación de los niveles de apoptosis	63
3.7.1. Cuantificación de Caspasa 3	63
3.7.2. PARP proteolizada	63
3.8. Respuesta aguda a radiación γ en timocitos	64
3.9. Tratamientos con radiación γ en ratones	64
3.10. Análisis estadístico	65

4. Resultados

4.1. Caracterización fenotípica y fondos genéticos	68
4.1.1. Viabilidad de los mutantes estudiados	68
4.1.2. Diferencias en mortalidad embrionaria	69
4.1.3. Causas de mortalidad embrionaria	71
4.2. Supervivencia y causas de mortalidad post-natal	73
4.2.1. Causas de mortalidad en ratones mutantes para $p21^{Cip1}$	73
4.2.2. Causas de mortalidad en ratones mutantes para $Trp53$	75
4.2.3. Causas de mortalidad en ratones dobles mutantes	76
4.2.4. Curvas de supervivencia y períodos de latencia tumoral	76
4.3. Espectro tumoral e histopatología	81
4.3.1. Espectro tumoral de los distintos mutantes	81
4.3.2. Incidencia de linfomas	87
4.3.3. Incidencia de sarcomas	89
4.3.4. Características patológicas de los tumores	89
4.4. $p21^{Cip1}$ y respuesta a radiación γ	91
4.4.1. Inducción de linfomas tímicos por radiación γ	91
4.4.2. Respuesta aguda a radiación γ	93
4.5. Expresión de $p21^{Cip1}$, apoptosis y linfomas tímicos	94
4.5.1. Expresión de $p21^{Cip1}$ en linfomas de ratones C57BL/6J	94
4.5.2. Expresión de $p21^{Cip1}$ en tumores nulos para $Trp53$	95
4.5.3. Niveles de apoptosis en linfomas tímicos	96
4.5.4. Índices de proliferación en linfomas tímicos	98

4.5.5. p21 ^{Cip1} y latencias en aparición de linfomas	98
4.6. Ensayos con fibroblastos embrionarios	100
4.6.1. Duplicaciones de población celular en cultivo	100
4.6.2. Formación de colonias y crecimiento en <i>soft-agar</i>	101
4.6.3. Desarrollo de tumores en ensayos alogénicos	102
4.6.4. Irradiación e inestabilidad cromosómica	103
4.6.5. Respuesta a irradiación en MEFs	106
5. Discusión	109
6. Conclusiones	129
7. Bibliografía	132
8. Publicaciones	142

Prólogo

Uno de los principios básicos de la biología celular establece que el funcionamiento de una célula, y por extensión el de un tejido u órgano, es reflejo de la actividad y composición de un conjunto de cadenas polipeptídicas. Según esto, la función de las células –y, en último término, la de los órganos– depende en gran medida de las proteínas que se encuentren presentes en su interior y en su entorno en un momento dado, y no sorprende que cuando se altera la función de aquéllas, se produzcan cambios en la composición y actividad de éstas, y viceversa. Un fenómeno paradigmático de lo anterior se encuentra en el mecanismo de aparición y progresión de un tumor. Toda célula cancerosa lleva consigo una alteración de su acervo proteico y, por lo tanto, de su función. La homeostasis proteica en la célula se encuentra controlada a un primer nivel por patrones de expresión génica finamente regulados para cada tipo celular que, a su vez, son modulados por rutas más o menos complejas de señalización molecular. Los productos de la expresión de estos genes son regulados, a un segundo nivel, por mecanismos de localización, activación, degradación, etc., que se superponen y entrecruzan dando lugar a una red de intercambio de información biológica dentro de la célula.

Dada su gran complejidad, la descripción de los procesos biológicos se suele hacer sin el conocimiento detallado de todos los elementos que los integran. Hasta el momento sólo se conocen datos, en su mayoría parciales, de la función de un 15-20% de los genes presentes en el genoma humano –unos 35.000–. Aún con datos relevantes sobre la utilidad de esta pequeña porción del genoma, la información relativa a su regulación es aún más limitada. Si se consideran las interacciones del genoma con su entorno celular, tisular e incluso medioambiental, el balance entre incógnitas planteadas y despejadas es ciertamente desolador. Así pues, es posible que no se esté considerando más allá de las dos terceras partes de la información necesaria para comprender muchos de los procesos biológicos y sus correspondientes patologías en toda su extensión.

Es posible que no estemos preparados aún para comprender nuestra propia complejidad.

El trabajo que se presenta a continuación es tan sólo un pequeño ejemplo de lo anteriormente expuesto, y pretende ser un intento, fallido quizás, de contribuir al avance en el conocimiento de la génesis y progresión tumoral.

En cualquier caso, y como dijo Marco Aurelio; «a nadie le acontece cosa alguna que no sea, por naturaleza, capaz de soportar». Claro, que él era un estoico...

Ernesto de la Cueva

Madrid, 2008

Abreviaturas más utilizadas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AECC	Asociación Española Contra el Cáncer
ARN	Ácido Ribonucleico
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia Related
CAK	CDK Activating Kinase
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CIP1	Cdk Inhibiting Protein 1
dKO	Doble KO
EGF	Epidermal Growth Factor
FADD	Fas-Activated Death Domain
IARC	International Agency for Research on Cancer
KO	Knock-Out
Mdm2	Mouse double minute 2
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MMHCC	Mouse Models for Human Cancer Consortium
NIH	National Institutes of Health
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP	Poly ADP-Ribose Polymerase
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
REAL	Revised European-American Lymphoma group
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SPF	Specific Pathogen Free
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRP53	Tumor Related Protein 53
UKCCC	UK Co-ordinating Committee on Cancer research
WAF1	Wild-type p53 Activated Fragment 1

1

Introducción

1.1. El cáncer

De manera general, el cáncer puede definirse como un conjunto de enfermedades caracterizadas por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, lo que da lugar a la pérdida de control de uno o varios de los elementos que regulan la proliferación celular. Estas alteraciones resultan en un crecimiento exacerbado de células anormales que acaba por manifestarse clínicamente, comprometiendo el funcionamiento del tejido u órgano en el que crece y, muy a menudo, la vida del individuo.

El término cáncer agrupa en torno a 150 enfermedades distintas. Aunque los diferentes tipos de cáncer muestran toda una serie de particularidades clínicas que requieren –y aconsejan– su estudio individualizado.

El ciclo de división celular

Se estima que el cuerpo humano está formado por alrededor de 200 tipos celulares distintos que son necesarios para realizar todas y cada una de las funciones del organismo. Obviamente, no todas las células realizan la misma función y es la suma de su especialización funcional más la correcta integración de su actividad y la respuesta a estímulos, lo que proporciona al organismo su viabilidad. La distinción entre constitución genética y expresión fenotípica tal y como la conocemos hoy día, no se conocía en absoluto hace un siglo y medio, cuando se introdujo el concepto de la *célula* como unidad metabólica y estructural básica. Se enunció entonces el aforismo *Omnis cellula e cellula*, el cual apunta a la continuidad de todos los organismos: toda célula deriva de otra célula (preexistente). Si bien los mecanismos del ciclo de división celular no eran conocidos entonces, sus cimientos quedaban ya establecidos.

Las enfermedades se empezaron a considerar –con independencia del agente causante– también como alteraciones en el funcionamiento de las células. Este concepto es especialmente atinado en el caso del cáncer, puesto que, en general,

puede considerarse causado por una acumulación de mutaciones en la célula que, tras un proceso de *evolución*, resulta en una división incontrolada.

La división celular es un proceso cíclico que consta de 4 fases (G₁, S, G₂ y M, ver figura 1.1.). Su duración es variable, si bien, una célula eucariota típica invertirá alrededor de 12 horas en completar la fase G₁, de 6 a 8 horas en sintetizar una nueva copia de su genoma (fase S), el paso a través de la fase G₂ se completará en un promedio de 3 a 6 horas, y, finalmente, en la citocinesis se invertirán entre 30 y 60 minutos [Murray, 1993]. Aunque inicialmente las fases G₁ y G₂ se consideraron meros intervalos de transición y preparación para la replicación del ADN y la mitosis respectivamente, hoy se sabe que es en estos períodos en los que tiene lugar la más exhaustiva y fina regulación del ciclo celular.

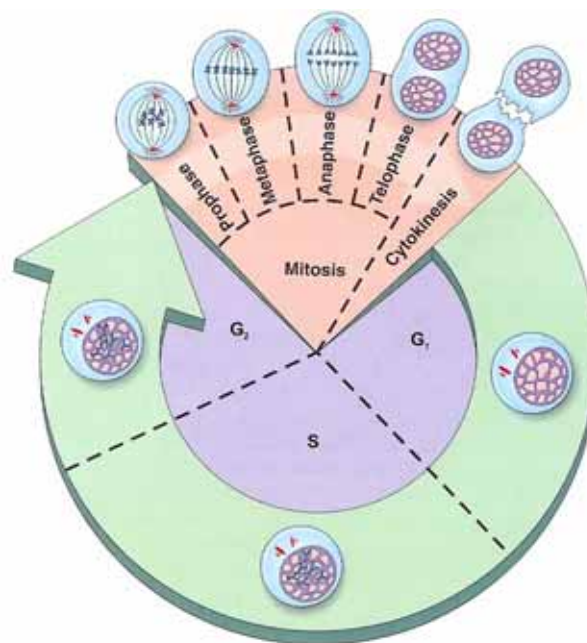


Figura 1.1. Esquema general de las fases del ciclo celular. El ciclo de división celular se divide en cuatro fases: G₁, S, G₂ y M.

Al inicio de la fase G₁, y en respuesta a factores de crecimiento, se induce la expresión de reguladores positivos de la proliferación celular y la fosforilación de la proteína pRb (retinoblastoma). Si dichos factores son retirados durante la primera mitad de esta fase, la célula saldrá del ciclo. No obstante, si se supera este primer punto de regulación, el ciclo evolucionará ya con independencia de factores externos. Este punto de control se conoce como punto de restricción (R) y coincide con la hiperfosforilación de la proteína pRb. En determinadas condiciones, las células pueden detener su progresión en la fase G₁ y permanecer durante un tiempo variable en estado de reposo o quiescencia (G₀). En el cáncer, se produce muy a menudo la pérdida de control sobre el punto de restricción, lo que provoca una proliferación independiente de estímulos. El período comprendido entre la fase S y la mitosis es la fase G₂. Durante esta fase, la célula se prepara para la escisión en dos células. Existe aquí un segundo punto de control (G₂/M), en el que la célula comprueba dos condiciones antes de dividirse: que se ha generado la masa necesaria y que se ha completado –y sólo se ha hecho una vez– la replicación del ADN.

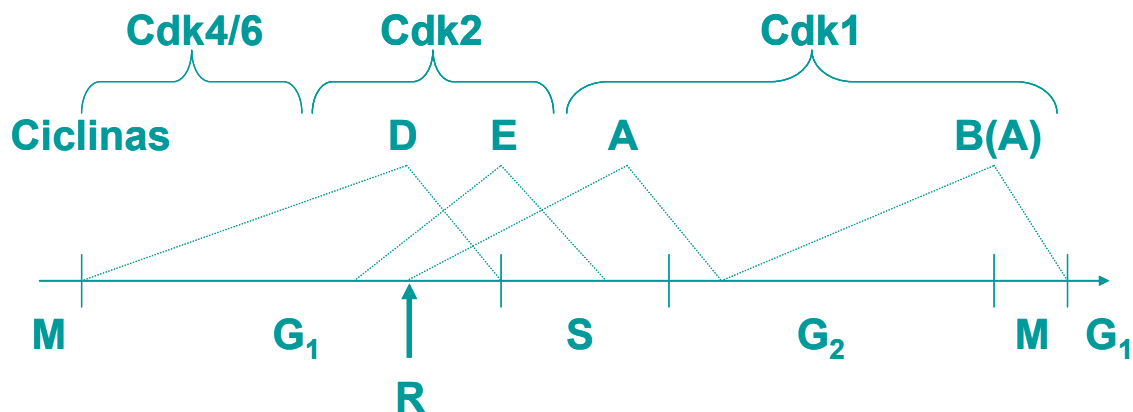


Figura 1.2. Los complejos ciclina-quinasa dependiente de ciclina dirigen la progresión del ciclo celular, estableciendo (mediante cambios en la composición de dichos complejos) los pasos de una a otra fase del ciclo.

Los principales elementos de control del ciclo celular están constituidos por una proteína reguladora, denominada ciclina, y una proteína-quinasa denominada quinasa dependiente de ciclina o CDK (*Cyclin-dependent kinase*; ver figura 1.2.). En los mamíferos existen diferentes ciclinas y quinasas que controlan los pasos clave del ciclo celular [Murray et al., 1993; Iliakis et al., 1997]. Los puntos de control anteriormente esbozados son mecanismos moleculares que establecen relaciones de dependencia entre procesos no ligados bioquímicamente. Si la célula no es capaz de superar adecuadamente estos puntos, inicia el proceso de muerte celular programada –apoptosis–, o entra en un estado de senescencia [Kastan et al., 1997].

El cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, en los que, como promedio, una de cada cuatro personas fallece debido a esta enfermedad. En España, el cáncer causa la muerte a más de 90.000 personas anualmente, y alrededor del 31% de los hombres y del 20% de las mujeres que fallecen lo hacen como consecuencia de un tumor. Además, se diagnostican más de 160.000 casos nuevos cada año (*datos de 2005, AECC web oficial*). El 70% de la mortalidad por cáncer es debida tan sólo a 10 localizaciones tumorales: pulmón, mama, colon/recto, estómago, próstata, vejiga, hígado, páncreas, sistema hematopoyético y sistema linfático. En las personas menores de 20 años, la leucemia es el tipo de cáncer más frecuente y, a pesar de los avances diagnósticos y terapéuticos de los últimos años, el que más muertes causa, seguido del cáncer de encéfalo y del linfoma (*datos AECC web oficial*).

El cáncer tiene su origen en la acumulación secuencial de alteraciones genéticas y epigenéticas en una célula susceptible. Algunas de estas alteraciones son responsables del desarrollo y mantenimiento del fenotipo canceroso. Otras, simplemente ocurren y pueden considerarse epifenoménicas. Se ha llegado a proponer que las células deben adquirir un estado de inestabilidad genómica

previamente al desarrollo de un cáncer [Loeb, 1991; Hanahan et al., 2000]. Esta inestabilidad genómica daría lugar a una mayor frecuencia de mutaciones y permitiría una mayor tolerancia a éstas por parte de la célula. Se estima que deben acumularse entre 5 y 8 mutaciones para generar un tumor [Renan, 1993]. Entre éstas, se encuentran mutaciones dominantes que transforman protooncogenes en oncogenes y recesivas que inactivan genes supresores de tumores conocidos a veces como *gatekeepers* [Kinzler et al., 1997]. Durante la evolución de una célula normal a cancerosa, se acumulan otras mutaciones sin relación directa con el fenotipo tumoral. Esta acumulación de mutaciones se facilitaría con la inactivación de otro grupo de genes –*caretakers*– que controlan la estabilidad genómica de la célula. La mayoría de los síndromes hereditarios que predisponen a desarrollar tumores se produce por la presencia de mutaciones en línea germinal de genes supresores de tumores o de reparación del ADN.

La necesidad de acumular mutaciones obedece a la necesidad por parte de la célula de superar los mecanismos de control que impiden su proliferación incontrolada. Una célula cancerosa progresa a través del ciclo celular sin necesidad de señales mitogénicas, silencia sus mecanismos de apoptosis, reactiva la telomerasa, y, por último, invade otros tejidos e induce metástasis.

Tipos de cáncer

Existen alrededor de 200 tipos celulares distintos y aunque, en principio, cualquier célula puede evolucionar hasta formar un tumor, en la práctica esto no es así y la mayoría de los tumores provienen de células epiteliales (carcinomas). Otros tipos comunes de cáncer derivan de células mesenquimales (sarcomas), de células del sistema linfohematopoyético (leucemias, linfomas y mielomas), o de células del sistema nervioso (neuroblastomas y gliomas, principalmente). Son muchas las patologías englobadas dentro del término *cáncer* y aunque todas ellas son entidades clínicas distintas, es posible agruparlas en una única categoría ya

que presentan una característica común: una proliferación celular anómala y exacerbada. Los diferentes tipos de cáncer se clasifican principalmente en función del tipo celular que ha originado el tumor y el órgano o tejido en el que éste se desarrolla. Desde un punto de vista clínico, la importancia del órgano afectado es grande ya que esto tiene implicaciones diagnósticas, terapéuticas y pronósticas.

Neoplasias del sistema hematopoyético

Las neoplasias de origen hematopoyético constituyen un grupo bastante heterogéneo de enfermedades proliferativas. Una particularidad de muchos de estos tumores es que, aunque existe un crecimiento celular incontrolado, no tiene que formarse siempre una masa tumoral. También presentan otras diferencias muy importantes respecto a los llamados tumores sólidos. Por ejemplo, el número de mutaciones necesarias para dar lugar a un tumor hematopoyético suele ser menor [Nowell, 2002]. Además, las translocaciones cromosómicas, como mecanismo de activación oncogénica, son mucho más frecuentes [Vogelstein et al., 2004].

La prevalencia de linfomas es de alrededor de un millón de personas en todo el mundo. El linfoma de tipo no Hodgkin es el tercer cáncer con mayor crecimiento –después del melanoma y del cáncer de pulmón– en los últimos años. La incidencia de linfomas aumenta anualmente en un 3%, y desde el año 2000 es el quinto cáncer en cuanto a mortalidad. Según los NIH de los Estados Unidos, los linfomas representan el 5% de todos los diagnósticos de cáncer en ese país. En España, se estima que los linfomas tienen una incidencia media de 3 casos nuevos por cada 100.000 habitantes por año, es decir, algo menos de 1500 nuevos casos cada año.

El linfoma linfoblástico representa menos del 5% del total de linfomas de tipo no Hodgkin en adultos, aunque es mucho más frecuente en niños (entre 30-50%).

Neoplasias de origen hematopoyético en el ratón

Aunque en el ratón pueden encontrarse muchos tumores de origen hematopoyético equivalentes a los descritos en el hombre, también es cierto que existen tipos tumorales sin una equivalencia clara. Por esto, en 2002 el MMHCC propuso una clasificación de las neoplasias hematopoyéticas de ratón basada en la propuesta por la OMS para las humanas. Según esta propuesta, conocida como la propuesta *Bethesda*, la clasificación sería:

Leucemias no-linfoides	<i>Leucemias mieloides</i>	Leucemia mieloide de células maduras
		Leucemia mieloide de células no maduras
		Leucemia mieloide tipo MPD
		Leucemia mielomonocítica
		Leucemia monolítica
	Leucemia eritroide (eritroleucemia)	
	Leucemia megacariocítica	
	Leucemia bifenotípica	
Sarcomas hematopoyéticos no linfoides	Sarcoma granulocítico	
	Sarcoma histiocítico	
	Sarcoma mastocítico	
Displasias mieloides	Síndrome mielodisplásico	
	Citopenia con incremento de blastos	
Proliferación mieloide	Mieloproliferación (genética)	
	Enfermedad mieloproliferativa	

Tabla 1.1. Propuesta de clasificación de las neoplasias hematopoyéticas no linfoides (mieloides) en ratón. Clasificación “Bethesda”.

Células B precursoras	Linfoma linfoblástico (leucemia linfoblástica) de células B	
Células B maduras	Linfoma de células B pequeñas	
	Linfoma esplénico de zona marginal	
	Linfoma folicular de células B	
	Linfoma difuso de células B grandes	Centroblástico
		Inmunoblástico
		Asociado a histiocitos
	Linfoma primario difuso mediastínico (tímico) de células B grandes	
Linfoma de Burkitt (clásico)		
Linfoma "Burkitt-like"		
Células plasmáticas	Plasmacitoma	
	Plasmacitoma extraóseo	
	Plasmacitoma anaplásico	
Linfoma de células B- <i>Natural Killer</i>		

Tabla 1.2. Propuesta de clasificación de las neoplasias hematopoyéticas de células B linfoides en ratón. Clasificación "Bethesda".

Neoplasias de precursores de células T	Linfoma linfoblástico (leucemia linfoblástica)
Neoplasias de células T maduras	Linfoma de células T pequeñas
Neoplasias de células T de carácter indeterminado	Linfoma anaplásico de células grandes
Linfoma de células T-<i>Natural Killer</i>	

Tabla 1.3. Propuesta de clasificación de las neoplasias hematopoyéticas de células T linfoides en ratón. Clasificación "Bethesda".

El timo. Linfomas tímicos

El timo es un órgano linfoide primario localizado en la cavidad torácica, anterior al corazón, donde maduran los linfocitos T. Las células T progenitoras que provienen de la médula ósea, o del hígado (en el período fetal), llegan al timo donde sufren los procesos de maduración y selección hasta generar linfocitos T funcionales, que podrán salir a la periferia y poblar los órganos linfoides secundarios. Las células T inmaduras que llegan al timo no expresan CD4 o CD8, es decir, son CD4⁻CD8⁻, o dobles negativas (DN) [Ellmeier *et al.*, 1999]. Las células DN maduran a células dobles positivas (DP) según una secuencia de eventos que incluye la reorganización del receptor de linfocitos T (TCR). Las células DP se diferencian a SP (*single positive*) perdiendo la expresión de CD4 o CD8 y salen del timo hacia los órganos linfoides secundarios. Las células DN más inmaduras permanecen en la fase Go del ciclo celular y es durante el estadio IV (CD25⁻CD44⁻) de su maduración cuando sufren una gran proliferación multiplicando el número de células varios cientos de veces [Onoyama *et al.*, 2007]. Cuando la célula T en maduración alcanza el estado DP se produce una parada del ciclo de división y las células SP se mantienen en Go de nuevo hasta que reconocen el antígeno presentado por una célula presentadora de antígenos.

El timo esta dividido en dos regiones histológicamente diferenciadas: la corteza y la médula. La estructura cortical está compuesta por un epitelio subcapsular, células corticales epiteliales, macrófagos y timocitos inmaduros. En la médula se encuentran células epiteliales (de origen endodérmico), células dendríticas, macrófagos y timocitos maduros. La estructura histológica del timo muestra en su periferia una cápsula de tejido conjuntivo que delimita una organización en lobulillos. La estructura lobulillar tímica presenta una zona externa o cortical densamente celular más teñida que contrasta con la zona medular central más clara (figura 1.3). Los septos interlobulillares aparecen repletos de vasos sanguíneos llegando hasta la zona de unión corticomedular. El lobulillo muestra una zona cortical formada mayoritariamente por linfocitos de

pequeño tamaño con un disposición difusa y una zona medular que presenta menor contenido de linfocitos junto a células epiteliales configurando los típicos cuerpos de Hasall.

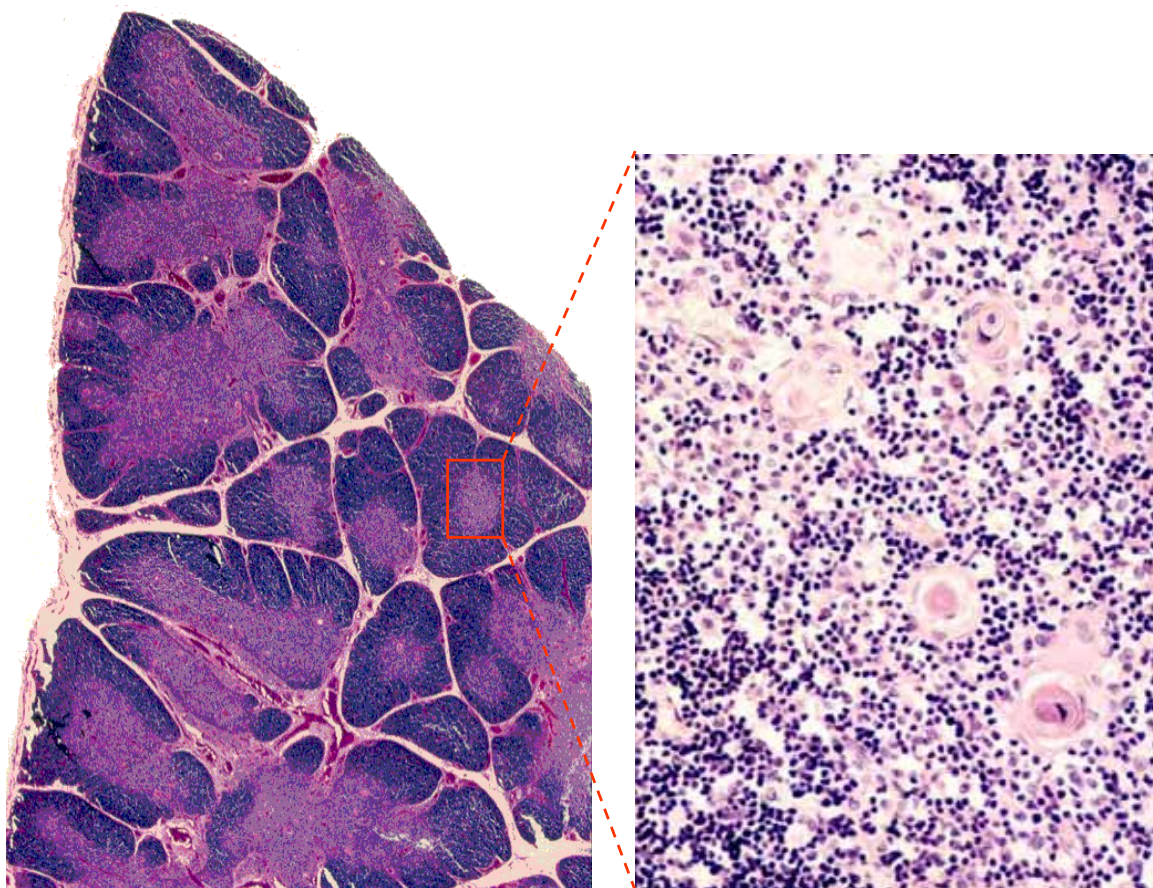


Figura 1.3. Ultraestructura histológica del timo. Se pueden distinguir claramente la zona cortical y la zona medular, así como las trabéculas.

Se ha publicado recientemente la existencia de un segundo timo funcional en el ratón [Terszowski *et al.*, 2006]. Éste, a diferencia del timo torácico, se encuentra localizado en el cuello del ratón, y se desarrolla en un estadio postnatal, alcanzando el tamaño de un nódulo linfático. La existencia de este timo cerca del músculo cervical, tanto en ratón como en humanos, era ya conocida, pero nunca se había llegado a analizar su función *in vivo*. El timo “cervical” tiene una ultraestructura similar al timo torácico; es decir, está constituido por una corteza y una médula. La localización topológica de este tejido se siguió mediante la utilización de un ratón transgénico que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de *Foxn1*, un factor de transcripción imprescindible para la diferenciación del epitelio tímico, lo cual permitió distinguir el tejido tímico de otros tejidos linfoides situados en la zona cervical mediante visualización de la fluorescencia *in situ*. La localización y el número de timos varía en función de la línea de ratón estudiada; así por ejemplo, en BALB/cJ existe un mayor número de timos cervicales que en C57BL/6J [Terszowski *et al.*, 2006].

1.2. Modelos animales para el estudio del cáncer

El principal objetivo del estudio de tumores en ratón es, lógicamente, la obtención de información relevante para el diagnóstico y tratamiento de sus equivalentes en el hombre. Como se ha indicado anteriormente, en el grupo de las neoplasias hematopoyéticas en general, y de los linfomas en particular, no es siempre fácil encontrar tumores equivalentes en ambas especies. Existe una diferencia fundamental en cuanto a la fisiología y características de los órganos linfoides. Por ejemplo, el ratón conserva nichos de hematopoyesis extramedular durante toda su vida, y el timo persiste hasta la edad adulta.

En muchos casos, además, es difícil comparar tumores humanos y murinos porque los sistemas de clasificación aplicados en ambos casos son distintos.

Modelos animales

El estudio *in vitro* de modelos que reproducen partes de sistemas biológicos complejos presenta la ventaja de aportar información de manera relativamente rápida y que puede ser “fácilmente” interpretada. En muchos casos, sin embargo, dicha información debe tomarse con cautela. En particular, la reproducción de aspectos clínicos o aproximaciones terapéuticas son claros ejemplos de procesos biológicos que no pueden ser reproducidos de manera adecuada en modelos sencillos. Por todo ello, el estudio de modelos animales en investigación biomédica posee un valor excepcional.

Si se revisan los avances logrados en las ciencias biomédicas durante los últimos 100 años, se puede comprobar que la mayoría se apoyaron en el estudio de algún modelo animal. Se han utilizado diversos animales modelo de entre los que destacan: la mosca de la fruta (o del vinagre), el pez cebra, el cobayo, la rata, y, sobre todo, el ratón de laboratorio. Las características que definen al ratón como un modelo animal ideal se pueden resumir en:

- Un tiempo de generación muy corto.
- Su pequeño tamaño.
- Ser animales muy prolíficos.
- Son mamíferos, como la especie humana.
- La disponibilidad de variantes genéticamente definidas y el conocimiento de la secuencia de su genoma.
- La cantidad de información sobre procesos fisiológicos y patológicos de que se dispone para esta especie.
- Lo asequible que es su manipulación genética tanto desde un punto de vista tecnológico como científico.

El uso de modelos animales ha sido una de las estrategias más exitosas en el estudio del cáncer durante el último siglo, y el desarrollo de técnicas de ingeniería genética, combinado con los avances en la manipulación embrionaria del ratón, ha resultado fundamental para la creación de nuevos modelos con características muy definidas capaces de aportar información mecanística sobre muchos eventos moleculares.

El desarrollo de ratones transgénicos en los años 80 permitió añadir un gen clonado en el laboratorio a la línea germinal de un ratón y estudiar los efectos que su expresión tiene sobre el fenotipo del animal [*Palmiter y Brinster, 1986*]. Por lo general, el gen introducido se coloca bajo el control de un promotor que dirige su expresión en tejidos diana. Esto permite, por ejemplo, el análisis de la capacidad oncogénica de ciertos genes en un órgano o tejido [*Hanahan et al., 1989*]. Se han generado una gran cantidad de modelos animales de cáncer utilizando esta aproximación experimental [*Hanahan et al., 1989; Bedell et al., 1997*]. En el caso de los genes supresores de tumores, su naturaleza recesiva no permite su estudio mediante técnicas convencionales de transgénesis: es necesaria la inactivación de

ambas copias del gen para poder analizar el efecto que su falta tiene sobre el desarrollo de tumores. Esto se consiguió a finales de los 80 con el desarrollo de células madre embrionarias [Evans et al., 1981] combinado con las técnicas de “gene targeting” [Thomas y Capecchi, 1987; Doetschman et al., 1987]. Utilizando esta técnica se han podido generar líneas de ratón con mutaciones inactivantes en genes supresores de tumores para prácticamente la totalidad de los identificados en pacientes humanos [Bedell et al., 1997; Venkatachalam y Donehower, 1998]. Esta técnica se ha denominado noqueado de genes y las ventajas que los modelos así creados presentan son numerosas. Por ejemplo, la posibilidad de identificar genes involucrados en tumorigenesis, pero cuya penetrancia es baja utilizando modelos heterocigotos [Dietrich et al., 1993; Nagase et al., 1995; Van Wezel et al., 1999]. Las técnicas de “gene targeting” no solo se utilizan para noquear genes, permiten también la introducción de prácticamente cualquier mutación en un gen.

Los investigadores Capecchi, Evans y Smithies han recibido el premio Nobel de medicina y fisiología en 2007 por el desarrollo de las técnicas de modificación genética en células madre embrionarias de ratón.

Importancia del fondo genético en modelos de ratón

Existen innumerables líneas mutantes de ratón, que reproducen diferentes tipos de cáncer o de síndromes de predisposición a padecer tumores. Se ha observado que el fenotipo de muchas de estas líneas mutantes, relacionadas o no con modelos de cáncer, se ve modificado por diversos factores. Se han publicado influencias medioambientales, del tipo de la dieta, el estatus sanitario, y, por supuesto, el fondo genético en el que se encuentra la mutación. En el contexto de una línea mutante de ratón, el fondo genético se refiere a la colección de alelos para todos sus loci excepto para el locus de interés más, en ocasiones, una región flanqueante. La presencia de alelos que determinen una mayor sensibilidad o resistencia a enfermedades, o las combinaciones de alelos para genes

modificadores puede conducir a la obtención de fenotipos confusos cuando el fondo genético de los modelos comparados no es equivalente.

Estirpe	Tumor	Incidencia (%)	Edad (semanas)	sexo
129P4/RrJLac	Linfoma linfocítico	21	>29	-
129P3/J	Leucemia linfoide	7.4	80	hembra
LP/J	Linfoma linfocítico	7.8	100	hembra
AKR	Leucemia linfoide	90	40	-
BALB/cAnN	Linfoma B	35	80	-
BALB/cLac	Leucemia linfoide	17	>30	-
BALB/c	Linfoma linfocítico de células pequeñas	5	55	-
BALB/c	Leucemia linfoide	14	55-60	-
BALB/cAnDe	Linfoma folicular de células B	8.8	80	-
BALB/cJ	Linfoma folicular de células B	23	-	-
A/Lac	Leucemia linfoide	10-43	>30	-
CBA/J	Linfoma	15	80-105	hembra
C3H/Fg	Leucemia linfoide	90	-	-
DBA/1Lac	Leucemia linfoide	23	>30	-
C58	Leucemia linfoide	89	20-90	-
C57L/HeDe	Linfoma folicular de células B	55	80	hembra
C57BR/CdLac	Leucemia linfoide	26	>30	
C57BL/10J	Linfoma	30	-	-
C57BL/6J	Linfoma	6	-	-
C57BL/6NCri	Sarcoma histiocítico	54	-	hembra
C57BL/6NCri	Sarcoma histiocítico	66	-	macho
SJL	Linfoma folicular de células B	90	56	-
PL	Leucemia	50	64	hembra
PL	Leucemia	90	64	macho

Tabla 1.4. Neoplasias espontáneas del sistema linfohematopoyético que se presentan con cierta frecuencia en determinadas estirpes consanguíneas de ratón.

En determinadas estirpes de ratón, hay determinadas neoplasias que aparecen de manera espontánea con una cierta incidencia. El análisis de 430 estirpes de ratón reveló que hay 38 cepas consanguíneas que presentaban una alta predisposición a desarrollar diversos tipos de tumores [Festing, 1993; Festing, 1994]. Utilizando técnicas de mapeo [Gariboldi et al., 1993a; Gariboldi et al., 1993b], algunas de

estas características se han asociado a regiones del genoma y a loci cuya función, en muchos casos, no es aún conocida. De entre los tumores espontáneos que se presentan en ratón, el linfoma puede considerarse relativamente frecuente (ver tabla 1.4). También en este caso el fondo genético parece ser un factor a tener en cuenta.

