



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNAM  
POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN Y  
LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL DE  
P53 EN EL ENDOMETRIO DE LA RATA  
DURANTE EL CICLO ESTRAL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**

**QFB MÓNICA ROSAS LEMUS**

Tutor: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES



MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

## RESUMEN

<b>I. ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
<b>1. Estructura y funciones de P53</b>	<b>1</b>
1.1. Funciones transcripcionales de P53	5
1.1.1. <i>P53, reparación del ADN y ciclo celular</i>	5
1.1.2. <i>P53 y la apoptosis</i>	7
1.2. Funciones no transcripcionales de P53	12
1.2.1. <i>Señales de localización citoplásmica y degradación de p53</i>	12
1.2.2. <i>Localización mitocondrial de P53</i>	13
<b>2. El endometrio de la rata durante el ciclo estral</b>	<b>17</b>
2.1. Regulación hormonal	17
2.2. Cambios histo-morfológicos	22
2.3. Patrones de muerte celular programada y mecanismos moleculares	24
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>28</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>29</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
4.1. Objetivo General	29
4.2. Objetivos particulares	29
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
5.1. Reactivos y soluciones	30
5.2. Obtención del endometrio	32
5.3. Fraccionamiento subcelular	33
5.4. Western blot	34
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>36</b>
6.1. Obtención del endometrio	36
6.2. Cambios en la expresión y localización mitocondrial de P53	40
6.3. Cambios en la expresión de PCNA, Bax y Bcl-2 y balance proapoptótico	43
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS</b>	<b>50</b>
<b>X. REFERENCIAS</b>	<b>51</b>

## RESUMEN

P53 es una proteína que está involucrada en la regulación del estrés oxidante, metabolismo, ciclo celular, reparación del ADN y muerte celular. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que puede inducir apoptosis mediante mecanismos transcripcionales cuando se localiza en el núcleo y no transcripcionales cuando se localiza en la mitocondria, aunque estudios recientes *in vitro* demuestran que células en proliferación también presentan una localización mitocondrial de p53, donde tiene un papel crucial en la reparación del ADN mitocondrial.

El endometrio de la rata es un modelo de estudio adecuado para realizar estudios de muerte celular por apoptosis, ya que es un tejido que muestra cambios cíclicos en la proliferación y la muerte celular de manera fisiológica. Se encuentra bajo el control de hormonas esteroides, principalmente estradiol ( $E_2$ ) y progesterona ( $P_4$ ) y ha sido objeto de estudio en nuestro laboratorio para tratar de entender los mecanismos moleculares de la apoptosis. Estudios previos realizados por nuestro grupo, demostraron que este tejido presenta cambios tanto en la expresión de mRNA como de la proteína de p53 durante ciclo estral, sin embargo no se conoce si existen cambios en su localización mitocondrial y sus implicaciones funcionales.

En este trabajo se observó que P53 presenta cambios en la localización mitocondrial del endometrio de la rata durante el ciclo estral. Se observó una localización mínima en el metaestro, un aumento estadísticamente significativo en el diestro, alcanza su máximo nivel de localización mitocondrial en el proestro y disminuye de manera significativa en el estro, lo cual podría sugerir una señal de localización mitocondrial desde el proestro para dar inicio a la apoptosis, o bien mantener su localización mitocondrial hasta el proestro para estabilizar al ADN durante la proliferación. Estos

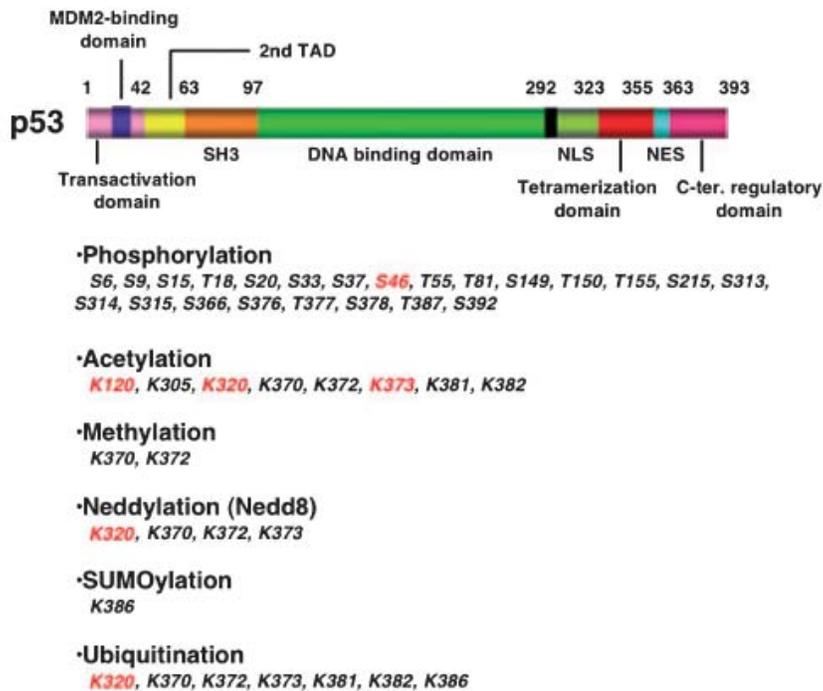
datos concuerdan con la máxima expresión de PCNA, la expresión mínima de Bax y balance proapoptótico, así como la máxima expresión de Bcl-2 observados durante el diestro indicando que la proliferación se está dando durante el diestro. Por otra parte la localización máxima de P53 en la mitocodria durante el proestro concuerda con la mínima expresión de Bcl-2 y el máximo índice proapoptótico para esta etapa. Es necesario determinar la localización submitocondrial de P53 para corroborar sus funciones durante la proliferación y la inducción de la muerte celular del endometrio de la rata durante el ciclo estral.

## **I. ANTECEDENTES**

### **1. Estructura y funciones de p53**

En varios tipos celulares se ha observado que P53 participa en la regulación de la muerte y el ciclo celular, la reparación del daño al ADN y la senescencia (Fuster y cols., 2007). Recientemente se le ha asociado a procesos importantes en reproducción e implantación (Hu y cols., 2008) del embrión, regulación del estrés oxidante, metabolismo (Corcoran y cols., 2006) y como parte de la maquinaria de reparación del ADN mitocondrial (Kulawiec y cols., 2009), y todo esto mediante su función transcripcional o independientemente de ella.

P53 es una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 53 kDa, y un tiempo de vida media de aproximadamente 20 min. En condiciones fisiológicas puede formar dímeros o tetrámeros. Cada monómero está constituido por 393 aminoácidos (aa). Para su estudio ha dividido en 4 dominios: extremo amino terminal, dominio central de unión al ADN, dominio de tetramerización y carboxilo terminal (Haupt y cols., 2003) (Figura 1).



**Figura 1. Dominios funcionales y modificaciones post-traduccionales de P53.** Se muestra la región del amino terminal en rosa, sus dos dominios de transactivación (TAD) en rosa y amarillo; en azul se muestra el dominio de unión a MDM2. En color verde se observa el dominio de unión al ADN (DBD). En rojo se observa el dominio de de tramerización y en rosa la región del carboxilo terminal. También se muestra una lista de las modificaciones post-traduccionales y las posiciones de los aminoácidos modificados.

La región amino terminal de P53 tiene la función de regular su actividad transcripcional, su degradación y la interacción con otras proteínas. Está formado por el dominio de transactivación (TAD) y una región rica en prolina (64-92) (Chang y cols., 1995; Walker y Levine, 1996). El TAD se ha dividido en dos subdominios TAD 1(1-40) y TAD2 (40-61), los cuales no tienen un plegamiento específico en la conformación nativa de la proteína (Bell y cols., 2002), pero se ha observado que existe una especie de estructura secundaria en regiones de importancia funcional que es rica en aminoácidos hidrofóbicos (Lee, 2000 ). Cuando el TAD interacciona con las proteínas con actividad de E3 ligasa: murine doble minute2 y 4 (MDM2 y MDM4), adopta una estructura de  $\alpha$ - hélice (Espinosa

y Emerson, 2001). La región amino terminal rica en prolinas es muy importante para la inducción de apoptosis mediante mecanismos no transcripcionales, pero no participa en el arresto del ciclo celular (Sakamuro y cols., 1997).

El dominio de unión al ADN o dominio central de unión al ADN (P53 C). Tiene una estructura tridimensional tipo inmunoglobulina que ocupa casi 2/4 partes de la proteína y los residuos 102 a 292 (el-Deiry, 1992). P53 regula la transcripción en su forma tetramérica, pero no todo el tetrámero se une al ADN: un dímero le otorga estabilidad y a través del otro dímero forma un sándwich entre las dos hojas  $\beta$  de cada monómero en forma anti paralela (Joerger y Fersht 2008). Estas hojas  $\beta$  permiten la unión de la proteína con secuencias específicas de ADN, las cuales son cuatro repeticiones formadas por decámeros de secuencias palindrómicas con secuencia general 5'-RRRWWGYYY-3'(R= A,G; W= A,T ;Y= C) separadas por 0-13 pares de bases (el-Deiry y cols., 1992). La mayoría de las mutaciones puntuales de P53 relacionadas con tumores humanos se localizan en éste dominio y es en éstos casos donde se observa la pérdida de la actividad biológica de la proteína (Hollstein y cols., 1994).

El dominio de tetramerización (TET) de P53 se localiza en la región del carboxilo terminal de la proteína; consiste en una pequeña  $\alpha$ - hélice y una hoja  $\beta$ , unidas por un giro ocasionado por el aminoácido Gly-334. Tiene la función de inducir la formación del tetrámero de P53 e interacciona con el dominio de unión al ADN mediante una unión flexible de 37 aminoácidos (Jeffrey y cols., 1995). Para que se lleve a cabo la oligomerización de la proteína, primero se forma el dímero que se estabiliza mediante la interacción molecular de las hojas  $\beta$  anti paralelas y un empaquetamiento entre las  $\alpha$ -hélices de cada monómero, donde participan los residuos Leu-330, Ile-332 y Phe-341. Estudios *in vitro* demuestran que la formación del dímero es un proceso co-traducciona l y ocurre en el poli-ribosoma. En contraste la formación del tetrámero es un proceso post-traducciona l, que ocurre cuando la concentración de proteína es alta y se lleva a cabo mediante la

interacción hidrofóbica de las hélices de dos dímeros a través de los residuos Leu-344 y Leu-348 (Jeffrey y cols., 1995; Mateu y Fersht, 1999).

El extremo carboxilo terminal comprende los aminoácidos 360-393, presenta importantes cambios conformacionales que permiten la unión con proteínas específicas y regula la interacción de la región central de la proteína con secuencias específicas de ADN (Ahn y Prives, 2001). En esta región de la proteína es donde se lleva a cabo la mayoría de las modificaciones postraduccionales, incluidas la acetilación, la ubiquitinación, la fosforilación, la sumoilación, la metilación y la nedeilación. Sin embargo no se sabe con exactitud cuáles son las consecuencias de estas modificaciones para la proteína sobre todo *in vivo* (Prives y Manley, 2001). Estudios previos han asociado la acetilación del extremo carboxilo terminal con la inducción del reclutamiento de factores coactivadores de transcripción como CBP y TRAP (Barlev y cols., 2001).

Los eventos que desencadenan el cambio conformacional de P53 y su consecuente unión al ADN son: la fosforilación de los residuos S-378 y S-392, la desfosforilación del residuo S-376, la acetilación de los residuos K-373 y K-382 y la delección del carboxilo terminal básico (Caspari, 2000; Jayaraman y Prives, 1995). Estos datos sugieren diferentes mecanismos mediante los cuales el carboxilo terminal puede regular de forma alostérica diferentes modos de activación y desactivación de P53 (Waterman y cols., 1995).

La regulación en la expresión y la activación de P53 pueden efectuarse a nivel transcripcional, postranscripcional y postraducciona (Farnebo y cols., 2010). El aumento en los niveles de P53 en la célula se deben principalmente a que aumenta el tiempo de vida media de la proteína y probablemente también a un incremento en la velocidad de síntesis (Ko y Prives, 1996). La inducción de la expresión de P53 está regulada principalmente por ciclos de retroalimentación

(Mdm2/p53, COP1/p53, Pirh2/P53, CARP/P53, y Torpor/P53) e involucran la participación de proteínas con actividad de E3 ubiquitin ligasa (Lu, 2010). El ciclo más estudiado es el de Mdm2/P53 y en este caso P53 induce la expresión de Mdm2, ésta se une a P53 e induce su degradación mediante poliubiquitinación vía el proteosoma 26 S (Kubbutat y cols., 1997). La interacción de Mdm2 y P53 se ve afectada por otras moléculas que pueden ser o no blancos transcripcionales de P53 y que pueden actuar sobre P53 o Mdm2 (Haupt y cols., 1996).

La regulación de la expresión de P53 por hormonas esteroides ha sido muy poco estudiada. Sin embargo se sabe que aunque el gen de P53 no contiene elementos de respuesta a hormonas esteroides, el estradiol ( $E_2$ ) induce la expresión de P53 a través de c-Myc en líneas celulares tumorales (Moudgil y cols., 2001). Asimismo se demostró que el estradiol también promueve la estabilización de P53, induce la degradación de MDM2 (Okumura y cols., 2002) y que P53 inhibe la actividad transcripcional del receptor a estrógenos  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) en la línea celular MCF-7 (Liu y cols., 1999). Sin embargo, hasta el momento no se conocen los mecanismos de regulación de la expresión y estabilización de p53 por hormonas esteroides, en condiciones fisiológicas.

Las señales que activan las funciones de P53, son principalmente condiciones de estrés en la célula, tales como la hipoxia, el daño al ADN causado por estrés oxidante, radiación  $\alpha$  y radiación UV (Ko y Prives, 1996).

## 1.1 Funciones transcripcionales de P53

### 1.1.1 P53, la reparación al ADN y el ciclo celular

P53 está involucrada en la activación de mecanismos de reparación del daño al ADN. Las causas que pueden dañar al ADN son principalmente: producción de ROS, la hiperproliferación, la radiación UV y radiación  $\alpha$ . La activación de P53 ante el daño al ADN y su participación en la reparación, requiere de su estabilización y localización nuclear mediante acetilación y fosforilación en diferentes sitios el carboxilo terminal, según la causa del daño. Estas modificaciones promueven que P53 induzca la reparación del ADN, detenga el ciclo celular o induzca la apoptosis (Meek, 2004).

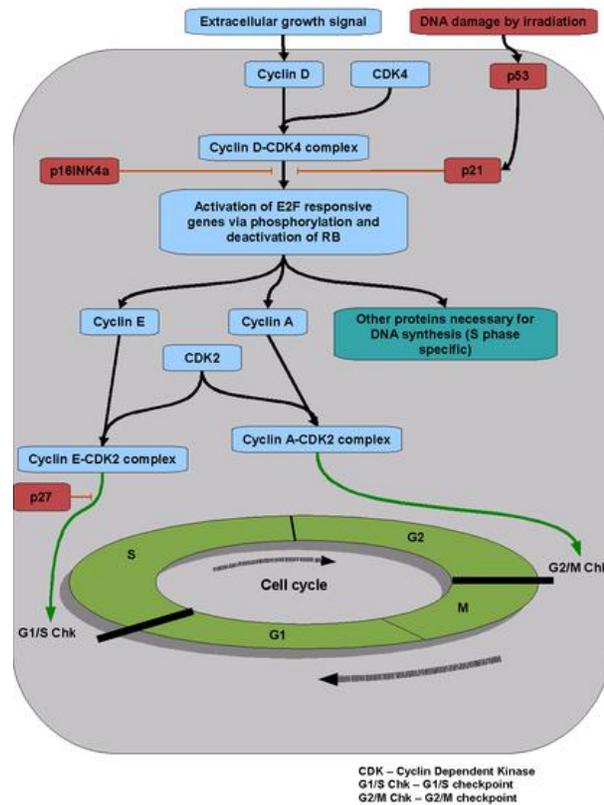
El mecanismo por el cual P53 repara al ADN es a través de la inducción de la expresión los genes que codifican para las proteínas que forman parte de la maquinaria de reparación. Las recluta al sitio de daño y también tiene actividad de exonucleasa 3'-5' (Latonen y Laiho, 2005)

El ciclo celular es un proceso mediante el cual, la célula puede dividirse y con ello inducir la proliferación y consta de cuatro etapas: G1, S, G2 y M. Durante la fase G1 la célula comienza un nuevo ciclo, aumenta su tamaño, empieza sintetizar ARN y proteínas necesarias para la replicación de todo el ADN durante la fase S. Durante la fase G2, la célula continua creciendo y sintetiza las proteínas necesarias para que las células hijas puedan dividirse apropiadamente. Finalmente durante la fase M, la célula organiza al ADN en dos copias idénticas de cromosomas y se lleva a cabo la división celular (Figura 2).

P53 regula negativamente la progresión del ciclo celular, durante la transición de la fase G1 a la fase S y durante la fase G2 a través de la inducción en la expresión de diversos genes, principalmente *p21* (Figura 2).

Durante la fase G1, las señales extracelulares de proliferación se traducen al núcleo y activan la maquinaria del ciclo celular. Una de las vías más estudiadas es Ip16-ciclina D1cdk4-Rb. La proteína Rb en su estado hipofosforilado, se une al factor E2F, bloqueando así la expresión de diversos genes necesarios para la fase S y que son inducidos por la presencia de este factor. El complejo ciclina D1-cdk4 fosforila a Rb, lo cual permite la liberación del factor E2F y la progresión del ciclo celular. La consecuencia real de la activación de P53 es que al promover la transcripción de p21 (el-Deiry, 1992) se ve inhibida la función de cinasa del complejo D1-cdk4 y se acumula Rb hipofosforilado. También se ha observado que p21 puede interactuar con el factor E2F y controlar directamente la actividad de esta proteína (Waga S 1994). Además, p21 puede regular el ciclo celular mediante la inhibición de complejos ciclina/cdk que participan en la fase G1 (ciclina D2/cdk6) y en la fase S (ciclina E/cdk2) o interactuar directamente con el factor de replicación y reparación PCNA, bloqueando la elongación durante la replicación del ADN (Waga, 1994) y deteniendo el ciclo celular en la fase S (Figura 2).

Cuando no es posible reparar al ADN o detener su síntesis durante la fase S y el ADN aún sigue dañado, existe otro punto en el ciclo celular donde todavía es posible detener el progreso de la división que es la fase G2 (Taylor y Stark, 2001). Uno de los mecanismos mediante los cuales P53 regula la transición G2/M involucra la participación de la ciclina dependiente de cinasa Cdc2, la cual es esencial para que la célula entre en mitosis (Nurse, 1990). Durante la fase G2, el complejo Cdc2/ciclina B se encuentra inactivo, debido a la fosforilación en la tirosina-15 y en la treonina-14 de Cdc2. Cuando la célula va a entrar en mitosis, estos residuos son desfosforilados por la acción de la fosfatasa Cdc25 la cual es fosforilada por el complejo Cdc2/ciclina B, iniciando un feedback positivo y el progreso del ciclo celular (Draetta y Eckstein, 1997). Muchos de los genes blanco de P53 pueden inhibir las funciones de Cdc2, entre ellos p21, 14-3-3 $\sigma$ , Gadd45 y el complejo CAK. Sin embargo P53 también puede inducir arresto del ciclo celular en G2 mediante otros blancos que no afectan la funcionalidad de Cdc2, tal es el caso de Reprimo, represión de la topoisomerasa II y la sobreexpresión de los genes *B99* y *MCG10* (Taylor y Stark, 2001) (Figura 2).



**Figura 2. La función de p53 en la regulación del ciclo celular.** Se observa en cuadros azules, la activación del ciclo celular inducido por factores de crecimiento extracelulares. Estos factores activan la Ciclina D, lo cual permite la formación del complejo Ciclina D/CDK4 y la activación del factor E2 para la síntesis de las proteínas necesarias para la duplicación del ADN, durante la fase de síntesis (S) y la activación de las Ciclinas E y A. Durante la transición de la fase G1 a S es necesaria la formación del complejo ciclina E/CDK2. A demás la activación de la Ciclina A y la formación del complejo Ciclina A-CDK2son necesarios para la progresión del ciclo celular en G2. Por su parte cuando el ADN se encuentra dañado, P53 induce la expresión de p21 el cual bloquea la formación del complejo Ciclina D/DCK4 y con ello la progresión del ciclo celular. Tomado de (Elledge y cols., 1992).

### 1.1.2 P53 y la apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se lleva a cabo para regular el crecimiento y la proliferación de los organismos multicelulares. Presenta características morfológicas y bioquímicas muy específicas, entre las cuales destacan: contracción del volumen celular, fragmentación del núcleo, condensación de la cromatina, retracción de pseudópodos, activación de caspasas, participación de las proteínas de la familia Bcl-2, fragmentación del ADN, exposición de fosfatidil serina, y la fagocitosis por macrófagos *in vivo* (Kroemer y cols., 2009).

Existen múltiples factores que inducen la apoptosis en una célula, los cuales pueden desencadenar la respuesta por la vía extrínseca o por la vía intrínseca. Finalmente ambas convergen en la mitocondria donde la proteína Bid proveniente de la vía extrínseca y las proteínas de la familia Bcl-2 de la vía extrínseca, se encuentran en la mitocondria, se induce la salida del citocromo C y posteriormente la activación de la cascada de caspasas (Haupt y cols., 2003).

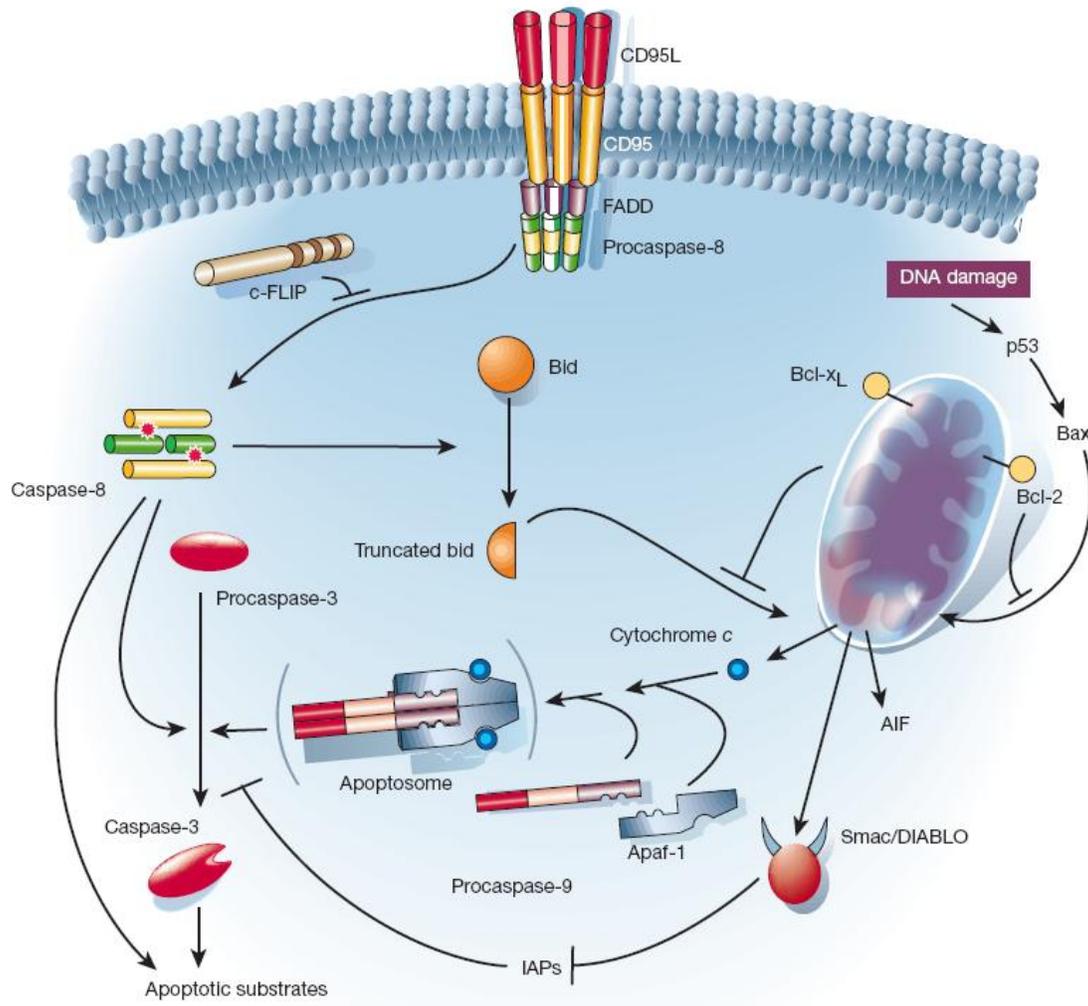
Se ha observado que P53 induce apoptosis tanto por la vía intrínseca como extrínseca mediante su función transcripcional en varios tipos celulares. Diversos estímulos pueden causar apoptosis dependiente de P53, de los cuales sobresalen :daño al ADN (Lowe y cols., 1993),expresión de oncogenes virales (Debbas y White, 1993),expresión de oncogenes celulares (Howes y cols., 1994; Wagner y cols., 1994); pérdida de factores de crecimiento (Canman y cols., 1995), interleucinas (Gottlieb y cols., 1994) o la pérdida de genes supresores de tumores (Wu y Levine, 1994). Sin embargo, las vías de apoptosis pueden ocurrir independientemente de P53 (Lowe y cols., 1993).

La vía extrínseca de apoptosis es activada por factores externos, por ejemplo, ligandos de los receptores de la familia TNF-R (Factor de necrosis tumoral), principalmente Fas-L. Una vez activados los receptores, se forman los complejos señalizadores de inducción de muerte DISC, se activa de la caspasa-8 y la caspasa-3 para inducir apoptosis (Haupt y cols., 2003) (Figura 3).