El fondo genético no sólo altera la expresión fenotípica de un ratón mutante, sino que puede modular su susceptibilidad o resistencia a determinados tratamientos de inducción de tumores. En este sentido y como aspecto muy relevante para el presente trabajo, cabe resaltar la influencia que el fondo genético tiene sobre la susceptibilidad a desarrollar linfomas tímicos tras una exposición a radiación γ . Son varios los estudios en los que se han encontrado diferencias entre distintas líneas de ratón [Saito *et al.*, 2001, Villa-Morales *et al.*, 2006].

El fondo genético C57BL/6J es el más utilizado en caracterización fenotípica de mutantes. Esta línea posee, entre otras características, una baja incidencia de tumores espontáneos, y una senescencia retardada en sus células madre hematopoyéticas con respecto a otros fondos (*i.e.* BALB/cJ o DBA/2J).

Modelos de ratón mutantes para Trp53

Durante los años 90 se crearon los primeros ratones mutantes nulos para el gen *Trp53* [Donehower *et al.*, 1992, Jacks *et al.*, 1994]. Los ratones deficientes para *Trp53* muestran una alta predisposición a desarrollar tumores a edades tempranas (un 90% muere entre los 6 y 8 meses de edad). El tumor que con mayor frecuencia se presenta es el linfoma de células T, en concreto el linfoma linfoblástico, siendo el timo el órgano más comúnmente afectado. Los ratones heterocigotos también muestran una incidencia elevada de tumores. En este caso los tumores más frecuentes son fibrosarcomas y osteosarcomas. Una alta proporción de los tumores

en heterocigóticos presenta la pérdida del alelo salvaje [Jacks *et al.*, 1994]. Los carcinomas aparecen en raras ocasiones en este modelo de ratón, siendo ésta la principal diferencia con respecto a pacientes humanos que sufren el síndrome de Li-Fraumeni.

Se ha estudiado también la actividad oncogénica de formas mutadas de p53 en modelos murinos [Lang *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004]. Los mutantes *Trp53R172H* y *Trp53R270H* en ratón se corresponden con las mutaciones en los codones 175 y 273, respectivamente, en humanos. Los ratones mutantes *Trp53R270H/+* y *Trp53R172H/+* reproducen las principales características del síndrome de Li-Fraumeni. Los mutantes *Trp53+/R270H* y *Trp53+/R172H* presentan espectros tumorales distintos de los observados en el mutante nulo *Trp53-/-* y en el heterocigoto *Trp53+/-*. En concreto, aparecen más carcinomas y tumores endoteliales (hemangiosarcomas), mientras que los linfomas T están ausentes en estos modelos [Olive *et al.*, 2004]. El espectro tumoral de los ratones *Trp53R270H/-* y *Trp53R172H/-* es también distinto del mostrado por *Trp53-/-*, siendo de nuevo llamativa la ausencia de linfomas T [Olive *et al.*, 2004].

Otro modelo interesante para el estudio de p53 es un transgénico que porta una copia adicional del gen [García-Cao *et al.*, 2002]. Estos ratones “super-p53” llevan un transgén que contiene una copia intacta de *Trp53* que se comporta como un alelo salvaje. Este modelo presenta toda una serie de características propias de una respuesta aumentada de p53, incluida una resistencia exacerbada a desarrollar tumores.

Modelos de ratón mutantes para $p21^{Cip1}$ (*Cdkn1a*)

El primer modelo mutante nulo para $p21^{Cip1}$ apareció en 1995 [Deng et al., 1995, Brugarolas et al., 1995]. En un primer estudio, se observó que su fenotipo no reproducía el del mutante nulo para *Trp53*; estos ratones no mostraban una susceptibilidad elevada a desarrollar tumores. En este trabajo se estudió el desarrollo de tumores sólo hasta los 7 meses de edad. Posteriormente, un estudio más detallado demostró que los ratones nulos para $p21^{Cip1}$ en realidad sí muestran una elevada incidencia de tumores a partir de los 16 meses de edad [Martín-Caballero et al., 2001]. Tanto en los resultados de esta tesis, como en los de un reciente trabajo publicado por nuestro laboratorio viene a confirmarse este fenotipo [De la Cueva et al., 2006].

Modelos de ratón para el estudio de linfomas tímicos

El linfoma tímico es un tumor que se puede encontrar con relativa frecuencia en ratones tanto *wild type* como mutantes [Ghebranious y Donehower, 1998], y puede inducirse mediante tratamientos con diferentes tipos de carcinógenos.

En el ámbito de los ratones modificados genéticamente existen modelos con una alta incidencia de linfomas tímicos, como por ejemplo los mutantes nulos para *Atm*, $p19^{ARF}$ y *Trp53* o el “knock-in” (K22M) para *Rad50*. Los ratones homocigotos nulos para *Atm* desarrollan linfomas tímicos con una incidencia cercana al 100% entre los 2 y 4 meses de vida [Wang et al., 1997]. La falta simultánea de los genes *Rag1* y *Prfl* (perforina) da también lugar a una incidencia del 100% de linfomas tímicos. El ratón transgénico para *Stat5b* desarrolla linfomas tímicos CD8⁺ [Bessette et al., 2007]. En este último trabajo se expone además que ciertas alteraciones en el desarrollo de linfocitos T en la transición DN/DP cooperan con vías de señalización de citoquinas para generar linfomas linfoblásticos T.

Los linfomas tímicos inducidos mediante agentes tumorigénicos –radiación γ o tratamiento con MNU, por ejemplo– son un buen modelo para identificar genes involucrados en el proceso de linfomagénesis. Las alteraciones genéticas encontradas más frecuentemente en estos sistemas se producen en genes como *N-ras* y *K-ras* [Newcomb et al., 1988; Perez de Castro et al., 1999] *c-Myc* [Evan et al., 1997], *Notch1* [Tsuji et al., 2003], *Trp53* [Brathwaite et al., 1992], *Ink4b* y *Ink4a* [Malumbres et al., 1999; Malumbres et al., 1997], *p73* [Herranz et al., 1999], *p19^{Arf}* [Meléndez et al., 2000], *Pten* y *Cd95/Fas* [Villa-Morales et al., 2007; Wakabayashi et al., 2003], *Znfn1a1/Ikaros* [Beverly et al., 2003; Kakinuma et al., 2002], *Rit/Bcl11B* [Wakabayashi et al., 2003], trisomías del 15 y traslocaciones recíprocas entre los cromosomas 1 y 5. Esta última alteración es exclusiva de linfomas tímicos inducidos por radiación γ . Curiosamente, las mutaciones en el gen *Trp53* no son frecuentes en linfomas tímicos inducidos, y sólo se han encontrado alteraciones en este gen en un 13% de linfomas tímicos inducidos por radiación γ . El gen *K-ras* se encuentra activado en un 40% de linfomas inducidos por radiación γ , mientras que el gen *N-ras* lo está en un 17%.

La inducción de linfomas tímicos mediante radiación γ es un modelo clásico de inducción de tumores [Kaplan y Brown, 1952]. El estudio de diferentes modelos murinos ha permitido demostrar que la susceptibilidad a la inducción de linfomas tímicos mediante radiación γ es un carácter bastante complejo con una base claramente poligénica [Mao et al., 2003; Saito et al., 2001; Tamura et al., 2005] y que ciertos genes implicados en el mantenimiento de la estabilidad genómica tienen una especial relevancia: *Trp53* [Donehower et al., 1992; Giaccia y Kastan, 1998], *Atm* [Liyanaige et al., 2000], genes de reparación de apareamientos erróneos [Baross-Francis et al., 2000], *p21^{Cip1}* [Wang et al., 1997; Martín-Caballero et al., 2001].

En los linfomas tímicos se ha observado una característica interesante: una reducción de los niveles de cadherinas (N y E) que son expresadas normalmente por las células estromáticas del timo. Estos análisis sugieren la necesidad de alteraciones génicas que no tienen lugar en células tumorales *per se* [Matabuena de Yzaguirre *et al.*, 2006]. Los oncogenes *c-Myc* y *Notch1* parecen tener un papel relevante, pero aún no han sido suficientemente clarificados los mecanismos moleculares por los que cooperarían con el desarrollo de estos linfomas.

1.3. p53, p21^{Cip1} y su vía de supresión tumoral

Como promedio, un 50% de los tumores humanos o bien ha perdido, o bien presenta alguna alteración en el gen supresor de tumores TRP53. Este dato da una idea de la posición que p53 ocupa en la regulación del ciclo de división celular y en otros procesos cruciales para la viabilidad de la célula (apoptosis, reparación del ADN, estabilidad genómica, etc). De hecho, TRP53 puede considerarse como el más importante gen supresor de tumores. En respuesta a diversas situaciones de estrés celular, p53 activa o reprime la expresión de un gran número de genes.

Así mismo, la vía de regulación iniciada por p53 es un elemento clave en el estudio de la biología de una célula tumoral y de una gran parte de las aproximaciones terapéuticas y diagnósticas en el campo de la oncología.

El supresor de tumores Trp53

El producto del gen supresor de tumores *Trp53* es una proteína descrita inicialmente en 1979 [Lane et al., 1979], formada por 393 aminoácidos y con un peso molecular de 53 kDa. La proteína p53 interfiere con numerosos mecanismos de carcinogénesis por lo que las lesiones genéticas más comunes en casi cualquier tumor conducen a su inactivación [Levine, 1997]. *Trp53* es inactivado principalmente por mutación, aunque también pueden encontrarse mecanismos de inhibición a nivel post-traducciona: incluyendo modificaciones químicas, sobreexpresión de proteínas inhibidoras o alteraciones en su localización celular. En tumores humanos, la mayoría de las mutaciones en *Trp53* se encuentran en los aminoácidos 175, 248, 249, 273 y 282 [Olivier et al., 2002]. Éstas suelen ser mutaciones sin sentido [Olivier et al., 2002], y un 90% de ellas se localizan en la secuencia que codifica para su dominio de unión a ADN [Levine, 1997].

Funciones de p53

p53 es un activador transcripcional que responde a situaciones de estrés celular tales como una lesión en el ADN, activación aberrante de oncogenes,

hipoxia, privación de nucleótidos, exposición a agentes quimioterápicos y otros compuestos que actúan sobre el ciclo celular [Hsieh et al., 1999; Jiménez et al., 1999; Vogelstein, 2000]. Sus efectos biológicos más importantes son la parada del ciclo celular en G1 y/o G2, el desencadenamiento de la apoptosis, el mantenimiento de la estabilidad genómica y la inhibición de la angiogénesis [Levine, 1997; Vogelstein, 2000]. Por todo ello, no resulta extraño que un gran número de tumores muestren mutaciones en esta vía. La frecuencia de mutaciones en *Trp53* varía en función del tipo de cáncer desde casi cero en tumores carcinoides de pulmón hasta un 95% en melanomas. Como promedio, el 50% de los tumores humanos pierde total o parcialmente la funcionalidad de p53.

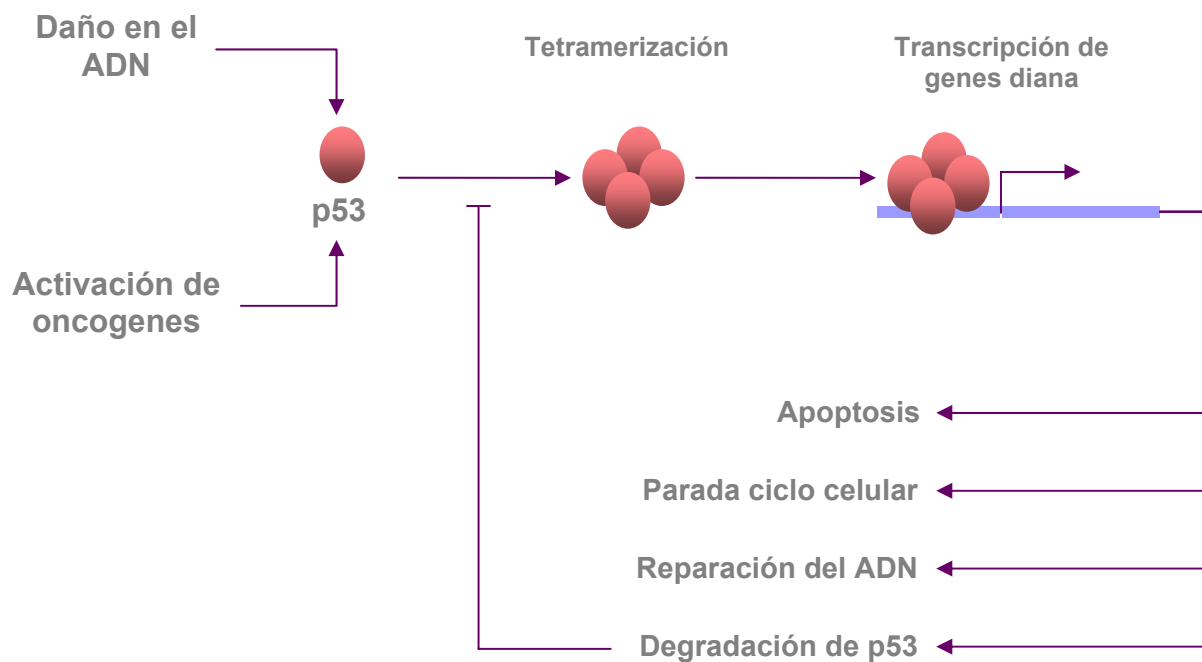


Figura 1.4. Principales respuestas desencadenadas por p53 tras su estabilización y activación.

De entre los genes que responden a p53 cabe destacar $p21^{Cip1}$. Su producto, la proteína $p21^{Cip1}$, es un inhibidor de complejos ciclina/CDK que induce,

principalmente, una parada del ciclo celular en G1. p53 activa genes que codifican para otras proteínas pro-apoptóticas: Bax, Fas/Apo, Killer/DR5, Puma, Noxa o Apaf-1. Otros genes regulados por p53 son los que codifican para: GADD45, 14-3-3 σ , Bid, Traf4, Caspasa 6, p53AIP1, BTG2, p53RDL1, p53R2, DDB2, XPC, mdm2, IGF-BP3, PIDD, la NOS endotelial, la subunidad p85 de PI3K, enzimas que generan intermedios reactivos de oxígeno, Tsp-1, y PERP, entre muchos otros. Además de su actividad como activador transcripcional, p53 es capaz de reprimir la expresión de determinados genes como *Bcl-2*, Survivina, *c-Myc*, MDR1 y la ciclina B.

Por su importancia en la génesis tumoral, la proteína p53 tiene gran relevancia en aspectos clínicos relacionados con el diagnóstico, pronóstico y terapéutica. La acción de muchos quimioterápicos está basada en su capacidad de desencadenar apoptosis [Gewirtz *et al.*, 2000], por lo tanto, la falta de p53 puede alterar la eficacia de mucho de estos compuestos. Sin embargo, hay numerosos estudios que arrojan resultados contradictorios en cuanto al valor pronóstico del estatus de p53 en diversos tumores [Bergh *et al.*, 1995; Elledge *et al.*, 1995; Stal *et al.*, 1995; Aas *et al.*, 1996; Thor *et al.*, 1998; Berns *et al.*, 2000; Rahko *et al.*, 2003].

Aproximadamente el 50% de los tumores humanos expresan niveles variables de formas mutadas, generalmente en su dominio de unión a ADN, de p53. Muchas de estas proteínas mutantes interactúan con otros miembros de la familia p53: p63 y p73 [Gaiddon *et al.*, 2001]. Esta interacción se debe, probablemente, a un cambio estructural en las proteínas mutantes, pero no en la proteína salvaje, por lo que sólo aquellas pueden interactuar con los otros miembros de la familia. Existe evidencia experimental de la actividad oncogénica de proteínas mutantes de p53 en modelos de ratón [Lang *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004]. En todos estos casos, la proteína mutante de p53 regularía de manera preferente un conjunto de genes para generar su fenotipo oncológico [Kim y Deppert, 2004; Sigal y Rotter, 2000]. Así

mismo, se ha visto que algunas proteínas mutantes de p53 se asocian preferentemente con determinados promotores génicos [Zalcenstein *et al.*, 2006]. Otro modelo sugiere que las proteínas mutantes de p53 adquieren nuevas funciones a través de su interacción con otras proteínas de su misma familia. En este caso, la proteína mutante de p53 inhibiría la actividad de p63 y p73 [Moll *et al.*, 2001].

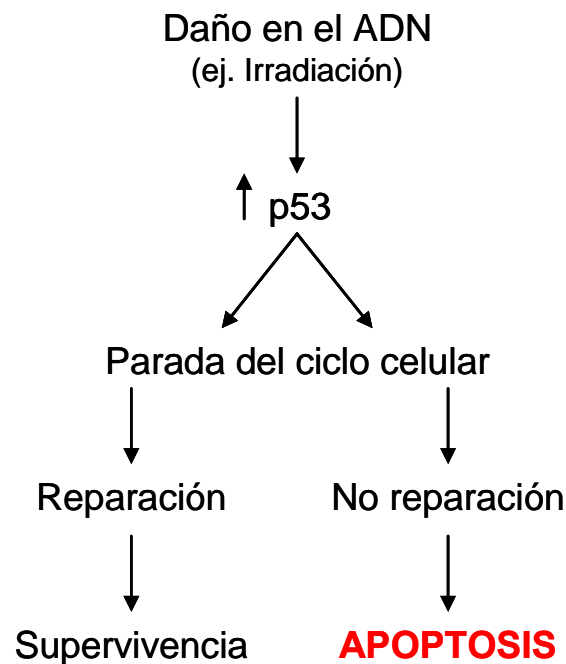


Figura 1.5. Tras un daño en el ADN, p53 se activa y actúa principalmente deteniendo el ciclo celular y activando el proceso de reparación del ADN. Si tras un tiempo determinado, la célula no ha conseguido reparar satisfactoriamente las lesiones, entonces se iniciará la vía apoptótica.

Algunos resultados recientes [Efeyan *et al.*, 2006] sugieren que la actividad principal de p53 como supresor de tumores se desencadenaría más como respuesta a la activación de oncogenes (estrés oncogénico) y no tanto como respuesta a daños en el ADN. Esto explicaría el porqué de la alta incidencia de

pérdidas de p19^{ARF} en tumores humanos, así como la llamativa ausencia de mutaciones en las quinasas que activan p53 en respuesta a un daño en el ADN.

Se han descrito tres niveles posibles de regulación para p53: estabilidad, actividad, y localización subcelular. La expresión de *Mdm2* se encuentra regulada por p53 y, a su vez, Mdm2 es capaz de unirse a p53 marcando así su degradación proteolítica. La sobreexpresión de Mdm2 es suficiente para inactivar p53 sin necesidad de mutaciones adicionales y esto se ha visto en varios tipos de cáncer.

La activación de p53 se consigue a través de múltiples modificaciones, tales como: fosforilación, acetilación, glicosilación, ribosilación, ubiquitinación o adición de moléculas de SUMO (*Small Ubiquitin-related MOdifier*) [Toledo et al., 2006]. La mayoría de los reguladores positivos de p53 se pueden clasificar bien como proteínas que estabilizan neutralizando el efecto inhibitor de Mdm2 (e.g., p19^{Arf}, c-Abl), o bien como proteínas que se unen al extremo carboxilo terminal promoviendo su unión al ADN (e.g., BRAC-1, 14-3-3 σ). Al igual que Mdm2, p19^{Arf} también actúa mediante un bucle de retroinhibición: la expresión de p19^{Arf} mediante el factor de transcripción E2f-1 puede ser bloqueada por p53.

La proteína p53 es fosforilada en ciertos residuos de serina de sus dominios carboxilo y amino terminales. La fosforilación de las serinas 15, 20, 33, y 37 ocurre tras la exposición a radiación γ [Giaccia y Kastan, 1998]. La fosforilación de la serina 392 facilita la tetramerización de p53 y aumenta su capacidad de unión al ADN. La serina 20 se encuentra en la región de unión a Mdm2 y las mutaciones en este residuo dan lugar a una variante de p53 que no se activa en respuesta a irradiación [Chehab et al., 1999]. El principal mecanismo de activación de p53 es, por lo tanto, la fosforilación y hay muchas quinasas capaces de hacerlo: caseína quinasa I, caseína quinasa II, DNA-PK, ATM, ATR, quinasas dependientes de ciclinas específicas de las fases S y G2, CAK, PKC, PKR, JNKs, Raf-1, etc.

El otro mecanismo de activación crítico para p53 es el que implica a su estabilización funcional y se desencadena básicamente mediante señalización oncogénica. Según esto, los dos principales mecanismos de activación de p53 en respuesta a los dos estímulos más importantes, serían funcionalmente independientes, y ambos estímulos estarían presentes en casi cualquier tipo de cáncer.

Dada la importancia de p53, resultó bastante sorprendente que los embriones de ratones nulos para p53 pudiesen completar su desarrollo. Por tanto, habría que admitir que la función de esta proteína se restringiría a la supresión tumoral, y que su importancia en la regulación “normal” del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis sería escasa. Sin embargo, parece que p53 es clave para la protección del embrión frente a determinados defectos del desarrollo. En concreto, del desarrollo del sistema nervioso central [Sah et al., 1995]. La sobreexpresión de p53 sí parece tener un efecto incompatible con un desarrollo embrionario normal: tanto un transgénico de p53 (bajo el control del promotor MMTV), como los mutantes nulos para Mdm2 presentan una letalidad embrionaria del 100% [Jones et al., 1995; Montes de Oca et al., 1995].

La proteína p21^{Cip1}

La proteína p21^{Cip1} fue descubierta de manera independiente y simultánea por varios grupos [Harper et al., 1993; El-Deiry et al., 1993]. El gen que codifica para p21^{Cip1} se denominó *CDKN1a* (*CDK inhibitor 1a*) y se mapeó en la region 6p21.2 del genoma humano [El-Deiry et al., 1993; Demetrick et al., 1995] y en el cromosoma 17, cerca del complejo H-2, en ratón [Huppi et al., 1994].

Funciones de p21^{Cip1}

p21^{Cip1} pertenece (junto con p27^{Kip1} y p57^{Kip2}) a la familia de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) denominada Cip/Kip. Aunque p21^{Cip1} se clasificó inicialmente como un inhibidor de las quinasas Cdc2 (Cdk1), Cdk2 y Cdk4, posteriormente se vio que era capaz de inhibir también la actividad de Cdk3 y Cdk6, y que su actividad inhibitoria era máxima para los complejos CDK-ciclina que controlan la transición G1/S del ciclo celular [Harper et al., 1995]. No obstante, la expresión de p21^{Cip1} puede hacer que las células se acumulen tanto en la fase G1 [Harper et al., 1995] como en G2 [Dulic et al., 1998; Medema et al., 1998].

La expresión de p21^{Cip1} se encuentra regulada por p53, por lo que, en condiciones normales, actúa deteniendo la progresión del ciclo celular en respuesta a estímulos oncogénicos, genotóxicos, oxidativos, etc. La sobreexpresión de p21^{Cip1} en líneas celulares tumorales inhibe la formación de colonias generando la misma respuesta celular que provoca la sobreexpresión de p53. La función supresora de tumores de p21^{Cip1} se localiza en su extremo N-terminal. Esta zona de la proteína es necesaria –y suficiente– para inhibir la actividad quinasa de las CDKs *in vivo* e *in vitro*.

p21^{Cip1} interacciona también con ciclinas a través de una región próxima a su extremo N-terminal (aminoácidos 17–24), y de una segunda región de unión débil cerca del extremo C-terminal. Existe otro sitio de unión a Cdk2, también en la región N-terminal (aminoácidos 53–58) que es necesario, junto con los otros dos sitios de unión a ciclinas, para una inhibición eficaz. La secuencia de unión está muy conservada y se encuentra también en reguladores positivos de CDKs, como por ejemplo Cdc25, y en algunos de sus sustratos (p107, p130 y E2F). p21^{Cip1} compete con p107 y p130 por su unión a CDKs, pudiendo incluso romper uniones ya existentes [Shiyanov et al., 1996].

Además de su unión a ciclinas y CDKs, p21^{Cip1} interacciona con muchas otras proteínas celulares. Algunas de estas interacciones están relacionadas con aspectos de la regulación del ciclo celular, otras con la modulación de la apoptosis, y otras sugieren nuevas funciones para p21^{Cip1} no relacionadas con las anteriores [Dotto et al., 2000].

En las células en proliferación, la fracción de p21^{Cip1} unida a los complejos ciclina/CDK está también unida a PCNA [Zhang et al., 1994]. Esto proporciona un nexo entre los complejos ciclina/CDK y la síntesis de ADN. Es probable que la decisión entre la función de replicación y la de reparación del ADN esté modulada por proteínas específicas de cada proceso [Dotto et al., 2000]. p21^{Cip1} se une a PCNA interfiriendo con la replicación del ADN, pero no con su reparación. Según esto, tras la detección de un daño en el ADN, p21^{Cip1} bloquearía la replicación y favorecería su reparación. Se ha descrito que la unión de p21^{Cip1} a PCNA se regula por fosforilación de su extremo C-terminal. Aunque no se conoce con detalle la actividad de esta región en p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, parece que podría tener una función similar. De hecho, p57^{Kip2} puede unirse a PCNA inhibiendo su actividad. La interacción de p21^{Cip1} con PCNA no afecta ni a su unión con el ADN, ni a la capacidad de éste de desplazarse sobre él, por lo que el efecto inhibitorio de p21^{Cip1} sobre PCNA debe residir en la interferencia con la unión a otras proteínas [Podust et al., 1995]. De hecho existen al menos otras dos proteínas que compiten con p21^{Cip1} por esa misma región de unión a PCNA: Fen 1 (Flap endonuclease 1) y MCMT (DNA-cytosine-5 methyltransferase) [Warbrick et al., 1997; Chuang et al., 1997]. Esto último sugiere que p21^{Cip1} podría tener un papel en la metilación del ADN durante la replicación y la reparación. Otra conexión entre p21^{Cip1} y metilación se encuentra en el hecho de la relación inversa entre los niveles de expresión de p21^{Cip1} y MCMT en células normales y transformadas [Chuang et al., 1997].

En contraste con su papel como inhibidor del ciclo celular, cuando $p21^{Cip1}$ se localiza en el citoplasma promueve la proliferación, supervivencia y transformación celular [Alpan et al., 1996; Asada et al., 1999; Dong et al., 2004; Harper et al., 1993; Tanaka et al., 2002; Zhou et al., 2001].

$p21^{Cip1}$ actúa también como regulador transcripcional reprimiendo el factor de transcripción E2F por interacción directa con él [Dimri et al., 1996; Shiyanov et al., 1996]. Se ha sugerido que $p21^{Cip1}$ podría unirse a otros factores de transcripción además de E2F [Delavaine et al., 1999]. De hecho, $p21^{Cip1}$ se une al extremo N-terminal de c-Myc inhibiendo su asociación con Max, reprimiendo así la transcripción de sus genes diana. A su vez, la interacción de c-Myc con $p21^{Cip1}$ compete con PCNA, inhibiendo la actividad de $p21^{Cip1}$ como modulador de la reparación del ADN. $p21^{Cip1}$ interacciona con otros elementos coactivadores de la transcripción, como p300 y CBP.

GADD45 es una proteína nuclear que se ha relacionado con la inhibición del crecimiento celular, la apoptosis, la estabilidad genómica y la reparación del ADN. GADD45 interacciona con PCNA en una región distinta a la reconocida por $p21^{Cip1}$ y aún así, ambas moléculas compiten por su unión a PCNA. GADD45 y $p21^{Cip1}$ parecen actuar sinérgicamente en la parada del ciclo celular. GADD45 activa a MEKK4 conectando así los procesos de activación de JNKs y apoptosis. $p21^{Cip1}$ se ha relacionado también con vías de modulación de otras proteínas relacionadas con MAPKs como SAPK y MEKK5/ASK1, y podría ser ésta una vía de implicación de dichas moléculas en un mecanismo de modulación de la apoptosis.

La caspasa 3 se encuentra en el citoplasma celular en forma de proenzima (procaspasa 3). La procaspasa 3 se activa por proteólisis tras la estimulación por señales de muerte celular. Se ha visto que $p21^{Cip1}$ se une a la procaspasa 3 bloqueando su activación e inhibiendo la apoptosis. Sorprendentemente, $p21^{Cip1}$

es, a su vez, un sustrato de la actividad proteolítica de la caspasa 3. La proteína p21^{Cip1} procesada –cortada por la caspasa 3– se localiza en el citoplasma y es incapaz de actuar sobre el ciclo de división celular o el proceso de apoptosis.

En ciertos tipos celulares, un desencadenante de la apoptosis parece ser el balance entre SAPK activadas y ERK1/2. p21^{Cip1} es un inhibidor no competitivo de los tres subtipos de SAPKs (α , β y γ) tanto *in vivo* como *in vitro*. Así mismo, p21^{Cip1} puede inhibir la actividad de la quinasa p38, que es, a su vez, un inductor de apoptosis. Además de en apoptosis, las proteínas del grupo SAPKs también están involucradas en procesos de diferenciación y crecimiento celular.

p21^{Cip1} se ha encontrado interactuando con otras proteínas importantes como son la proteína-quinasa CK2 [Gotz et al., 1996], la calmodulina [Taulés et al., 1999], SET –una proteína reguladora con potencial oncogénico– [Estanyol et al., 1999], y el factor de transcripción C/EBP- α [Timchenko et al., 1997]. En el caso de la calmodulina, su interacción con p21^{Cip1} parece ser necesaria para la localización nuclear tanto de p21^{Cip1} como de ciertos complejos ciclina/CDK. Dado que la calmodulina está presente en el núcleo, la posibilidad de un mecanismo de regulación de p21^{Cip1} por competencia parece razonable. C/EBP- α parece interactuar con p21^{Cip1} y promover su estabilización. *ref*

Se ha sugerido que p21^{Cip1} podría tener un papel a modo de adaptador para facilitar la formación de complejos CDK-ciclina [LaBaer et al., 1997], con lo cual, para pasar de un estado activo a inactivo la célula debería incrementar p21^{Cip1}, reducir la expresión de ciclinas, o ambos.

Se ha descrito una variante alélica de *p21^{Cip1}* con actividad proapoptótica [Nozell et al., 2002]. El estudio de los polimorfismos encontrados en p21^{Cip1} y p21B

parece descartar, sin embargo, cualquier vinculación significativa con el desarrollo de tumores.

El acortamiento progresivo de los telómeros tras sucesivas duplicaciones del ADN actúa como un mecanismo de supresión tumoral que es ejercido a través de la vía de p53. Este mismo fenómeno se ha relacionado con el proceso de envejecimiento. Un trabajo reciente señala que ambos efectos se pueden separar, y que el envejecimiento —pero no la supresión tumoral— depende de $p21^{Cip1}$ [Bell *et al.*, 2007].

Por último, $p21^{Cip1}$ también se ha relacionado con el mantenimiento de células madre de queratinocitos y hematopoyéticas. En ausencia de $p21^{Cip1}$, la fracción de queratinocitos con potencial autoregenerativo se incrementa, lo que da lugar a una mayor susceptibilidad a la carcinogénesis química. En células hematopoyéticas, la pérdida de $p21^{Cip1}$ provoca un incremento en la fracción de células madre, lo que, básicamente, mantiene estas células más tiempo en el ciclo de división celular. Si se realizan repoblaciones seriadas de la médula ósea, estas células acaban por perder su potencial autoregenerativo, lo que sugiere que un requisito para el mantenimiento de éste sería una proliferación controlada —o restringida— y/o una marcada resistencia a la apoptosis. Esta situación parece ser distinta para células T maduras en las que la pérdida de $p21^{Cip1}$ aporta una ventaja proliferativa tras una estimulación prolongada.

La importancia de $p21^{Cip1}$ en la regulación del ciclo celular parece indiscutible, aunque las mutaciones en $p21^{Cip1}$ no son, ni mucho menos, un fenómeno habitual en células cancerosas [Shiohara *et al.*, 1994]. Por otro lado, existen trabajos que muestran una correlación entre altos niveles de expresión de $p21^{Cip1}$ y la aparición de mecanismos de resistencia a quimioterapia y radioterapia. En un trabajo en el que se indujo apoptosis, expresión de p53 y expresión de

$p21^{Cip1}$ en cáncer cervical tras radioterapia, se observó que $p21^{Cip1}$ podría ser un supresor de la apoptosis mediada por irradiación en este tipo de cáncer [Niibe *et al.*, 1999].

Regulación de la expresión de $p21^{Cip1}$

Como se ha comentado, p53 es el principal regulador transcripcional de $p21^{Cip1}$. Aún así, existe toda una serie de factores alternativos que pueden promover su expresión en determinadas condiciones. Entre éstos caben destacar: Sp1/Sp3, TGF β , Smads, Ap2, Notch1, STATs, BRCA1, E2F-1/E2F-3, y CAAT/*enhancer binding protein* α y β [Gartel & Tyner, 1999]. Estas proteínas asocian la expresión de $p21^{Cip1}$ con diferentes vías de señalización celular relacionadas con diferenciación, senescencia, y apoptosis. Sin embargo, como también se ha indicado con anterioridad, a pesar de la, en teoría, relevante posición de $p21^{Cip1}$ en el mecanismo de supresión tumoral, la pérdida de expresión de este gen es un fenómeno ciertamente raro en tumores.

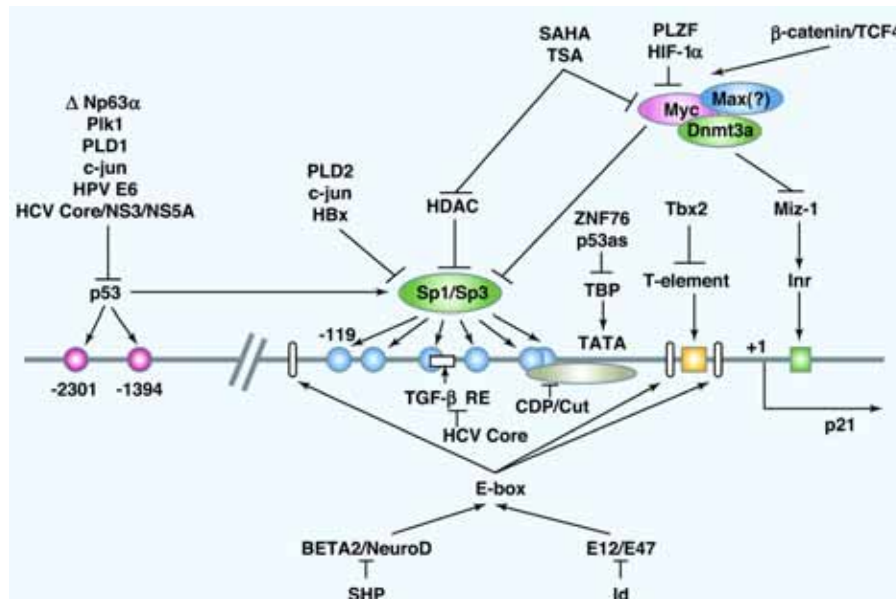


Figura 1.6. Principales mecanismos de regulación transcripcional de $p21^{Cip1}$. Tomado de Gartel & Tyner, 1999.

La regulación de la expresión de $p21^{Cip1}$ no es sólo positiva. $\Delta Np63$, que es una variante de *splicing* de p63, puede reprimir la expresión de $p21^{Cip1}$ en queratinocitos humanos. El mecanismo de represión está basado en la competencia directa con p53 por los sitios de unión al promotor [Westfall et al., 2003]. c-Jun, además de su actividad represora sobre p53, también regula de forma negativa a $p21^{Cip1}$ [Wang et al., 2000]. Otros mecanismos de represión implican la interacción con moduladores positivos. Por ejemplo, la fosfolipasa D2 regula de forma negativa a $p21^{Cip1}$ a través de su interacción con Sp1 [Kwun et al., 2003] y la deacetilasa de histonas 1, que compete con p53 por la unión a Sp1. Otros factores que regulan de manera negativa a $p21^{Cip1}$ incluyen la fosfolipasa D1 [Kwun et al., 2003] y c-Jun [Schreiber et al., 1999].

Otros factores parecen reprimir la transcripción de $p21^{Cip1}$ a través de una interacción con la maquinaria basal de la transcripción. Se ha visto, por ejemplo, que ZNF76 desplaza a TBP del promotor de $p21^{Cip1}$ inhibiendo así su inducción por p53. Así mismo, una forma variante de p53 denominada p53as (*p53 alternatively spliced*) que induce la transcripción de $p21^{Cip1}$ a través de los mismos sitios usados por p53 es capaz también de reprimir su transcripción por un mecanismo similar. En este caso, la capacidad de TBP de unirse a la región del promotor de $p21^{Cip1}$ se ve también disminuida en presencia de p53as. Debido a que el factor TBP es necesario para la transcripción de prácticamente todos los genes eucariotas, resulta difícil encontrar cual es el medio a través del cual se alcanza la especificidad por este mecanismo.

Existen otros factores que reprimen la transcripción de $p21^{Cip1}$ por unión directa a su promotor. Por ejemplo, Tbx2 que se encuentra sobreexpresado en algunas líneas celulares derivadas de tumores de mama. Más aún, la inactivación parcial de *Tbx2* da lugar a una sobreexpresión de $p21^{Cip1}$. Otros dos factores de

transcripción que reprimen la expresión de $p21^{Cip1}$ son Runx-1 y Runx-2. Mientras que Runx-1 se asocia con mSin3A como mecanismo de represión de $p21^{Cip1}$, Runx-2 interacciona con la deacetilasa de histonas 6. Otro factor que reprime $p21^{Cip1}$ por unión directa al ADN es la proteína de dominios homeóticos CDP/Cux. Se sabe que la transcripción de $p21^{Cip1}$ puede ser reprimida por CDP/Cux mediante su unión con la región del promotor comprendida entre las posiciones -60 y -35. También se ha demostrado que la presencia de G9a, una metiltransferasa, en el promotor es necesaria en este mecanismo. Existe una isoforma de CDP/Cux que también reprime la expresión de $p21^{Cip1}$. Esta isoforma se ha encontrado sobreexpresada en tumores de mama, pero su expresión en tejido mamario normal es muy baja. En este sentido, se ha encontrado que la sobreexpresión de $p21^{Cip1}$ en tumores de mama y su localización citoplasmática se relaciona con un mal pronóstico del tumor y una mayor resistencia a la quimioterapia.

El control epigenético de la transcripción de $p21^{Cip1}$ parece ser un mecanismo de regulación negativa y así se ha podido observar en varios tipos tumorales. Por ejemplo, en rhabdomyosarcomas el elemento de respuesta a STATs presente en la región promotora de $p21^{Cip1}$ se encuentra hipermetilado. En la línea celular H719 (cáncer de pulmón), se han encontrado metiladas islas CpG próximas al sitio de unión de Sp1/Sp3. En un estudio sobre leucemia linfoblástica, el 41% de los casos mostró hipermetilación del promotor de $p21^{Cip1}$ en muestras obtenidas de médula ósea. Se ha observado que el tratamiento de células que presentan hipermetilación del promotor de $p21^{Cip1}$ con un inhibidor de la ADN metiltransferasa (5-aza-2'-deoxicitidina) restaura la expresión de $p21^{Cip1}$. Esta correlación negativa entre la actividad de la ADN metiltransferasa y la expresión de $p21^{Cip1}$ está de acuerdo con la participación de Dnmt3a en la represión de $p21^{Cip1}$ mediada por c-Myc.

Un miembro de la familia de proteínas inhibidoras del crecimiento, p47ING1a, que normalmente actúa como un regulador negativo de la proliferación

celular, tiene la capacidad de reducir los niveles de $p21^{Cip1}$ en contraste con otros miembros de la misma familia que generalmente los elevan. Se sabe que *Rac1* y *RhoA* pueden reprimir la transcripción de $p21^{Cip1}$.

Interacción con otras vías de supresión tumoral

Existen dos vías principales de supresión tumoral: la vía de *p53* y la vía de *pRb*. En principio, parecían dos vías independientes reguladas por estímulos específicos: presencia de mitógenos, activación de oncogenes, estrés celular, daño en el ADN, etc. Pero en la práctica, estos estímulos se integran generando una respuesta coordinada. Por ejemplo, la señalización por mitógenos actúa a través de complejos ciclina/CDK, pero a la vez, se generan señales adicionales, como la activación de *p53*, *p73* y $p21^{Cip1}$ que proporcionan un segundo nivel de regulación. El factor de transcripción *E2F-1* activa $p19^{Arf}$, que a su vez estabiliza *p53*. *E2F-1* también es capaz de activar la transcripción de *p73*, que puede activar la de $p21^{Cip1}$ en determinados tipos celulares. En último término, $p21^{Cip1}$ inhibe la liberación de *E2F-1* de sus complejos con *pRb*, lo que resulta en un mecanismo de retroinhibición. En algunos tejidos, *E2F-1* promueve directamente la expresión de $p21^{Cip1}$. A diferencia de *Trp53*, $p19^{Arf}$ y *pRb*, las mutaciones en $p21^{Cip1}$ y *p73* no son, en absoluto, frecuentes en tumores.

Además de su común inactivación por oncoproteínas virales, los supresores de tumores *p53* y *pRb* no se presuponían conectados. Sin embargo, en la última década, se han podido descifrar varios mecanismos a través de los cuales estas vías se relacionan. Los puntos de contacto existentes entre *p53* y *pRb* afectan principalmente a la regulación del tránsito entre G1 y S, con el factor de transcripción *E2F* como principal protagonista. Por ejemplo, tras un daño en el ADN, la proteína $p21^{Cip1}$ –inducida por *p53*– interacciona con los complejos ciclina A/Cdk2 y ciclina E/Cdk2, que a su vez fosforilan a *pRb*, llevando a la activación de *E2F*. De forma parecida, la inducción de $p19^{Arf}$ por *E2F-1* antagoniza con la

capacidad de Mdm2 para inducir la degradación de p53, lo que conlleva la estabilización de esta proteína.

Abundando en esta interacción, existen resultados que apuntan hacia una implicación directa del estatus de pRb en el resultado final de la activación de p53 en la célula, protegiendo a ésta, por ejemplo, de la apoptosis tras su sobreexpresión [Haas-Kogan *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1999], o decantando la parada del ciclo promovida por p53 hacia el lado de la apoptosis cuando se inhibe su actividad [Gottlieb *et al.*, 1998].

Otro punto de conexión entre las dos principales vías de supresión tumoral lo constituye el locus *Ink4a*, desde el que se transcriben dos de los principales reguladores positivos de pRb y de p53: p16^{Ink4a} y 19^{Arf}.

El análisis de expresión génica mediante *microarrays* ha puesto de manifiesto la gran relación funcional existente entre diferentes vías de señalización oncogénicas y de supresión tumoral. Así, la pérdida de la proteína p19^{Arf} podría considerarse equivalente –funcionalmente– a la pérdida de p53, y la sobreexpresión de la ciclina D1 equivaldría a la inactivación funcional de pRb. Según esto, y debido a la complejidad de estas vías de regulación y las particularidades específicas de cada tejido, la heterogeneidad de las alteraciones moleculares que presentan distintos tipos de cáncer podría ser más aparente que real.

Parece claro, según todo lo expuesto, que las vías de señalización no deben verse como una sucesión lineal de interacciones moleculares sino como verdaderas redes moleculares. La pérdida de pRb dará lugar a la activación de E2F, que a su vez induce la expresión de p19^{Arf} y, por lo tanto, la estabilización de p53. Por otro

lado, $p21^{Cip1}$, uno de los principales efectores de p53, bloquea la fosforilación de pRb manteniendo así la represión sobre E2F. Ya que $p21^{Cip1}$ se encuentra regulado positivamente por p53 y negativamente por pRb, éste podría ser un punto de equilibrio importante entre ambas vías en determinadas situaciones y/o tipos celulares.

2

Objetivos

2.1. Antecedentes e hipótesis

La complejidad de la ruta de señalización iniciada por p53 es ciertamente grande. Tanto su interacción con otras importantes vías de señalización celular, como la modulación individual de la actividad de los genes que responden a su activación, aportan posibilidades adicionales de regulación que permitirían integrar las informaciones procedentes del contexto molecular y el tipo celular. La proteína p21^{Cip1} es uno de los principales efectores de dicha respuesta. Aunque *a priori* pudiese pensarse que p21^{Cip1} no juega un papel relevante –o no se expresa en absoluto– en ausencia de p53, lo cierto es que sí lo hace [MacLeod et al., 1995] y hay evidencias experimentales que apoyan la idea de que p21^{Cip1} podría desempeñar actividades importantes con independencia de p53 en determinados tipos celulares.

A partir de una serie de resultados obtenidos anteriormente por nuestro laboratorio, en los que se pone de manifiesto la relevancia de p21^{Cip1} en el desarrollo de linfomas tímicos en ratón, parece que el linfocito T podría ser uno de los tipos celulares en los que el estatus de p21^{Cip1} podría ser sumamente importante por sí solo.

La hipótesis central del presente trabajo se construyó en torno a dichos resultados preliminares, y podría resumirse en la siguiente pregunta: ¿Podría tener p21^{Cip1} una actividad *oncogénica* en el desarrollo de linfomas T en ratón? Esta actividad contrastaría de forma clara con su actividad comúnmente aceptada como supresor de tumores.

2.2. Objetivos

En base a la principal hipótesis de trabajo esbozada anteriormente, los objetivos concretos de esta tesis son los que a continuación se enuncian:

1. Obtención de un ratón doble mutante para los genes *Trp53* y *p21^{Cip1}* en un fondo genético homogéneo (C57BL/6J) y estudio de su viabilidad y principales características fenotípicas.
2. Determinación y análisis comparativo del espectro tumoral de ratones mutantes nulos para *p21^{Cip1}*, *Trp53*, dobles mutantes y distintas combinaciones en heterocigosis.
3. Estudio de la susceptibilidad al desarrollo de linfomas tímicos inducidos por tratamiento con radiación γ en ratones deficientes para *p21^{Cip1}*, *Trp53*, y mutantes dobles en el fondo genético susceptible C57BL/6J, en comparación con los ratones de la cepa consanguínea control.
4. Estudio de la expresión de *p21^{Cip1}* en linfomas tímicos desarrollados tanto de forma espontánea como inducida en ratones mutantes nulos para *Trp53* y controles.
5. Análisis comparativo de los niveles de apoptosis y niveles de expresión de *p21^{Cip1}* en muestras de los tumores obtenidos en los apartados 2 y 3 con especial atención a los linfomas tímicos.
6. Estudio de características proliferativas básicas de fibroblastos embrionarios (MEFs) obtenidos de los distintos modelos.

3

Materiales y métodos

3.1. Modelos animales

La influencia que el fondo genético puede tener sobre el fenotipo de un modelo murino de cáncer aconseja que los análisis comparativos, sobre todo los relativos a incidencias y latencias, se lleven a cabo en animales con fondos genéticos, si no idénticos, sí al menos equivalentes. Con el objeto de eliminar en la medida de lo posible esta posible distorsión en la interpretación de los datos, los modelos animales utilizados en la presente tesis doctoral se llevaron a un fondo congénico C57BL/6J. Además, este fondo genético resulta especialmente adecuado para los estudios de inducción de linfomas tímicos mediante irradiación γ [Saito et al., 2001, Villa-Morales et al., 2006]. El proceso de generación de animales congénicos consistió en retrocuzar parentales híbridos para cada una de las mutaciones estudiadas (que estaban en fondo 129S2) con parentales puros C57BL/6J. Tras 10 cruces de este tipo, la contribución del fondo genético C57BL/6J se habría elevado hasta un 99.9% (los animales resultantes serían isogénicos para el 99.9% de sus *loci*). Para el primer cruce se utilizaron siempre mutantes heterocigotos hembra, seleccionándose a continuación siempre machos para las siguientes generaciones. Con esto se pretendía fijar el cromosoma Y del fondo genético deseado ya en el primer cruce.

Backcross	% C57BL/6J	% 129S2
N1	50.0	50.0
N2	75.0	25.0
N3	87.5	12.5
N4	93.75	6.25
N5	96.875	3.125
N6	98.4375	1.5625
N7	99.21875	0.78125
N8	99.60938	0.390625
N9	99.80469	0.195313
N10	99.90234	0.097656

Figura 3.1. Aumento del porcentaje de fondo genético C57BL/6J (y disminución por lo tanto del de 129S2) en función del número de retrocruzamientos sucesivos (N, backcross).

Ratones nulos para $p21^{Cip1}$

Los ratones mutantes nulos para el gen $p21^{Cip1}$ se obtuvieron del laboratorio del Dr. Gregg J. Hannon (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, EEUU) quien amablemente cedió al Dr. Manuel Serrano (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid) varias parejas de éstos con el objeto de establecer una nueva colonia. Inicialmente, el fondo genético de estos ratones era una mezcla heterogénea (F2) de, al menos, dos estirpes consanguíneas de ratón: C57BL/6J y 129S2/SvPas (procedentes de la línea de células madre embrionarias D3) [Brugarolas *et al.*, 1995]. La línea de ratón obtenida inicialmente por medio del Dr. Gregg Hannon se encuentra hoy en día disponible comercialmente (The Jackson Laboratory) bajo la denominación B6;129S2- $Cdkn1a^{tm1Tyj}/J$ (stock ID: 003263).

Ratones nulos para $Trp53$

Los ratones mutantes nulos para el gen $Trp53$ se obtuvieron de un proveedor comercial (The Jackson Laboratory, B6.129S2- $Trp53^{tm1Tyj}/J$, stock ID: 002101). Estos ratones eran ya congénicos en fondo genético C57BL/6J de la línea inicialmente generada por el Dr. Tyler Jacks [Jacks *et al.*, 1994]. La mutación original se obtuvo en un fondo genético 129S2/SvPas aportado por la línea de células madre embrionarias D3.

Ratones nulos para $p21^{Cip1}$ $Trp53$

Con el objeto de crear el modelo de ratón doble deficiente para los genes $p21^{Cip1}$ y $Trp53$ se cruzaron ratones mutantes nulos sencillos para cada uno de ellos (ratones mutantes homocigotos para $Trp53$ con hembras mutantes homocigotas para $p21^{Cip1}$). En una primera generación se obtuvieron ratones heterocigotos para ambos *loci*, que volvieron a cruzarse entre sí de forma aleatoria para obtener dobles mutantes. A partir de un tamaño crítico, la colonia se mantuvo cruzando machos dobles mutantes con hembras mutantes

homocigotas para $p21^{Cip1}$ y heterocigotas para $Trp53$, con lo cual, la frecuencia esperada de ratones mutantes dobles homocigotos en la descendencia de cada cruzamiento era siempre del 50%. Esto ayudó a simplificar el posterior análisis de viabilidad, mortalidad embrionaria y mortalidad perinatal.

Nota. Con el objetivo de simplificar la notación de las líneas de ratón, en adelante se utilizará un nombre abreviado para cada una de ellas.

B6.129S2- $Trp53^{tm1Tyj}/J$	p53KO
B6;129S2- $Cdkn1a^{tm1Tyj}/J$	p21KO
B6;129S2- $Cdkn1a^{tm1Tyj} Trp53^{tm1Tyj}/J$	p21p53dKO

3.2. Análisis genético

3.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN para los análisis genotípicos se realizó a partir de un fragmento de aproximadamente 5 mm de tejido de la cola de ratón (vértebras coccígeas). La muestra se obtuvo de ratones de alrededor de 4 semanas de edad. Para la purificación de ADN genómico se siguió el siguiente protocolo:

1. Añadir 0.5 ml de solución de Proteinasa K (480 μ l de PK buffer + 20 μ l de PK stock 10 mg/ml) a la muestra de tejido e incubar a 55° C durante toda la noche con agitación.
2. Añadir 0.5 ml de fenol/cloroformo (1:1). Mezclar bien con el vórtex, y centrifugar durante 5 minutos a 15.000 rpm.
3. Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio, evitando tocar la interfase.

4. Precipitar el ADN añadiendo 0.5 ml de etanol absoluto frío y mezclar suavemente invirtiendo el tubo varias veces (el precipitado debería hacerse visible inmediatamente). Posteriormente, centrifugar 7 minutos a 15.000 rpm.
5. Retirar la fase líquida, añadir 300 µl de etanol 70% frío para lavar el pellet de ADN y, sin mezclar ni agitar, retirar otra vez el líquido.
6. Dejar secar el pellet con el tubo abierto, durante 5 minutos.
7. Resuspender en 100 µl de buffer Tris EDTA, con agitación. Por lo general, estas preparaciones tienen una concentración de ADN de aproximadamente 100 ng/µl.
8. Finalmente, la solución de ADN se conserva a 4° C separando dos alícuotas por seguridad.

3.2.2. Determinación genotípica del alelo p21^{Cip1}

La determinación del genotipo se llevó a cabo mediante amplificación de las secuencias génicas de interés mediante PCR. La secuencia de los oligos se tomó directamente de [Brugarolas *et al.*, 1995]. Las condiciones de reacción empleadas se detallan más adelante.

Determinación del alelo salvaje (~900 bp):

oligo p21+116F: 5'-AAG-CCT-TGA-TTC-TGA-TGT-GGG-C-3'

oligo p21-135: 5'-TGA-CGA-AGT-CAA-AGT-TCC-ACC-G-3'

Determinación del alelo mutante nulo (~750 bp):

oligo p21+116F 5'-AAG-CCT-TGA-TTC-TGA-TGT-GGG-C-3'

oligo Neo 19+ 5'-GCT-ATC-AGG-ACA-TAG-CGT-TGG-C-3'

3.2.3. Determinación genotípica del alelo *Trp53*

Se realizó como en el caso anterior con las secuencias de oligos tomadas del artículo de Jacks et al [*Jacks et al., 1994*]. Las condiciones de la reacción se detallan más adelante.

Determinación del alelo salvaje (~400 bp):

oligo IMR036 5'-ACA-GCG-TGG-TGG-TAC-CTT-AT-3'

oligo IMR037 5'-TAT-ACT-CAG-AGC-CGG-CCT-3'

Determinación del alelo mutante nulo (~600 bp):

oligo IMR037 5'-TAT-ACT-CAG-AGC-CGG-CCT-3'

oligo IMR038 5'-CTA-TCA-GGA-CAT-AGC-GTT-GG-3'

3.2.4. Condiciones de la reacción de amplificación

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en termocicladores de los modelos 2700 y 9700 de Perkin Elmer. Para la reacción de PCR se utilizó la siguiente mezcla (volumen final 25 μ l):

MgCl ₂	1.5 mM
TaqPol buffer	1x
dNTPs	200 μ M
TaqPol (Perkin Elmer)	0.25-0.5 U
cada oligo	0.4 μ M
DNA molde	100 ng

Condiciones de amplificación (pasos):

1. 94° C 3 minutos
2. 94° C 1 minuto
3. 64° C 1 minuto
4. 72° C 2 minutos
5. volver al paso 2 y completar 39 ciclos
6. 72° C 10 minutos (extensión final)
7. Amplificación finalizada. Mantener a 4° C

3.2.4. Análisis electroforético

Los productos de PCR se mezclaron con un tampón de carga que contenía 30% glicerol, 25% (p/v) de xilencianol y 25% (p/v) de azul de bromofenol. Se utilizaron geles de agarosa (Pronadisa) de baja electroósmosis (DEO) y *low melting* (LM) en porcentajes variables (1,5% - 3%). En todos los casos se aplicó una corriente de 100mA. La visualización de los fragmentos se realizó mediante un transiluminador al excitar con luz ultravioleta el bromuro de etidio incluido en el gel.

3.3. Estudios in vivo

3.3.1. Manejo y control de los ratones

Durante el desarrollo del estudio, los ratones se mantuvieron en cubetas de material plástico (policarbonato) con un sistema de ventilación individual y presión diferencial positiva dentro de la cubeta (Sealsafe™, Tecniplast). La colonia se mantuvo dentro de una zona de barrera libre de gérmenes patógenos específicos para ratón (SPF). La colonia fue analizada con una frecuencia

trimestral con el objeto de descartar la presencia de microorganismos patógenos, no se encontró ningún problema significativo durante el tiempo que duró el estudio. El manejo de los animales (excepto para los procedimientos terminales) se realizó en una cabina de flujo laminar presurizada positivamente con respecto a la habitación.

3.3.2. Determinación del punto final y toma de muestras

La determinación del punto final de los experimentos es muy importante en estudios de carcinogénesis. Además de poseer un indudable componente ético, una determinación del punto final basada en la valoración de parámetros y el establecimiento de criterios que reduzcan al máximo la interpretación subjetiva es especialmente importante cuando se estudian latencias de aparición de tumores en distintos mutantes. La decisión del momento de la eutanasia (*i.e.* punto final del experimento) de los ratones se hizo sobre la base de los síntomas observados, la condición corporal, y el tamaño del tumor (cuando esto fue posible). Se siguieron las recomendaciones publicadas por el UKCCCR (*United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research*) y el CCAC (*Canadian Council on Animal Care*).

Los ratones se observaron diariamente. En caso de encontrarse signos o síntomas de enfermedad se procedió a decidir sobre el punto final del experimento. Una vez determinado el punto final del experimento los ratones fueron sacrificados siguiendo las recomendaciones de la AVMA (*American Veterinary Medical Association*) y se realizó un protocolo sistemático de necropsia. El procedimiento de eutanasia se llevó a cabo en una cámara diseñada especialmente en la que se introdujo una concentración creciente de CO₂, de acuerdo también con las directrices europeas e internacionales.

Durante la necropsia se realizó una descripción detallada de los hallazgos patológicos y se tomaron muestras representativas tanto de los tejidos acordados

previamente, como de las lesiones observadas. Las muestras se fijaron en formaldehído al 10% tamponado con PBS (Sigma-Aldrich). Tras un período de entre 24 y 48 horas en la solución fijadora, se procedió al tallado de las muestras que fueron incluidas en parafina sintética (Paraplast Regular, Sigma-Aldrich) mediante un procesador automático de tejidos (modelo ASP200, Leica). La elaboración de bloques se realizó en una estación automatizada (modelo EG1160, Leica) dotada de dispensador de parafina, consola térmica y crioconsola. Se realizaron cortes a 4-5 μm de grosor, en un microtomo automático (modelo RM2255, Leica), que fueron posteriormente desparafinados en xilol (Sigma-Aldrich), hidratados en una serie decreciente de alcoholes y teñidos con hematoxilina y eosina en un teñidor automático (modelo Autostainer XL ST5010, Leica).

3.3.3. Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de los modelos objeto del presente estudio se llevó a cabo principalmente por el seguimiento de ciertos parámetros físicos, biológicos y clínicos, del desarrollo embrionario y de las incidencias y latencias tumorales. El fenotipo observado tras estos estudios preliminares se completó con la derivación de fibroblastos embrionarios y el análisis de sus características proliferativas *in vitro*. Se siguió, por ejemplo, la evolución del peso y el crecimiento de los ratones mutantes durante los primeros 3 meses de desarrollo, se realizó un análisis rutinario tanto hematológico como de bioquímica clínica básica a las 4 y a las 8 semanas de edad, se recogieron los parámetros reproductivos de los distintos genotipos, etc. Además, se prestó una especial atención a la observación clínica diaria de los animales.

El fenotipo tumoral fue, en su mayor parte, puesto de manifiesto a partir de signos clínicos y posteriormente confirmado mediante la caracterización histopatológica de las muestras recogidas.

3.4. Estudio histopatológico

3.4.1. Caracterización histopatológica e iconografía

El ratón es probablemente el modelo experimental más interesante para estudiar las enfermedades neoplásicas humanas, pero es obligado señalar que existen diferencias importantes entre ambas especies y que ciertas neoplasias de ratón no tienen un equivalente directo en patología humana y viceversa. Aún así, la clasificación de tumores que se ha seguido en la presente tesis doctoral se ciñe a las recomendaciones internacionales más recientes que tienden a unificar, en la medida de lo posible, la clasificación de neoplasias en ambas especies. Se ha seguido la clasificación realizada por la IARC de la OMS (*International Agency for Research on Cancer*, Organización Mundial de la Salud) para los tumores de ratón, publicada en el año 2001 [Mohr et al., 2001], y se han tomado en consideración las propuestas de clasificación realizadas por el subcomité del MMHCC [*Mouse Model of Human Cancers Consortium*].

3.4.2. Técnicas inmunohistoquímicas

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron en secciones de tejidos de unos 4 µm montadas sobre portaobjetos previamente tratados con VECTABOND™ (Vector Laboratories) y mediante el método de la estreptavidina-biotina-peroxidasa que a continuación se describe:

- 1.** Desparafinado e hidratación de las muestras.
- 2.** Inhibición de la peroxidasa endógena mediante una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 3.** Lavar con TBS, 5 minutos (repetir 3 pases).
- 4.** Como pretratamientos, se emplearon distintos protocolos:

- 4.1.** Calor para desenmascarar el antígeno utilizando el microondas (100° C) durante 15 minutos con una solución de tampón citrato 10 mM (pH=6,0). En ciertos casos se realizó un pretratamiento con tripsina (Sigma) al 0.1% en una solución de CaCl₂ a 37° C durante 10 minutos.
- 4.2.** Tratamiento con *Mouse on Mouse*TM (Vector Laboratories), sistema de bloqueo para el empleo de anticuerpos primarios de ratón sobre tejidos de ratón.
- 5.** Tres lavados en TBS, de 5 minutos cada uno.
 - 6.** Aplicación del anticuerpo primario e incubación a 4° C durante 18 horas.
 - 7.** Tres lavados en TBS, de 5 minutos cada uno.
 - 8.** Incubación con el segundo anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - 9.** Tres lavados en TBS, de 5 minutos cada uno.
 - 10.** Incubación con estreptoavidina conjugada con peroxidasa, diluida 1:20 en TBS (Zymed Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - 11.** Tres lavados en TBS, de 5 minutos cada uno.
 - 12.** Revelado mediante adición del cromógeno 3-3'-diaminobencidina tetrahidrocloridrato (Sigma Chemical) diluido al 0.002% en TBS, con un 0.01% de peróxido de hidrógeno, a temperatura ambiente y tiempo variable controlado al microscopio.
 - 13.** Tinción de contrastes con hematoxilina de Harris durante 1 minuto, lavado, deshidratación y montaje.

3.4.3. Anticuerpos utilizados

Monoclonales:

- Ratón anti-p21 (F-5, Santa Cruz Biotechnology, 1:50).
- Rata anti-CD45R/B220 (Southern Biotechnology, 1:100).
- Rata anti-F4/80 (BMA Biomedicals AG, 1:20).
- Rata anti-MOMA-1 (BMA Biomedicals AG, 1:50).
- Rata anti-ER-MP 23 (BMA Biomedicals AG, 1:50).
- Rata anti-CD11b (Chemicon International, 1:20).
- Ratón anti-desmina humana (Sigma, 1:100).

Policlonales:

- Conejo anti-p21 humano (C-19, Santa Cruz Biotech., 1:50).
- Conejo anti-CD3 humano (Dako, 1:100).
- Conejo anti- α -1-antitripsina humana (Dako, 1:1000).
- Cabra anti-vimentina humana (Dako, 1:20).
- Conejo anti-factor VIII humano (Dako, 1:200).

Secundarios:

- Conejo anti-IgG de rata biotinilado y conejo anti-IgG de ratón biotinilado (Vector Laboratories, 1:400) para anticuerpos monoclonales.
- Cabra anti-IgG de conejo biotinilado (Vector Laboratories, 1:400) para anticuerpos policlonales.

3.5. Estudios *in vitro* (MEFs)

3.5.1. Fibroblastos embrionarios murinos (MEFs)

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) para los ensayos *in vitro* se obtuvieron según el siguiente protocolo:

- 1.** Sacrificar las hembras de los genotipos adecuados a los 12-13 días de gestación en un medio estéril. Extraer los cuernos uterinos y transferir a una placa de Petri (P150) estéril que contenga PBS más estreptomina/penicilina (PBS + P/E, Sigma-Aldrich).
- 2.** Extraer los embriones y transferir a una placa limpia. Lavar en PBS + P/E y transferir a una segunda placa.
- 3.** Retirar la cabeza y las vísceras de los embriones con unas pinzas estériles y transferirlos a placas de Petri P60 individuales con PBS + P/E.
- 4.** Trocear los tejidos con unas pinzas finas y resuspender utilizando una pipeta de 5 ml. Repetir hasta que el tejido tenga el aspecto de una suspensión celular.
- 5.** Recoger la suspensión, centrifugar (270 g, 5 minutos) y añadir 1ml de Tripsina/EDTA (2.5 g/l Tripsina + 0.2 g/l EDTA·4Na, Sigma-Aldrich).
- 6.** Incubar a 37° C durante al menos 5 minutos.
- 7.** Una vez transcurrido el tiempo de incubación, inactivar la solución de Tripsina/EDTA con un volumen equivalente de medio de cultivo para MEFs (DMEM-Glutamina 4mM + 15% FBS, Gibco). Mezclar bien el homogenizado con una pipeta para dispersar las células por la placa.

8. Sembrar la suspensión en placas de Petri P100 e incubar a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas.
9. Cambiar el medio y retirar los restos de tejido.
10. Cuando las células alcancen una confluencia de un 90%, diluir 1:5 para expandir o congelar. En este punto las células se considerarán como pase cero.

3.5.2. Tratamientos con radiación γ

Las células (MEFs) fueron sometidas en todos los casos a una única dosis de radiación γ (6 Gy) en un irradiador con fuente de ¹³⁷Cs, modelo MARK I-30 (Shepherd & associates, USA) a un ritmo de 1.14 Gy/minuto. Previamente, estas células se habían sincronizado por privación de factores de crecimiento. Tras la irradiación, se cambió el medio de cultivo y se dejaron crecer hasta un 90% de confluencia.

3.5.3. Medida de la proliferación celular *in vitro*

Se sembraron 10⁶ células en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino en placas de 10 cm de diámetro. Cada tres días, se contó el número de células por placa, volviéndose a sembrar 10⁶ en las mismas condiciones. El procedimiento se repitió 25 veces. El número de duplicaciones de la población (PDL: *population doubling level*) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{PDL} = \log(n_f/n_o) / \log 2$$

n_o: número inicial de células.

n_f: número final de células.

3.5.4. Proliferación celular *sin adhesión a sustrato*

La proliferación celular posee una característica peculiar: las células dependen de su unión a una matriz extracelular para proliferar –con la notable excepción de las células hematopoyéticas–. Las células mesenquimales no unidas

a un sustrato no proliferan aún cuando en el medio existan factores de crecimiento adecuados. En contraste con esta característica, muchas células transformadas pierden esta propiedad y proliferan de manera independiente de la matriz extracelular. La pérdida de este fenotipo –adhesión a la matriz extracelular– se relaciona con la capacidad de las células de formar tumores en animales [Shin et al., 1975]. En fibroblastos de ratón existe una relación directa entre la unión a la matriz extracelular y el progreso del ciclo celular mediante la expresión de ciclina A y ciclina D1. Desde hace tiempo se conoce la implicación de la vía de señalización p53/p21^{Cip1} en la inhibición del crecimiento celular sin adhesión a placa [Wu et al., 1997].

En el presente trabajo, la propiedad de MEFs de diferentes genotipos de crecer sin adhesión a un sustrato se determinó en base a su capacidad de formar colonias en *soft-agar*. Se resuspendieron 10^4 células en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino que contenía un 0.3% agarosa de bajo punto de fusión (LMP agarose, BioRad). Una vez homogeneizada la suspensión, se sembró en placas P6 tapizadas con agarosa LMP al 0.5% en medio completo. Las placas se mantuvieron en un incubador durante 14 días a 37° C, añadiendo 1 ml de medio completo conteniendo un 0.3% de agarosa LMP una vez a la semana. Una vez transcurrido el periodo de incubación (14 días) se observó la presencia de colonias al microscopio.

3.5.5. Ensayo de formación de colonias

La habilidad de los fibroblastos embrionarios de crecer una vez que el cultivo ha llegado a un estado de confluencia se determinó por la capacidad de crear colonias en cultivos adheridos a un sustrato. Para ello, se sembraron 6×10^3 células en una placa de 10 cm de diámetro en medio DMEM completo y se mantuvieron en un incubador a 37° C durante 14 días cambiando el medio de cultivo cada tres. Una vez transcurrido el período de incubación las células se fijaron a la placa con etanol frío, se tiñeron con cristal violeta al 1% y se cuantificó la presencia de colonias de más de un mm de diámetro.

3.5.6. Formación de tumores en trasplantes *in vivo*

En un ensayo destinado a comprobar la capacidad de los fibroblastos embrionarios de formar tumores *in vivo*, se inocularon subcutáneamente MEFs obtenidos de los distintos modelos estudiados en el presente trabajo.