P53 induce la expresión de Fas (CD95/Apo1) un receptor de la familia TNF-R en bazo, riñón, timo e intestino cuando son sometidos a radiación  $\gamma$ , no así en corazón e hígado. Sin embargo no se ha determinado la importancia de esta regulación tejido-específica (Bouvard y cols., 2000). El receptor DR5/KILLER es un miembro de la familia de receptores TRAIL, (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF) cuya expresión también es inducida por P53 dependiendo del estímulo de muerte y del tejido. Por otra parte también PERP, es un blanco inducible por P53 (Attardi y cols., 2000), aunque los mecanismos específicos de esta inducción como factor proapoptótico aún no se han elucidado

La vía intrínseca de apoptosis es activada por condiciones de estrés celular y daño al ADN principalmente. Involucra la participación de P53 activado por daño al ADN, la salida del citocromo C, AIF y Smac/DIABLO de la mitocondria hacia el citoplasma, activación de la cascada de caspasas y se encuentra regulada por la familia de proteínas Bcl-2 (Hengartner, 2000) (Figura 3).

Las proteínas de la familia Bcl-2, se clasifican de acuerdo a sus funciones y dominios de homología con Bcl-2: Antiapoptóticas BH1-4, Bcl-2, Mcl-1, A1, Boo/Diva/Bcl-2-L10, Bcl-B, Bcl-X<sub>L</sub>. Proapoptóticas con 2 o 3 dominios BH, Bax, Bak, Bcl-xS, Bok/Mtd y Bcl-GL. Proapoptóticas que contienen sólo el dominio BH3: Bad, Bik/Nbk, Blk, Bid, Hrk/DP5, Bim/Bod, Bmf, Noxa, Puma/Bbc-3. El dominio BH3 está presente en todos los miembros, es esencial para la heterodimerización y función proapoptótica (Bouillet, 2002).



**Figura 3 Mecanismos de activación e inducción de apoptosis.** Por la vía extrínseca a través del receptor de muerte y auto activación de la caspasa-8 que promueve la activación de la caspasa-3. La activación de la vía intrínseca mediante la activación de P53 por daño al ADN, inducción de de la expresión de Bax y Bak, la represión en la expresión de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>. Estos cambios inducen la translocación de P53 a la mitocondria y la formación de poros en la membrana mitocondrial externa, salida de factores proapoptóticos: el citocromo C, Smac/DIABLO y AIF hacia el citoplasma y la formación del apoptosoma, promoviendo la activación de la caspasa-3 y la apoptosis. Tomado de Hengartner, 2000.

La función principal de las proteínas de la familia Bcl-2 es inhibir la apoptosis mediante el control del estrés oxidante y la formación de complejos heterodiméricos antiapoptóticos en la membrana externa de la mitocondria. Estos complejos se componen de una proteína proapoptótica y una antiapoptótica. Los más estudiados son: Bax-Bcl-2 y Bak-Bcl<sub>L</sub>, aunque también se ha observado que tanto Bcl-2 como Bax, pueden interactuar con el VDAC ya sea inhibiendo la apertura del PTP en el caso de Bcl-2 o favoreciendo su apertura en el caso de Bax (Narita y cols., 1998). Estos complejos regulan la homeostasis del calcio, el volumen intramitocondrial, el potencial de membrana (Mignotte y Vayssiere, 1998) y controlan la liberación de factores proapoptóticos de la mitocondria.

Ante señales de daño en la célula, se produce un incremento en la cantidad de P53, ésta transloca a la mitocondria y forma heterodímeros con las proteínas antiapoptóticas, dejando libres a las proteínas proapoptóticas. Estos cambios en las interacciones entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia Bcl-2, permiten que las proteínas proapoptóticas se oligomericen y formen poros en la membrana externa de la mitocondria, lo cual induce la salida del citocromo C, APAF-1 y Smac/DIABLO. El citocromo C y Apaf-1 se unen en el citoplasma, lo cual induce un cambio conformacional y la activación de la procaspasa 9, favoreciendo la unión a este complejo para dar origen al apoptosoma, la autoactivación de la caspasa-9, la activación de la caspasa-3 y desencadenar así la proteólisis masiva de sustratos (Figura 3) (Hengartner, 2000).

Por otra parte Smac/DIABLO promueve la activación de la caspasa-3 mediante la inhibición de los efectos represivos de las proteínas de la familia IAP sobre ésta. Las caspasas tienen actividad proteolítica sobre múltiples proteínas citoplásmicas, estructurales, cinasas así como otras proteínas relacionadas con el ciclo celular y reparación del ADN, lo cual conduce a la apoptosis de manera definitiva (Hengartner, 2000) (Figura 3).

Entre los genes cuya expresión es regulada por P53 y que pueden determinar la entrada a una vía apoptótica por la vía intrínseca, se encuentran *bax*, *bcl-2*, *puma*

y *nox*. De todos estos genes sólo *bcl-2* es inhibido por P53 en algunos tipos celulares. La sobreexpresión de *bcl-2* puede bloquear la apoptosis inducida por P53. Por lo tanto, la síntesis de Bax y la inhibición de Bcl-2 dependientes de P53 inducen la respuesta de la célula hacia apoptosis (Haupt y cols., 2003).

## 1.2 Funciones no transcripcionales de P53

### 1.2.1. Señales de localización citoplásmica y degradación de P53

Los efectos biológicos de P53 se llevan a cabo mediante sus funciones transcripcionales y sus funciones no transcripcionales. Las funciones no transcripcionales dependen de múltiples eventos de modificaciones postraduccionales de la proteína que permiten su acumulación en el citoplasma, su translocación a la mitocondria y evitan su transporte hacia el núcleo (Green y Kroemer, 2009). Se ha descrito que la poliADP ribosilación, acetilación de serinas en la región del carboxilo terminal y la fosforilación de las serinas o treoninas en la región del amino terminal, promueven la localización nuclear, mientras que la monoubiquitinación, fosforilación y la desacetilación promueven la exportación de P53 al citoplasma (Fuster y cols., 2007).

Bajo condiciones normales, la degradación de P53 se encuentra regulada por su interacción con MDM2, la cual es una proteína con actividad de ubiquitin ligasa que, en conjunto con el coactivador transcripcional p300, promueve la poliubiquitinación y degradación de P53 vía el proteosoma (Vousden, 2002). La unión de MDM2 al amino terminal de p53, donde se encuentra el dominio de transactivación, es muy importante para bloquear su actividad transcripcional, inducir la desacetilación de residuos clave de lisina en el carboxilo terminal mediado por HDA1 y hacer a P53 blanco de poliubiquitinación (Wu y cols., 1993).

### 1.2.2. Localización mitocondrial de P53

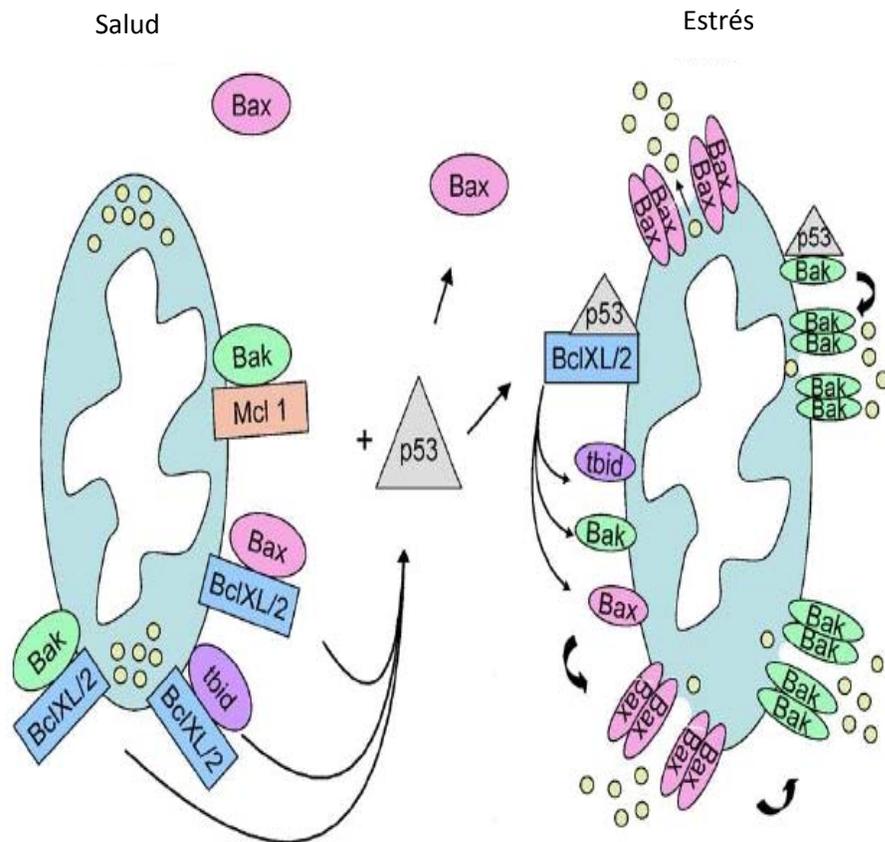
Se demostró que en algunos tipos celulares que presentan apoptosis mediada por P53, inducida por daño al ADN o por hipoxia, una fracción de la proteína activa P53 se encuentra localizada en el citoplasma, específicamente en la mitocondria (Marchenko y cols., 2000; Mihara y Moll, 2003). Este efecto no ocurre durante la apoptosis independiente de P53 o durante el arresto del ciclo celular. Se ha observado que P53 puede interactuar a nivel mitocondrial y citoplásmico con las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> por medio de su dominio de unión al ADN (Wolff y cols., 2008). Este efecto es potencializado por la interacción de PUMA con Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> en el citoplasma, impidiendo la localización mitocondrial de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> (Charlot y cols., 2004; Mihara y Moll, 2003)

Se sabe que los cambios en los estados de fosforilación, ubiquitinación y acetilación promueven la exportación nuclear de P53, ocasionando que se acumule en el citoplasma, lo cual favorece la translocación a la mitocondria; sin embargo, no se ha determinado cuál de estos factores son los responsables de la localización mitocondrial de P53, ya que mientras en algunos tipos celulares se favorece la localización mitocondrial en estado fosforilado, en otros se encuentra a P53 en estado poliubiquitinado y en otros no es necesaria la participación de ubiquitina o fosforilación y la proteína sin modificaciones postraduccionales, puede ser importada a la mitocondria (Erster y cols., 2004).

Otros estudios *in vitro* demostraron que cuando P53 se transloca a la mitocondria en condiciones de estrés sólo toma 30 min para alcanzar el máximo de localización mitocondrial (Erster y cols., 2004; Marchenko y cols., 2000). Esto sugiere que proviene de un almacén de proteína acumulado en el citoplasma y que la proteína proveniente del núcleo contribuye poco, ya que la translocación de P53 del núcleo al citoplasma, toma aproximadamente 3-8 h (Stommel y cols.,

1999). Estos estudios son de gran interés y constituyen una fuente de información importante, sin embargo es necesario determinar cuál de éstos procesos sucede y es preferente bajo condiciones fisiológicas.

Cuando P53 se localiza en la membrana externa de la mitocondria, forma heterodímeros con Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, por lo que estas proteínas ya no pueden interactuar con Bax o Bak y se favorece la formación de poros en la membrana externa, la permeabilización y la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial. En consecuencia se observa la salida del citocromo C, AIF y SMAC/DIABLO lo cual desencadena la activación de la cascada de caspasas y la muerte celular por apoptosis (Green y Kroemer, 2009) ( Figura 4).



**Figura 4 Mecanismo de inducción de la apoptosis no transcripcional por P53.** Bajo condiciones de salud, la mitocondria presenta interacción entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas en la membrana externa. Cuando la célula es sometida a estrés, hay un incremento en la expresión de P53. Es mediante la interacción de P53 con las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 y la proteína proapoptótica Bax, cuando se lleva a cabo la formación de homodímeros de las proteínas proapoptóticas, propiciando la formación de poros en la membrana, la salida del citocromo C y la activación de las caspasas. Tomado de Mihara y Moll, 2003.