Para ello, se tomaron MEFs a pase 0 y se expandieron en cultivo según los métodos descritos anteriormente, cuando los cultivos alcanzaron un 80-90% de confluencia, las células se resuspendieron dividiéndolas en alícuotas de 10⁶ células que fueron inoculadas por vía subcutánea en los flancos de ratones BALB/cJ-*nu/nu* (Charles River Laboratories, Francia). El desarrollo de tumores se siguió mediante la observación de cambios en el lugar de inoculación. Los ratones se observaron diariamente y durante, al menos, 30 días.

3.5.7. Inestabilidad cromosómica en MEFs

La inestabilidad cromosómica se estudió en fibroblastos embrionarios derivados de ratones B6-p21KO, B6-p53KO y B6-p21p53dKO sometidos a una única dosis de radiación γ (6 Gy). Previamente, estas células se habían sincronizado por privación de factores de crecimiento. Tras la irradiación, se cambió el medio y se dejaron crecer hasta un 90% de confluencia.

La preparación de metafases para el análisis cromosómico se llevó a cabo según un protocolo convencional que incluye la fijación de células con una solución metanol/acético (3:1). Tras este tratamiento se prepararon muestras en portaobjetos y se hibridaron utilizando el método de SKY (*Spectral Karyotyping*) según las recomendaciones del fabricante (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha-Emck, Israel). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio Zeiss Axioplan (Zeiss) dotado con una cámara SD300 Spectra cube (Applied Spectral Imaging) utilizando un filtro óptico SKY-1 (Chroma Technology, Brattleboro, VT). Se capturaron como mínimo 25 metafases de cada placa de cultivo. Una anomalía cromosómica estructural fue considerada clonal en caso de presentarse en dos o más células. En el caso de una aberración numérica, para ser considerada una alteración clonal, esta debía observarse en tres o más células.

3.6. Análisis de proteínas

3.6.2. Cuantificación de proteínas	77
3.6.3. Western blot	77

3.6.1. Extracción de proteínas

1. Tomar 10 mg de tejido congelado (-80° C).
2. Lavar la muestra con PBS y trocear finamente (puede ser necesario el uso de un homogenizador de tejidos).
3. Añadir tampón de lisis frío (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 5 mM Na₂P₂O₇, 1 mM Na₂VO₄, and 50 mM NaF). Añadir un cóctel de inhibidores de proteasas (Boehringer Mannheim). Mezclar con vórtex.
4. A partir de este punto mantener las muestras a 4° C.
5. Dejar las muestras en hielo durante 30 minutos y mezclar ocasionalmente.
6. Centrifugar a 10,000 rpm 15 minutos a 4° C.
7. Recoger el sobrenadante con cuidado de no tocar el pellet.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y guardar a -80° C.

*Cóctel de inhibidores de proteasas (100X):

PMSF, 5mg (50 µg/ml).

Aprotinin, 100 µg (1 µg/ml).

Leupeptin, 100 µg (1 µg/ml).

Pepstatin, 100 µg (1 µg/ml).

3.6.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó utilizando un kit comercial basado en el método Bradford (Bio-Rad). Se siguieron las recomendaciones del fabricante sin introducir ninguna modificación.

3.6.3. Western blot

Se tomaron 30 µg de proteína y se añadió 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 2.5% L-mercaptoetanol, posteriormente, la muestra se calentó a 100° C durante 5 minutos. Las muestras así desnaturalizadas, se cargaron en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida al 15%, utilizándose un tampón compuesto por 2.5 x 10⁻² M Tris-HCl pH 8.3, 1.92 x 10⁻¹ M glicina, 0.1% SDS. Una vez corrido el gel, se electrotransfirió (5 mA/cm²) a una membrana PVDF (Bio-Rad) utilizándose un tampón de transferencia compuesto por 2.5 x 10⁻² M Tris-HCl pH 8.3, 1.92 x 10⁻¹ M glicina y 20% de metanol. Las membranas se incubaron con una solución de leche desnatada al 10% en PBS, y posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-p21 (Oncogene Science, USA), diluido en 1 x 10⁻² M Tris-HCl pH 8.3, 5 x 10⁻¹ M NaCl (TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavó en TBS con Tween 20 al 0.05% (TTBS). El período de incubación con el anticuerpo secundario unido a biotina se llevó a cabo en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo, la membrana se lavó con TTBS y se incubó con el complejo streptavidina-fosfatasa alcalina. El sustrato utilizado fue NBT/BCIP. La membrana se trató durante 30 minutos a 50°C con una solución (100mM 2-mercaptoetanol; 2% SDS; 62.5 mM Tris pH 6.7). Posteriormente, se lavó la membrana en abundante PBS-T dos veces 10 minutos cada vez y se sumergió en solución de bloqueo durante una hora. Una vez lavada, la misma membrana se trató con un anticuerpo monoclonal anti β-actina (dilución 1:1000, AC-15 Sigma) como control de la cantidad de proteína en el gel.

3.7. Evaluación de los niveles de apoptosis

3.7.1. Cuantificación de caspasa 3

La cuantificación de la fracción de células en apoptosis en tejidos se realizó mediante una tinción inmunohistoquímica destinada a poner de manifiesto la forma activa de la caspasa 3. El corte proteolítico de la procaspasa 3 durante la activación de la vía apoptótica da lugar a una forma activa de esta proteasa (caspasa 3). Es éste un fenómeno común tanto para la vía intrínseca como para la extrínseca de activación de apoptosis. Es por esto que la identificación de la caspasa 3 en un corte histológico es un buen método de estimación de la apoptosis. El porcentaje de células apoptóticas se calculó por recuento de las células positivas para la inmunotinción con anticuerpo anti-caspasa 3 (AF835, R & D Systems; detalles de la inmunotinción en sección 3.12). Se contaron al menos 1.000 células en, al menos, 5 áreas diferentes de la preparación. Para cada medición se tomaron tres muestras al azar de tumores de cada genotipo.

3.7.2. PARP proteolizada

Tras una primera estimación de los niveles de apoptosis mediante la determinación de caspasa 3 activa en cortes histológicos, los resultados se confirmaron por la presencia del subproducto de 85 Kda que resulta del procesamiento proteolítico de la proteína nuclear PARP (*Poly ADP-Ribose Polymerase*). El análisis de PARP se realizó utilizando un anticuerpo anti-PARP (MCA 1522; Serotec) en un *immunoblot*. El porcentaje de PARP procesada (es decir, cortada: asociado con apoptosis) en relación con el total se cuantificó por métodos densitométricos.

3.8. Respuesta aguda a radiación γ en timocitos

La respuesta apoptótica aguda al tratamiento con radiación γ se determinó en células T aisladas de timos de 3 ratones de cada grupo (genotipo). Los ratones, de 4 semanas de edad, fueron sometidos a una única dosis de radiación γ (10 Gy), proporcionada por un irradiador modelo MARK I-30 (Shepherd & Associates, USA) con fuente de ^{137}Cs a un ritmo de 1.14 Gy/minuto. Transcurridas 3 horas desde la irradiación, los ratones se sacrificaron de acuerdo con el método descrito anteriormente y se extrajo el timo siguiendo técnicas asépticas.

La fracción de timocitos apoptóticos (contenido en ADN menor de 2n [García-Cao *et al.*, 2002]) se determinó utilizando un citómetro de flujo analítico (FACSCalibur, Beckton Dickinson).

3.9. Tratamientos con radiación γ en ratones

El tratamiento con radiación γ se empleó para inducir linfomas tímicos en los ratones. Se seleccionaron grupos de ratones de los genotipos adecuados de 4 semanas de edad y se sometieron a una dosis de radiación γ de 1.75 Gy en un irradiador con fuente de ^{137}Cs , modelo MARK I-30 (Shepherd & associates, USA) a un ritmo de 1.14 Gy/minuto. El tratamiento se repitió una vez por semana durante 4 semanas. Tras la irradiación se realizó un seguimiento diario de la aparición de tumores mediante la observación de signos y síntomas de enfermedad.

3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de la probabilidad de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier. Este método de análisis es también conocido como del “límite del producto”. La característica distintiva del análisis de supervivencia por este método es que la proporción acumulada de ratones que sobrevive se calcula para el tiempo de supervivencia individual de cada individuo y no se agrupan los tiempos de supervivencia en intervalos. Por esta razón, el método resulta especialmente adecuado para estudios de supervivencia en los que se utiliza un número no muy grande de individuos (como era nuestro caso). La validez de este método descansa sobre dos premisas:

- Los individuos que se retiran del estudio tienen un destino parecido a los que quedan.
- El período de tiempo durante el cual un individuo entra en el estudio no tiene efecto independiente en la respuesta.

Los intervalos de confianza de esta gráfica son puntuales, no de toda la curva. Esto es, para un período de tiempo concreto, la confianza de que el verdadero valor de la supervivencia esté entre los límites del intervalo es del 95%. Sin embargo, la confianza de que toda la curva esté entre las dos bandas dibujadas no es del 95%. En nuestro estudio, la observación de los animales comenzó a la edad de destete y continuó hasta que el último animal del estudio tuvo que ser sacrificado. Por lo tanto, no hubo ningún dato censurado.

Con el objeto de averiguar si las diferencias en supervivencia observadas entre los distintos grupos de ratones eran significativas, se utilizó el test de Mantel-Haenszel (también llamado test *LogRank*, test de azares proporcionales, o test de Mantel-Cox). Se trata de un test muy potente para detectar diferencias cuando los logaritmos de las curvas de supervivencia son proporcionales (lo que

sería equivalente a decir que los azares son proporcionales). Sin embargo, si las curvas de supervivencia se cortan, sería difícil poder detectar estas diferencias. En esos casos es más útil el test de Breslow (también llamado test de Gehan o test de Wilcoxon generalizado), que prima de forma especial las diferencias detectadas al principio de la curva.

El desarrollo de tumores en los modelos animales estudiados se expresó en forma de incidencia y latencia, calculándose las medias para el desarrollo de tumores en general y las específicas de cada tipo de tumor.

Existen dos tipos de medidas de incidencia: la incidencia acumulada y la tasa de incidencia, también denominada densidad de incidencia. En nuestro estudio se ha considerado la incidencia acumulada, que puede definirse como la proporción de individuos sanos que desarrollan una determinada enfermedad (cáncer) a lo largo de un período de tiempo. Como cualquier proporción, viene dada en términos de porcentaje. Además, al no ser una tasa, se ha acompañado siempre del período de observación para poder ser interpretada.

La latencia es el intervalo de tiempo que media entre la presentación del estímulo y el inicio de la respuesta. En nuestro caso, es el tiempo transcurrido entre el nacimiento y la eutanasia del ratón. Los períodos de latencia se expresaron en meses.

4

Resultados

“La pluralidad no debe ser asumida sin la necesidad”

Guillermo de Ockham

4.1. Caracterización fenotípica y fondos genéticos

Con el objeto de estudiar *in vivo* el fenotipo a que da lugar la falta de $p21^{Cip1}$ y $p53$, se obtuvieron ratones mutantes nulos sencillos (*knock-out* o KO) para $p21^{Cip1}$ y $Trp53$ en un fondo genético C57BL/6J, y dobles mutantes (también denominado doble *knock-out* o dKO) para ambos genes en el mismo fondo genético. Los modelos mencionados, obtenidos tras 10 retrocruzamientos consecutivos con ratones C57BL/6J, eran isogénicos para el 99.9% de sus *loci* con lo cual quedaba minimizada la influencia de genes modificadores diferentes sobre el fenotipo tumoral. Restan tan solo dos regiones de unos 10 cM en torno a los genes mutados (cromosoma 17 para $p21^{Cip1}$ y cromosoma 11 para $Trp53$) en las que, debido a una baja frecuencia de recombinación, se mantiene el fondo genético propio de la célula ES en que se obtuvo el KO, 129S2 en este caso.

Se estudió el fenotipo del ratón B6- $p21p53$ dKO comparándolo con los de los mutantes sencillos B6- $p21$ KO y B6- $p53$ KO. Se prestó especial atención a la incidencia de tumores tanto espontáneos como inducidos y a otras características relacionadas con su viabilidad y desarrollo.

4.1.1. Viabilidad de los mutantes estudiados

El concepto de viabilidad en el presente estudio se ha estimado por la capacidad de un ratón de alcanzar el estadio de adulto joven (*i.e.* 8 semanas de edad). Según este criterio, los datos de viabilidad obtenidos para el ratón $p21$ KO en fondo C57BL/6J son similares a los previamente publicados por otro grupo para este modelo en un fondo genético mixto [Deng *et al.*, 1995], y corroboran la ausencia de mortalidad embrionaria y/o perinatal relacionada con la ausencia de este gen.

En trabajos anteriores al nuestro ya se había descrito una incidencia variable de mortalidad embrionaria en ratones mutantes nulos para *Trp53* [Armstrong et al., 1995; Sah et al., 1995; Dey et al., 2000]. Curiosamente, esta característica parece estar en gran medida modulada por el fondo genético del ratón en que se estudie. De hecho, los datos de mortalidad embrionaria encontrados en mutantes nulos para *Trp53* en distintos fondos genéticos varían desde un 15% hasta casi un 100% en función de la línea de ratón [Dey et al., 2000].

La viabilidad del doble mutante B6-p21p53dKO se encontró reducida en relación a la de los mutantes nulos B6-p21KO y B6-p53KO. El hecho de que la incidencia de mortalidad embrionaria se vea incrementada en el doble mutante indica que debe existir un efecto cooperativo entre ambos genes sobre esta característica y que, por lo tanto, éstos deben contribuir a través de vías independientes –o sólo parcialmente solapadas– al desarrollo embrionario del ratón.

4.1.2. Diferencias en mortalidad embrionaria

La determinación genotípica de los ratones nacidos evidenció que el porcentaje de ratones B6-p21p53dKO nacidos (16,8%) disminuía claramente con respecto al de los esperados (50%) (ver tabla 4.1). Según este resultado, algo más del 66% de los ratones dobles mutantes no debe completar su desarrollo embrionario y muere durante el período de gestación.

Nacidos	♂	♀	
83,2% (164/197)	56,7% (93/164)	43,3% (71/164)	B6-p21KO p53HET
16,8% (33/197)	93,9% (31/33)	6,1% (2/33)	B6-p21p53dKO
66,7% (48/72)	39,6% (19/48)	60,4% (29/48)	B6-p53HET
33,3% (24/72)	75,0% (18/24)	25,0% (6/24)	B6-p53KO

Tabla 4.1. Porcentajes obtenidos de los diferentes genotipos estudiados. El porcentaje esperado de mutantes en la descendencia viene determinado por el tipo de cruzamiento y era del 50% en todos los grupos. En el caso de los mutantes B6-p21KO, los apareamientos se realizaron entre homocigotos por lo que el porcentaje esperado de mutantes era del 100%. En éstos no se vió diferencia alguna con los controles WT.

En nuestra colonia de ratones mutantes nulos sencillos B6-p53KO, el porcentaje total de mutantes homocigotos nacidos fue del 33.3% (siendo el porcentaje teórico esperado también del 50%). Según este resultado, la mortalidad durante el desarrollo embrionario para este genotipo superó ligeramente el 33%, es decir, aproximadamente la mitad de la observada en el doble mutante.

La distribución de la mortalidad embrionaria para mutantes homocigotos en función del sexo en nuestra colonia B6-p53KO se asemeja bastante a lo descrito anteriormente por otros autores [Armstrong et al., 1995; Sah et al., 1995], con una incidencia claramente mayor en las hembras (ver tabla 4.1). En el modelo doble mutante la incidencia de mortalidad embrionaria en las hembras se ve incrementada hasta casi un 95% (ver tabla 4.1).

4.1.3. Causas de mortalidad embrionaria

Tras un análisis más detallado de las causas de mortalidad embrionaria, tanto en el modelo B6-p21p53dKO como en B6-p53KO, se vio que los fetos morían en todos los casos analizados entre los días 12.5 y 15.5 de gestación. La mortalidad embrionaria en ambos casos se debió a alteraciones muy importantes en la formación del sistema nervioso central que condujeron, por lo general, al desarrollo de exencefalia (ver figura 4.1) y a la muerte del feto. De forma esporádica se observaron también otros tipos de malformaciones craneofaciales y anomalías oculares (microftalmia) con una menor incidencia (porcentajes no mostrados). Los ratones WT en fondo C57BL/6J muestran hidrocefalia y microftalmia de manera espontánea con una baja incidencia (menor del 5%).



Figura 4.1. Exencefalia y malformaciones craneofaciales observadas en el doble mutante (flechas). La fotografía mostrada corresponde a un feto de 14.5 días de gestación.

4.1.4. Desarrollo postnatal

Cabe resaltar que, si bien los modelos B6-p53KO y B6-p21p53dKO presentan una alta mortalidad embrionaria, la mortalidad peri y postnatal en ambos modelos fue inexistente o muy baja y similar a la encontrada en ratones control C57BL/6J. Esto es, existe una alta incidencia de mortalidad durante el desarrollo embrionario, pero si éste llega a término, entonces los ratones nacidos no presentan alteraciones significativas en su desarrollo hasta el estadio de adulto joven. En ninguno de los mutantes nulos sencillos se encontró mortalidad relacionada con su fenotipo entre el nacimiento y la edad adulta.

Como complemento del estudio fenotípico, se realizó un seguimiento del peso de los ratones desde las 3 hasta las 12 semanas de vida, no encontrándose diferencias significativas entre los distintos genotipos, o con el control WT. Esto sugiere que a partir del nacimiento y durante las primeras semanas de vida tanto los ratones B6-p53KO, como los B6-p21KO, y los B6-p21p53dKO presentan un desarrollo (crecimiento) normal, comparable a los controles WT. No se observó ninguna otra peculiaridad en parámetros relacionados con el desarrollo de los ratones mutantes respecto a los controles WT, aunque las únicas hembras mutantes B6-p21p53dKO (n=3) analizadas resultaron ser estériles. Algunos análisis muy preliminares apuntaron hacia la ausencia de un ciclo estral normal (no hubo signos de celo) como causa de dicha esterilidad. El resto de los genotipos y sexos resultó ser viable y fértil.

4.2. Supervivencia y causas de mortalidad post-natal

El siguiente paso en la caracterización fenotípica de los modelos analizados consistió en un estudio de “envejecimiento”. Como objetivo final, se determinarían las causas de muerte, prestando especial atención al desarrollo de tumores.

4.2.1. Causas de mortalidad en ratones mutantes para $p21^{Cip1}$

Los ratones B6-p21KO presentaron una incidencia tumoral claramente mayor que el ratón control WT. Aún así, el desarrollo de tumores no fue en este modelo la principal causa de muerte durante la edad adulta. Se siguió, en paralelo, el desarrollo espontáneo de tumores en 20 ratones WT (C57BL/6J) –10 machos y 10 hembras– no encontrándose ningún tumor en dicho grupo control durante los 24 meses que duró el estudio.

El ratón mutante B6-p21KO presenta una susceptibilidad moderada al desarrollo espontáneo de tumores, aunque la mortalidad por esta causa antes de los 12 meses de edad fue extremadamente baja (4%: tan sólo 2 casos en los 50 ratones estudiados, ver figura 4.3). Se comprobó que la latencia media de aparición de tumores para este modelo era de 18.2 meses (ver tabla 4.3). La incidencia total de tumores en ratones nulos para $p21^{Cip1}$ fue de un 42% (21/50).

Se ha descrito una alta mortalidad en ratones nulos para $p21^{Cip1}$ a edades tempranas (*i.e.* antes o alrededor de los 10 meses de edad), debida al desarrollo de un cuadro de glomerulonefritis que tiene su origen en una proliferación anómala de células T de memoria [Balomenos *et al.*, 2000]. En un fondo genético mixto, la incidencia de dicho daño glomerular acompañado de una proteinuria severa alcanza un 60% en ratones hembra nulos para $p21^{Cip1}$, siendo ésta la principal causa de muerte en hembras adultas. La incidencia de esta alteración en machos se ve reducida hasta algo más de un 9% (Martín-Caballero, comunicación

personal). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el 69,6% (16/23) de los ratones hembra B6-p21KO murieron o tuvieron que ser sacrificados por causas no relacionadas con el desarrollo de tumores. Si bien la determinación exacta de la causa de la muerte en dichos casos no es el objeto principal de esta tesis, sí se observaron alteraciones renales durante los análisis post-mortem con cierta frecuencia. Sin embargo, durante los posteriores estudios anatomopatológicos de estas muestras sólo se pudo encontrar una condición similar a la descrita más arriba para el fondo genético mixto en un 31% de las hembras (5/16), no observándose nada similar en los machos (0/13). Tampoco se observó alteración renal alguna en ratones B6-p21p53dKO, ni en ratones homocigotos nulos para $p21^{Cip1}$ y heterocigotos para $Trp53$.

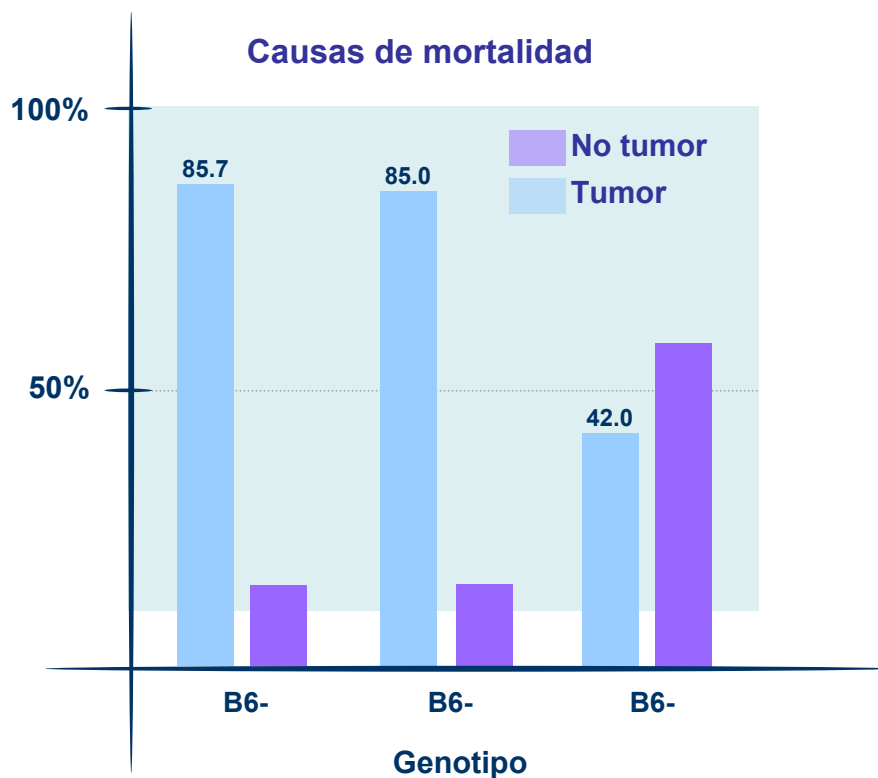


Figura 4.2. Diagrama representativo de las principales causas de mortalidad (tumor/no tumor) en ratones adultos pertenecientes a los tres principales modelos estudiados. Tanto en el modelo B6-p21p53dKO como en el B6-p53KO la principal causa de muerte fue el desarrollo de tumores.

Curiosamente, mientras algo más de la mitad de los ratones macho B6-p21KO desarrollaron tumores (14/27), en el caso de los ratones hembra se observaron tumores espontáneos en algo menos de un tercio de los individuos (7/23).

Total	♂	♀	
58,0% (29/50)	48,1% (13/27)	69,6% (16/23)	B6-p21KO
14,3% (3/21)	5,3% (1/19)	100,0% (2/2)	B6-p21p53dKO
15,0% (3/20)	18,2% (2/11)	11,1% (1/9)	B6-p53KO

Tabla 4.2. Porcentajes de mortalidad no debida a tumores en los distintos modelos estudiados y en función del sexo. En los casos en que pudo determinarse la causa de la muerte, no se encontró ninguna relación con el genotipo del animal.

4.2.2. Causas de mortalidad en ratones mutantes para p53

Como se esperaba, dado el importantísimo papel que p53 juega en la regulación del ciclo celular, y en base a lo que anteriormente se había descrito en modelos de ratón deficientes para *Trp53* en fondos genéticos distintos [Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994], el ratón B6-p53KO mostró una elevada susceptibilidad al desarrollo espontáneo de tumores, siendo ésta la principal causa de muerte en el ratón adulto (17/20; 85.0%, ver figura 4.2).

4.2.3. Causas de mortalidad en ratones dobles mutantes

Como ya se ha indicado en la sección anterior, la principal causa de mortalidad en el ratón B6-p21p53dKO fue un desarrollo deficiente del sistema nervioso central, lo que provocó la muerte del feto entre los días 12.5 y 15.5 del desarrollo embrionario. Debido a dicha anomalía, el 66% de los ratones no completa el desarrollo embrionario, pero los ratones nacidos (33%) alcanzan la edad adulta sin signo clínico o síntoma aparente alguno.

La principal causa de mortalidad en el ratón B6-p21p53dKO adulto fue el desarrollo de tumores (ver figura 4.2). De los 21 ratones B6-p21p53dKO que constituyeron el ensayo de envejecimiento (mediante el cual se calculó la incidencia de tumores espontáneos), en 18 (85.7%) se encontraron tumores de diversos tipos; por lo general linfomas y sarcomas, como se discutirá más adelante. Curiosamente, los dos únicos ratones hembra del grupo murieron a la edad de 10.4 y 7.9 meses por causas no relacionadas con el desarrollo de tumores. En ningún caso se encontraron alteraciones renales iguales o parecidas a las descritas en el mutante sencillo B6-p21KO.

4.2.4. Curvas de supervivencia y periodos de latencia tumoral

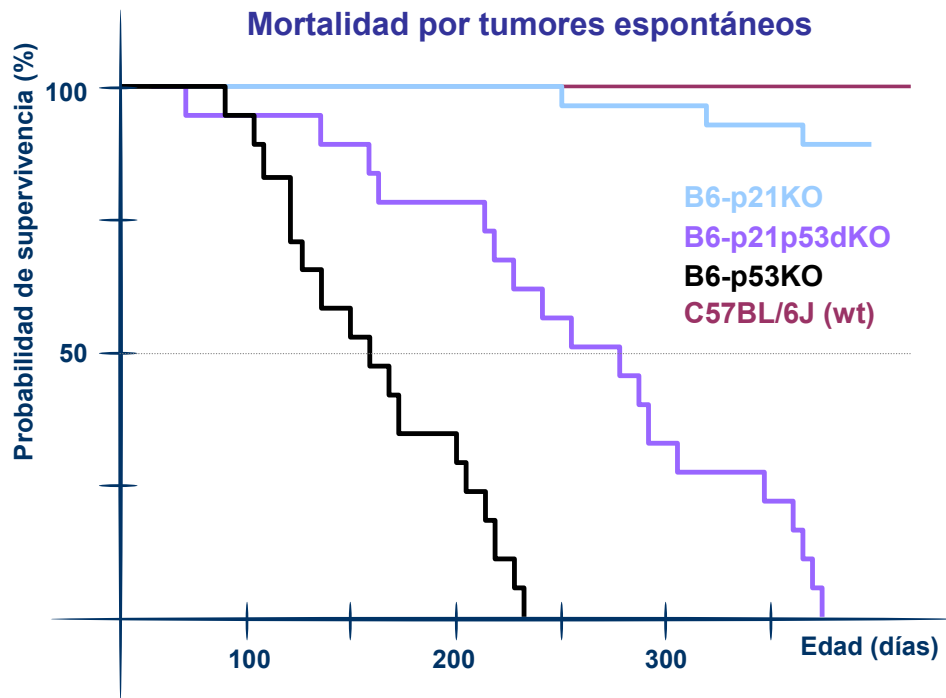
En el ratón B6-p53KO el periodo medio de latencia antes de la aparición de tumores fue de 5.9 meses (ver tabla 4.3). Sorprendentemente, la ausencia simultánea de p21^{Cip1} y p53 dio lugar a una extensión estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la esperanza de vida (aumento de latencia media de aparición de tumores) en el modelo B6-p21p53dKO, que se elevó hasta los 8.6 meses. No obstante, aunque la latencia media se encuentra aumentada en el doble mutante, la incidencia media de aparición de tumores para el modelo B6-p21p53dKO y el B6-p53KO fue prácticamente la misma: 85.7% y 85.0%, respectivamente (ver figura 4.2.).

	Incidencia media	Latencia media	
	85,0%	5,9	B6-p53KO
	85,7%	8,6	B6-p21p53dKO
	84,2%	12,4	B6-p53HET
	42,0%	18,2	B6-p21KO
	84,6%	18,7	B6-p21KO p53HET

Tabla 4.3. Incidencias medias y períodos medios de latencia de aparición de tumores en los distintos genotipos analizados. El período de latencia se computa por la edad de muerte del ratón.

Los periodos de latencia tumoral y las curvas de supervivencia, parecen indicar que la ausencia adicional de la proteína p21^{Cip1} retarda de alguna manera la aparición de tumores –en concreto de linfomas tímicos– en el ratón B6-p53KO. La diferencia entre las latencias medias observadas podría deberse, como se discutirá más adelante, más a un cambio en el espectro tumoral que a un efecto real sobre la progresión tumoral causado por la falta de p21^{Cip1}.

A.



B.

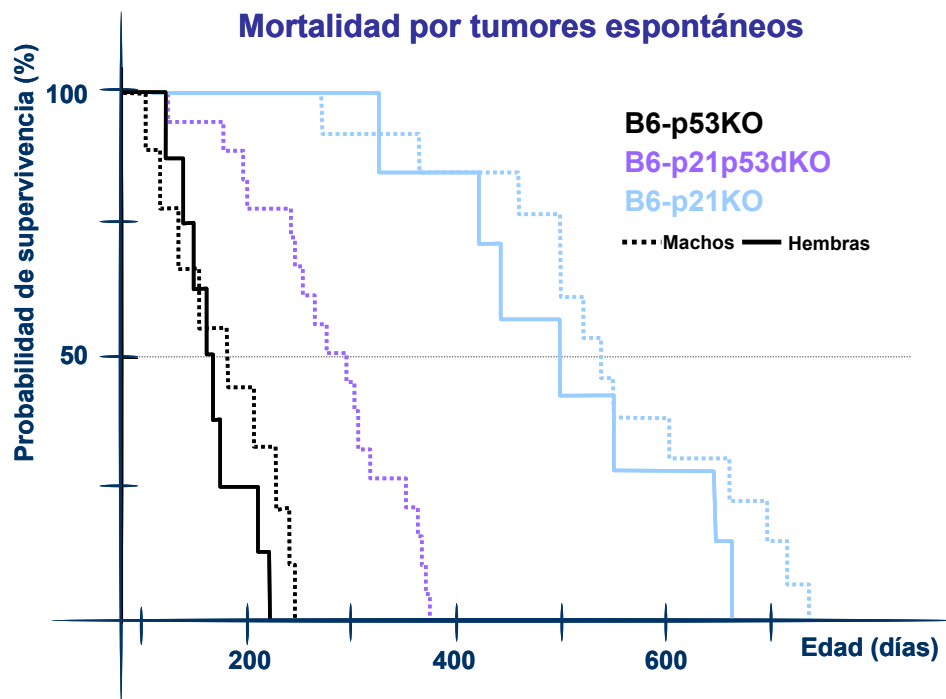


Figura 4.3. Representación de Kaplan-Meier de la probabilidad de supervivencia. La única causa de mortalidad considerada es esta gráfica fue la debida a tumores. A. Genotipos estudiados. B. Representación en función del sexo.

La predisposición a desarrollar tumores del ratón mutante nulo para *Trp53* es tan acusada que se podría estar enmascarando el posible efecto de la falta de $p21^{Cip1}$. Por este motivo, se diseñó un entorno celular menos condicionado trabajando con dos grupos de ratones heterocigotos para *Trp53*, uno de ellos con $p21^{Cip1}$ funcional (B6- $p21^{+/+}Trp53^{+/-}$ o B6-p53HET), y el otro nulo para este segundo gen (B6- $p21^{-/-}Trp53^{+/-}$ o B6-p21KO_{p53}HET). En el diseño de este experimento se contó también con información previa que indicaba que los ratones mutantes heterocigotos para *Trp53* muestran una clara predisposición a desarrollar tumores, si bien, el linfoma tímico no es ya el tipo de tumor más frecuente en este modelo.

De los 65 ratones B6-p21KO_{p53}HET estudiados, 55 desarrollaron tumores (84.6%), y del grupo de 19 ratones B6-p53HET, 16 presentaron tumores (84.2%). A la vista de los datos de incidencia tumoral, la ausencia de $p21^{Cip1}$ no parece tener efecto alguno sobre la aparición de tumores en ratones heterocigotos para *Trp53*. Este efecto es prácticamente idéntico al observado en ratones B6-p53KO y B6-p21p53dKO. Sin embargo, sí existe una diferencia importante en cuanto a la latencia media de aparición de tumores y al espectro tumoral. Los ratones B6-p53HET desarrollaron tumores con una latencia media de 12.4 meses mientras que en los ratones B6-p21KO_{p53}HET el periodo de latencia se extendió hasta los 18.7 meses, lo que representa un incremento significativo de más del 50% ($p < 0.001$). Así mismo, se pudo constatar un descenso en la incidencia de linfomas (ver más adelante).

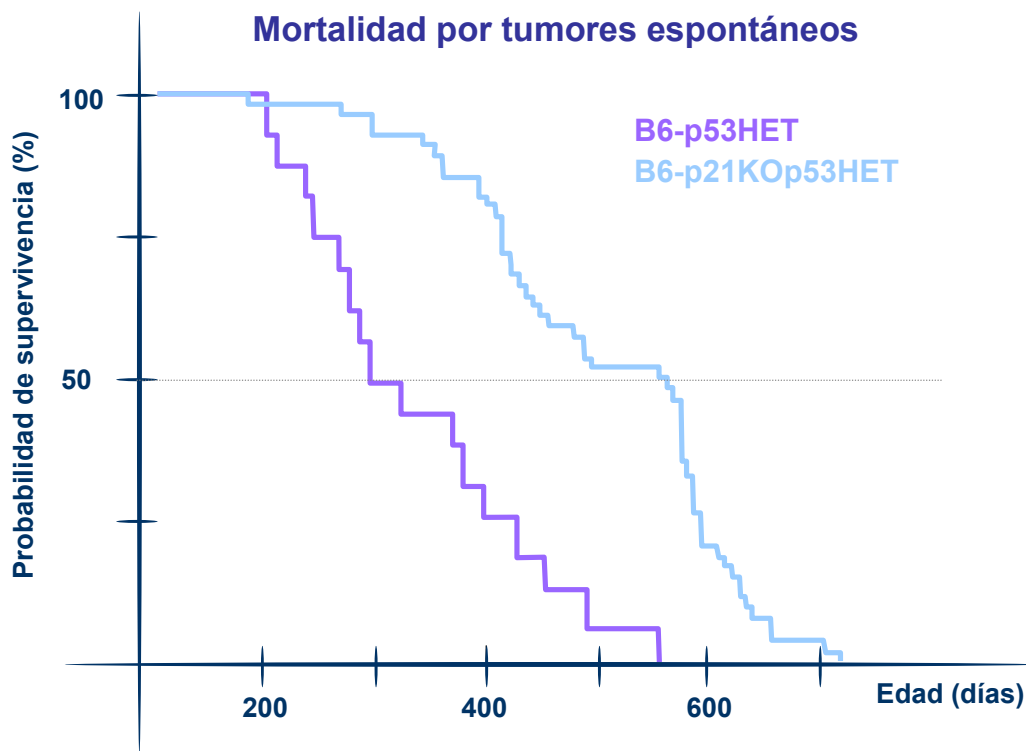


Figura 4.4. Representación de Kaplan-Meier de la probabilidad de supervivencia cuando se considera sólo la mortalidad debida a tumores. Los dos grupos representados son heterocigotos para *Trp53*, y la única diferencia es la presencia o ausencia de $p21^{Cip1}$.