Se ha observado que P53 no sólo se localiza en la membrana externa de la mitocondria formando complejos con Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> para la inducción de la

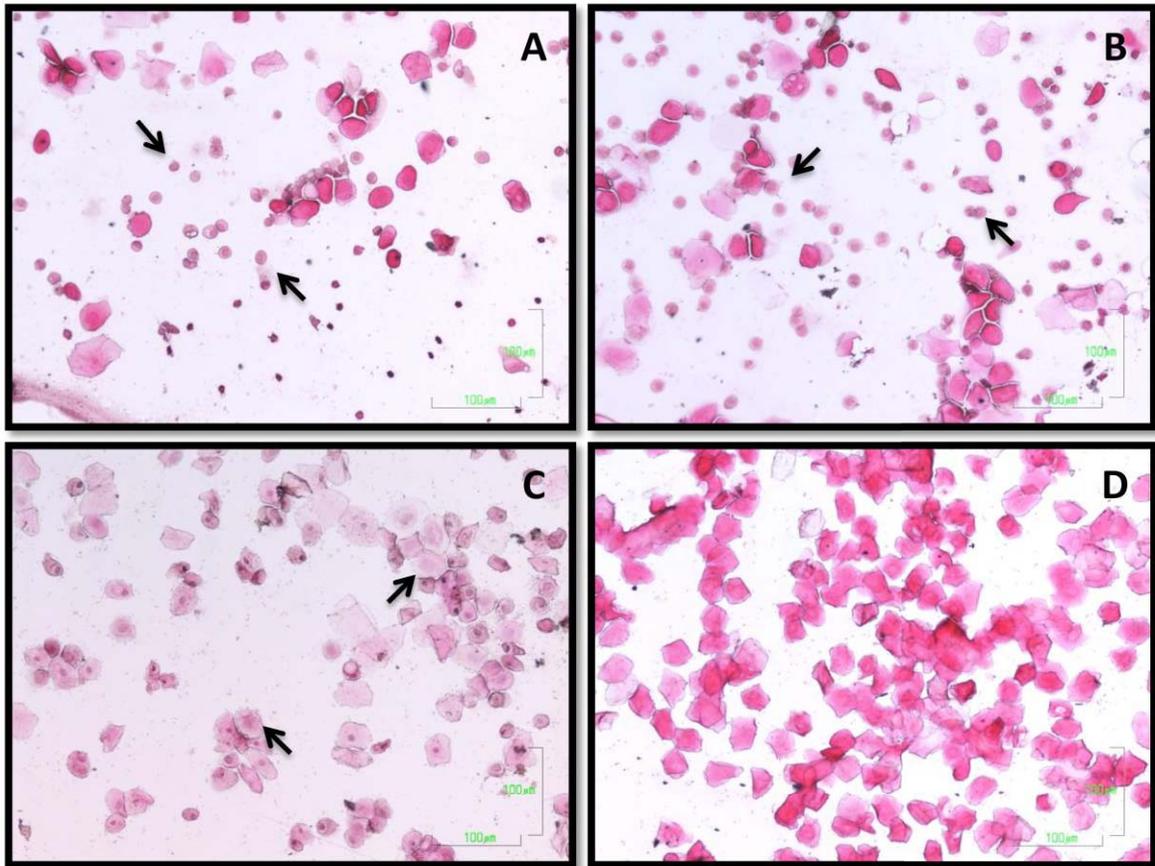
apoptosis en varios tipos celulares, sino que también una pequeña fracción de esta proteína se localiza dentro de la mitocondria (Chen y cols., 2006). En células que se encuentran en proliferación, se demostró que P53 se localiza en la matriz mitocondrial, interaccionando con las proteínas mhsp70, mhsp60 (Dumont y cols., 2003) e interactúa con la Pol Y (Chen y cols., 2006). Esta localización sugiere que podría formar parte de una vía de respuesta al daño para proteger y activar la maquinaria de reparación del ADN mitocondrial. Este ADN es altamente susceptible a mutaciones ya que no se encuentra empacado en histonas, no tiene una eficiente maquinaria de reparación, y su localización en la membrana interna hacia la matriz mitocondrial, lo hace expone al estrés oxidante causado por la cadena respiratoria. El daño al ADN mitocondrial tienen severas consecuencias para la progresión del ciclo celular y por lo tanto afecta la proliferación (Kulawiec y cols., 2009).

Otros estudios demuestran la existencia de un complejo formado por mtTFA, un importante factor de transcripción mitocondrial y P53 lo cual favorece la reparación del ADN mitocondrial. También se sugiere que P53 podría funcionar como factor de transcripción en la mitocondria, sin embargo no existen estudios que demuestren la existencia de elementos de respuesta a P53, su interacción directa con el ADN mitocondrial y su posible participación como factor de transcripción dentro de la mitocondria (Chen y cols., 2006).

## 2. El endometrio de la rata durante el ciclo estral

### 2.1. Regulación hormonal

La rata es un mamífero de ovulación cíclica, no requiere de la cópula o un periodo estacional específico para que este fenómeno ocurra (Beyer, 1980). Ovula durante todo el año, su ciclo estral tiene una duración de cuatro días y se compone de cuatro etapas: metaestro, diestro, proestro y estro (Freeman, 1988; (Westwood, 2008). Estas etapas se pueden detectar mediante el análisis de los cambios morfológicos en las células del epitelio vaginal, obtenido a través de frotis vaginales (Figura 5). El metaestro es el inicio del ciclo estral, durante esta etapa la pared vaginal de la rata muestra un aspecto húmedo y rosado, se observa una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares y la ausencia de células epiteliales cornificadas. La etapa siguiente es el diestro, durante esta etapa se observa una mayor cantidad de leucocitos polimorfonucleares, ausencia de células epiteliales cornificadas y se observan células redondas con núcleo en pocas cantidades. En el proestro ya no se observan leucocitos polimorfonucleares y predominan células epiteliales redondas, nucleadas y agrupadas. El estro es la etapa donde se observa la mayor cantidad de células apoptóticas, por lo tanto la pared celular vaginal presenta un aspecto seco y predominan las células epiteliales cornificadas, sin núcleo y de forma irregular (Baker, 1979; Marcondes, 2002; Westwood, 2008) (Figura 5).



**Figura 5. Morfología celular de un frotis vaginal de la rata durante el ciclo estral teñido con H/E.** En la fotografía **A** se muestran células cornificadas y las flechas indican la presencia de leucocitos característicos del el metaestro. En la fotografía **B** se señalan con las flechas los leucocitos y se observan pocas células cornificadas típicas del diestro. La fotografía **C** muestra y señala con las flechas las células nucleadas y agrupadas en racimo características del proestro. La fotografía **D** muestra células queratinizadas o cornificadas, sin núcleo y de forma irregular, características del estro. La barra representa 100µm.

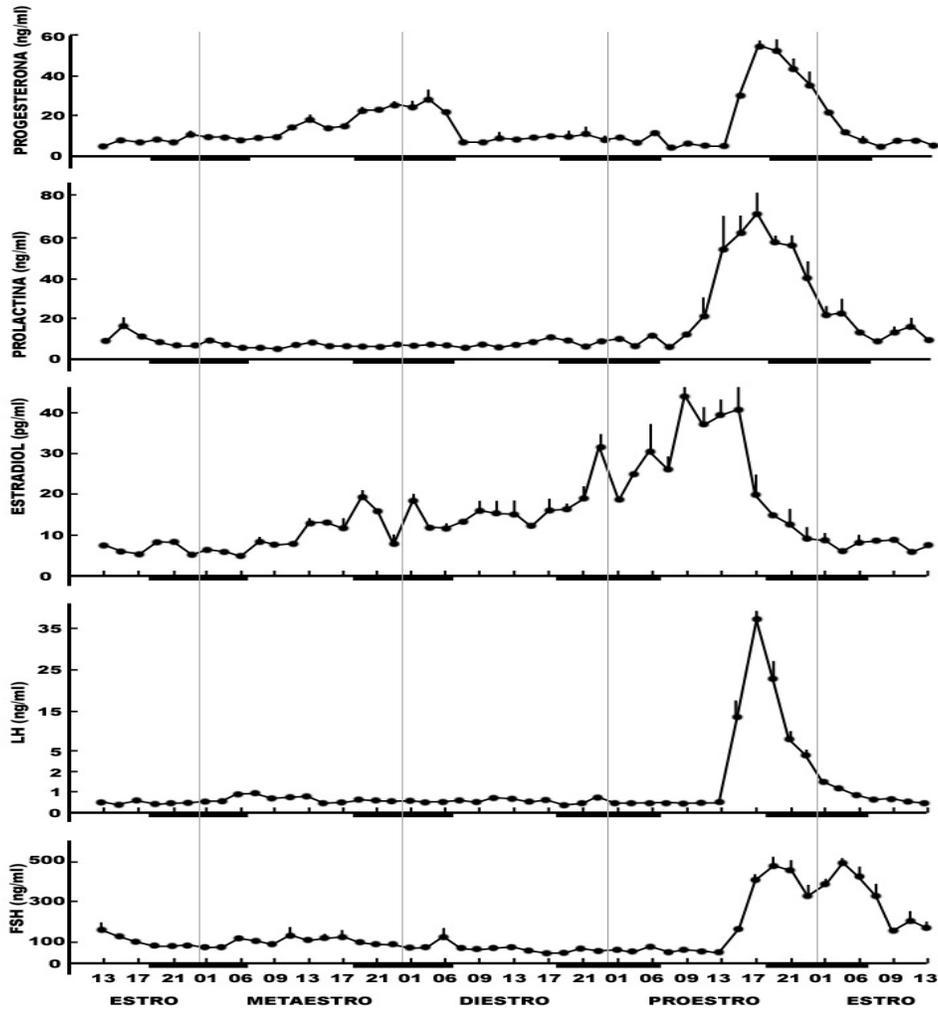
Las hormonas sexuales afectan de manera significativa la actividad funcional del cervix, vagina y útero de la rata. Estos efectos son resultado de la interacción de estas hormonas con sus receptores, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en todo el tracto reproductivo de la rata. La secreción de estas hormonas responden a un ciclo que involucra la participación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, el cual permite la regulación de la proliferación y muerte celular de los tejidos del tracto reproductivo de la rata, propiciando un ciclo adecuado para la reproducción de este mamífero.

El E<sub>2</sub> es secretado por las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos de Graaf que se encuentran en desarrollo. En ratas que presentan un ciclo regular de cuatro a cinco días, los niveles de estradiol (E<sub>2</sub>) circulante en plasma son basales ( $8 \pm 2$  pg/mL) durante el estro, empiezan a incrementarse durante la tarde del metaestro y el diestro hasta llegar a un valor máximo de ( $45 \pm 2$  pg/mL) a las 9:00 h del proestro. Hacia la tarde del proestro, los niveles de E<sub>2</sub> disminuyen rápidamente y alcanzan valores basales en las primeras horas de la mañana del estro (Brown-Grant y cols., 1970; Butcher y cols., 1974) (Figura 6).

El aumento en la concentración de estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural que activa la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. La GnRH estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) por la hipófisis. Los niveles circulantes de LH empiezan a incrementarse entre las 14:00 h y las 15:00 h del proestro, alcanzando su nivel máximo ( $37 \pm 5$  ng/mL) entre las 17:00 h y 19:00 h de la misma etapa (Brown-Grant y cols., 1970; Butcher y cols., 1974; Freeman, 1988). El incremento en la concentración plasmática de LH, induce la ruptura folicular y la ovulación durante las primeras horas del estro. La concentración circulante de LH desciende hacia la noche del proestro alcanzando niveles basales ( $0.5 \pm 0.15$  ng/mL) durante las primeras horas de la mañana del estro y se mantiene así durante el metaestro y diestro. El patrón de secreción de la

hormona folículo estimulante (FSH) y prolactina, es similar al de LH durante el ciclo estral (Figura 6).

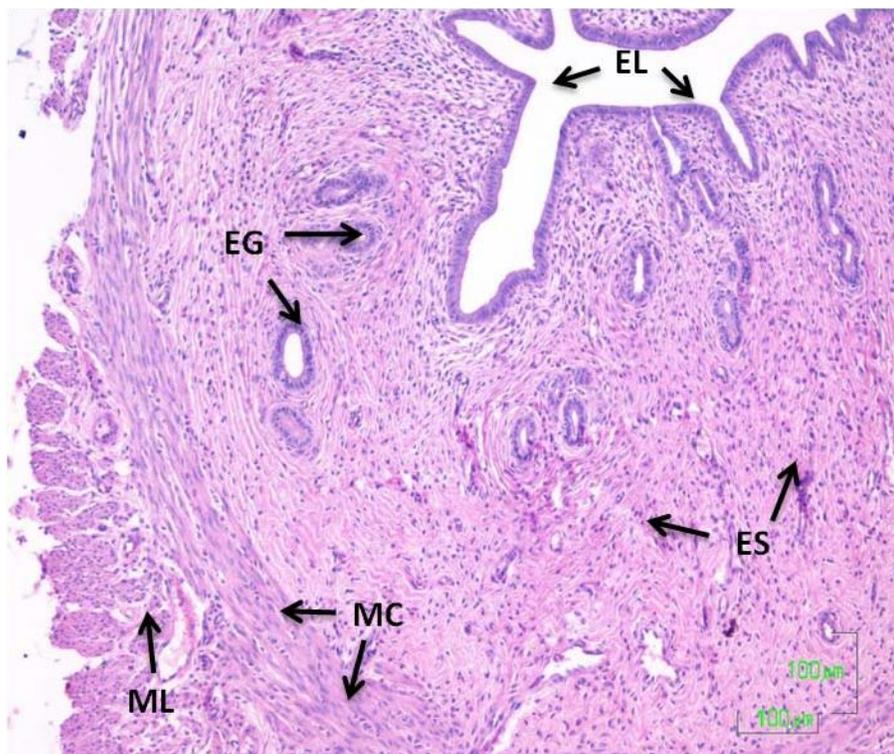
La progesterona  $P_4$  presenta dos máximos en los niveles plasmáticos circulantes durante el ciclo estral. Un primer máximo es secretado por el cuerpo lúteo ( $24 \pm 3$  ng/mL), se observa alrededor del medio día del metaestro y se mantiene hasta las primeras horas de la mañana del diestro. Hacia las 6:00 h del diestro se observa una disminución en los niveles plasmáticos de  $P_4$ , llegando a niveles basales. El segundo máximo ( $46 \pm 7$  ng/mL), se observa entre las 12 :00 h y las 21:00 h del proestro y se debe a la secreción de  $P_4$  por las células de la granulosa del folículo preovulatorio, éste incremento es casi simultáneo al incremento de LH. Los niveles de  $P_4$  regresan a niveles basales ( $2 \pm 1$  ng/mL) durante la mañana del estro (Brown-Grant y cols., 1970; Butcher y cols., 1974; Freeman, 1988) (Figura 6).



**Figura 6. Concentraciones hormonales durante el ciclo estral de la rata.** Concentración de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH (ng/mL) en plasma, obtenido en intervalos de 2 h a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras sobre el eje de las ordenadas, representan los intervalos de oscuridad, los números en la base representan la hora del día y las líneas verticales dividen las etapas del ciclo estral. Tomado de Freeman, 1998.

## 2.2. Cambios histo-morfológicos

El útero es un órgano que se compone de dos capas funcionales, el miometrio o porción muscular constituido por una capa externa longitudinal y una interna circular y el endometrio que está constituido por el estroma una capa basal donde se localizan glándulas y el epitelio luminal (Spornitz y cols., 1994) (Figura 5). Se ha demostrado que el endometrio es sensible a los cambios en la secreción de hormonas esteroides, lo cual induce importantes cambios en cuanto a proliferación y muerte celular conduciendo a un ciclo de altamente regulado (Mendoza-Rodríguez y cols., 2003b; Spornitz y cols., 1994; Westwood, 2008).



**Figura 7. Corte transversal del útero de rata teñido con HE.** Se muestran el miometrio longitudinal (ML) y el miometrio circular (MC). El endometrio constituido por el epitelio glandular (EG), el epitelio luminal (EL) y el estroma (ES). Barra= 100  $\mu$ m.

Se demostró que en el útero de ratas ovariectomizadas, la señalización para el inicio de la proliferación en el endometrio de la rata, es dada por el  $E_2$  y tiene efectos tanto en el epitelio luminal como glandular. El epitelio glandular inicia la

proliferación a las 0:00 h del metaestro, mientras que el epitelio luminal empieza a proliferar hacia las 3:00 h de la misma etapa (Baranda-Ávila y cols., 2009).

El inicio del ciclo es el metaestro, se observa un epitelio columnar delgado, con pocas células en mitosis y todavía se observa degeneración celular, vacuolización luminal e infiltración de leucocitos. Durante el diestro se observa un útero pequeño e inactivo con poca vascularización; el epitelio luminal es cuboidal bajo, columnar muy delgado, presenta pocas mitosis al inicio pero aumentan conforme avanza el ciclo. Las glándulas presentan poca actividad inicial, se observan pocas células muertas y al final de la etapa se observa edema estromal (Baranda-Ávila y cols., 2009; Mendoza-Rodríguez y cols., 2003a; Westwood, 2008). En el proestro se observa un importante engrosamiento del epitelio luminal conformándose por un tejido alto cuboidal y columnar, tiene una duración de 12-14 h. Durante esta etapa se observan los máximos niveles de secreción de estradiol y progesterona en circulación sanguínea. El útero completo se observa hinchado, grueso y congestionado, el epitelio muestra una morfología cavernosa, plegada y es en ésta etapa cuando se observa el máximo grosor del epitelio luminal uterino. La etapa del estro se caracteriza por la nula presencia de células en mitosis. Se empiezan a observar células apoptóticas, primero en el epitelio glandular y más tarde en el epitelio luminal acompañados por la presencia de leucocitos infiltrados. El útero sigue siendo grueso, el epitelio cavernoso y tiene una duración de 25-27 h (Baranda-Ávila y cols., 2009; Mendoza-Rodríguez y cols., 2003a; Westwood, 2008).

### 2.3. Patrones de muerte celular programada y mecanismos moleculares.

El útero de diversos mamíferos incluyendo el humano presenta muerte celular por apoptosis (Sandow y cols., 1979). Los estudios en este tejido han demostrado que el crecimiento y la regresión cíclica del tracto reproductivo femenino se encuentra bajo el control del  $E_2$  y la  $P_4$ ; (Hopwood y Levison 1976; Mendoza-Rodríguez y cols., 2003b). El  $E_2$  tiene un efecto mitogénico en el epitelio uterino, mientras que la  $P_4$  detiene la proliferación al inhibir la mitosis promovida por el  $E_2$ . En el útero de la rata además de la inducción de la ovulación, la preparación del endometrio para la implantación y el mantenimiento del embarazo, la  $P_4$  inhibe la apoptosis en el útero de la rata (Terada y cols., 1989). El incremento de los niveles plasmáticos de  $E_2$  induce la proliferación del tejido. Posteriormente, la integridad del tejido se mantiene en parte por el efecto antiapoptótico de la  $P_4$ . Si no se produce fertilización, los niveles de  $P_4$  caen y el epitelio uterino regresa por apoptosis (Baranda-Ávila y cols., 2009; Mendoza-Rodríguez y cols., 2003a; Sato y cols., 1997)

Mediante técnicas histomorfológicas se ha observado muerte celular por apoptosis en el útero de rata y se ha establecido una relación inversa entre la proliferación y la muerte celular (Spornitz y cols., 1994). Varios estudios han detectado la presencia de apoptosis en el útero de la rata durante el ciclo estral. Sin embargo los resultados no coinciden con una etapa exacta en la cual se observe el máximo índice apoptótico (Burroughs y cols., 2000; Lai y cols., 2000; Sato y cols., 1997).

En nuestro laboratorio se encontró el mayor índice apoptótico del epitelio luminal y glandular en la etapa del estro, disminuyendo en el metaestro, y siendo casi nulo para el diestro y el proestro (Mendoza-Rodríguez y cols., 2003b).

Las células apoptóticas en el endometrio presentan vacuolas en la superficie membranal, y un núcleo irregular con cromatina condensada y aglutinada a lo largo de la membrana nuclear. En algunas células se presentan fragmentos nucleares. Estas células son fagocitadas por células epiteliales vecinas no apoptóticas, las cuales presentan un gran contenido de vacuolas fagocíticas. No se encuentra infiltración de leucocitos en el epitelio durante la etapa del estro. En contraste se observan una gran cantidad de linfocitos infiltrados y macrófagos, que penetran por los espacios intercelulares del epitelio uterino en la etapa del metaestro. Las células apoptóticas son en su mayoría fagocitadas por las células mononucleares infiltradas. Los macrófagos muestran gránulos y núcleos con algunas vacuolas que contienen cuerpos apoptóticos en varias etapas de degradación (Mendoza-Rodríguez y cols., 2002; Mendoza-Rodríguez y cols., 2003b; Terada y cols., 1989).

A pesar de que la regresión del endometrio es un fenómeno ampliamente reconocido, poco se sabe de los mecanismos moleculares que están involucrados con la apoptosis en el epitelio uterino durante el ciclo estral. En estudios recientes, se ha evaluado la expresión de múltiples genes de la familia de Bcl-2 que están involucrados con el proceso apoptótico, particularmente durante la transición de la etapa del proestro al estro. Se sabe que el significado funcional de la relación Bax:Bcl-2 y/o Bcl-x<sub>s</sub>:Bcl-x<sub>L</sub> determina la posibilidad de formación de homodímeros de Bax y Bcl-x<sub>L</sub>. Una relación alta de Bax:Bcl-2 y/o Bcl-x<sub>s</sub>:Bcl-x<sub>L</sub> aumenta la posibilidad de formación de homodímeros de Bax y Bcl-x<sub>s</sub> y por tanto la inducción de señales de muerte celular. En cambio una relación baja promueve la formación de heterodímeros entre Bax y Bcl-2 y Bcl-x<sub>s</sub> con Bcl-x<sub>L</sub>, los cuales promueven la sobrevivencia celular. En el endometrio de la rata se ha observado que existen cambios significativos en la expresión de genes de la familia Bcl-2 a la media noche del proestro, caracterizado por un incremento en los índices proapoptóticos Bax/Bcl-2 y Bcl-x<sub>s</sub>/Bcl-x<sub>L</sub>. Estos datos sugieren que los genes estudiados participan

activamente en la regulación de la apoptosis en este tejido (Mendoza-Rodríguez y cols., 2003b)

En la apoptosis participan diversos factores, se ha estudiado el papel de XIAP y Smac/DIABLO en la muerte celular del endometrio de la rata y se ha observado que la máxima expresión para XIAP se observa durante el estro y el metaestro. En ratas ovariectomizadas(OVX) y tratadas con estradiol (OVX +E), se ha observado un aumento en la expresión de XIAP, mientras que para Smac/DIABLO se observa una expresión constante desde el metaestro hasta el proestro y disminuye significativamente durante el estro. Además también se observa que disminuye su expresión en ratas OVX tratadas con estradiol (Leblanc y cols., 2003; Nurse, 1990).

Las caspasas son factores importantes para la progresión de la apoptosis, se han estudiado los cambios en la expresión y activación de estas enzimas durante el ciclo estral y se ha observado que las caspasas activas 3, 6 y 7 tienen su máxima expresión durante el estro (Leblanc y cols., 2003). En la transición proestro-estro la activación de la caspasa-3 se observa desde las 0:00 h del estro y alcanza su máxima expresión a las 13:00 h del estro. En cambio, la caspasa 8 se activa alrededor de las 21:00 h del proestro y alcanza su máximo a las 6:00 h del estro, mientras que la caspasa 9 activa se detecta desde las 13:00 h del proestro y aumenta gradualmente hasta alcanzar su máximo a las 6:00 h del estro (Mendoza-Rodríguez y cols., 2009).

En cuanto a la participación de P53 en la muerte celular del endometrio de la rata, se ha demostrado mediante inmunohistoquímica que el epitelio luminal presenta cambios importantes en la expresión tanto del ARN mensajero como de la

proteína. Siendo notorio un máximo en la expresión del mRNA de durante el metaestro que va disminuyendo hacia el proestro y el estro, mientras que la expresión de la proteína, presenta cambios tanto en la expresión como en su localización subcelular. Durante el metaestro, la localización de P53 es predominante en el núcleo, mientras que para el proestro y estro, la cantidad de proteína disminuye de forma significativa, además de que su localización es más notoria en el citoplasma, (Mendoza-Rodríguez y cols., 2002).

Durante el estro se presenta el mayor índice apoptótico y una localización citoplásmica de la proteína P53 en el epitelio uterino, por lo cual no puede llevar a cabo su función transactivadora para regular la expresión de genes involucrados en el mecanismo de muerte celular (Mendoza-Rodríguez y cols., 2002). Sin embargo, si P53 se localizara en la mitocondria, podría desencadenar procesos de inducción de apoptosis por mecanismos no transcripcionales. Hasta el momento no existen estudios que demuestren la localización mitocondrial de P53 en el endometrio de la rata. Por lo tanto en el presente estudio se siguieron los cambios en la localización mitocondrial de P53 en este modelo fisiológico de apoptosis.

## **I. Planteamiento del problema.**

Ensayos *in vitro* y bajo condiciones de estrés inducido demuestran que P53 es una proteína clave para la inducción de la muerte celular tanto por mecanismos transcripcionales, como no transcripcionales, y para mantener la integridad tanto del ADN nuclear como mitocondrial durante la proliferación.

El endometrio de la rata es un tejido que muestra importantes cambios cíclicos dependientes de hormonas esteroides, que regulan la proliferación y muerte celular durante el ciclo estral y se ha demostrado que P53 presenta cambios tanto en su localización subcelular como en su expresión. Sin embargo no se ha estudiado cuál es la localización específica P53 cuando se observa fuera del núcleo y se desconocen también sus implicaciones funcionales. Por lo tanto es importante estudiar la localización de P53 en la mitocondria y si esta localización corresponde con la inducción de la muerte celular del endometrio de la rata.

## **Hipótesis**

La expresión y localización mitocondrial máxima de P53 coincidirán con la etapa de muerte celular del tejido endometrial de la rata durante el ciclo estral de la rata, induciendo apoptosis mediante mecanismos no transcripcionales.

## **II. Objetivos.**

### **4.1 Objetivo general**

Analizar la relación entre la localización mitocondrial de P53 y la inducción de la apoptosis en el endometrio de la rata durante el ciclo estral.

### **4.2 Objetivos particulares**

- ▶ Estudiar los cambios en la localización mitocondrial de P53 en el endometrio de la rata durante el ciclo estral.
  