4.3. Espectro tumoral e histopatología

Tras obtener una valoración inicial de las causas de mortalidad y de las características generales del desarrollo de tumores, el siguiente paso del trabajo consistió en la determinación del espectro tumoral para cada uno de los genotipos.

4.3.1. Espectro tumoral de los distintos mutantes

Los ratones nulos para *Trp53* presentan una alta incidencia de neoplasias, en especial de tumores de origen hematopoyético [Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994] y sarcomas. En nuestro estudio, se observó que un 70.6% de los ratones B6-p53KO desarrollaron linfomas T (ver tabla 4.4). En el doble mutante, la incidencia de linfomas T se vio disminuida hasta un 44.4% ($p < 0.01$). Todos los linfomas encontrados tanto en el mutante nulo sencillo para *Trp53*, como en el doble mutante fueron linfomas T. Además, los linfomas tímicos representaron el 100% de los linfomas T encontrados en el doble mutante y el en el mutante sencillo para *Trp53* en fondo genético C57BL/6J. El ratón B6-p21KO también desarrolló linfomas, si bien se localizaron siempre en el bazo y fueron caracterizados todos como linfomas B (confirmado por inmunotinción positiva para B220). La incidencia de linfomas B en el ratón B6-p21KO fue de un 14.3%.

Tumor	B6-p53KO		B6-p21p53dKO		B6-p21KO	
Linfoma T	*70,6	**5,4	44,4	6,6	-	
Linfoma B	-		-		14,3	17,7
Sarcoma histiocítico	-		16,7	11,2	42,9	15,6
Hemagiosarcoma	11,7	6,4	16,7	9,0	33,3	17,3
Otros sarcomas	5,9	8,3	22,2	10,9	-	
Osteosarcoma	5,9	7,6	-		-	
Carcinoma	5,9	7,3	-		9,5	21,2
* incidencia (%)						
** Latencia media (meses)						

Tabla 4.4. Incidencias medias y períodos medios de latencia de aparición de tumores en los distintos genotipos analizados. El período de latencia se computa por la edad de muerte del ratón.

En el caso del ratón doble mutante, los sarcomas –considerados en su conjunto– superan en incidencia a los linfomas (54.6% frente a 44.4%). Durante la realización del presente estudio no se han observado linfomas tímicos en ratones mutantes nulos para $p21^{Cip1}$. Tampoco son muy comunes estos tumores en ratones WT, pero se ha descrito un caso en un ratón hembra de más de 16 meses de edad en fondo genético mixto (Martín-Caballero, comunicación personal).

Llama poderosamente la atención el hecho de que no se haya detectado el desarrollo de ningún carcinoma en los ratones B6p21p53dKO, mientras que en los ratones B6-p53KO sí se observaron con una cierta frecuencia (7.3%). Otro dato que cabe resaltar es la incidencia de sarcomas histiocíticos que variaba desde un 42.9% para el modelo B6-p21KO, hasta un 16.7% en el B6-p21p53dKO, no encontrándose representado este tipo tumoral en los ratones B6-p53KO.

Tumor	B6-p53HET		B6-p21KO p53HET	
Linfoma T	*31,2	**8,7	9,3	12,3
Linfoma B	12,5	9,2		-
Sarcoma histiocítico		-	33,3	18,8
Hemagiosarcoma		-	7,4	19,2
Otros sarcomas	31,2	16,6	24,0	16,4
Osteosarcoma	6,2	14,5	16,7	14,8
Carcinoma	18,7	14,6	9,3	17,0
<i>* incidencia (%)</i>				
<i>** Latencia media (meses)</i>				

Tabla 4.5. Incidencias medias y períodos medios de latencia de aparición de tumores en los distintos genotipos analizados. El período de latencia se computa por la edad de muerte del ratón.

A.

	Edad	Sexo	Tumor	Localización
1	270	M	Hemangiosarcoma	Hígado/bazo
2	356	H	Sarcoma histiocítico	Hígado/bazo
3	395	M	Sarcoma histiocítico	Hígado
4	421	H	Sarcoma histiocítico	Hígado/bazo
5	467	H	Hemangiosarcoma	Mesos/hígado
6	482	M	Sarcoma histiocítico	Hígado/bazo
7	504	M	Sarcoma histiocítico	Hígado/bazo
8	504	M	Sarcoma histiocítico	Hígado/bazo
9	504	H	Sarcoma histiocítico	Hígado/bazo
10	528	M	Linfoma B	Bazo
11	543	M	Linfoma B	Bazo
12	558	M	Carcinoma	Pulmón
13	558	H	Hemangiosarcoma	Diafragma
14	558	M	Sarcoma histiocítico	Hígado
15	617	M	Linfoma B	Bazo
16	657	H	Hemangiosarcoma	Hígado
17	669	M	Hemangiosarcoma	Bazo
18	669	H	Sarcoma histiocítico	Bazo
19	711	M	Hemangiosarcoma	Hígado
20	730	M	Hemangiosarcoma	Mesos
21	746	M	Carcinoma	Piel

B.

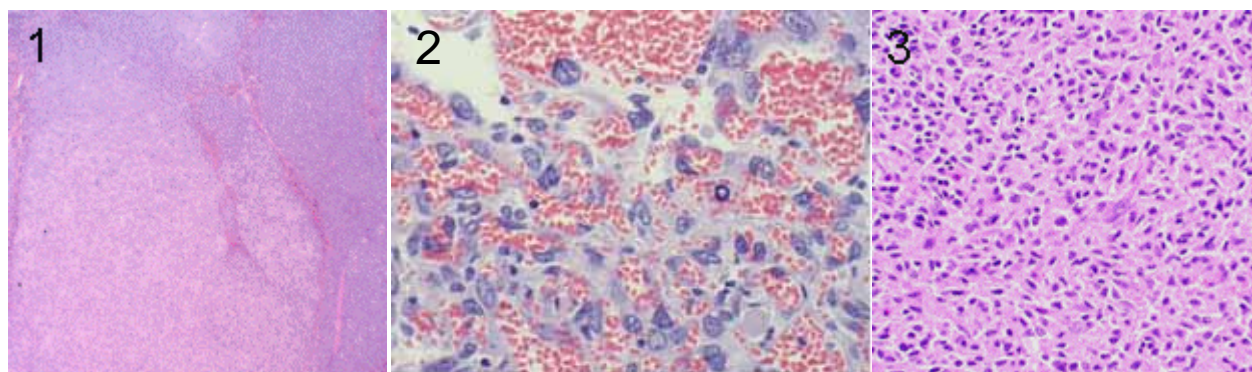


Figura 4.6. A. Tumores espontáneos encontrados en ratones deficientes para $p21^{Cip1}$. Junto con la caracterización histopatológica y el tejido u órgano donde se encontró el tumor, se detalla el sexo del animal y la edad a la que se realizó la necropsia. B. Microfotografías de los tumores más representativos; 1. Linfoma B. 2. Hemangiosarcoma. 3. Sarcoma histiocítico.

A.

	Edad	Sexo	Tumor	Localización
1	106	M	Linfoma tímico	Timo
2	121	M	Linfoma tímico	Timo
3	122	H	Linfoma tímico	Timo
4	137	M	Linfoma tímico	Timo
5	138	H	Linfoma tímico	Timo
6	142	H	Hemangiosarcoma	Bazo
7	152	M	Linfoma tímico	Timo
8	167	H	Linfoma tímico	Timo
9	173	H	Linfoma tímico	Timo
10	184	H	Linfoma tímico	Timo
11	188	M	Linfoma tímico	Timo
12	213	M	Linfoma tímico	Timo
13	218	H	Carcinoma	Pulmón
14	228	H	Osteosarcoma	Mandíbula
15	233	M	Linfoma tímico	Timo
16	244	M	Hemangiosarcoma	Hígado
17	248	M	Fibrosarcoma	Dermis

B.

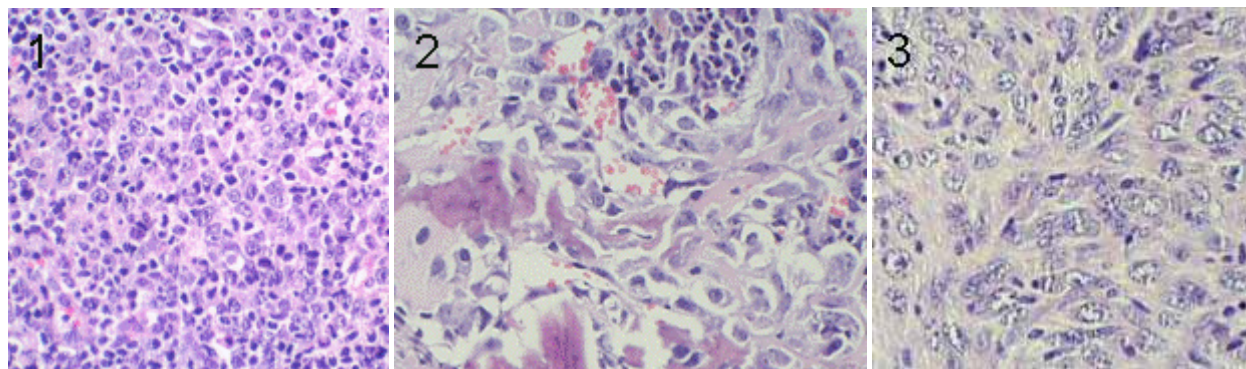


Figura 4.7. A. Tumores espontáneos encontrados en ratones deficientes para *Trp53*. Junto con la caracterización histopatológica y el tejido u órgano donde se encontró el tumor, se detalla el sexo del animal y la edad a la que se realizó la necropsia. B. Microfotografías de algunos de los tumores más representativos; 1. Linfoma tímico. 2. Osteosarcoma. 3. Fibrosarcoma.

A.

	Edad	Sexo	Tumor	Localización
1	76	M	Linfoma tímico	Timo
2	137	M	Linfoma tímico	Timo
3	160	M	Linfoma tímico	Timo
4	167	M	Hemangiosarcoma	Hígado
5	214	M	Linfoma tímico	Timo
6	219	M	Hemangiosarcoma	Bazo
7	228	M	Linfoma tímico	Timo
8	244	M	Fibrosarcoma	Dermis
9	257	M	Linfoma tímico	Timo
10	279	M	Sarcoma histiocítico	Hígado
11	289	M	Hemangiosarcoma	Hígado
12	293	M	Linfoma tímico	Timo
13	305	M	Fibrosarcoma	Dermis
14	350	M	Hemangiosarcoma	Hígado
15	362	M	Sarcoma histiocítico	Hígado
16	365	M	Sarcoma histiocítico	Bazo
17	371	M	Fibrosarcoma	Dermis
18	372	M	Fibrosarcoma	Dermis

B.

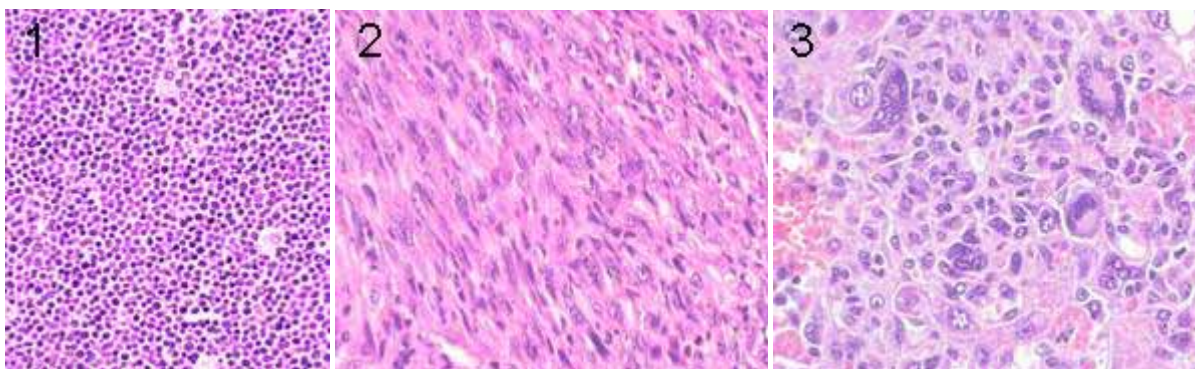


Figura 4.8. A. Tumores espontáneos encontrados en ratones deficientes para $p21^{Cip1}$ y $Trp53$. Junto con la caracterización histopatológica y el tejido u órgano donde se encontró el tumor, se detalla el sexo del animal y la edad a la que se realizó la necropsia. B. Microfotografías de los tumores más representativos; 1. Linfoma tímico. 2. Fibrosarcoma. 3. Sarcoma histiocítico del hígado con células gigantes multinucleadas.

4.3.2. Incidencia de linfomas

Tras la determinación del espectro tumoral presentado por los distintos modelos estudiados, una de sus características más llamativas fue la variación de la incidencia de linfomas, y de linfomas de células T en particular, en función de las diferentes combinaciones de genotipos para $p21^{Cip1}$ y $Trp53$. A la vista de estos resultados, se podría interpretar que la ausencia de $Trp53$ tiene un efecto determinante sobre la aparición de linfomas T en ratones con un fondo genético C57BL/6J (ver tabla 4.4). Sin embargo, la incidencia de linfomas se vio reducida en ausencia de $p21^{Cip1}$. En el caso del ratón B6-p53KO la reducción fue de un 37.1% (de 70.6% a 44.4%), mientras que en el heterocigoto el descenso fue aún más llamativo alcanzando un 78.7% (de 43.7% a 9.3%). Más aún, el ratón B6-p21KO no desarrolló linfomas de células T (ver figura 4.6) aunque sí linfomas de células B.

Todos los linfomas encontrados en nuestra colonia de ratones mutantes B6-p53KO fueron caracterizados como linfomas linfoblásticos de células T y se localizaron en el timo, en cambio, datos obtenidos en un fondo genético mixto (129S2 x C57BL/6J) arrojaron un 75% de linfomas tímicos caracterizados como linfoblásticos de células T, lo que apunta, de nuevo, hacia un efecto del fondo genético en el espectro tumoral de estos ratones.

Los ratones WT no desarrollaron ningún tumor durante los 24 meses de seguimiento.

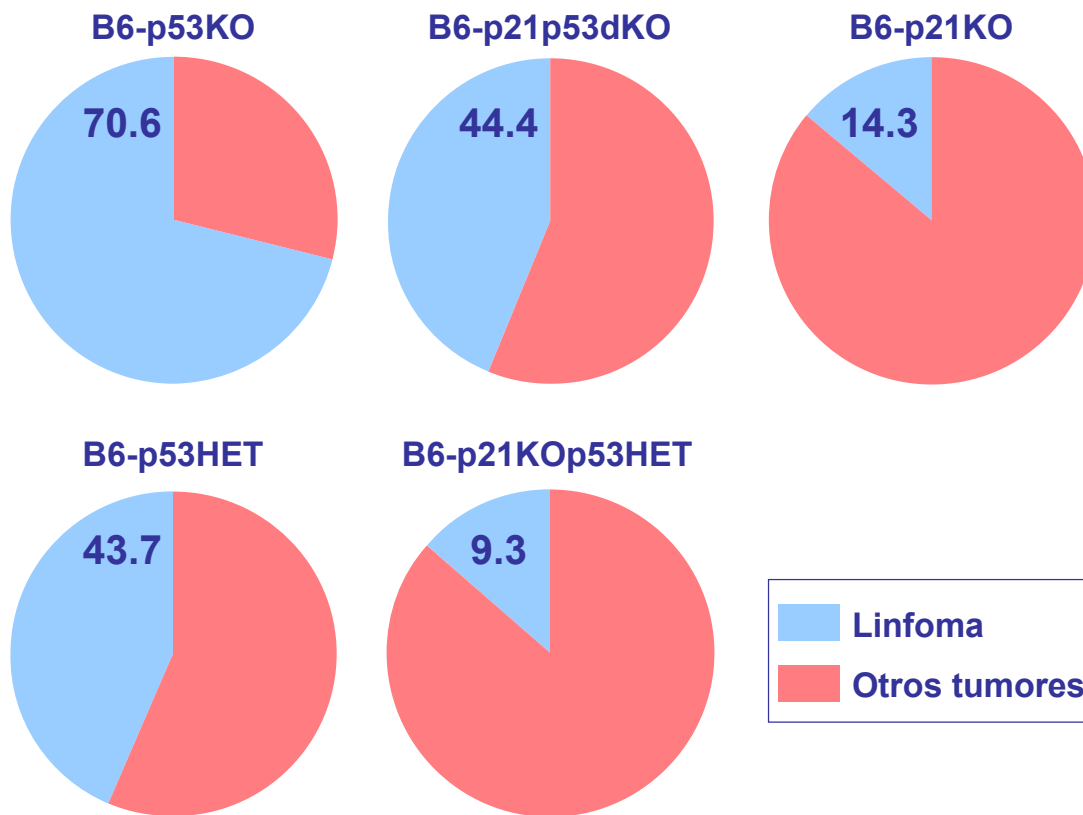


Figura 4.9. Incidencia de linfomas (tanto linfomas t como linfomas B) en los distintos modelos en función del estatus de los genes $p21^{Cip1}$ y $Trp53$.

se podría decir que la incidencia de linfomas tímicos viene marcada más por la ausencia de $p21^{Cip1}$ que por el fondo genético del ratón. (ver figura 4.9). Estos datos vienen a confirmar algunos de nuestros resultados anteriores que ya apuntaban este posible papel de $p21^{Cip1}$ proporcionando cierta ventaja selectiva a las células T en un estadio neoplásico o preneoplásico, mientras que su falta o inactivación funcional sensibilizaría dichas células frente a señales antiproliferativas y/o apoptóticas [Martín-Caballero et al., 2001].

4.3.3. Incidencia de sarcomas

Los sarcomas –de diferentes tipos– fueron los tumores que se encontraron con mayor frecuencia en todos los modelos mutantes nulos para $p21^{Cip1}$ con independencia del estatus de $Trp53$. En estos ratones, se observa una variación curiosa en la incidencia de sarcomas histiocíticos en función del genotipo para $Trp53$. Así, en el doble mutante B6-p21p53dKO la incidencia fue del 16.7%, en el heterocigoto para $Trp53$ y nulo para $p21^{Cip1}$, del 33.3%, y en el mutante sencillo p21KO, del 42.9%. Los hemangiosarcomas se presentaron en todos los modelos excepto en el ratón heterocigoto para $Trp53$, en el que sólo se encontraron fibrosarcomas y osteosarcomas. Éstos últimos se encontraron en el modelo B6-p21KO p53HET, pero no en el B6-p21p53dKO.

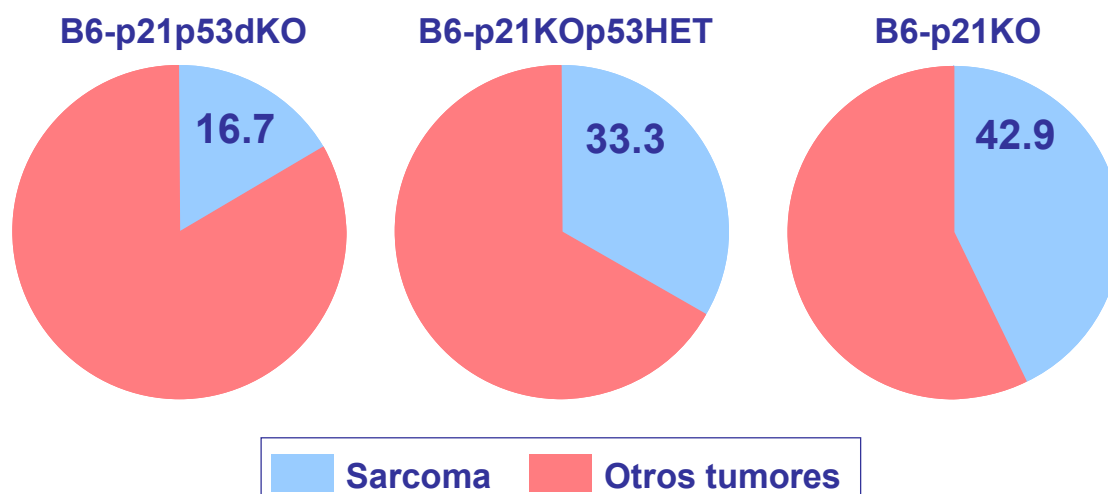


Figura 4.10. Visión general de la incidencia de sarcomas (de todo tipo) en los distintos modelos en función del estatus de $p21^{Cip1}$ y $Trp53$.

4.3.4. Características patológicas de los tumores

En los ratones nulos para $p21^{Cip1}$ el principal órgano afectado por el desarrollo de tumores fue el bazo, seguido por el hígado. Todos los linfomas B encontrados, además de la mayoría de los sarcomas histiocíticos, afectaron al bazo. Éstos últimos y los hemangiosarcomas tuvieron al hígado como el principal

órgano afectado. Tanto en el ratón doble mutante como en el mutante sencillo para *Trp53*, el órgano más comúnmente afectado fue el timo (linfomas T).

Todos los linfomas tímicos fueron clasificados histopatológicamente como linfomas linfoblásticos de células T inmaduras.

El sarcoma histiocítico es un tumor hematopoyético (aunque no linfoide) que tiene su origen en células fagocíticas del sistema mononuclear. Éstos sarcomas afectaron preferentemente al hígado y al bazo, viéndose involucrados en muchos casos los nódulos linfáticos mesentéricos, la médula ósea e incluso los pulmones. Las células del tumor poseían un citoplasma eosinófilo abundante y un núcleo pleomórfico con hendiduras. El índice mitótico observado fue moderadamente alto. Desde un punto de vista inmunohistoquímico, todos los sarcomas histiocíticos fueron positivos al marcador F4/80 de macrófagos.

Todos los fibrosarcomas observados se encontraron en el tejido subcutáneo, preferentemente en las extremidades traseras o en los flancos del animal. Se encontraban formados por células alargadas en forma de huso, poco diferenciadas, y dispuestas en haces típicos de este tipo de tumor.

Todos los tumores del mismo tipo presentaban características histopatológicas similares siendo indistinguibles en función de su genotipo.

4.4. $p21^{Cip1}$ y respuesta a radiación γ

En estudios previos realizados en ratones nulos para $p21^{Cip1}$, sometidos a un protocolo de inducción de linfomas tímicos mediante tratamiento con radiación γ , se había observado que su ausencia podría tener un efecto protector frente al desarrollo de este tipo de tumores [Martín-Caballero et al., 2001]. Por otro lado, se sabe que los ratones deficientes para *Trp53* desarrollan linfomas tímicos de manera espontánea con una incidencia muy alta, siendo, así mismo, muy sensibles al tratamiento con radiación γ y, en general, a cualquier agente genotóxico. Por otro lado, la susceptibilidad del fondo genético C57BL/6J a la radiación γ es grande y conocida [Santos et al., 1996; Santos et al., 2002].

4.4.1. Inducción de linfomas tímicos por radiación γ

Con el objeto de comprobar el efecto protector que la falta de $p21^{Cip1}$ parece tener sobre la inducción de linfomas tímicos, y si este efecto se reitera en ratones nulos para *Trp53*, se sometieron a un protocolo de inducción de linfomas mediante radiación γ ratones mutantes nulos B6-p53KO y doble mutantes B6-p21p53dKO.

De manera sorprendente, los ratones doble mutantes B6-p21p53dKO desarrollaron linfomas tímicos con una latencia media parecida a los controles WT, y significativamente mayor ($p < 0.001$) que la de los ratones mutantes B6-p53KO (ver figura 4.11). El 50% de los ratones tratados había desarrollado tumores a los 115 (B6-p53KO), 167 (WT) y 191 (B6-p21p53dKO) días. En el modelo B6-p21KO la incidencia de tumores no llegó a un 50% (fue de un 35% hasta los 12 meses).

En anteriores experimentos de inducción de linfomas por irradiación γ se había visto que los ratones nulos para $p21^{Cip1}$ en un fondo genético mixto no

desarrollan linfomas tímicos. En el presente trabajo, y utilizando ratones en un fondo genético puro C57BL/6J, se encontraron tumores en 5 de 14 ratones irradiados, de estos 5 tumores, 2 fueron clasificados como linfomas T tímicos. Las características histopatológicas de estos dos tumores en nada se diferenciaron del resto de linfomas tímicos T.

Es interesante resaltar el hecho de que el primer tumor que apareció en un ratón B6-p21p53dKO, lo hizo después de que el último de los ratones B6-p53KO hubiese sido sacrificado como consecuencia de la aparición de un linfoma tímico (154 y 148 días, respectivamente).

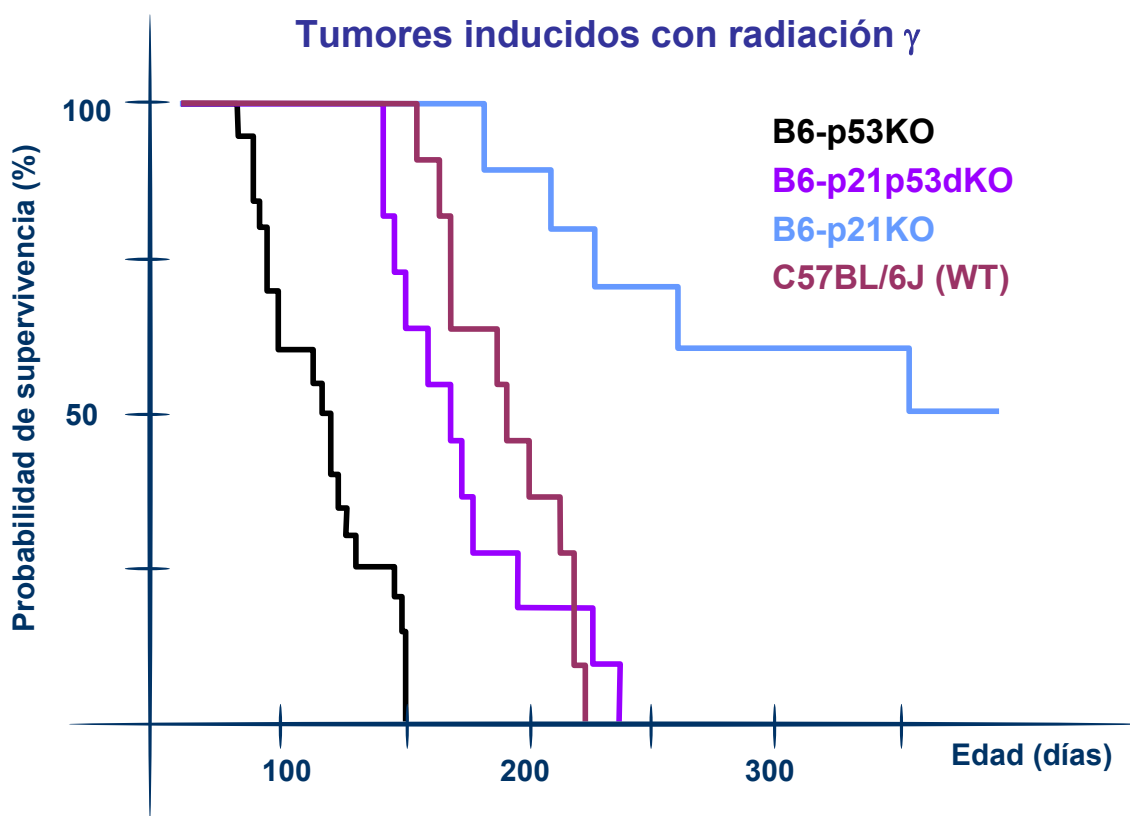


Figura 4.11. Representación de Kaplan-Meier de la probabilidad de supervivencia tras el tratamiento de inducción de linfomas por irradiación γ .

4.4.2. Respuesta aguda a radiación γ

Una de las preguntas que seguía sin contestación era si $p21^{Cip1}$ afecta a la supervivencia de células T normales del timo, o sólo a las células T tumorales. Para comprobar esto, se irradiaron ratones de los distintos genotipos con una dosis letal de radiación γ (10Gy) y se midió la respuesta apoptótica aguda (a las 3 horas). De acuerdo con resultados previos de otros grupos [Lowe *et al.*, 1993; Deng *et al.*, 1995], se observó una potente respuesta apoptótica en los timos de ratones WT y B6-p21KO. Esta respuesta apoptótica aguda no se encontró en ratones B6-p53KO y B6-p21p53dKO. Esto parece confirmar que $p21^{Cip1}$ no influye en la respuesta apoptótica aguda a un daño en el ADN con independencia del estatus de p53.

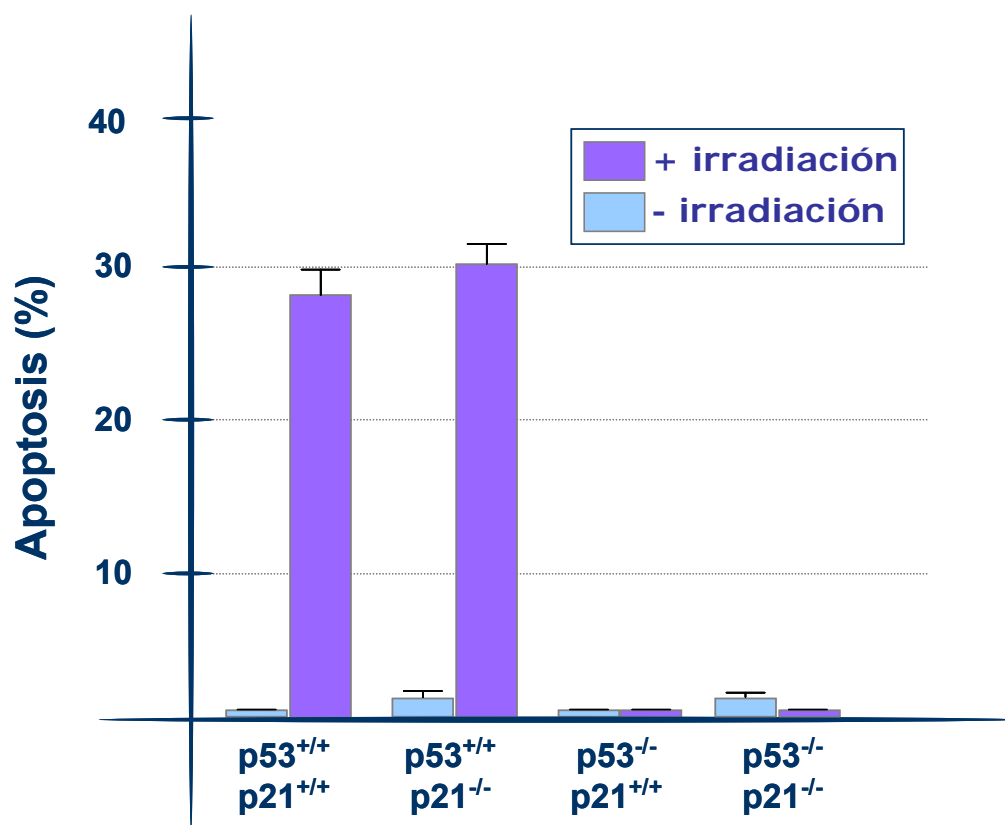


Figura 4.12. Respuesta apoptótica aguda a radiación γ en timocitos. El nivel de apoptosis observado en el doble mutante fue de en torno al 1%, similares niveles se observaron en el ratón mutante para *Trp53*. Sin embargo, el mismo tratamiento en ratones WT y mutantes nulos para $p21^{Cip1}$ dio como resultado niveles apoptóticos de alrededor del 26% y el 30% respectivamente.

4.5. Expresión de $p21^{Cip1}$, apoptosis y linfomas tímicos

Como se ha comentado anteriormente, la pérdida de expresión de $p21^{Cip1}$ o su inactivación por mutación, no son hechos que se presenten con frecuencia en tumores humanos o en modelos animales. En determinados tipos de cáncer se ha descrito una relación entre los niveles de expresión de $p21^{Cip1}$ y un pronóstico clínico favorable. Curiosamente, en estudios similares realizados en tipos tumorales distintos se ha encontrado una relación entre la expresión de $p21^{Cip1}$ y un mal pronóstico y/o una mayor resistencia a la quimioterapia. Es decir, los datos disponibles hasta la fecha no permiten alcanzar propuestas concluyentes con respecto al papel de $p21^{Cip1}$, cuyo efecto parece estar influenciado por el tipo tumoral o el estadio del tumor. Con el objeto de obtener información a cerca del papel que juega la expresión de $p21^{Cip1}$ en el desarrollo de los linfomas tímicos de ratón se analizó la expresión de este gen en muestras procedentes de ratones nulos para *Trp53* encontrándose que todos estos tumores expresaban $p21^{Cip1}$.

4.5.1. Expresión de $p21^{Cip1}$ en linfomas wild type

Como se ha indicado anteriormente, en el grupo control de ratones WT no se vio el desarrollo de ningún tipo de tumores espontáneos. Por esto, la expresión de $p21^{Cip1}$ sólo se midió en ratones WT sometidos al protocolo de inducción de linfomas por radiación γ . Como se puede comprobar en la figura 4.13, todos los linfomas de este tipo menos uno mantienen o superan los niveles de expresión de $p21^{Cip1}$ de los ratones no tratados.

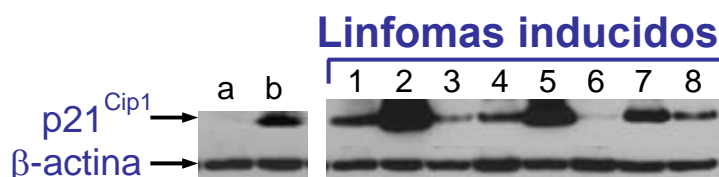


Figura 4.13. Expresión de $p21^{Cip1}$ en linfomas tímicos generados por irradiación γ en ratones WT.

4.5.2. Expresión de $p21^{Cip1}$ en tumores nulos para $Trp53$

Todos los linfomas tímicos obtenidos de manera espontánea en ratones nulos para $Trp53$ expresaban también $p21^{Cip1}$, siendo los niveles de expresión (medidos por densitometría) bastante parecidos en todas las muestras.

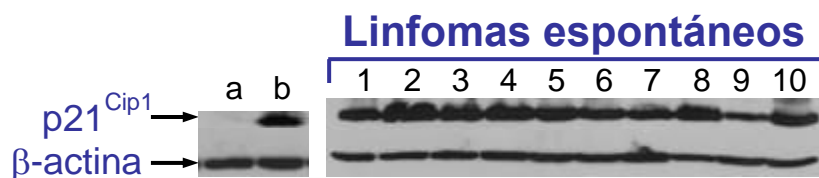


Figura 4.14. Expresión de $p21^{Cip1}$ en linfomas tímicos obtenidos espontáneamente en ratones nulos para $Trp53$.

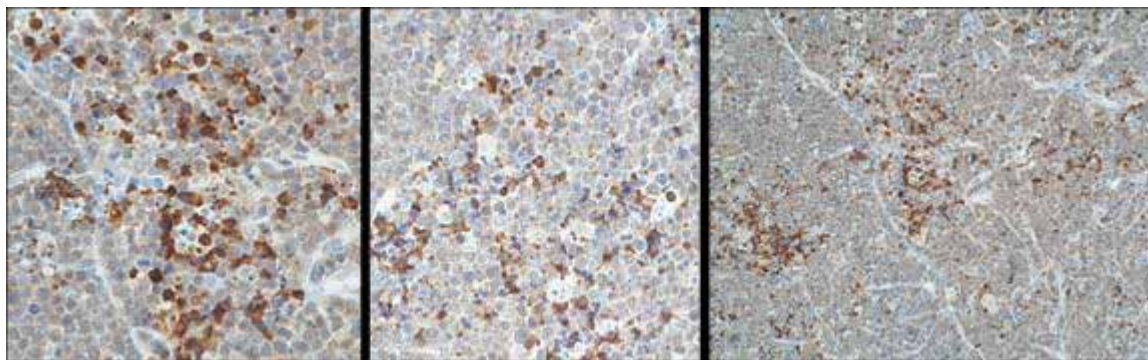


Figura 4.15. Expresión de $p21^{Cip1}$ en linfomas T tímicos desarrollados espontáneamente por ratones mutantes nulos para $Trp53$.

No se observó ninguna correlación entre los niveles de expresión de $p21^{Cip1}$ y el grado histopatológico del tumor.

4.5.3. Niveles de apoptosis en linfomas tímicos

Otro hecho destacable fue la constatación de que la ausencia de $p21^{Cip1}$ estaba siempre asociada con un nivel más alto de apoptosis en las muestras de linfomas tímicos con independencia del estadio del tumor. El nivel de apoptosis se midió de manera directa tomando como indicador la inmunotinción positiva para la caspasa 3 activada (ver figura 4.16). El porcentaje medio de células positivas para la caspasa 3 activada encontrado en muestras de tumores que procedían de ratones mutantes nulos para $p21^{Cip1}$ (además de para *Trp53*) fue el doble del observado en tumores procedentes de ratones con copias funcionales del gen $p21^{Cip1}$ ($p < 0.05$), es decir, en ratones B6-p53KO.

La identificación fiable de las células apoptóticas requiere, por lo general, la utilización de más de un método de determinación de apoptosis. Por ello, el efecto de $p21^{Cip1}$ sobre los niveles de apoptosis se confirmó mediante la determinación de los niveles de la polimerasa PARP (*Poly ADP-Ribose Polymerase*) procesada (es decir, cortada). PARP es una proteína nuclear de unión a ADN que reconoce roturas en la doble hélice e interviene en su mecanismo de reparación. Este enzima es sustrato de varias caspasas (caspasa 3, 6, 7, 8 y 9) las cuales llevan a cabo su procesamiento proteolítico. Una vez cortada, la enzima PARP pierde su capacidad de intervenir en la reparación del ADN. De nuevo, la medida del porcentaje de enzima PARP procesada por las caspasas indica que los linfomas tímicos procedentes de ratones B6-p21p53dKO presentan un nivel de apoptosis significativamente mayor ($p < 0.01$) que los linfomas procedentes de ratones B6-p53KO con $p21^{Cip1}$ funcional (ver figura 4.17).

En contraste con los datos obtenidos de los linfomas tímicos, los sarcomas estudiados en ratones B6-p53KO y B6-p21p53dKO no presentaron diferencias significativas en sus niveles de apoptosis (medidos por el porcentaje de PARP procesada, datos no mostrados).

Niveles de apoptosis en linfomas tímicos

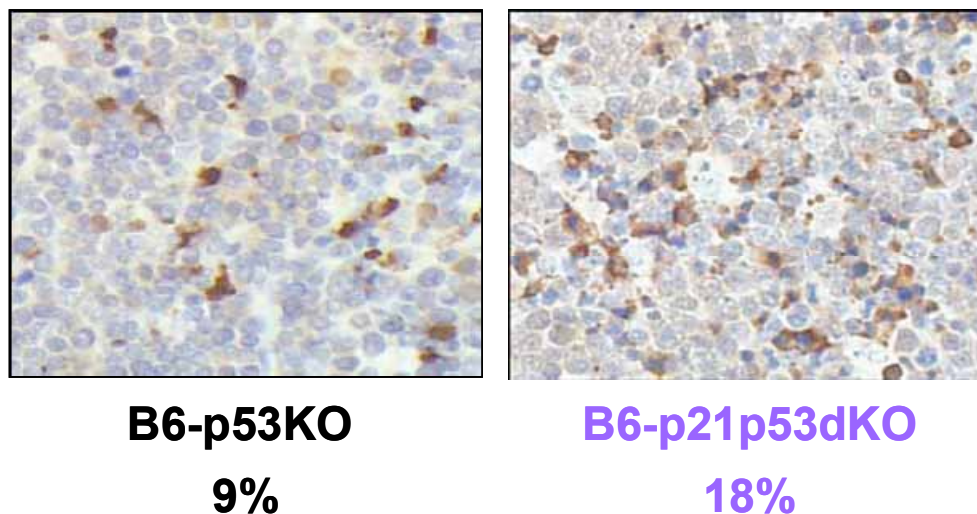


Figura 4.16. Medida del nivel de apoptosis en muestras de linfomas tímicos desarrollados por ratones nulos para *Trp53* y doble KO para *Trp53* y *p21^{Cip1}*. Como promedio, se encontró que el 18% de las células T en el doble mutante eran positivas a la inmunotinción para la caspasa 3. Dicho promedio fue del 9% en el ratón deficiente para *Trp53*.

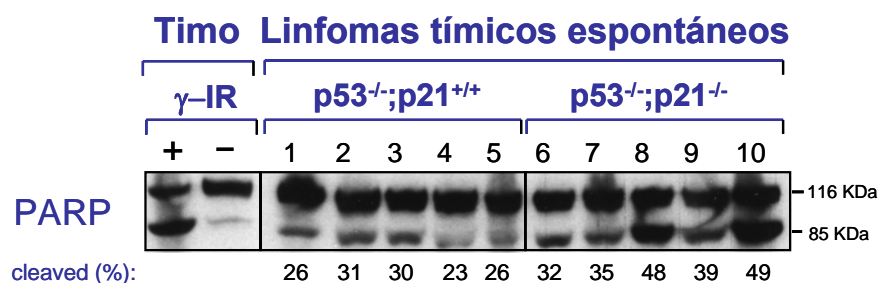


Figura 4.17. Medida del nivel de apoptosis en función de la fracción de proteína PARP procesada (cortada) por acción de las caspasas. El porcentaje de PARP cortada se calculó por una medida densitométrica de las bandas obtenidas en el western blot.

4.5.4. Índices de proliferación en linfomas tímicos

Como medida del nivel de proliferación celular en linfomas tímicos se determinó la expresión de Ki-67. Aunque el nivel de apoptosis es mayor en linfomas tímicos de ratones B6-p21p53dKO (respecto a B6-p53KO), en ambos casos los índices de proliferación celular son equivalentes (8.1% y 8.3%). Según esto, parece lógico esperar que este tumor progrese más rápido en ratones que poseen una copia funcional de $p21^{Cip1}$. Los datos de latencia para linfomas tímicos parecen apoyar la anterior hipótesis, observándose una latencia media de aparición de 6.6 meses para el modelo B6-p21p53dKO y 5.4 meses para el B6-p53KO.

p	$p21^{+/+};p53^{-/-}$	$p21^{-/-};p53^{-/-}$	
< 0,05	9 ± 4	18 ± 2	Caspasa 3 activa (%)
< 0,01	28 ± 3	41 ± 8	PARP proteolizado (%)
n.s.	8 ± 3	8 ± 1	Ki-67 (%)

Tabla 4.4. Tabla resumen: fracción de proteína PARP cortada por acción de las caspasas, células positivas a caspasa 3 y niveles de proliferación (Ki-67). Mientras el número de células en proliferación es similar en los tumores deficientes para *Trp53* y en los doble deficientes, el nivel de apoptosis es mayor para el modelo doble mutante.

4.5.5. $p21^{Cip1}$ y latencias de aparición de linfomas

El hecho de que en todas las muestras de linfomas tímicos analizadas se encuentre expresión de $p21^{Cip1}$ en ausencia de p53 apunta hacia un papel importante para esta proteína en la formación y/o desarrollo de este tipo de tumor.

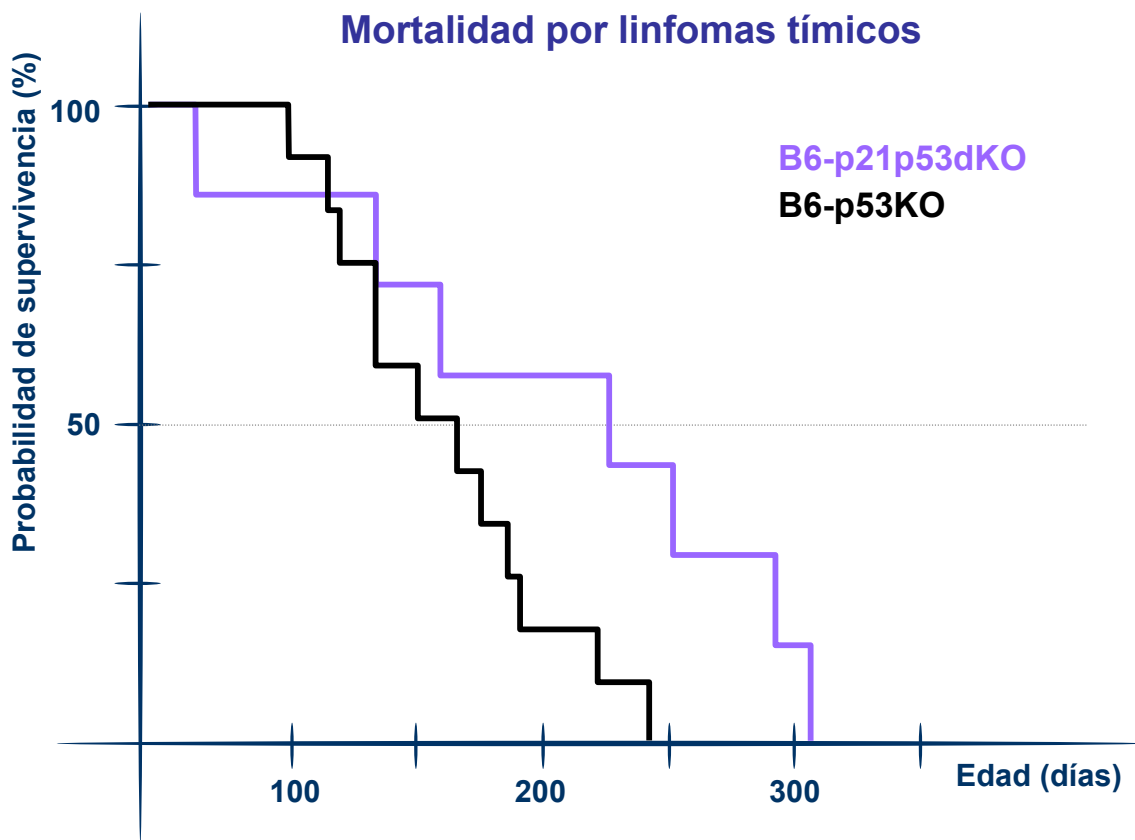


Figura 4.18. Representación de Kaplan-Meier de la probabilidad de supervivencia cuando la causa de muerte considerada es exclusivamente el linfoma tímico.

4.6. Ensayos con fibroblastos embrionarios

Los datos obtenidos en los distintos estudios *in vivo* sugieren que $p21^{Cip1}$ favorece de alguna forma la supervivencia celular o aporta algún tipo de ventaja proliferativa a las células T, al reducir su nivel de apoptosis. Sin embargo, mientras que este efecto parece claro en los linfomas T del timo, en otros tipos tumorales –como los sarcomas– $p21^{Cip1}$ podría estar provocando un efecto diferente. De hecho, la incidencia de sarcomas en general (considerando en conjunto todos los tipos de sarcoma) en ratones B6-p53KO fue de un 23.5%, mientras que en el modelo B6-p21p53dKO fue de un 55.6%.

Para profundizar en el papel de $p21^{Cip1}$ se obtuvieron fibroblastos embrionarios (MEFs) con el objeto de poder estudiar determinados parámetros del ciclo de división en células deficientes para $p21^{Cip1}$ y $Trp53$. Se realizaron varios ensayos *in vitro* como por ejemplo, el análisis de las duplicaciones de población acumuladas en cultivo, la capacidad de formar colonias, el crecimiento sin adhesión a un sustrato o la capacidad de desarrollar tumores en trasplantes *in vivo*.

4.6.1. Duplicaciones de población celular en cultivo

Los cultivos celulares primarios se dividen un número determinado de veces, deteniéndose a continuación y entrando en un estado de senescencia replicativa. La inactivación de genes supresores de tumores lleva consigo la eliminación de este estado de senescencia celular [Garkavtsev *et al.*, 1998]. Los datos de cinética de proliferación en base al número acumulado de duplicaciones de la población de MEFs en cultivo vinieron a apoyar la hipótesis de que la falta de $p21^{Cip1}$ tiene efectos diferentes –incluso opuestos– en función del tipo celular que se estudie. A la vista de los datos representados en la figura 4.12, la falta de $p21^{Cip1}$, añadida a la de p53, aporta a los fibroblastos una mayor capacidad proliferativa.

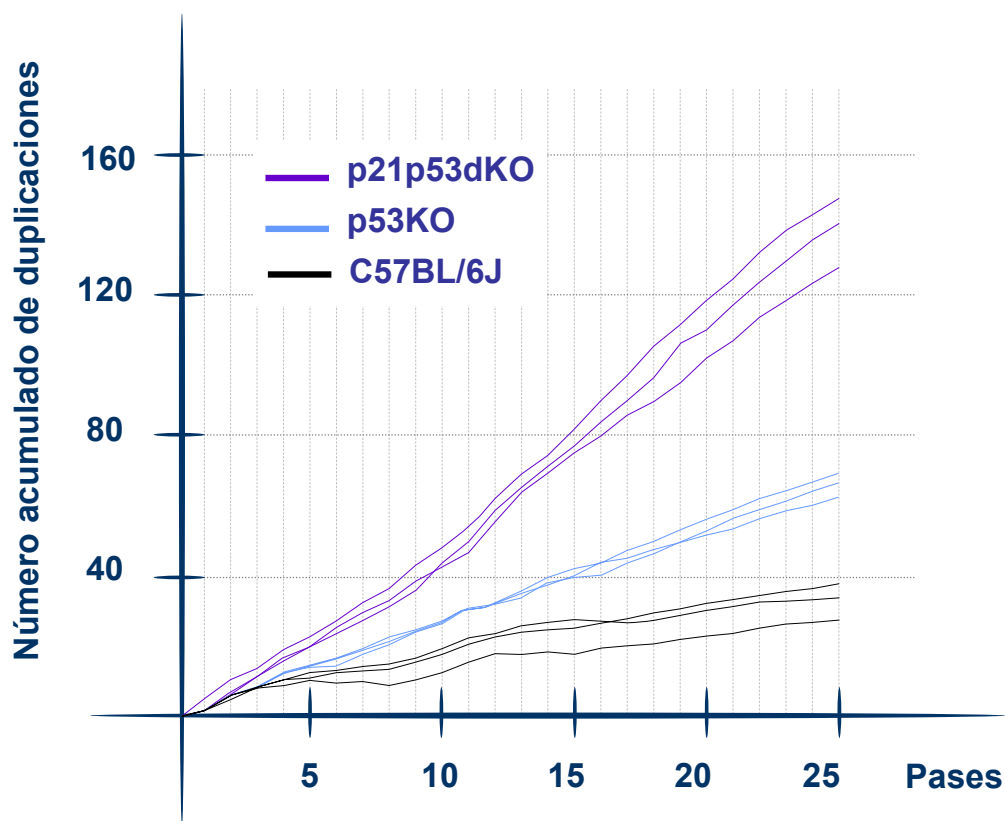


Figura 4.19. Proliferación de fibroblastos embrionarios en cultivo. Representación del número de duplicaciones de células en cultivo en función del pase.

4.6.2. Formación de colonias y crecimiento en soft-agar

Se estudió la eficiencia de formación de colonias en fibroblastos embrionarios mutantes nulos para $p21^{Cip1}$, $Trp53$, para ambos genes, y en controles WT. Como se esperaba, los fibroblastos derivados de ratones WT no formaron colonias. Un resultado parecido se obtuvo con los fibroblastos derivados de ratones B6-p21KO, en este caso, el máximo número de colonias que se observó en una placa (6×10^3 células sembradas) fue de 6. Tanto los fibroblastos derivados de ratones B6-p53KO como los derivados del doble mutante mostraron una mayor eficiencia de formación de colonias.

Los fibroblastos embrionarios doble mutantes cultivados en condiciones que previenen la adhesión a sustrato fueron capaces de crecer y formar grandes colonias. En contraste, en los fibroblastos embrionarios mutantes sencillos para *Trp53* y *p21^{Cip1}* no se encontraron colonias tras cultivarlos en “soft-agar” durante 14 días.

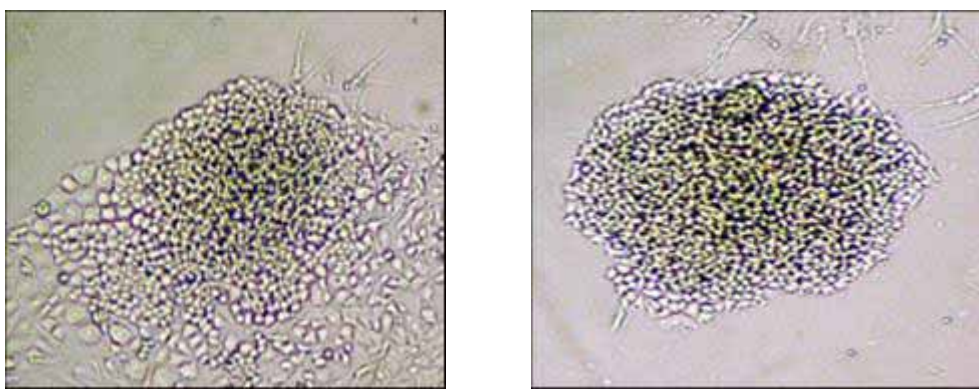


Figura 4.20. Crecimiento sin adhesión a la placa de cultivo de fibroblastos embrionarios obtenidos de ratones (fetos) doble mutantes.

4.6.3. Desarrollo de tumores en ensayos “xenograft”

En otro experimento realizado con el objeto de analizar si los fibroblastos embrionarios derivados de los distintos genotipos obtenidos presentaban la capacidad de desarrollar fibrosarcomas *in vivo*, se inocularon por vía subcutánea 10^6 células (MEFs) en ratones inmunodeficientes *nude* (ratones atímicos BALB/cJ-*nude*). Tras seguir su evolución durante 6 semanas, no se encontró crecimiento en ninguno de los ratones inoculados. Según estos resultados, ni los fibroblastos embrionarios B6-p21KO, ni los B6-p53KO, ni los dobles mutantes B6-p21p53dKO tienen capacidad de formar tumores cuando se transplantan.

4.6.4. Irradiación e inestabilidad cromosómica

En fibroblastos derivados de ratones B6-p21KO se encontró una alta incidencia de cariotipos tetraploides (4n), y también, se pudieron identificar fusiones teloméricas no clonales afectando a cromosomas no homólogos en un 25% de las células analizadas.

En fibroblastos derivados de ratones B6-p53KO se encontraron cariotipos diploides (2n) y tetraploides (4n) en una proporción similar, si bien todas las células analizadas presentaban una evidente inestabilidad cromosómica. Todas las células presentaban anomalías cromosómicas numéricas y estructurales que incluían fusiones teloméricas no clonales, monosomías, cromosomas dicéntricos, traslocaciones que implicaban al cromosoma 10 de manera recurrente con diferentes cromosomas.

Por último, los fibroblastos derivados del doble mutante para $p21^{Cip1}$ y $Trp53$ presentaron características similares a los mutantes sencillos B6-p53KO desde un punto de vista cromosómico, observándose células diploides y tetraploides con similares aberraciones cromosómicas.

Par	p21KO	p53KO	p21p53dKO	
1	3	2	4	
2	4	4	3	
3	3	2	3	
4	4	2	4	
5	4	3	3	
6	4	2	2	
7	3	1	2	
8	4	2	3	
9	4	2	2	
10	3	2	2	
11	4	2	2	
12	1	3	1	
13	3	1	3	
14	4	2	3	
15	5	2	-	
16	4	4	2	
17	4	2	4	
18	4	2	2	
19	5	2	2	
X	3	2	-	
Y	-	1	-	
	19	5	9	Polisomías
	1	2	3	Uni/nulisomías

Tabla 4.5. Tabla resumen de las anomalías cromosómicas significativas encontradas en fibroblastos embrionarios irradiados (6 Gy).

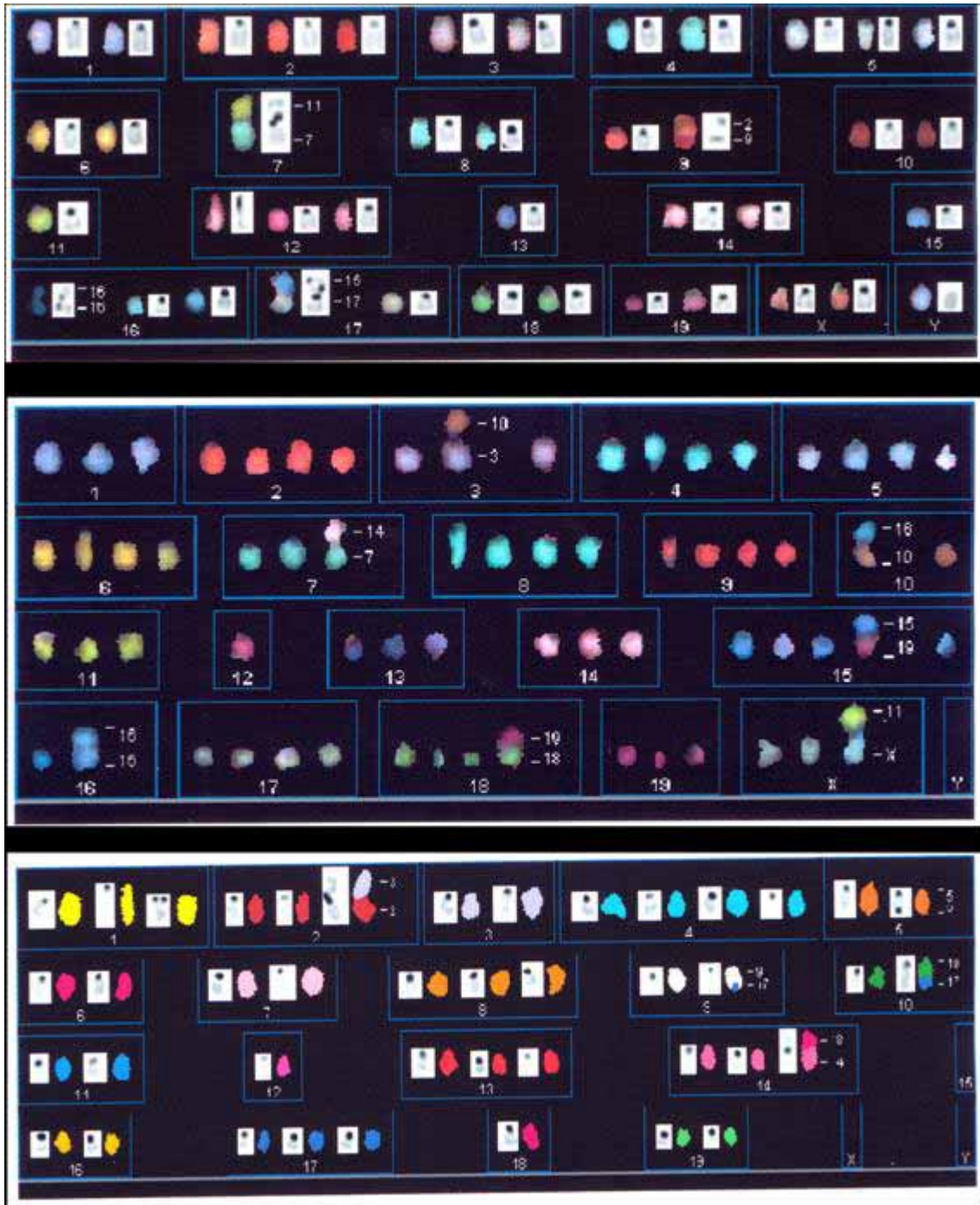


Figura 4.21. Cariotipo espectral (SKY: spectral karyotyping) obtenido tras irradiar fibroblastos (MEF) procedentes de los distintos genotipos estudiados.

4.6.5. Respuesta a irradiación en MEFs

Tras irradiar fibroblastos embrionarios en cultivo durante su fase de crecimiento exponencial a una confluencia del 50-60% se vio que a las 24 horas había diferencias en cuanto al porcentaje de células que se encontraban en las distintas fases del ciclo celular. Aproximadamente, un 75% de los MEFs WT se detuvo en la fase G1, mientras que

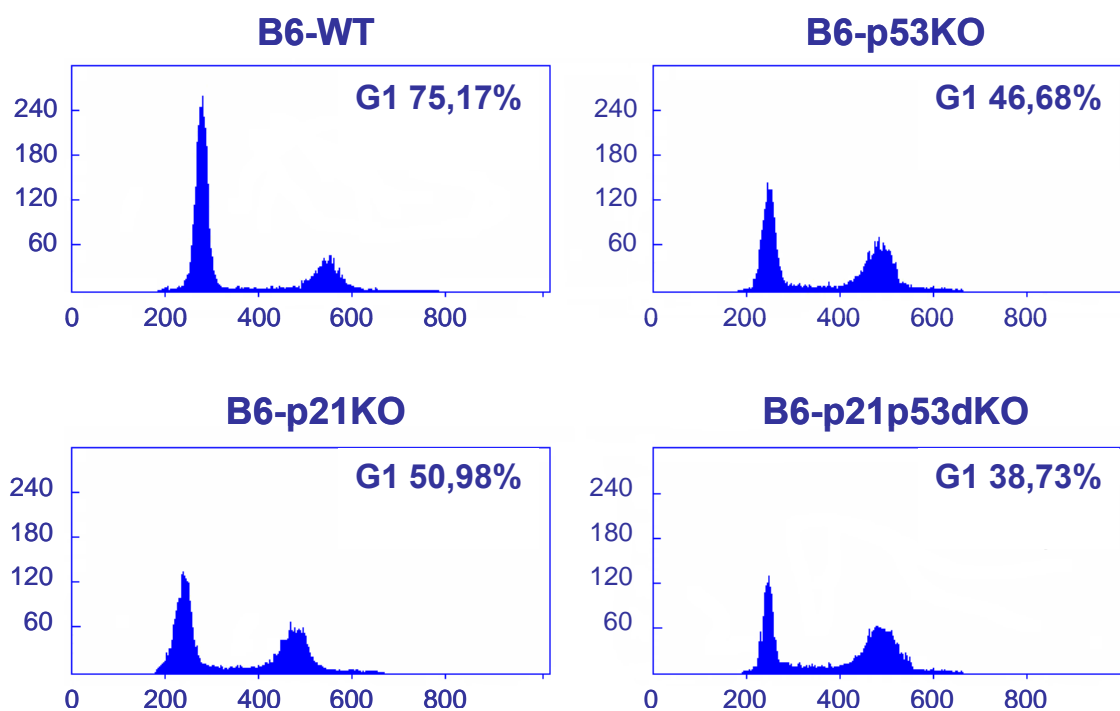


Figura 4.22. Células detenidas en la fase G1 del ciclo celular después de someter fibroblastos embrionarios de los 4 genotipos estudiados a irradiación γ (6Gy). Los MEFs se irradiaron durante el crecimiento exponencial a una confluencia del 50-60%. El análisis por citometría de flujo mostrado se realizó 24 horas después de la irradiación.

	WT	p21KO	p53KO	dKO	WT	p21KO	p53KO	dKO	
	75,17	50,98	46,68	38,73	75,31	70,30	70,13	71,82	G0/G1
	1,60	6,16	5,83	11,72	2,23	4,74	5,31	5,60	S
	22,78	40,43	47,05	48,05	21,40	23,82	24,36	19,66	G2/M
	0,51	2,90	0,60	2,00	1,27	1,51	0,41	3,58	SubG0
	24 horas post-irradiación				48 horas post-irradiación				

Tabla 4.6. Exposición de fibroblastos embrionarios a una dosis única de radiación γ (6Gy) y determinación del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 24 y 48 horas.

5

Discusión

5. *Discusión*

El ratón de laboratorio es un modelo ciertamente estimable para el estudio de neoplasias de origen linfohematopoyético. Determinadas líneas de ratón muestran incidencias bastante elevadas de tumores espontáneos del sistema linfohematopoyético, por lo que en general no resulta difícil encontrar modelos adecuados para estudiar muchas de estas neoplasias. De entre los tumores de origen linfohematopoyético que se presentan espontáneamente en el ratón, el linfoma lo hace con una frecuencia relativamente alta (ver tabla 1.4 en la introducción). Otra característica interesante de este modelo es que, de la misma forma que pueden encontrarse tratamientos con los que inducir específicamente ciertos tipos de cáncer, hay también disponibles líneas de ratón resistentes a su inducción. Por otro lado, el genoma del ratón es un sistema conocido y su manipulación para crear modelos con alteraciones genéticas específicas resulta hoy en día bastante asequible.

Sin embargo conviene señalar la importancia del fondo genético que debe ser tomada en cuenta durante el estudio fenotípico de un ratón mutante. Según esto, el efecto que un alelo mutante –o una modificación genética introducida– pudiera tener sobre la incidencia o el espectro tumoral debería tomarse siempre con cautela y colocarse, en la medida de lo posible, en un contexto genético determinado antes de iniciar un análisis comparativo de los datos en mayor profundidad. Se debe prestar atención a las características fisiológicas y patologías inherentes al fondo genético, y a la distribución de incidencias y latencias tumorales en función del sexo. Conviene que se encuentren representados ambos sexos de manera equilibrada en todos los grupos objeto de estudio. Siempre que sea posible, se debe garantizar que la muestra contiene suficientes individuos y que las características anteriormente mencionadas y su influencia sobre las conclusiones hayan sido evaluadas. Por último, se debe tener presente que las condiciones sanitarias, de mantenimiento y de manejo pueden alterar parámetros inmunológicos y/o fisiológicos. Esto puede a su vez modificar

el desarrollo de tumores y distorsionar su comparación con otros modelos o con grupos control. Se ha visto también que muchos de los modificadores mencionados afectan de manera distinta a ratones mutantes y a sus controles *wild type*, por lo que los efectos de una mutación pueden ser aún más difíciles de interpretar.

Como paradigma –ciertamente relevante para este trabajo– de lo anteriormente apuntado, cabe exponer aquí el rango de variación que experimenta el espectro tumoral de ratones mutantes nulos para el gen *Trp53* en función de su fondo genético y sexo. La ausencia de p53 tiene un efecto muy severo sobre la incidencia tumoral en ratón. No obstante, incluso un fenotipo tan intenso puede resultar en gran medida modulado por el fondo genético del animal. Los ratones nulos para *Trp53* en un fondo genético mixto (50% C57BL/6J y 50% 129S2) desarrollan linfomas de células T con una incidencia ligeramente superior al 70% [Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1992]. Si el fondo genético de C57BL/6J se incrementa hasta un 99%, la incidencia de linfomas T no varía significativamente, mientras que si se coloca la mutación en un fondo genético 129S2, entonces el 50% de los ratones machos mutantes desarrollará teratomas malignos [Donehower et al., 1995]. De igual manera, la latencia de aparición de tumores también se ve reducida para los ratones p53KO en fondo 129S2 [Donehower et al., 1995]. Si se traslada la mutación a un fondo genético BALB/cJ, la incidencia de linfomas T se ve reducida a un 53% [Kuperwasser et al., 2000]. En este último caso, se encontró que el tumor predominante en el mutante heterocigoto era el carcinoma mamario (42%), seguido del linfoma de células T (24%) y del hemangiosarcoma en tercer lugar (8%). Los ratones heterocigotos para el alelo nulo de *Trp53* en el fondo mixto mencionado anteriormente desarrollan principalmente sarcomas (en particular osteosarcomas y hemangiosarcomas). En un trabajo relacionado se vio que durante el retrocruzamiento de ratones mutantes para *Trp53* hacia el fondo genético BALB/cJ, la F6 desarrollaba linfomas con una incidencia del 66% y los hemangiosarcomas se presentaban en un 28% de los casos. El mismo número de

retrocruzamientos en un fondo DBA/2J arrojó una incidencia del 87% para los linfomas, descendiendo la de hemangiosarcomas hasta un 3% [Backlund *et al.*, 2001].