- ▶ Analizar y relacionar los cambios en la expresión de P53, PCNA, Bcl-2 y Bax en endometrio durante el ciclo estral de la rata.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos y soluciones

- **Solución Buffer (PBS)pH= 7.4:**

NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 mM.

- **Solución TBS:**

Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM.

- **Solución TBS Tween 0.1% (v/v):**

Solución buffer TBS, Tween 20.

- **Buffer de lisis para proteína:**

NP-40 1% v/v, SDS 0.1%, Desoxicolato de sodio 0.5%, PBS pH=7.4.

- **Buffer de carga para proteína:**

SDS 2%, Azul de bromofenol 0.1%, Glicerol 10%, Tris –HCl 50mM.

- **Solución buffer para aislamiento de mitocondrias:**

Manitol 210mM, sacarosa 70mM, EDTA 1mM, HEPES 10mM, albúmina sérica bobina deslipidada 0.5mg/mL, Coctel de inhibidores de proteasas complete ROCHE.

- **Solución buffer isotónica para lavado de mitocondrias:**

Tris –HCl 10mM, EDTA 1mM, sacarosa 250mM, coctel de inhibidores de proteasas complete ROCHE.

- **Buffer de electroforesis pH= 8.3:**

Tris-Base 0,025M, glicina 0,192M, SDS 1% (p/v).

- **Buffer de transferencia pH= 8:**

Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v

- **Anticuerpos primarios y secundarios:**

-

<b>Anticuerpo</b>	<b>Casa comercial</b>
Anti-P53 (FL-393) SC-6243	Santa Cruz Biotechnology, Inc
-Anti-Bcl-2 (C-2) SC-7382	
-Anti-Bax (B-9) SC-7480	
-Anti-PCNA (PC10) SC-56	
- Anti rabbit IgG-HRP SC-2005	
- Anti mouse IgG-HRP SC-2004	
-Anti-mHSP70 ABR MA3-028	ABR-Affinity BioReagents

## 5.2. Obtención del endometrio

Para la obtención de la proteína de endometrio total, se utilizaron por cada etapa del ciclo estral tres grupos, cada uno formado por 3 ratas. En cambio para la obtención de mitocondrias de endometrio, debido a que la cantidad de mitocondrias obtenidas no era suficiente, fue necesario utilizar tres grupos, cada uno formado por cuatro ratas, por cada etapa del ciclo estral. Las ratas utilizadas tanto para la obtención del endometrio total como para la obtención de mitocondrias de endometrio fueron hembras de la cepa Wistar de 13 semanas de edad, las cuales se mantuvieron con ciclos de luz oscuridad 12:12 h, con alimento, agua *ad libitum*, y fueron sacrificadas mediante decapitación a las 13:00 h de cada día del ciclo. Se disecaron ambos cuernos uterinos y se cortaron longitudinalmente para exponer el endometrio. El endometrio fue obtenido mediante raspado suave con el bisel de una aguja con calibre de 25G. El tejido obtenido de ambos cuernos, fue mezclado en 1mL buffer de lisis para extracción de proteína o buffer isotónico para obtención de mitocondrias. Este mismo proceso fue realizado para obtener cortes del tejido endometrial obtenido y el remanente uterino correspondiente al miometrio.

Una porción del endometrio obtenido se utilizó para cortes por congelación y fue fijado en solución de paraformaldehído 4% durante 8 h, se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  y fueron teñidos mediante la técnica HE. La otra porción se utilizó para obtener cortes semifinos y fue fijada durante 24 h con solución fijadora de Karnovsky a 4°C durante 24 h. Posteriormente fue lavada y conservada en buffer de desoxicolatos hasta su utilización. Fue incluida en epon, se realizaron cortes de 1  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con azul de toluidina. Todos los cortes se observaron con un microscopio Nikon E600.

### 5.3. Obtención de la proteína total de endometrio

El endometrio total fue homogenizado en buffer de lisis para proteína y adicionalmente se realizó una homogenización mecánica, utilizando polytron Kinematika a velocidad máxima, aplicando tres pulsos de 10 s cada uno a 4°C. La muestra se centrifugó a 12,500 rpm durante 15 min a 4°C y se obtuvo el extracto proteínico en el sobrenadante, el cual fue conservado a -70°C. Los extractos proteínicos fueron cuantificados por el método de Bradford.

### 5.4. Fraccionamiento subcelular

El tejido obtenido de los raspados de endometrio se mezcló y llevó a un volumen final de 2 mL con buffer de aislamiento isotónico para mitocondrias. Se homogenizó utilizando un homogenizador Potter evelheim con vástago de teflón y claranse de 0.006 inch. El vástago del homogenizador se adaptó a un taladro cuya velocidad fue regulada al 50% y se aplicaron aplicando 2 x 30 pulsos a 4°C. La muestra se centrifugó 800 g x 20 min a 4°C, se separó el sobrenadante (SB1) y el botón enriquecido con núcleos y células completas se resuspendió en buffer isotónico para mitocondrias, se disgregó nuevamente y se realizó una segunda centrifugación a 800 g x 20 min a 4°C, se separó el sobrenadante (SB2) y se mezcló con el sobrenadante anterior (SB1+SB2). El botón enriquecido con núcleos y células completas se lavó con buffer de lavado para mitocondrias. Finalmente se resuspendió en buffer para extracción de proteína y fue conservado a -70°C hasta ser utilizado.

Los sobrenadantes mezclados se centrifugaron a 8200 g x 20 min a 4°C. El sobrenadante fue considerado como la fracción citosólica y el botón obtenido corresponde a la fracción mitocondrial. La fracción mitocondrial fue lavada 2 veces con buffer de lavado para mitocondrias, resuspendido en buffer de lisis para

proteína y conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizado. Las fracciones mitocondriales y el lisado celular total fueron cuantificados por el método de Bradford.

### 5.5. Western blot.

Los extractos proteínicos tanto de endometrio total como del fraccionado subcelular, fueron cuantificados por el método de Bradford.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE, utilizando un gel de poliacrilamida al 10% y se cargaron  $10\ \mu\text{g}$  de proteína total por cada muestra. Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de PVDF por método semi-seco. Las membranas fueron bloqueadas con albúmina al 1% (m/v) en TBS-Tween 0.1% durante dos horas a temperatura ambiente e incubadas con los anticuerpos primarios toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Para las proteínas del endometrio total: P53 (1:300), PCNA (1:1000) como indicador de proliferación, Bax (1:1000) proteína proapoptótica, Bcl-2 (1:1000) proteína antiapoptótica,

Para las proteínas de las mitocondrias del endometrio: mHSP70 (1:5000) como marcador mitocondrial, (1:300), PCNA (1:1000) como marcado nuclear.

Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 min con TBS- Tween 0.1%, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a HRP (anti-rabbit para P53 y anti-mouse para Bax, Bcl-2, mHSP70 y PCNA), durante 1 h a temperatura ambiente y las membranas se lavaron 2 veces durante 10 min con TBS-Tween 0.1%(v/v).

El revelado de las membranas se realizó por detección de quimioluminiscencia utilizando ECL millipore 1:10, solución de revelado, fijado de KODAK y placas fotográficas Amersham Hyperfilm ECL.

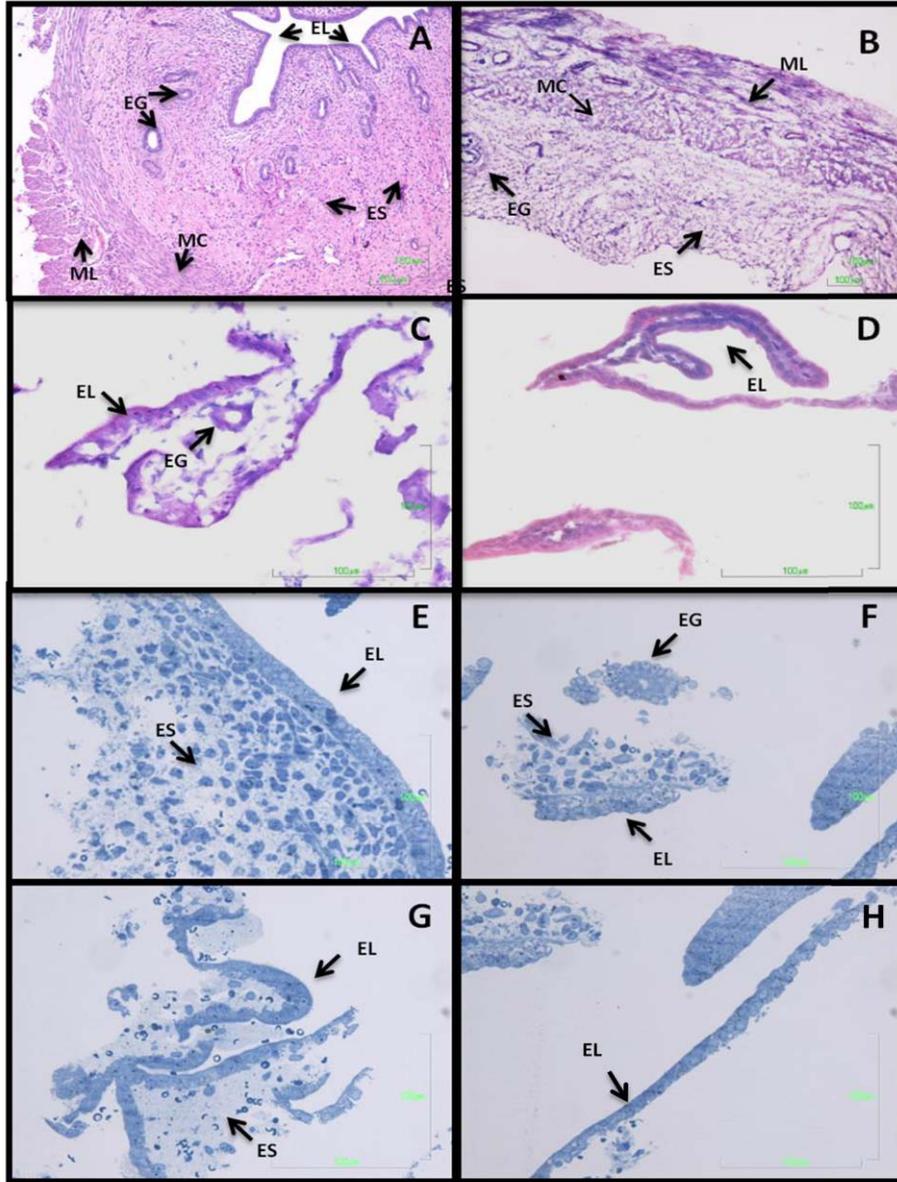
Los cambios en la expresión de cada proteína fueron analizados mediante densitometría con el programa KODAK 1D 3.6, tomando la intensidad neta (Int net) del área que ocupaban las bandas obtenidas en la placas de western blot. La densitometría de P53 fue corregida contra el control de carga (Int net rel). En el caso del endometrio total se corrigió con una proteína de 50KDa, que mantenía su expresión constante en el gel teñido con azul de coomassie. Para el fraccionamiento subcelular la expresión de P53 mitocondrial (mt P53) fue corregida contra el marcador mitocondrial mHSP70 y la expresión de P53 del lisado celular fue corregido contra el marcador nuclear PCNA. Posteriormente para determinar la cantidad de mtP53 respecto al P53 total, se realizó el cociente entre mtP53 y P53 total. Las densitometrías de la expresión de P53 corregidas se sometieron a un análisis estadístico, realizado mediante análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey, utilizando el programa Graph Pad prisma 4.0.

## **VI. RESULTADOS**

### **6.1. Aislamiento del endometrio.**

Para comprobar que el tejido obtenido al raspar la luz del útero, correspondía al endometrio y no se encontraba contaminado con miometrio, se realizaron cortes histológicos y tinciones en HE tanto de la fracción endometrial como del tejido remanente del raspado. También se realizaron cortes finos de la porción endometrial y se tiñeron con azul de toluidina.

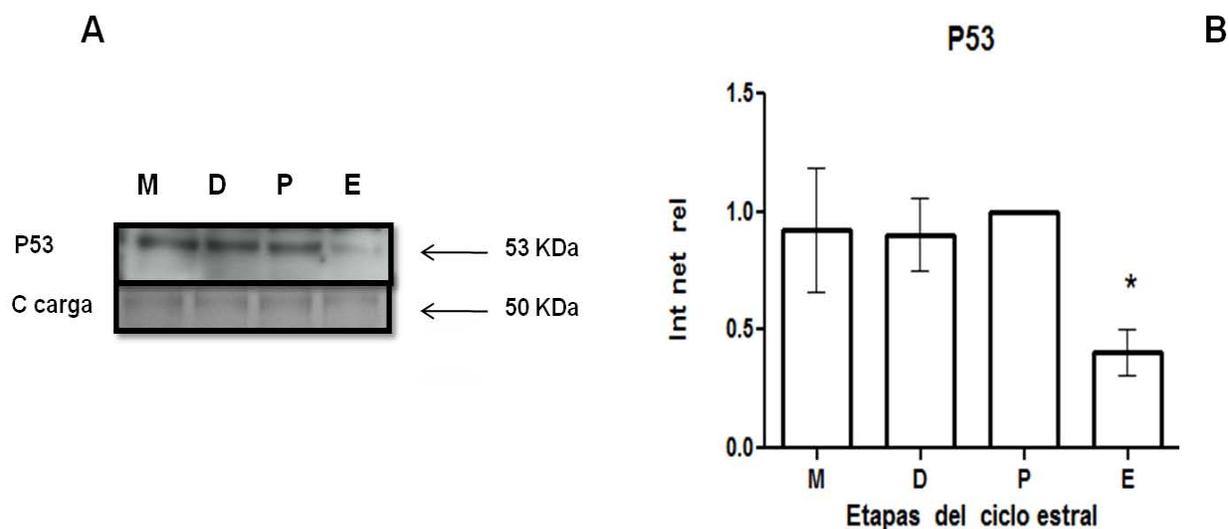
En la figura 8 se observa que la que la fracción endometrial con la que se trabajó contiene diversos tipos celulares. Se encuentra enriquecida con células epiteliales que conservan la estructura del epitelio luminal (Fig. 8C, 8D y 8E). En algunos casos se encuentran unidas al estroma (Fig. 8E y 8G). Las células del epitelio glandular (Fig. 8C y 8F), se observan aisladas tanto del estroma como del epitelio luminal y en menor proporción en comparación con las células estromales y epiteliales.



**Figura 1 . Aislamiento del endometrio.** La fracción endometrial se encuentra enriquecida con células epiteliales, se observan también células estromales y células del epitelio glandular. **A** muestra un corte transversal del útero completo de rata teñido con H/E, las flechas señalan el epitelio luminal (EL), epitelio glandular (EG), el estroma(ES), el miometrio circular (MC) y el miometrio longitudinal(ML). **B** muestra un corte histológico transversal del tejido uterino remanente a la extracción del endometrio, se observa una porción rica en estroma unida al miometrio y la ausencia de epitelio luminal. **C** muestra un epitelio con estroma remanente y una glándula. **D** presenta un epitelio luminal sin estroma. En la fotografía **E** se observan tanto epitelio luminal como estroma unidos. En la fotografía **F**, se observan: epitelio glandular, epitelio luminal y estroma. **G** muestra epitelio luminal con un poco de estroma. En la imagen **H** se observa epitelio luminal sin estroma. Los cortes histológicos de las fotografías A-D, fueron teñidos con HE. Los cortes histológicos (E-H) fueron teñidos con azul de toluidina.

## 6.2. Cambios en la expresión y localización mitocondrial de P53.

Para evaluar los cambios en la expresión de P53 en el endometrio de la rata durante el ciclo estral, se realizó un estudio de expresión de la proteína, mediante western blot, durante las diferentes etapas del ciclo estral de la rata. Se observó que la expresión de P53 no muestra cambios estadísticamente significativos desde el metaestro hasta el proestro, sin embargo durante el estro la cantidad de proteína disminuye significativamente casi en un 50% (Figura 9).

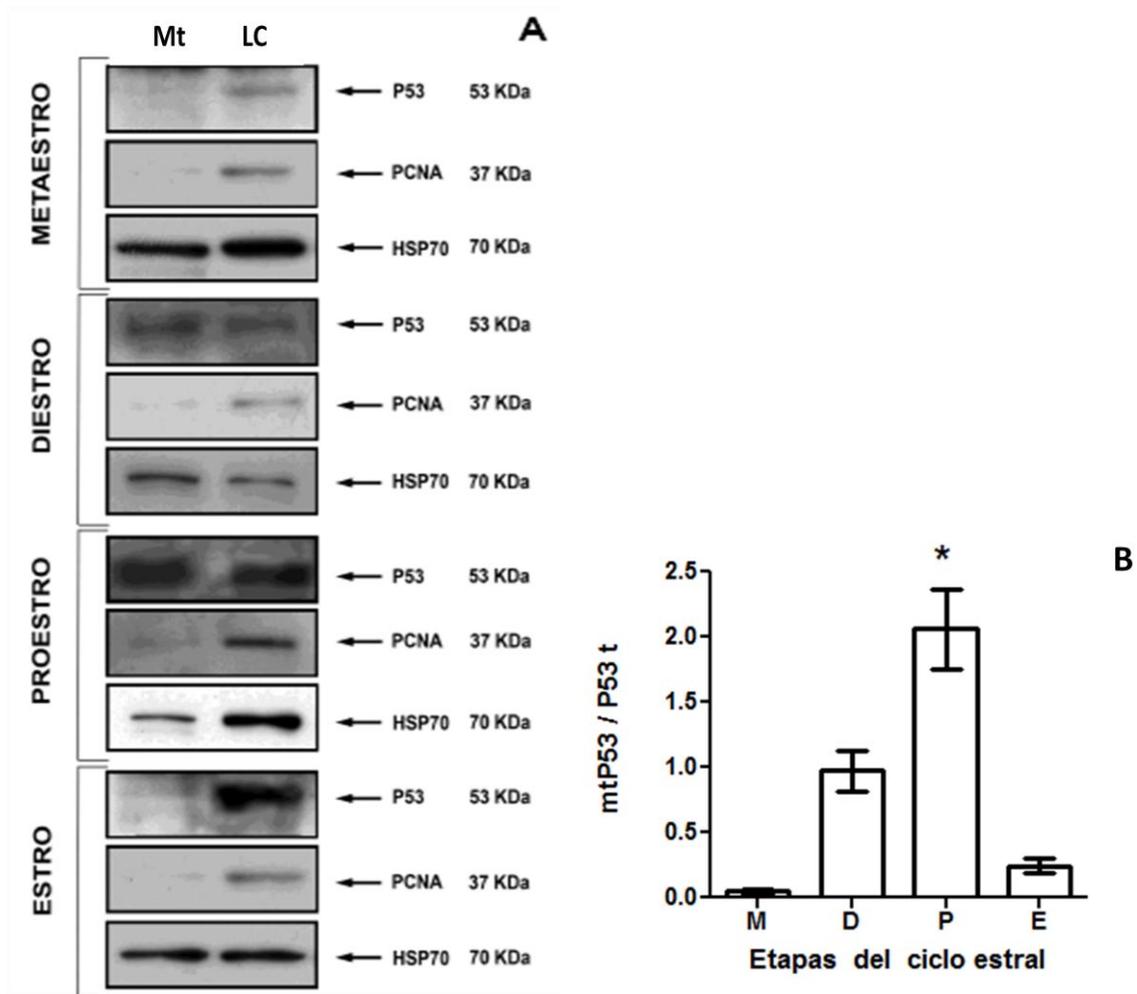


**Figura 9. Cambios en la expresión de P53 en el endometrio de la rata durante el ciclo estral.** Se muestran el western blot **A** y el histograma **B** representativos del promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Metaestro **M**, diestro **D** y proestro **P**. \* $P < 0.05$  para E vs M, D y P.

Estudios previos demostraron que P53 cambia su localización subcelular en los epitelios uterinos, durante las diferentes etapas del ciclo estral de la rata. Durante

el metaestro mostraba una localización nuclear importante, mientras que para el proestro y estro se observó una disminución tanto en la expresión de la proteína, como en su localización nuclear y se hizo evidente su localización citoplásmica. Sin embargo se desconocía si estos cambios en la distribución subcelular de la proteína corresponden a una localización mitocondrial.

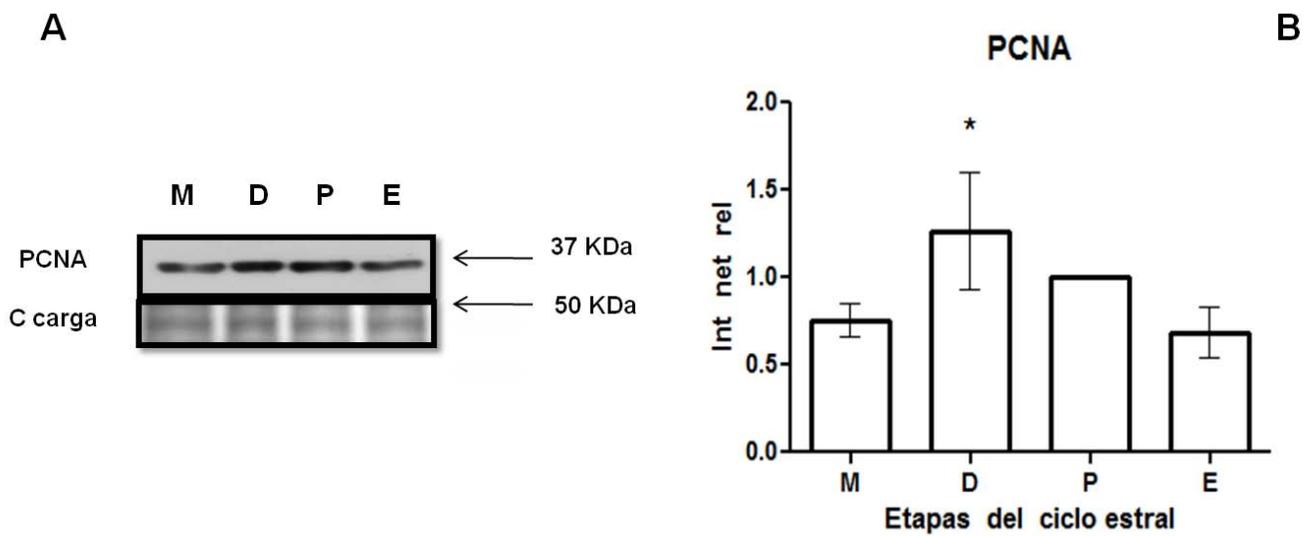
En este estudio se observó que P53 se localiza en mitocondrias aisladas del endometrio y que la cantidad de proteína que se localiza en la mitocondria, cambia durante el ciclo estral de la rata. La etapa del ciclo estral donde se observó la menor cantidad de proteína localizada en la mitocondria fue el metaestro, durante el diestro aumentó de manera estadísticamente significativa, casi en un 50% respecto al máximo de localización mitocondrial, el cual se observó durante el proestro y para el estro la cantidad de P53 localizado en la mitocondria disminuyó de manera estadísticamente significativa, siendo aproximadamente el 25% de la expresión máxima (Figura 10).



**Figura 10. Cambios en la localización mitocondrial de P53 en el endometrio de la rata durante el ciclo estral.** **A** Western blot representativo de P53, **Mit** mitocondria, **LC** lisado celular, **PCNA** marcador nuclear y **HSP70** marcador mitocondrial. **B** histograma muestra del promedio y la desviación estándar de la proteína P53 en mitocondria vs P53 en endometrio total (P53t) durante el ciclo estral. **M** metaestro, **D** diestro, **E** estro, **P** proestro. Se realizaron tres experimentos independientes para cada etapa del ciclo. \* $P < 0.05$  para P respecto a M y E.

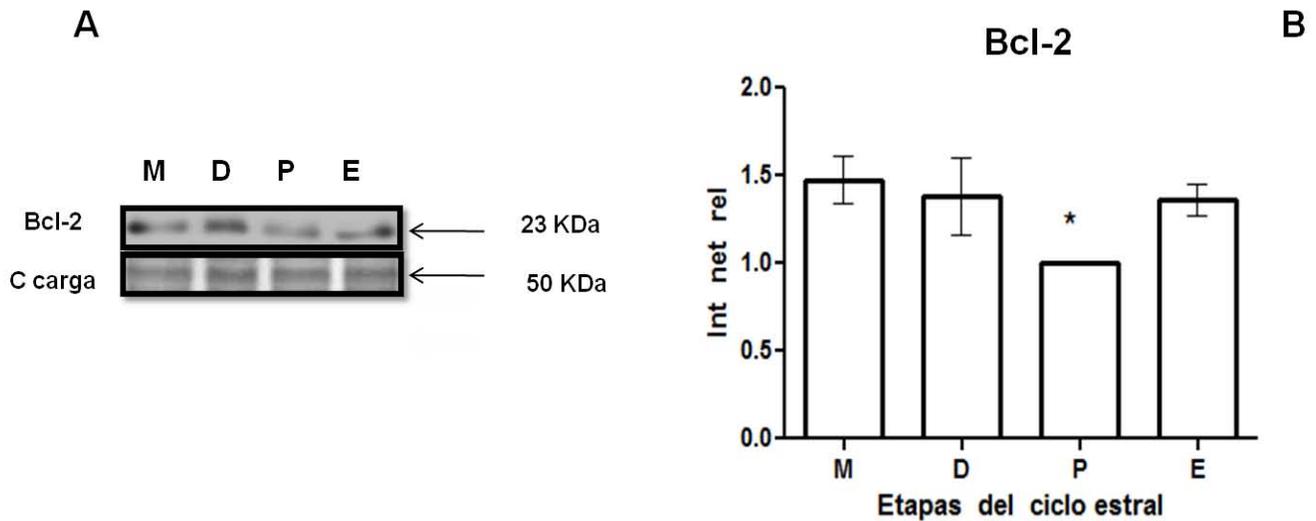
### 6.3. Cambios en la expresión de PCNA, Bax y Bcl-2 .