Son menos los datos de que se dispone en relación a la influencia del fondo genético sobre el espectro tumoral en ratones mutantes nulos para $p21^{Cip1}$. Más aún, no son muchos los estudios detallados sobre el espectro tumoral en este modelo animal. En un principio se reseñó la ausencia de neoplasias espontáneas en ratones deficientes para $p21^{Cip1}$ [Brugarolas *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1995], más tarde se ha podido demostrar que estos ratones en realidad sí presentan cierta susceptibilidad a desarrollar determinados tipos de tumor a partir de los 16 meses de edad [Martín-Caballero *et al.*, 2001]. Los resultados aportados por el presente trabajo vienen a confirmar esta característica, observándose una incidencia media de tumores del 42% (en fondo genético C57BL/6J), similar a la descrita por Martín-Caballero *et al.*, (41%) en ratones con un fondo genético mixto (C57BL/6J x 129S2). Se observa, no obstante, una pequeña diferencia entre estos dos fondos genéticos en cuanto a su fenotipo tumoral: en ambos modelos el tumor más frecuente es el sarcoma histiocítico y la latencia media de aparición es similar (alrededor de 15 meses), sin embargo, su incidencia se ve reducida desde un 52.3% a un 42.9% al aumentar el porcentaje de fondo C57BL/6J.

Algunos resultados obtenidos por otros grupos han puesto de manifiesto la importancia que el fondo genético del ratón tiene sobre el desarrollo, morfología y diseminación de linfomas en un modelo de ratón deficiente para $Trp53$ [van Meyel *et al.*, 1998].

El efecto del fondo genético sobre el fenotipo tumoral se ha visto en otros modelos murinos. Por ejemplo, los mutantes heterocigotos nulos para $Pten$ en un fondo genético mixto BALB/c x 129 empiezan a desarrollar tumores a una edad de 6 meses [Freeman *et al.*, 2006]. Si se realizan dos retrocruzamientos con

C57BL/6J se empiezan a ver tumores a los 1.5 meses [Podsypanina et al., 1999]. Más aún, la incidencia de hiperplasias linfoides en machos y hembras fue del 45% y 100% respectivamente en el fondo C57BL/6J x 129 y del 20% y 33% en el fondo BALB/c x 129 [Freeman et al., 2006].

Lo anteriormente expuesto revela la importancia del fondo genético en la expresión fenotípica de modelos mutantes de ratón. Como quiera que una parte considerable de los resultados obtenidos en la primera fase del presente trabajo se encuentra relacionada con cambios, a veces bastante sutiles, en incidencias y latencias de determinados tipos de tumores, es necesario señalar que todos los experimentos se realizaron en ratones cuyo fondo genético era equivalente (99.9% C57BL/6J).

En principio, tanto $p21^{Cip1}$ como $p53$ son proteínas con un papel importante durante el desarrollo embrionario. De hecho, se ha encontrado expresión de $p53$ en todos los tejidos de ratón hasta aproximadamente el día 10.5 de desarrollo embrionario [Schmid et al., 1991]. Los datos de mortalidad embrionaria obtenidos en el presente trabajo vienen a abundar en esta característica. Tanto los ratones B6- $p53$ KO, como los B6- $p21p53$ dKO muestran una elevada mortalidad embrionaria (33.4% y 66.4%, respectivamente) de mutantes homocigotos. Aunque la causa de mortalidad en uno y otro fue la misma, en el doble mutante la incidencia fue casi el doble de la observada en el mutante sencillo B6- $p53$ KO. El efecto cooperativo que la falta simultánea de ambos genes tiene sobre el desarrollo de malformaciones craneofaciales y defectos del sistema nervioso central apunta a su participación en vías independientes, o sólo parcialmente solapadas, durante el desarrollo de los tejidos implicados. En relación con esto, se ha visto que $p21^{Cip1}$ se expresa en múltiples tejidos durante su desarrollo y diferenciación y que esta expresión no depende, en principio, de $p53$ [McLeod et al., 1995]. No obstante, deben existir vías alternativas o complementarias que compensan, al menos parcialmente, la falta simultánea de ambos genes y por ello,

algo más del 30% de los ratones doble mutantes sí completa el desarrollo embrionario y alcanza la edad adulta.

Curiosamente, no se observó mortalidad embrionaria alguna en el mutante sencillo B6-p21KO. Esto sugiere que la falta de p21^{Cip1} se ve compensada totalmente en este modelo. Esta compensación total del fenotipo necesitaría, al menos en parte, de la actividad de p53. Según esto, cuando ambos genes faltan, al fenotipo propio del p53KO se le sumaría la ausencia de compensación parcial que éste aporta a la falta de p21^{Cip1}.

La anomalía encontrada en el 100% de los casos de mortalidad embrionaria fue una alteración de la maduración del sistema nervioso central que provocó principalmente exencefalia en el feto. Otros modelos mutantes (KO) de ratón que presentan este fenotipo son: *Cart1*, *Casp3*, *Casp9*, *Cecr2*, *cited2*, *crooked tail*, *Ep300*, *Jarid2*, *Nf1*, *Nog*, *Pax2*, *Ski*, *splotch*, *Tcof1*, *Traf4*, *Traf6*, *YY1*. En muchos de estos mutantes se han descrito variaciones en la penetrancia de esta característica en función del fondo genético. En general, al aumentar el porcentaje de fondo genético propio o relacionado con estirpes del grupo “129”, la severidad del fenotipo aumenta. También se ha visto que las anomalías oculares (*e.g.* microftalmia) son muy frecuentes en ratones nulos para *Trp53* en un fondo C57BL/6J, pero en absoluto lo son en el fondo 129S2 [Ikeda *et al.*, 1999].

El desarrollo postnatal de los ratones dobles mutantes B6-p21p53dKO fue normal, de lo que se deduce que la falta de p53 y p21^{Cip1} tiene efecto sobre la génesis del tejido, pero su función no se vería afectada de forma significativa.

En el presente trabajo se aportan nuevos resultados que sugieren tanto un papel *oncogénico* para p21^{Cip1} en linfomas tímicos, como su aparente necesidad para el desarrollo de este tipo de tumores –en contraste, por ejemplo, con los

sarcomas– y su independencia funcional de p53. El linfoma T tímico fue el tumor más frecuente y el que presentó el menor período de latencia en ratones nulos para *Trp53*. En contraste, el mutante doble B6-p21p53dKO presentó una reducción significativa de la incidencia de linfomas tímicos. En el caso de los mutantes heterocigotos para *Trp53*, el 44% de los tumores fueron caracterizados como linfomas, de los cuales aproximadamente el 70% fueron linfomas T. Al eliminar $p21^{Cip1}$ en el heterocigoto, la incidencia general de linfomas descendió hasta un 12% y todos ellos fueron caracterizados como linfomas de células T. En ratones nulos para *Trp53* todos los linfomas encontrados fueron linfomas de células T (positivos para CD3), con independencia del estatus de $p21^{Cip1}$.

El aumento en la supervivencia del doble mutante B6-p21p53dKO no se correlaciona con una menor susceptibilidad general a desarrollar tumores y podría tener su origen en un cambio del espectro tumoral de este modelo respecto a B6-p53KO. En el primero, la incidencia observada de linfomas tímicos fue de un 44% mientras que en el segundo superó el 70%. El impacto que la presencia de linfomas T tímicos tiene sobre la supervivencia, deriva de su peculiar progresión clínica. Los linfomas tímicos en ratón evolucionan según un curso clínico agudo, con una aparición muy rápida de síntomas (principalmente disnea), que hace necesario poner punto final al experimento (eutanasia). Esto podría explicar una extensión general en la supervivencia en el doble mutante, si bien, en contraste con lo observado en el ratón B6-p53KO, los linfomas tímicos en el doble mutante aparecen también más tarde. Tras el estudio comparativo de los linfomas tímicos del doble mutante respecto del mutante sencillo, se concluyó que existe tanto una disminución de la incidencia, como un aumento de la latencia para este tipo de tumores.

Este cambio en el espectro tumoral y en la latencia de aparición, en principio sorprendente, parece estar de acuerdo con otros resultados obtenidos en modelos murinos relacionados. Por ejemplo, los ratones nulos para el gen *Atm* desarrollan

exclusivamente linfomas tímicos entre los 3 y 6 primeros meses de vida. *Atm* es una proteína-quinasa que activa a *p53* en respuesta a un daño en el ADN. En este mutante, la eliminación adicional de $p21^{Cip1}$ aumentó la latencia de aparición de linfomas tímicos de manera significativa [Wang et al., 1997] y redujo su incidencia desde un 100% a un 36% [Shen et al., 2005]. Como se esperaba, los ratones doble mutantes *Atm/Trp53* desarrollaron linfomas tímicos a los 2 meses de edad [Xu et al., 1998]. Por otro lado, al tratar ratones WT, $p21^{HET}$ y $p21^{KO}$ con el carcinógeno ENU se vio que la incidencia de linfomas se reducía desde más de un 30% para el WT y el heterocigoto, hasta un 10% en el mutante nulo [Philipp-Staheli et al., 2003]. Los ratones deficientes para *Ink4c* ($p18^{Ink4c}$) y *Trp53* desarrollan tipos tumorales nuevos no vistos en los mutantes sencillos, como por ejemplo carcinomas hepatocelulares y coriocarcinomas testiculares. Si a la falta de *p53* se le suma la de $p27^{Kip1}$, entonces aparecen otra serie de tumores como el carcinoma de colon [Damo et al., 2005]. La ausencia de $p27^{Kip1}$ en un mutante nulo para *Ink4a/Arf* provoca una aceleración del desarrollo de tumores. En contraste, la ausencia de $p21^{Cip1}$ no parece afectar a la supervivencia de estos mutantes. Sí afecta, por el contrario, al espectro tumoral aumentando la incidencia de fibrosarcomas [Martín-Caballero et al., 2004].

Este mismo aumento en la supervivencia al eliminar $p21^{Cip1}$ se observó también en modelos heterocigotos nulos para *Trp53*. En ratones B6- $p53^{HET}$, la edad promedio de aparición de tumores se elevó de 11 a 19 meses (un aumento del 73%) en ausencia de $p21^{Cip1}$. Aunque los ratones nulos para *Trp53* desarrollan diversos tipos de tumor, el único grupo en el que se pudo apreciar una clara reducción de la incidencia y/o un aumento de la latencia fue en los linfomas. En realidad, también se observó una reducción en la incidencia de carcinomas –que no se llegaron a encontrar en el doble mutante–, pero su significación estadística parece discutible.

Por lo general, uno de los problemas que se encuentran al estudiar modelos mutantes de ratón es que en realidad lo que se mide no es una latencia de *aparición* de tumores o su progresión, sino la edad a la que el animal muere por un tumor. En nuestro caso, al decir que los linfomas aparecen más tarde nos referimos a que los ratones tuvieron que ser eutanasiados más tarde de acuerdo a los parámetros comunes de punto final previamente acordados para todos los modelos. En base a los experimentos realizados, no se puede afirmar con seguridad que el linfoma tímico evolucione más lentamente en el doble mutante, podría ser también que el tumor haya aparecido más tarde, y que su progresión sea similar.

Lo que sí parece claro es que en los ratones nulos para $p21^{Cip1}$ no se ve acelerado el proceso general de tumorigénesis en ausencia de p53. Esto sugiere que la actividad de $p21^{Cip1}$ como supresor de tumores depende en gran medida de p53, al menos para la mayoría de los tejidos. Sin embargo, en el caso específico de los linfomas tímicos, el efecto de $p21^{Cip1}$ parece ser independiente de p53.

El aparente “tropismo” de ciertas lesiones o combinaciones de lesiones genéticas y/o epigenéticas por determinados tipos tumorales es evidente. Es éste un problema complejo y difícil de abordar, y que está, por supuesto, más allá del alcance de este trabajo. Lo que sí parece ser relevante para nuestro estudio es la idea de que en el ambiente del timo se deben dar unas condiciones favorables en las cuales, las células T superarían con mayor facilidad un hipotético estadio inicial de crisis y darían lugar a un tumor con mayor *facilidad*. La generación de cierto tipo de daño en el ADN (roturas de doble cadena) y su vía de señalización tienen un papel en todo esto; los ratones sometidos a radiación γ , los mutantes nulos para *Atm* y los mutantes nulos para *Trp53* (en un porcentaje muy elevado) desarrollan todos linfomas tímicos.

Dado que los ratones utilizados en el estudio poseían un fondo genético equivalente, no es posible explicar las diferencias encontradas en base a la acción de genes modificadores o diferencias alélicas –o de expresión– en genes clave para el desarrollo de tumores. Es por ello que $p21^{Cip1}$ –o mejor dicho su falta– se sitúa como principal responsable de la menor susceptibilidad al desarrollo de linfomas tímicos en el modelo B6-p21p53dKO. Alternativamente, podría pensarse que la presencia de $p21^{Cip1}$ favorece, de alguna forma, la aparición y/o el desarrollo de este tipo de tumor. Esta última hipótesis podría encontrar apoyo en el hecho de que la inmensa mayoría de los linfomas tímicos obtenidos de ratones B6-p53KO expresan $p21^{Cip1}$. En este sentido, se ha visto que la falta de $p21^{Cip1}$ tiene un efecto protector frente al desarrollo de linfomas tímicos en modelos de inducción mediante radiación γ en ratones deficientes sólo para $p21^{Cip1}$ [Martín-Caballero et al., 2001 y nuestros datos]. En el presente trabajo se describe que el modelo B6-p21p53dKO irradiado desarrolla linfomas tímicos en un 100% de los casos, al igual que el ratón B6-p53KO y el WT (el fondo genético C57BL/6J presenta una gran susceptibilidad al desarrollo de linfomas inducidos por irradiación γ). El período de latencia para el doble mutante es significativamente mayor que en el mutante sencillo B6-p53KO y similar al observado en ratones control (WT), lo que indica que la falta adicional de $p21^{Cip1}$ da lugar a la recuperación del fenotipo salvaje. Esto sugiere que $p21^{Cip1}$ actúa en algún momento durante el desarrollo de linfomas de manera que podría facilitar su progresión. El que todos los linfomas tímicos obtenidos presenten las mismas características histopatológicas, y el que el período de latencia aumente significativamente en el doble mutante parecen confirmar que $p21^{Cip1}$ tiene su efecto principalmente sobre la progresión tumoral. El hecho de que el primer linfoma tímico encontrado en el modelo B6-p21p53dKO irradiado se presentase después de que el último de los B6-p53KO hubiese tenido que ser sacrificado debido a la presencia de tumores, nos da una idea del dramático impacto que la falta de $p21^{Cip1}$ tiene sobre la latencia de aparición de linfomas tímicos en estas circunstancias.

Así mismo, lo anterior parece encajar bien con el hecho de la ausencia de linfomas T en ratones nulos para $p21^{Cip1}$ en diferentes fondos genéticos. Una posible explicación de la ausencia de linfomas tímicos en ratones deficientes en $p21^{Cip1}$ sería que esta proteína no interviene en la formación del tumor y sólo tendría un efecto sobre su progresión. El hecho de que el doble mutante desarrolle linfomas tímicos, tanto de manera espontánea como inducida, sugiere que, en determinadas situaciones, $p21^{Cip1}$ interviene de manera positiva, y probablemente indirecta, en el desarrollo de linfomas tímicos, pero también demuestra que los linfomas tímicos se desarrollan en su ausencia cuando $p53$ no es funcional. Todo esto apunta hacia un papel modulador para $p21^{Cip1}$ en la progresión –más que en la aparición– de este tipo de tumor.

Al menos en las células T del timo, $p21^{Cip1}$ podría realizar funciones importantes e independientes de $p53$. El hallazgo de la expresión de $p21^{Cip1}$ en linfomas tímicos obtenidos de ratones nulos para $Trp53$, demuestra que en este contexto particular existen factores alternativos capaces de activar la transcripción de $p21^{Cip1}$ en respuesta a determinados estímulos y por mecanismos aún no bien conocidos. Lo que sí parece claro es que la mayoría de los linfomas tímicos conserva esta vía activada durante la progresión del tumor. Por el contrario, y en cualquier caso, la expresión de la proteína $p21^{Cip1}$ no aporta una ventaja proliferativa a los linfocitos T en un estadio neoplásico. Esto se ha comprobado a través de los niveles de Ki-67 e índices mitóticos, que son iguales en linfomas tímicos con y sin $p21^{Cip1}$. Conviene resaltar, eso sí, que en nuestro trabajo no se ha encontrado ninguna correlación entre los niveles de expresión de la proteína $p21^{Cip1}$ y el período de latencia o el grado histológico de los linfomas tímicos estudiados.

Trás un análisis de los resultados obtenidos durante la caracterización fenotípica de los linfomas tímicos antes mencionados, se especuló con la posibilidad de que –por un mecanismo no bien caracterizado– $p21^{Cip1}$ estuviese

interfiriendo con el mecanismo de apoptosis en estos tumores. Varios son los datos que apuntan en la dirección de una regulación negativa de la apoptosis por parte p21^{Cip1} en células T del timo. En primer lugar, el índice de apoptosis fue mayor –aproximadamente el doble– en los tumores sin p53 que tampoco expresaban p21^{Cip1}. En segundo lugar, el índice de proliferación –medido por positividad al antígeno Ki-67– fue similar en todos los linfomas tímicos analizados con independencia de su genotipo. En tercer lugar, en los linfomas tímicos en los que existía expresión de p21^{Cip1}, la localización de esta proteína fue tanto nuclear como citoplasmática, pero siempre se vio p21^{Cip1} citoplasmática. En este sentido, algunos datos obtenidos a partir de tumores humanos apuntan hacia la localización citoplasmática de p21^{Cip1} como un factor de pronóstico negativo que se asocia con una reducción marcada de la apoptosis.

En suma, todo lo anterior apunta a que la proteína p21^{Cip1} reduce el nivel de apoptosis en linfomas tímicos y que lo hace por un mecanismo independiente de p53. Según esto, la ausencia de p21^{Cip1} retiraría el freno a la vía apoptótica.

La función de p21^{Cip1} en linfomas tímicos parece apartarse de lo observado en otros tipos de tumor –inhibición o retardo en el crecimiento–, de entre los que destacan tumores de la piel y otros carcinomas. Esto es así no sólo en tumores espontáneos, sino que también se ha observado en tumores inducidos. En este sentido, existe una creciente evidencia experimental que apunta hacia dicha actividad para p21^{Cip1}, tanto dependiente como independiente de p53 [Gartel & Tyner, 2002].

La expresión de p21^{Cip1} se ha relacionado con una inhibición de la apoptosis en melanomas [Gorospe *et al.*, 1997] y en cáncer colorrectal [Polyak *et al.*, 1996]. No obstante, el papel de p21^{Cip1} en este proceso sigue siendo controvertido ya que se ha visto también que su expresión induce apoptosis en tumores de mama [Sheikh *et al.*, 1995; Shibata *et al.*, 2001], de endometrio [Ramondetta *et al.*, 2000] y en

carcinomas de útero [Tsao *et al.*, 1999]. Esto parece reflejar que su papel es como modulador del crecimiento celular y que varía en función del tejido y del tipo de tumor. Por otro lado, los niveles de apoptosis en una célula T están influenciados también por el tejido en que se encuentre, así, los linfocitos esplénicos de ratones mutantes nulos para $p21^{Cip1}$ tienen un nivel de apoptosis basal bastante elevado y mayor que los linfocitos del timo [Komarova *et al.*, 2000].

Durante el desarrollo del presente estudio nos preguntamos también si el efecto que la falta de $p21^{Cip1}$ tiene sobre los linfomas tímicos se extiende a otros tipos tumorales. En ningún sarcoma de los encontrados en ratones B6-p53KO se encontró expresión de $p21^{Cip1}$, lo que sugiere que lo visto en linfomas tímicos no puede extrapolarse a otros tumores de los encontrados en estos modelos.

Teniendo en cuenta la complejidad de las interacciones moleculares de $p21^{Cip1}$ tanto con proteínas nucleares como citoplásmicas, no es fácil proponer un mecanismo a través del cual $p21^{Cip1}$ ejercería su función antiapoptótica. Una posibilidad interesante, sin embargo, sería su capacidad de unirse –inhibiendo su actividad– a la procaspasa 3 [Suzuki *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999]. Esta hipótesis es especialmente atractiva ya que explicaría el porqué $p21^{Cip1}$ interfiere con la señalización apoptótica canalizada tanto a través de Fas como de TNF, y podría justificar, en parte, su independencia de p53. De acuerdo con nuestros resultados y con otros anteriores [Wang *et al.*, 1997; Martín-Caballero *et al.*, 2001], la actividad de $p21^{Cip1}$ como factor que incrementa la supervivencia de células T operaría sólo en células T tumorales (linfomas tímicos), pero no en células T normales (datos obtenidos del experimento de irradiación γ aguda). Parece razonable suponer que las células de un linfoma tímico procesan la señalización proapoptótica de manera diferente a las células T en un ambiente tímico normal. En este contexto, la presencia de $p21^{Cip1}$ aportaría a los linfomas T una mayor probabilidad de supervivencia en su inicio y progresión, lo que explicaría la mayor incidencia y menor latencia de estos tumores en ratones con $p21^{Cip1}$ funcional.

Otra alternativa que se manejó durante el desarrollo del trabajo fue la posibilidad de que $p21^{Cip1}$, por algún mecanismo, afectase positivamente a la supervivencia celular en el timo y/o en los linfomas tímicos. Los datos de respuesta a irradiación aguda parecen descartar esta posibilidad. Según éstos, y de acuerdo con anteriores estudios [Lowe *et al.*, 1993; Deng *et al.*, 1995], tanto los timocitos WT como los nulos para $p21^{Cip1}$ mostraron una fuerte respuesta apoptótica mientras que los deficientes para *Trp53* se mostraron resistentes. Los timocitos doble KO no mostraron apoptosis, lo que indica que $p21^{Cip1}$, independientemente del estatus de *p53*, no afecta a la respuesta aguda a irradiación γ , por lo que ésta podría ser descartada como causa de las diferencias observadas en la incidencia de linfomas tímicos entre modelos con y sin $p21^{Cip1}$. Los datos de expresión de $p21^{Cip1}$ en linfomas vienen a confirmar esto último. El hecho de que todos los linfomas espontáneos obtenidos de ratones B6-*p53*KO presenten expresión de $p21^{Cip1}$ y que ésta sea homogénea es compatible con un papel positivo (activo) para $p21^{Cip1}$ en el desarrollo de estos tumores.

En anteriores resultados publicados por nuestro grupo se ha demostrado la sobreexpresión de *Notch1* en una mayoría de linfomas tímicos inducidos por tratamiento con radiación γ en ratones C57BL/6J [López-Nieva *et al.*, 2004]. Es interesante resaltar que *Notch1*, pese a ser un receptor localizado en la superficie celular, actúa como un factor de transcripción y que $p21^{Cip1}$ se encuentra entre los genes diana [Rangarajan *et al.*, 2001]. Así mismo, la activación constitutiva de *Notch1* –provocada por una mutación que genera una forma truncada de la proteína– da lugar al desarrollo de linfomas linfoblásticos T en el hombre [Ellisen *et al.*, 1991]. Según esto, en linfomas tímicos obtenidos de ratones nulos para *Trp53*, *Notch1* podría ser el factor alternativo que induce $p21^{Cip1}$.

Una parte esencial de la respuesta al daño en el ADN es canalizada a través de *p53* el cual desencadena básicamente dos procesos: parada del ciclo celular en G1 ($p21^{Cip1}$) e inducción de apoptosis (Bax). Por otro lado, *p53* regula de manera

negativa la activación de Notch1 en el timo mediante la inhibición de la presenilina 1 (PS1) [Laws et al., 2004]. Este mecanismo de represión se ha explicado mediante una competición directa por la unión a p300/CBP entre p53 y otros factores de transcripción involucrados en la expresión de PS1 [Pastorcic et al., 2000]. La señalización a través de Notch1 induce el mantenimiento de la capacidad proliferativa y autoregenerativa de precursores hematopoyéticos [Varnum-Finney et al., 2000]. En este contexto, parece razonable suponer que Notch1 podría estar implicado en el mantenimiento de precursores hematopoyéticos, y que esta actividad la ejerce, al menos parcialmente, a través de $p21^{Cip1}$, cuya falta se ha relacionado con la extinción prematura de dichos precursores [Cheng et al., 2000]. Además de esto, se ha demostrado que Notch1 puede inducir la diferenciación hacia células T de precursores linfoides cuando estos entran en el timo [Pear et al., 2003], lo que favorecería la aparición de linfomas de células T. De hecho, Notch1 se ha identificado también como un oncogén en linfomas T en ratón [Radtke et al., 2003], incluidos aquellos obtenidos por irradiación γ [Tsuji et al., 2003]. Notch1, además, está asociado con la expresión de *c-Myc* y *Hes1*. Nuestro laboratorio ha demostrado que la sobreexpresión de *Myc* es muy común en linfomas tímicos [Santos et al., 2006]. Mientras *Myc* es un activador de *Pten*, *Hes1* es un potente inhibidor de la actividad de esta fosfatasa y en un entorno celular con Notch1 activo, la inhibición de *Pten* parece ser predominante [Gutierrez et al., 2007]. Curiosamente, *c-Myc*, $p21^{Cip1}$ y *Notch1* se encuentran normalmente sobreexpresados en linfomas, y la deficiencia de *Pten* da lugar también al desarrollo de este tumor.

Según todo lo anterior, la pérdida de p53 podría dar lugar al desarrollo de linfomas tímicos debido principalmente a una respuesta apoptótica deficiente facilitada por la sobreexpresión de $p21^{Cip1}$ y su traslocación al citoplasma, fenómenos promovidos, a su vez, por la actividad de Notch1. La actividad de *c-Myc* actuaría promoviendo la supervivencia celular. En ratones nulos para $p21^{Cip1}$ este mecanismo estaría bloqueado. En este caso, la actividad de p53 más el bloqueo de la actividad oncogénica de Notch1 en células T por dicha vía darían

como resultado una protección frente al desarrollo de linfomas T. En cualquier caso, nuestros resultados enfatizan la importancia de las vías de regulación en las que $p21^{Cip1}$ estaría involucrada y en las que participaría con independencia del estatus de $p53$.

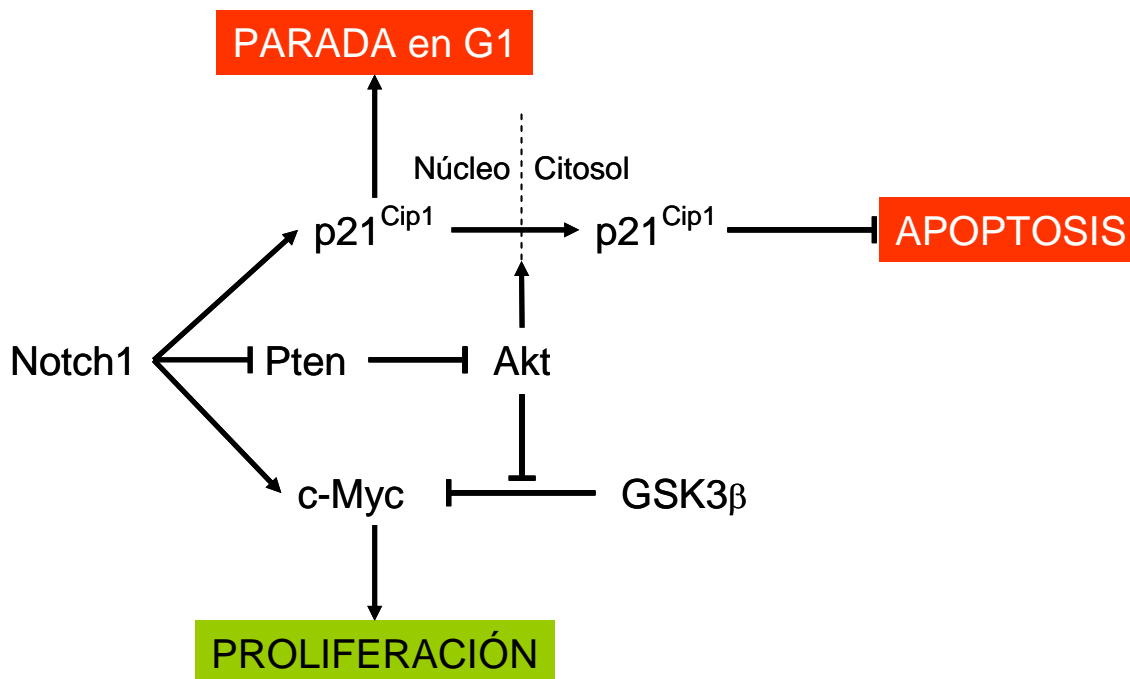


Figura 5.1. Mecanismo hipotético por el cual Notch1 podría actuar como modulador principal de la supervivencia de células T en el timo en un entorno carente de $p53$. En este escenario, la sobreexpresión de Notch1 conllevaría el aumento de actividad de Akt y c-Myc promoviendo la supervivencia celular. A su vez, Akt podría retener una gran parte de $p21^{Cip1}$ en el citoplasma, lo que interferiría con el mecanismo de apoptosis.

Los precursores hematopoyéticos presentan un elevado índice de proliferación en ratones nulos para $p21^{Cip1}$, dando lugar a un agotamiento prematuro de dicha fracción celular. Sin embargo, en precursores aún más inmaduros, $p21^{Cip1}$ parece ser necesario para el inicio de su proliferación dependiente de factores de crecimiento [Lee *et al.*, 2001]. Curiosamente, se han

encontrado niveles altos de p21^{Cip1} en linfoblastos de ratones nulos para *Atm* y en pacientes con ataxia telangiectasia [Xu et al., 1996], y la falta de p21^{Cip1} reduce la incidencia de linfomas T tanto en ratones control [Martín-Caballero et al., 2001] como en ratones deficientes para *Atm* [Wang et al., 1997]. El hecho de que, en ciertos tumores, la expresión de p21^{Cip1} se encuentre asociada con un mal pronóstico y con resistencia a apoptosis inducida por quimioterapia [Ruan et al., 1999] parece estar en línea con nuestros resultados. Aún así, y como se verá más adelante, el valor pronóstico de p21^{Cip1} no es, ni mucho menos, objeto de consenso.

Se ha visto que ciertas leucemias que expresan altos niveles de p21^{Cip1} tienen un peor pronóstico clínico que las leucemias que no expresan p21^{Cip1}. Por lo visto en estas leucemias, el efecto negativo de la expresión de p21^{Cip1} parece residir en un menor grado de apoptosis, lo que también contribuye a una mayor probabilidad de desarrollar quimiorresistencia. Aunque p21^{Cip1} se encuentra fuertemente regulado por p53, su importancia como factor pronóstico parece ser totalmente independiente del estatus de p53. En líneas celulares derivadas de leucemia, la expresión de p21^{Cip1} parece proteger ciertas dianas (e.g. PARP, pRb y laminina) de la acción de las caspasas.

p21^{Cip1} puede actuar sobre el mecanismo de apoptosis, interfiriendo con la señalización de supervivencia iniciada por la vía PI3K/Akt [Li et al., 2002]. Es probable que, tras su inducción por p53, p21^{Cip1} actúe evitando la apoptosis en células con su ADN dañado hasta que este sea reparado. En este sentido, se ha sugerido que c-Myc tendría también un papel importante en el desarrollo de linfomas T al reprimir la expresión de p21^{Cip1} [Seoane et al., 2002]. La localización citoplásmica de p21^{Cip1} mediada por fosforilación (por parte de PI3K/Akt) tiene un carácter antiapoptótico [Asada et al., 1999]. En el presente trabajo se ha demostrado que el índice de apoptosis en linfomas tímicos de ratones nulos para p53 pasa a ser el doble cuando se elimina también p21^{Cip1}.

Se ha visto que ciertos oligonucleótidos antisentido de $p21^{Cip1}$ aumentan la sensibilidad al Taxol, es decir a la apoptosis, en células derivadas de glioblastoma [Weiss et al., 2000], y a inhibidores de deacetilasas de histonas (HDACi) y Tricostatina A (TSA) en carcinomas hepatocelulares [Svechnikova et al., 2007]. Así mismo, en líneas celulares derivadas de diversos tumores, la falta de $p21^{Cip1}$ aumenta la sensibilidad a apoptosis inducida por varios métodos [Fan et al., 1997; Stewart et al., 1999]. Por otro lado, los diferentes intentos de correlacionar niveles de expresión de $p21^{Cip1}$ con un pronóstico clínico en diversos tipos de cáncer han resultado, cuanto menos, inconsistentes. Esto sugiere que la posible función de $p21^{Cip1}$ como inhibidor de apoptosis en linfocitos no es necesariamente la misma en otros tipos tumorales, especialmente sarcomas y algunos carcinomas.

Los sarcomas, considerados en conjunto, constituyeron el 56% de los tumores encontrados en el modelo doble mutante, de hecho, éste sólo presentó linfomas de células T y varios tipos de sarcomas. Esta alta incidencia de sarcomas, con un curso clínico mucho más lento, podría justificar en parte la diferencia en la supervivencia global encontrada entre ambos modelos, mientras que la incidencia total de tumores es prácticamente igual (alrededor de un 85% en ambos casos). Podría pensarse que la falta adicional del gen $p21^{Cip1}$ en el ratón B6- $p53$ KO interfiere con la formación y/o desarrollo de linfomas tímicos lo que da lugar –tiempo– a que se desarrollen más sarcomas. La predisposición a desarrollar sarcomas del doble mutante es, en cualquier caso, evidente. Las características proliferativas de los fibroblastos embrionarios (MEFs) de él derivados así lo sugieren. Según nuestros datos, los MEFs doble mutantes crecen en cultivo a un ritmo significativamente mayor ($p < 0.01$) que los nulos para $Trp53$, sin experimentar fase de crisis. Tanto los ensayos de formación de colonias, como el crecimiento sin adhesión a placa produjeron resultados que apuntan en la misma dirección. Esto sugiere que ambos genes intervienen en vías de regulación del ciclo celular independientes y que su pérdida produce un efecto acumulado o cooperativo.

Estos resultados estarían, sin embargo, en aparente contradicción con el hecho de que la falta de $p21^{Cip1}$ retrase la aparición de linfomas tímicos, si bien, se debe tener en cuenta la posibilidad del desempeño de funciones distintas por parte de $p21^{Cip1}$ en tipos celulares distintos. En este sentido, la incidencia de fibrosarcomas se ve aumentada casi 4 veces en el ratón B6- $p21p53$ dKO respecto del mutante sencillo B6- $p53$ KO. Este fenotipo sería el reflejo de las características proliferativas de fibroblastos observadas en MEFs derivados de ambos modelos. Curiosamente, el ratón B6- $p21$ KO no presentó fibrosarcomas, lo que parece estar de acuerdo con lo observado *in vitro* (ver resultados). Aún así, al realizar trasplantes de fibroblastos derivados del ratón B6- $p21p53$ dKO, estos no fueron capaces de crecer y desarrollar un tumor *in vivo*. Es decir, la pérdida de $p21^{Cip1}$ y $p53$ favorece la formación de tumores derivados de fibroblastos, pero no es suficiente para que se desarrolle el tumor.

Se ha demostrado que $p21^{Cip1}$ juega un papel significativo en la supresión tumoral, que parece más importante que el de Bax, pero menos relevante que el de $p53$ o el de sus principales reguladores: Atm y $p19^{ARF}$. Los ratones nulos para $p21^{Cip1}$ desarrollan una variedad notable de neoplasias de origen hematopoyético, endotelial y epitelial. Sorprendentemente, los ratones B6- $p21$ KO no desarrollan linfomas T, que es el tumor más frecuente en ratones nulos para *Trp53* [Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994]. Sobre la base de nuestros datos, proponemos que $p21^{Cip1}$ contribuye a mediar en la supresión de tumores vía $p53$, en algunos tipos de tumor entre los que se encuentran los sarcomas histiocíticos, hemangiomas, linfomas de células B, y carcinomas de pulmón.

Nuestros resultados aportan una evidencia genética a cerca de la actividad oncogénica de $p21^{Cip1}$ en linfomas tímicos. Esta actividad es independiente de $p53$, y se encuentra asociada con una reducción del nivel de apoptosis, si bien no se ha podido demostrar que sea exclusivamente éste el mecanismo mediante el

cual p21^{Cip1} ejercería tal función. Este papel de p21^{Cip1} parece ser excepcional –en sentido literal– y hay diferentes trabajos que apoyan la función general de p21^{Cip1} como supresor de tumores en otros tejidos (piel, colon, hipófisis, tiroides, glándulas salivares, tejido conjuntivo –sarcomas–, etc). Curiosamente, las evidencias hasta ahora encontradas a cerca del papel de p21^{Cip1} en linfomas B apuntan hacia un papel neutro. Sin embargo, este papel oncogénico de p21^{Cip1} en linfomas tímicos podría darse en otros tipos tumorales bajo determinadas circunstancias.

p21^{Cip1} parece encontrarse sometido a un delicado balance. El conjunto de los datos aquí expuestos sugiere que tanto la regulación de la expresión de p21^{Cip1} como su localización subcelular son capaces de modular significativamente su actividad. Así, p21^{Cip1} puede mostrar su actividad natural como supresor de tumores en la mayoría de los casos, pero en condiciones determinadas y/o en tipos celulares determinados, esta actividad puede caer del lado oncogénico. La acumulación de tantos resultados –y tan dispares– en cuanto al papel de p21^{Cip1} como factor pronóstico en tumores humanos parece ser el reflejo de este delicado equilibrio. En cualquier caso, es mucho el trabajo que queda por hacer para clarificar ésta y otras vías y entender los mecanismos que subyacen a este maremágnum de datos, en apariencia, contradictorios.

6

Conclusiones

6. Conclusiones

1. La viabilidad del ratón doble mutante B6-p21p53dKO se encuentra sensiblemente reducida en comparación con los mutantes nulos sencillos (B6-p21KO y B6-p53KO).
2. Tanto el ratón doble mutante como el mutante nulo sencillo para *Trp53* desarrollan tumores con alta incidencia y corto período de latencia.
3. La incidencia observada de linfomas T en el ratón nulo para *Trp53* se ve reducida desde un 70% a un 44% cuando se elimina, simultáneamente, *p21^{Cip1}*. El tipo tumoral observado con mayor frecuencia en el ratón doble mutante fue el sarcoma (55.6%), en claro contraste con lo observado en el mutante sencillo para *Trp53* que desarrolla fundamentalmente linfomas.
4. Los ratones mutantes nulos para *Trp53* mostraron gran susceptibilidad a la inducción de linfomas por radiación γ . Los dobles mutantes presentaron menor susceptibilidad, desarrollando linfomas con una latencia media similar a los ratones control *wild-type*.
5. Los linfomas tímicos –tanto inducidos como espontáneos– obtenidos de ratones carentes de p53 funcional expresan niveles variables de $p21^{Cip1}$. Estos datos nos permiten concluir que *in vivo* $p21^{Cip1}$ debe proporcionar alguna ventaja proliferativa a las células T en un estadio neoplásico o preneoplásico.
6. El nivel de apoptosis en los linfomas tímicos desarrollados por el doble mutante es el doble del observado en el mutante sencillo para *Trp53*.
7. Los fibroblastos embrionarios obtenidos del doble mutante poseen una cinética de proliferación más rápida que los obtenidos del mutante sencillo *Trp53*. Además, muestran una mayor eficiencia en la formación de colonias y una mayor capacidad de proliferación sin adhesión a sustrato.

8. Las evidencias experimentales aportadas por este trabajo apuntan hacia un papel oncogénico para $p21^{Cip1}$ en el desarrollo de linfomas T en ratón. La expresión de $p21^{Cip1}$ en dichos tumores no depende del estatus de p53. Sería de gran interés continuar analizando el papel de $p21^{Cip1}$ en relación con otros genes importantes para el desarrollo de los linfomas T como por ejemplo *Notch1* y *c-Myc*.

7

Bibliografía

1. Aas T, Børresen AL, Geisler S, Smith-Sørensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lønning PE. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. **Nat Med** 2(7):811-4. **1996**
2. Alban RS, y Pardee AB. p21WAF1/CIP1/SDI1 is elevated through a p53-independent pathway by mimosine **Cell Growth Differ.** 7, 893–901. **1996**
3. Armstrong JF, Kaufman MH, Harrison DJ, Clarke AR. High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. **Curr Biol** 5(8):931–6. **1995**
4. Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K., and Mizutani, S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytic differentiation. *EMBO J.*, 18:1223–1234. **1999**
5. Backlund MG, Trasti SL, Backlund DC, Cressman VL, Godfrey V, Koller BH. Impact of ionizing radiation and genetic background on mammary tumorigenesis in p53-deficient mice. **Cancer Res** 61(17):6577–6582. **2001**
6. Balomenos D, Martin-Caballero J, Garcia MI, Prieto I, Flores JM, Serrano M, Martinez AC. The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development. **Nat Med** 6:171–176. **2000**
7. Baross-Francis A, Milhausen MK, Andrew SE, Jevon G, Jirik FR. Tumors arising in DNA mismatch repair-deficient mice show a wide variation in mutation frequency as assessed by a transgenic reporter gene. **Carcinogenesis** 21(6):1259-62. **2000**
8. Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. **Genes Dev** 11(1):1-10. **1997**
9. Bell JF, Sharpless NE. Telomeres, p21 and the cancer-aging hypothesis. **Nature Genetics** 39, 11–12. **2007**
10. Bergh J, Norberg T, Sjögren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. **Nat Med** 1(10):1029-34. **1995**
11. Berns EM, Foekens JA, Vossen R, Look MP, Devilee P, Henzen-Logmans SC, van Staveren IL, van Putten WL, Inganäs M, Meijer-van Gelder ME, Cornelisse C, Claassen CJ, Portengen H, Bakker B, Klijn JG. Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. **Cancer Res** 60(8):2155-62. **2000**
12. Bessette K, Lang M, Fava RA, Grundy M, Heinen J, Horne L, Spolski R, Al-Shami A, Morse HC 3rd, Leonard WJ, Kelly JA. A Stat5b transgene is capable of inducing CD8+ lymphoblastic lymphoma in the absence of normal TCR/MHC signaling. **Blood** [PMID: 17890450] **2007**
13. Beverly LJ, Capobianco AJ. Perturbation of Ikaros isoform selection by MLV integration is a cooperative event in Notch(IC)-induced T cell leukemogenesis. **Cancer Cell** 3:551–564. **2003**
14. Brathwaite O, Bayona W, Newcomb EW. p53 mutations in C57BL/6J murine thymic lymphomas induced by gamma-irradiation and N-methylnitrosourea. **Cancer Res** 52(13):3791–5. **1992**
15. Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. **Nature** 377(6549):552–7. **1995**
16. Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. **Proc Natl Acad Sci USA** 96(24):13777–82. **1999**

17. Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21(cip1/waf1). **Science** 287:1804–1808. **2000**
18. Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Nam HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. **Science** 277:1996–2000. **1997**
19. Damo LA, Snyder PW, Franklin DS. Tumorigenesis in p27/p53- and p18/p53-double null mice: functional collaboration between the pRb and p53 pathways. **Mol Carcinog** 42(2):109–20. **2005**
20. Delavaine L, La Thangue NB. Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. **Oncogene** 18:5381–5392. **1999**
21. De la Cueva E, García-Cao I, Herranz M, López P, García-Palencia P, Flores JM, Serrano M, Fernández-Piqueras J, Martín-Caballero J. Tumorigenic activity of p21Waf1/Cip1 in thymic lymphoma. **Oncogene** 25(29):4128–32. **2006**
22. Demetrick DJ, Matsumoto S, Hannon GJ, Okamoto K, Xiong Y, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). **Cytogenet Cell Genet** 69(3-4):190–2. **1995**
23. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. **Cell** 82:675–684. **1995**
24. Dey DC, Bronson RP, Dahl J, Carroll JP, Benjamin TL. Accelerated Development of Polyoma Tumors and Embryonic Lethality: Different Effects of p53 Loss on Related Mouse Backgrounds. **Cell Growth & Differentiation** 11:231–237. **2000**
25. Dietrich WF, Lander ES, Smith JS, Moser AR, Gould KA, Luongo C, Borenstein N, Dove W. Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. **Cell** 75(4):631–9. **1993**
26. Dimri GP, Nakanishi M, Desprez PY, Smith JR, Campisi J. Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. **Mol Cell Biol** 16(6):2987–97. **1996**
27. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. **Nature** 330(6148):576–8. **1987**
28. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature** 356:215–221. **1992**
29. Donehower LA, Harvey M, Vogel H, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Park SH, Thompson T, Ford RJ, Bradley A. Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice. **Mol Carcinog** 14(1):16–22. **1995**
30. Dong Y, Chi SL, Borowsky AD, Fan Y, Weiss RH. Cytosolic p21Waf1/Cip1 increases cell cycle transit in vascular smooth muscle cells. **Cell Signal** 16: 263–269. **2004**
31. Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? **Biochim Biophys Acta** 1471(1):M43–56. **2000**
32. Dulić V, Stein GH, Far DF, Reed SI. Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. **Mol Cell Biol** 18(1):546–57. **1998**
33. Efeyan A, Garcia-Cao I, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M. Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. **Nature** 443(7108):159. **2006**
34. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer E, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell** 75:817–825. **1993**

35. Elledge RM, Gray R, Mansour E, Yu Y, Clark GM, Ravdin P, Osborne CK, Gilchrist K, Davidson NE, Robert N, Tormey DC, Allred DC. Accumulation of p53 protein as a possible predictor of response to adjuvant combination chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil, and prednisone for breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 87(16):1254-6. **1995**
36. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. **Cell** 66(4):649-661. **1991**
37. Ellmeier W, Sawada S, Littman DR. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. **Annu Rev Immunol** 17:523-54. **1999**
38. Estanyol JM, Jaumot M, Casanovas O, Rodriguez-Vilarrupla A, Agell N, Bachs O. The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity. **J Biol Chem** 274:33161-33165. **1999**
39. Evan G. Cancer--a matter of life and cell death. **Int J Cancer** 71(5):709-11. **1997**
40. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature** 292(5819):154-6. **1981**
41. Fan S, Chang JK, Smith ML, Duba D, Fornace AJ, O'Connor PM. Cells lacking CIP1/WAF1 genes exhibit preferential sensitivity to cisplatin and nitrogen mustard. **Oncogene** 14:2127-2136 **1997**
42. Festing MFW. Inbred strains of mice. **Mouse Genome** 92: 373-495. **1994**
43. Festing MFW. Origins and characteristics of inbred strains of mice. **Mouse Genome** 91: 393-509. **1993**
44. Freeman D, Lesche R, Kertesz N, Wang S, Li G, Gao J, Groszer M, Martinez-Diaz H, Rozengurt N, Thomas G, Liu X, Wu H. Genetic background controls tumor development in PTEN-deficient mice. **Cancer Res** 66(13):6492-6. **2006**
45. Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C: A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. **Mol Cell Biol** 21:1874-1887. **2001**
46. García-Cao I, García-Cao M, Martín-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, Weill JC, Blasco MA, Serrano M. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. **EMBO J** 21:6225-35. **2002**
47. Gariboldi M, Manenti G, Canzian F, et al. A major susceptibility locus to murine carcinogenesis maps on chromosome 6. **Nature Genet** 3: 132-136. **1993a**
48. Gariboldi M, Manenti G, Canzian F, et al. Chromosome mapping of murine susceptibility loci to liver carcinogenesis. **Cancer Res** 53: 209-211. **1993b**
49. Garkavtsev I, Hull C, Riabowol K. Molecular aspects of the relationship between cancer and aging: tumor suppressor activity during cellular senescence. **Exp Gerontol** 33(1-2):81-94. **1998**
50. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. **Exp Cell Res** 246(2):280-9. **1999**
51. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. **Mol Cancer Ther** 1(8):639-49. **2002**
52. Gewirtz DA. Growth arrest and cell death in the breast tumor cell in response to ionizing radiation and chemotherapeutic agents which induce DNA damage. **Breast Cancer Res Treat** 62(3):223-35. **2000**
53. Ghebranious N, Donehower LA. Mouse models in tumor suppression. **Oncogene** 17(25):3385-400. **1998**
54. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. **Genes Dev** 12: 2973-2983. **1998**.
55. Gorospe M, Cirielli C, Wang X, et al. p21Waf1/Cip1 protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. **Oncogene** 14:929-935. **1997**

56. Gottlieb E and Moshe O. p53 facilitates pRb cleavage in IL-3-deprived cells: novel pro-apoptotic activity of p53. **EMBO J** 17:3587–3596. **1998**
57. Gotz C, Wagner P, Issinger OG, Montenarh M. p21WAF1/CIP1 interacts with protein kinase CK2. **Oncogene** 13:391–398. **1996**
58. Gutierrez A, Look AT. NOTCH and PI3K-AKT pathways intertwined. **Cancer Cell** 12(5):411–3. **2007**
59. Haas-Kogan DA, Kogan SC, Levi D, et al. Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. **EMBO J** 14:461–472. **1995**
60. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 100:57–70. **2000**
61. Hanahan D. Transgenic mice as probes into complex systems. **Science** 246(4935):1265–75. **1989**
62. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell** 75:805–816. **1993**
63. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. **Mol Biol Cell** 6(4):387–400. **1995**
64. Herranz M, Santos J, Salido E, Fernández-Piqueras J, Serrano M. Mouse p73 gene maps to the distal part of chromosome 4 and might be involved in the progression of gamma-radiation-induced T-cell lymphomas. **Cancer Res** 59(9):2068–71. **1999**
65. Hsieh TC, Juan G, Darzynkiewicz Z, Wu JM. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. **Cancer Res** 59(11): 2596–2601. **1999**
66. Huppi K, Siwarski D, Dosik J, Michieli P, Chedid M, Reed S, Mock B, Givol D, Mushinski JF. Molecular cloning, sequencing, chromosomal localization and expression of mouse p21 (Waf1). **Oncogene** 9(10):3017–20. **1994**
67. Ikeda S, Hawes NL, Chang B, Avery CS, Smith RS, Nishina PM. Severe ocular abnormalities in C57BL/6 but not in 129/Sv p53-deficient mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 40(8):1874–8. **1999**
68. Iliakis G. Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. **Semin Oncol** 24:602–615. **1997**
69. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. **Nature** 359: 295–300. **1992**
70. Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, Weinberg RA. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. **Curr Biol** 4:1–7. **1994**
71. Jimenez GS, Khan SH, Stommel JM, Wahl GM. p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. **Oncogene** 18(53):7656–65. **1999**
72. Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. **Nature** 378:206–208. **1995**
73. Kakinuma S, Nishimura M, Sasanuma S, Mita K, Suzuki G, Katsura Y, Sado T, Shimada Y. Spectrum of Zfnf1a1 (Ikaros) inactivation and its association with loss of heterozygosity in radiogenic T-cell lymphomas in susceptible B6C3F1 mice. **Radiat Res** 157:331–340. **2002**
74. Kaplan HS, Brown MB. Protection against radiation-induced lymphoma development by shielding and partial-body irradiation of mice. **Cancer Res** 12(6):441–4. **1952**
75. Kastan MB. Checkpoint Controls and Cancer. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1997**

76. Kim E, Deppert W. Transcriptional activities of mutant p53: when mutations are more than a loss. *J Cell Biochem* 93(5):878-86. **2004**
77. Kinzler K, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761-763. **1997**
78. Komarova EA, Christov K, Faerman AI, Gudkov AV. Different impact of p53 and p21 on the radiation response of mouse tissues. *Oncogene* 19(33):3791-8. **2000**
79. Kuperwasser C, Hurlbut GD, Kittrell FS, Dickinson ES, Laucirica R, Medina D, Naber SP, Jerry DJ. Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome. *Am J Pathol* 157(6):2151-2159. **2000**
80. Kwun HJ, Lee JH, Min do S, Jang KL. Transcriptional repression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene by phospholipase D1 and D2. *FEBS Lett* 544:38-44. **2003**
81. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11(7):847-62. **1997**
82. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 278:261-263. **1979**
83. Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, Valentin-Vega YA, Terzian T, Caldwell LC, Strong LC, El-Naggar AK, Lozano G. Gain of Function of a p53 Hot Spot Mutation in a Mouse Model of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell* 119:861-872. **2004**
84. Laws AM, Osborne BA. p53 regulates thymic Notch1 activation. *Eur J Immunol* 34(3):726-34. **2004**
85. Lee Y, Chong MJ, McKinnon PJ. Ataxia telangiectasia mutated-dependent apoptosis after genotoxic stress in the developing nervous system is determined by cellular differentiation status. *J Neurosci* 21, 6687-6693. **2001**
86. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3):323-331. **1997**
87. Li Y, Dowbenko D, Lasky LA. AKT/PKB phosphorylation of p21Cip1/WAF1 enhances protein stability of p21Cip1/WAF1 and promotes cell survival. *J Biol Chem* 277:11352-11361. **2002**
88. Liyanage M, Weaver Z, Barlow C, Coleman A, Pankratz DG, Anderson S, Wynshaw-Boris A, Ried T. Abnormal rearrangement within the alpha/delta T-cell receptor locus in lymphomas from Atm-deficient mice. *Blood* 96(5):1940-6. **2000**
89. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51:3075-9. **1991**
90. López-Nieva P, Santos J, Fernández-Piqueras J. Defective expression of Notch1 and Notch2 in connection to alterations of c-Myc and Ikaros in gamma-radiation-induced mouse thymic lymphomas. *Carcinogenesis* 25(7):1299-1309. **2004**
91. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362(6423):847-9. **1993**
92. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9(8):935-944. **1995**
93. Malumbres M, Pérez de Castro I, Santos J, Fernández Piqueras J, Pellicer A. Hypermethylation of the cell cycle inhibitor p15INK4b 3'-untranslated region interferes with its transcriptional regulation in primary lymphomas. *Oncogene* 18(2):385-96. **1999**
94. Malumbres M, Pérez de Castro I, Santos J, Meléndez B, Manges R, Serrano M, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4b by deletion and de novo methylation with independence of

- p16INK4a alterations in murine primary T-cell lymphomas. ***Oncogene*** 14(11):1361–70. **1997**
95. Mao JH, Wu D, Perez-Losada J, Nagase H, DelRosario R, Balmain A. Genetic interactions between Pten and p53 in radiation-induced lymphoma development. ***Oncogene*** 22(52):8379–85. **2003**
96. Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Collado M, Serrano M. Different cooperating effect of p21 or p27 deficiency in combination with INK4a/ARF deletion in mice. ***Oncogene*** 23(50):8231–7. **2004**
97. Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. ***Cancer Res*** 61(16):6234–6238. **2001**
98. Matabuena de Yzaguirre M, Hernández JS, Navarro PF, Nieva PL, Herranz M, Fraga MF, Esteller M, Juarranz A, Fernández-Piqueras J. Epigenetic silencing of E- and N-cadherins in the stroma of mouse thymic lymphomas. ***Carcinogenesis*** 27(5):1081–9. **2006**
99. Medema RH, Klompmaker R, Smits VA, Rijksen G. p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. ***Oncogene*** 16(4):431–41. **1998**
100. Meléndez B, Malumbres M, de Castro IP, Santos J, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. Characterization of the murine p19(ARF) promoter CpG island and its methylation pattern in primary lymphomas. ***Carcinogenesis*** 21(4):817–21. **2000**
101. Mohr, U. International Classification of Rodent Tumors. The Mouse. Berlin: Springer-Verlag. **2001**
102. Moll UM, Erster S, Zaika A. p53, p63 and p73--solos, alliances and feuds among family members. ***Biochim Biophys Acta*** 1552(2):47–59. **2001**
103. Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by absence of p53. ***Nature*** 378:203–206. **1995**
104. Murray A, Hunt T. ***The Cell Cycle: An Introduction***. New York: W.H. Freeman and Co., **1993**
105. Nagase T, Seki N, Tanaka A, Ishikawa K, Nomura N. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IV. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0121-KIAA0160) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. ***DNA Res*** 2(4):167–74, 199–210. **1995**
106. Newcomb EW, Steinberg JJ, Pellicer A. ras oncogenes and phenotypic staging in N-methylnitrosourea- and gamma-irradiation-induced thymic lymphomas in C57BL/6J mice. ***Cancer Res*** 48(19):5514–21. **1988**
107. Niibe Y, Nakano T, Ohno T, Tsujii H, Oka K. Relationship between p21/WAF-1/CIP-1 and apoptosis in cervical cancer during radiation therapy. ***Int J Radiat Oncol Biol Phys*** 44(2):297–303. **1999**
108. Nowell PC. Tumor progression: a brief historical perspective. ***Semin Cancer Biol*** 12(4):261–6. **2002**
109. Nozell S, Chen X. p21B, a variant of p21(Waf1/Cip1), is induced by the p53 family. ***Oncogene*** 21:1285–94. **2002**
110. Olive KP, Tuveson DA, Zachary CR, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T. Mutant p53 Gain of Function in Two Mouse Models of Li-Fraumeni Syndrome. ***Cell*** 119: 847–860. **2004**
111. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. ***Hum Mutat*** 19(6):607–14. **2002**
112. Onoyama I, Tsunematsu R, Matsumoto A, Kimura T, de Alborán IM, Nakayama K, Nakayama KI. Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell

- differentiation and results in lymphomatogenesis. *J Exp Med* 204(12):2875–88. **2007**
113. Palmiter RD, Brinster RL. Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet* 20:465–99. **1986**
114. Pastorcic M, Das HK. Regulation of transcription of the human presenilin-1 gene by ets transcription factors and the p53 protooncogene. *J Biol Chem* 275(45):34938–45. **2000**
115. Pear WS, Radtke F. Notch signaling in lymphopoiesis. *Semin Immunol* 15(2):69–79. **2003**
116. Pérez de Castro IP, Malumbres M, Santos J, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. Cooperative alterations of Rb pathway regulators in mouse primary T cell lymphomas. *Carcinogenesis* 20(9):1675–82. **1999**
117. Philipp-Staheli J, Kim KH, Liggitt D, Gurley KE, Longton G, Kemp CJ. Distinct roles for p53, p27^{Kip1}, and p21^{Cip1} during tumor development. *Oncogene* 23(4):905–13. **2003**
118. Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, et al. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1563–8. **1999**
119. Podust VN, Podust LM, Goubin F, Ducommun B, Hubscher U. Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Biochemistry* 34:8869–8875. **1995**
120. Polyak K, Waldman T, He TC, et al. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev* 10:1945–1952. **1996**
121. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 3(10):756–767. **2003**
122. Rahko E, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A. A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 39(4):447–53. **2003**
123. Ramondetta L, Mills GB, Burke TW, et al. Adenovirus-mediated expression of p53 or p21 in papillary serous endometrial carcinoma cell line (SPEC-2) results in both growth inhibition and apoptotic cell death: potential application of gene therapy to endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 6:278–284. **2000**
124. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 20(13):3427–36. **2001**
125. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 7:139–146. **1993**
126. Ruan S, Okcu MF, Pong RC, Andreeff M, Levin V, Hsieh JT, Zhang W. Attenuation of WAF1/Cip1 expression by an antisense adenovirus expression vector sensitizes glioblastoma cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin. *Clin Cancer Res* 5:197–202. **1999**
127. Sah VP, Attardi LD, Mulligan GJ, Williams BO, Bronson RT, Jacks T. A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet* 10(2):175–80. **1995**
128. Saito Y, Ochiai Y, Kodama Y, Tamura Y, Togashi T, Kosugi-Okano H, Miyazawa T, Wakabayashi Y, Hatakeyama K, Wakana S, Niwa O, Kominami R. Genetic loci controlling susceptibility to gamma-ray-induced thymic lymphoma. *Oncogene* 20(37):5243–7. **2001**
129. Santos J, Perez de Castro I, Herranz M, Pellicer A, Fernandez-Piqueras, J. Allelic losses on chromosome 4 suggest the existence of a candidate tumor suppressor gene

- region of about 0.6 cM in gamma-radiation-induced mouse primary thymic lymphomas. ***Oncogene* 12:669–676. 1996**
130. Santos J, Montagutelli X, Acevedo A, Lopez P, Vaquero C, Fernandez M, Arnau MR, Szatanik M, Salido E, Guenet JL, Fernandez-Piqueras J. A new locus for resistance to gamma-radiation-induced thymic lymphoma identified using inter-specific consomic and inter-specific recombinant congenic strains of mice. ***Oncogene* 21:6680–6683. 2002**
 131. Santos J, Vaquero C, Reyes J, López-Nieva P, Matabuena M, Villa M, Fernández P, Fernández-Piqueras J. Lack of correlation between DNA copy number and mRNA expression levels of c-myc in gamma-radiation-induced mouse thymic lymphomas by using quantitative real-time PCR. ***Clin Transl Oncol* 8(5):349–53. 2006**
 132. Schmid P, Lorenz A, Hameister H, Montenarh M. Expression of p53 during mouse embryogenesis. ***Development* 113: 857–865. 1991**
 133. Schreiber M, Kolbus A, Piu F, et al. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. ***Genes Dev* 13:607–19. 1999**
 134. Seoane, J., Le, H. V., and Massague, J. Myc suppression of the p21Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature (Lond.)*, 419:729–734, **2002**
 135. Sheikh MS, Rochefort H, Garcia M. Overexpression of p21 WAF1/CIP1 induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines. ***Oncogene* 11:1899–1905. 1995**
 136. Shen KC, Heng H, Wang Y, Lu S, Liu G, Deng CX, Brooks SC, Wang YA. ATM and p21 cooperate to suppress aneuploidy and subsequent tumor development. ***Cancer Res* 65(19):8747–53. 2005**
 137. Shibata M-A, Yoshidome K, Shibata E, et al. Suppression of mammary carcinoma growth in vitro and in vivo by inducible expression of the Cdk inhibitor p21. ***Cancer Gene Ther* 8:23–25. 2001**
 138. Shin SI, Freedman VH, Risser R, Pollack R. Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. ***Proc Natl Acad Sci USA* 72(11):4435–9. 1975**
 139. Shiohara M, el-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen DL, Vogelstein B, Koeffler HP. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. ***Blood* 84(11):3781–4. 1994**
 140. Shiyonov P, Bagchi S, Adami G, Kokontis J, Hay N, Arroyo M, Morozov A, Raychaudhuri P. p21 Disrupts the interaction between cdk2 and the E2F-p130 complex. ***Mol Cell Biol* 16:737–744. 1996**
 141. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. ***Cancer Res* 60(24):6788–93. 2000**
 142. Stål O, Stenmark Askmalm M, Wingren S, Rutqvist LE, Skoog L, Ferraud L, Sullivan S, Carstensen J, Nordenskjöld B. p53 expression and the result of adjuvant therapy of breast cancer. ***Acta Oncol* 34(6):767–70. 1995**
 143. Stewart ZA, Mays D, Pietenpol JA. Defective G1-S cell cycle checkpoint function sensitizes cells to microtubule inhibitor-induced apoptosis. ***Cancer Res* 59:3831–3837. 1999**
 144. Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. ***Oncogene* 17(8):931–9. 1998**
 145. Suzuki A, Tsutomi Y, Yamamoto N, Shibutani T, Akahane K. Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. ***Mol Cell Biol* 19(5):3842–7. 1999**

146. Svechnikova I, Ammerpohl O, Ekström TJ. p21waf1/Cip1 partially mediates apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 354(2):466–71. **2007**
147. Tamura Y, Maruyama M, Mishima Y, Fujisawa H, Obata M, Kodama Y, Yoshikai Y, Aoyagi Y, Niwa O, Schaffner W, Kominami R. Predisposition to mouse thymic lymphomas in response to ionizing radiation depends on variant alleles encoding metal-responsive transcription factor-1 (Mtf-1). *Oncogene* 24(3):399–406. **2005**
148. Tanaka H, Yamashita T, Asada M, Mizutani S, Yoshikawa H, Tohyama M. Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J Cell Biol* 158, 321–329. **2002**
149. Taules M, Rodriguez-Vilarrupla A, Rius E, Estanyol JM, Casanovas O, Sacks DB, Perez-Paya E, Bachs O, Agell N. Calmodulin binds to p21(Cip1) and is involved in the regulation of its nuclear localization. *J Biol Chem* 274:24445–24448. **1999**
150. Terszowski G, Muller SM, Bleul CC, Blum C, Schirmbeck R, Reimann J, Pasquier LD, Amagai T, Boehm T, Rodewald HR. Evidence for a functional second thymus in mice. *Science* 312(5771):284–7. **2006**
151. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51(3):503–12. **1987**
152. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, Barcos M, Cirrincione C, Edgerton S, Allred C, Norton L, Liu ET. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90(18):1346–60. **1998**
153. Timchenko NA, Harris TE, Wilde M, Bilyeu TA, Burgess-Beusse BL, Finegold MJ, Darlington GJ. CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice *Mol Cell Biol* 17:7353–7361. **1997**
154. Toledo F, Geoffrey MW. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature Reviews Cancer* 6:909–923. **2006**
155. Tsao Y-P, Huang S-J, Chang J-L, et al. Adenovirus-mediated p21Waf1/Cip1 gene transfer induces apoptosis of human cervical cancer cell lines. *J Virol* 73:4983–4990. **1999**
156. Tsuji H, Ishii-Ohba H, Ukai H, Katsube T, Ogiu T. Radiation-induced deletions in the 5' end region of Notch1 lead to the formation of truncated proteins and are involved in the development of mouse thymic lymphomas. *Carcinogenesis* 24(7):1257–68. **2003**
157. van Meyel DJ, Sanchez-Sweatman OH, Kerkvliet N, Stitt L, Ramsay DA, Khokha R, Chambers AF, Cairncross JG. Genetic background influences timing, morphology and dissemination of lymphomas in p53-deficient mice. *Int J Oncol* 13(5):917–22. **1998**
158. van Wezel T, Ruivenkamp CA, Stassen AP, Moen CJ, Demant P. Four new colon cancer susceptibility loci, Scc6 to Scc9 in the mouse. *Cancer Res* 59(17):4216–8. **1999**
159. Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear WS, Bernstein ID. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* 6(11):1278–81. **2000**
160. Venkatachalam S, Donehower LA. Murine tumor suppressor models. *Mutat Res* 400(1-2):391–407. **1998**
161. Villa-Morales M, Santos J, Fernández-Piqueras J. Functional Fas (Cd95/Apo-1) promoter polymorphisms in inbred mouse strains exhibiting different susceptibility to -radiation-induced thymic lymphoma. *Oncogene* 25, 2022–2029. **2006**

162. Villa-Morales M, Santos J, Pérez-Gómez E, Quintanilla M, Fernández-Piqueras J. A role for the Fas/FasL system in modulating genetic susceptibility to T-cell lymphoblastic lymphomas. **Cancer Res** 67(11):5107–16. **2007**
163. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med** 10(8):789–99. **2004**
164. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. **Nature** 408(6810):307–10. **2000**
165. Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, Takeda N, Sakata J, Mishima Y, Hitomi J, Yamamoto T, Utsuyama M, Niwa O, Aizawa S, Kominami R. Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. **Nat Immunol** 4:533–539. **2003**
166. Wang CH, Tsao YP, Chen HJ, Chen HL, Wang HW, Chen SL. Transcriptional repression of p21(Waf1/Cip1/Sdi1) gene by c-jun through Sp1 site. **Biochem Biophys Res Commun** 270:303–10. **2000**
167. Wang YA, Elson A, Leder P. Loss of p21 increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in atm-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci** 94:14590–14595. **1997**
168. Warbrick E, Lane DP, Glover DM, Cox LS. Homologous regions of Fen1 and p21Cip1 compete for binding to the same site on PCNA: a potential mechanism to co-ordinate DNA replication and repair. **Oncogene** 14(19):2313–2321. **1997**
169. Weiss RH, Joo A, Randour C. p21Waf1/Cip1 is an assembly factor required for PDGF-induced vascular smooth muscle cell proliferation. **J. Biol. Chem** 275:10285–10290. **2000**
170. Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA. The Np63 phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. **Mol Cell Biol** 23:2264–76. **2003**
171. Wu RC, Schönthal AH. Activation of p53-p21waf1 pathway in response to disruption of cell-matrix interactions. **J Biol Chem** 272(46):29091–8. **1997**
172. Xu Y, Baltimore D. Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. **Genes Dev** 10:2401–2410. **1996**
173. Xu Y, Yang EM, Brugarolas J, Jacks T, Baltimore D. Involvement of p53 and p21 in cellular defects and tumorigenesis in Atm^{-/-} mice. **Mol Cell Biol** 18(7):4385–90. **1998**
174. Yamamoto H, Soh JW, Monden T, et al. Paradoxical increase in retinoblastoma protein in colorectal carcinomas may protect cells from apoptosis. **Clin Cancer Res** 5:1805–1815. **1999**
175. Zalcenstein A, Weisz L, Stambolsky P, Bar J, Rotter V, Oren M. Repression of the MSP/MST-1 gene contributes to the antiapoptotic gain of function of mutant p53. **Oncogene** 25(3):359–69. **2006**
176. Zhang H, Hannon GJ, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. **Genes Dev** 8:1750–1758. **1994**
177. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. **Nat Cell Biol** 3:245–252. **2001**

8

Publicaciones