Existen diversas proteínas utilizadas como marcador de proliferación celular. PCNA es una proteína involucrada en la proliferación celular, su expresión se ve aumentada durante la fase S del ciclo celular (Figura 11). En este trabajo se estudiaron los cambios en la expresión de ésta proteína durante el ciclo estral de la rata y se observó que su expresión máxima se observa durante el diestro, en el metaestro se observa un 60% de la expresión máxima y esta diferencia es estadísticamente significativa respecto al diestro. También se observó que en el estro hay una disminución estadísticamente significativa en la expresión de la proteína siendo aproximadamente el 55% de la expresión máxima y es estadísticamente significativa respecto al diestro. Por otra parte no parece haber diferencia estadísticamente significativa, en la expresión de la proteína durante el diestro y proestro.



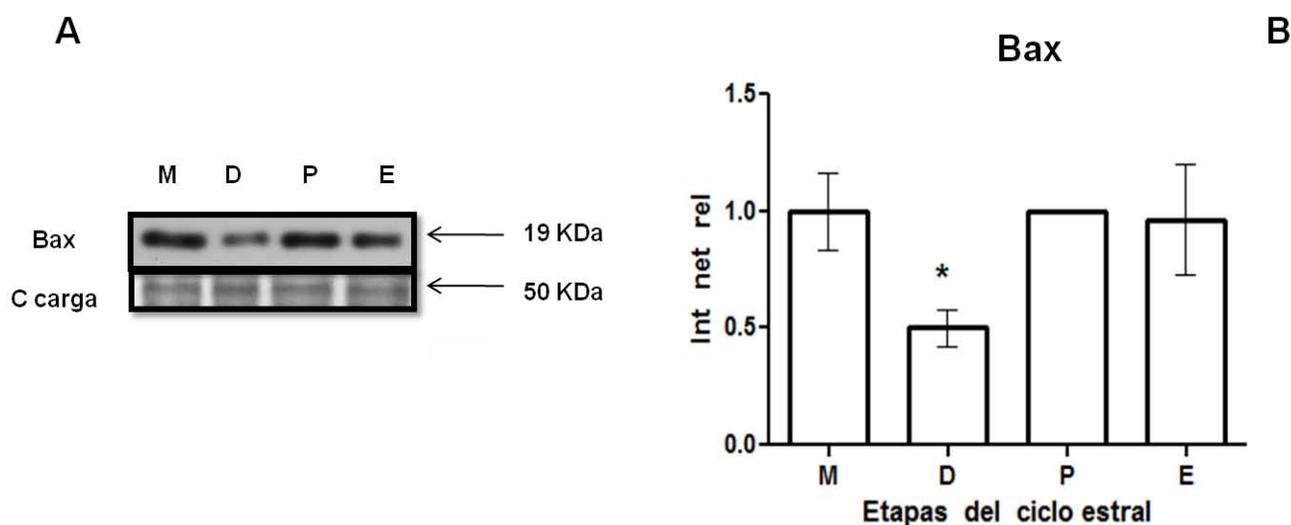
**Figura 11. Cambios en la expresión de PCNA durante el ciclo estral.** **A** muestra el western blot y **B** el histograma representativo de tres experimentos independientes de los cambios en la expresión de PCNA durante el ciclo estral. **M** metaestro, **D** diestro, **E** estro, **P** proestro. \* $P < 0.05$  para D vs M y E.

La familia de las proteínas Bcl-2 está involucrada con la inducción de la muerte y sobrevivencia de la célula. La proteína Bcl-2 es una proteína localizada en la membrana externa de la mitocondria y tiene una función antiapoptótica. En el presente trabajo se analizaron los cambios en la expresión de Bcl-2 y se puede observar que en el proestro se expresa aproximadamente en un 75%, por lo tanto hay una disminución en su expresión estadísticamente significativa respecto a las demás etapas del ciclo, donde la expresión de la proteína se mantiene constante (Figura 12).



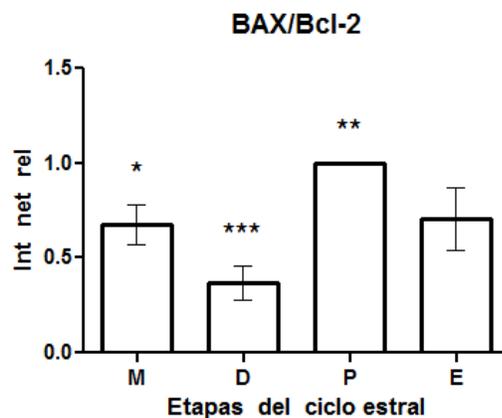
**Figura 12. Cambios en la expresión de Bcl-2 durante el ciclo estral.** Se observan el western blot **A** y el histograma **B**, representativos del promedio y la desviación estándar de los cambios en la expresión de Bcl-2. Se realizaron tres experimentos independientes por cada etapa del ciclo. **M** metaestro, **D** diestro, **E** estro, **P** proestro. \* $P < 0.05$  para P vs M, D y E.

La Proteína Bax forma parte de la familia de las proteínas Bcl-2 y es una proteína proapoptótica. En el presente trabajo se analizaron los cambios en la expresión de Bax, y se puede observar que hay una disminución en su expresión de aproximadamente 50% en el diestro, la cual es estadísticamente significativa respecto a las demás etapas del ciclo, donde mantiene su expresión constante (Figura 13).



**Figura 13. Cambios en la expresión de Bax durante el ciclo estral.** Se muestran el western blot **A** y el histograma **B** del promedio y la desviación estándar de los cambios en la expresión de Bax durante el ciclo estral de la rata. Se realizaron tres experimentos independientes por cada etapa del ciclo. **M** metaestro, **D** diestro, **E** estro, **P** proestro. \* $P < 0.05$  para D vs M, P y E

El balance proapoptótico es una relación entre la expresión de las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas que permite determinar si la función proapoptótica de éstas es favorable. En el presente trabajo se analizaron los cambios en la expresión tanto de Bax como Bcl-2. Se realizó el cociente de la expresión de las proteínas para determinar el balance proapoptótico y se puede observar que el máximo balance proapoptótico se observa durante el proestro y es estadísticamente significativo respecto al metaestro y diestro. Durante el diestro se observa un balance proapoptótico de aproximadamente 30% y muestra diferencia estadísticamente significativa respecto al metaestro proestro y estro. En el metaestro se observa un balance proapoptótico de aproximadamente 70%. En el estro se observa un balance proapoptótico muy similar al metaestro y el cambio en el balance proapoptótico sólo es estadísticamente significativo respecto al metaestro (Figura 14).



**Figura 14. Cambios en el balance proapoptótico del endometrio de la ratona durante el ciclo estral.** Se muestra el histograma del cociente de la expresión de Bax y Bcl-2 durante el ciclo estral. **M** metaestro, **D** diestro, **E** estro, **P** proestro. \*\*\* $P < 0.05$  para D vs P, E y M  
\*\*  $P < 0.05$  para P vs D y M, \* $P < 0.05$  para M vs D y P.

## VII. DISCUSIÓN.

La expresión de P53 en endometrio total se mantuvo constante desde el metaestro hasta el proestro y disminuyó en el estro. Estos datos concuerdan con estudios anteriores donde se demuestra que tanto el ARN mensajero como la proteína de P53 tienen su máxima expresión y localización nuclear durante el inicio de la proliferación y disminuye hacia el inicio de la muerte (Mendoza-Rodríguez y cols., 2002), lo cual puede ser debido a que en las 13:00 h del estro, la mayor parte de las células del endometrio ya han sufrido apoptosis.

La permanencia de la proteína P53 en el tejido endometrial durante las primeras etapas del ciclo estral, puede deberse tanto al incremento en la velocidad de síntesis inducida por hormonas esteroides, particularmente el estradiol, o bien por modificaciones postraduccionales de la proteína que eviten su degradación. Se sabe que la mayoría de las funciones citoplásmicas de P53, son controladas mediante modificaciones postraduccionales que evitan su degradación, principalmente la monoubiquitinación y fosforilación (Marchenko y Moll 2007). Estas modificaciones inducen su localización citoplásmica y promueven la apoptosis por la vía no transcripcional (Green y Kroemer, 2009).

Otro blanco de estudio para obtener mayor información sobre las modificaciones postraduccionales de P53 en el endometrio de la rata, son los cambios en la expresión de MDM2. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, demuestran que es la principal ubiquitin ligasa de esta proteína e induce monoubiquitinación cuando la expresión de MDM2 es menor que la expresión de P53. La monoubiquitinación promueve la acumulación de la proteína pero no su degradación, permitiendo la acumulación de P53 en el citoplasma. Cuando la expresión de MDM2 es mayor que la de P53, induce poliubiquitinación y degradación de P53 via el proteosoma (Li y cols., 2003).

Se ha estudiado que el estradiol induce la degradación de MDM2 en líneas celulares tumorales y dado que el endometrio es un blanco fisiológico para esta hormona, podría sugerirse que la acumulación de P53 en las células del endometrio es estabilizada por el estradiol. Por lo que sería importante establecer esta relación en el futuro, lo cual permitiría entender la contribución de la ubiquitinación de P53 durante el ciclo estral.

Por otro lado, se observó que la localización mitocondrial de P53 cambia durante el ciclo, siendo mínima durante el metaestro (inicio de la proliferación), aumentando hacia el diestro (mayor proliferación), siendo máxima durante el proestro y disminuyendo nuevamente en el estro. Estos cambios pueden ser consecuencia de que durante el metaestro hay poca muerte, por lo tanto no se requiere la presencia de P53 en mitocondria para la inducción de la muerte celular.

Para el diestro, la localización mitocondrial de P53 aumenta de manera estadísticamente significativa. Durante esta etapa la proliferación celular va en aumento y es evidente tanto bioquímica como morfológicamente. Estudios recientes han demostrado que P53 se localiza en la matriz mitocondrial de células en proliferación (Ferecatu y cols., 2009) y tiene importantes funciones durante la reparación del DNA mitocondrial en células cancerígenas colorectales en estado proliferativo (Chen y cols., 2006). Por lo tanto es probable que el aumento en la localización mitocondrial de P53 durante el diestro, tenga relación con su función protectora para el ADN mitocondrial durante la proliferación, evitando daño y mutaciones en el ADN mitocondrial, permitir que el ciclo celular se lleve a cabo adecuadamente (Kulawiec y cols., 2009) y con ello la regeneración del endometrio.

Durante el proestro se observó la máxima localización mitocondrial de P53, lo cual puede obedecer a dos procesos importantes. El primero es que durante esta etapa se alcanza el máximo de figuras mitóticas, producto de la proliferación inducida por el estradiol, seguido de una señal antiapoptótica por parte de la progesterona.

Por lo tanto, si P53 también tiene efectos sobre la reparación del ADN mitocondrial de las células del endometrio durante la proliferación, sería necesaria su localización mitocondrial, para inducir reparación por daño al ADN mitocondrial durante las etapas de mayor proliferación (Chen y cols., 2006). El segundo sugeriría que la localización mitocondrial de P53 obedece a su función proapoptótica, induciendo su localización mitocondrial desde horas tempranas al inicio de la muerte, lo cual correlaciona con la expresión de la caspasa 9 activa en el útero de la rata desde las 13:00h del proestro (Mendoza-Rodríguez y cols., 2009), ya que ésta es la responsable de la formación del apoptosoma junto con APAF-1 y el citocromo C. Para poder determinar cuál es la función de la localización mitocondrial de P53 durante el proestro, es necesario estudiar si se encuentra en la matriz mitocondrial interactuando con el ADN mitocondrial o bien, si se localiza en la membrana externa mitocondrial para favorecer el inicio de la apoptosis.

La proteína PCNA es un importante indicador de proliferación, ya que participa en la replicación del ADN durante la fase S del ciclo celular. En este trabajo se observó que a las 13:00 h del diestro la expresión de PCNA es máxima, lo cual indicaría que es durante esta etapa del ciclo estral de la rata cuando se encuentra la mayor cantidad de células en la fase S del ciclo celular que aún no se dividen. Por lo tanto puede decirse que es una etapa de inicio de la proliferación celular lo cual concuerda con la alta proliferación observada en nuestro laboratorio (Baranda-Ávila y cols., 2009; Mendoza-Rodríguez y cols., 2003a) y un útero delgado (Westwood, 2008). En esta etapa, la expresión de Bax disminuye de forma estadísticamente significativa, mientras que Bcl-2 se mantiene constante durante el metaestro y diestro, pero disminuye su expresión de manera significativa durante el proestro. Estos resultados podrían sugerir que las señales de apoptosis empiezan en el día del proestro y que durante esta etapa el ciclo celular ya no se encuentra en un proceso proliferativo, sino de división celular e inhibición de la apoptosis por efecto de la progesterona. En contraste, estudios previos (Mendoza-Rodríguez y cols., 2003b) demostraron mediante

inmunohistoquímica, que tanto para el epitelio glandular como luminal del endometrio, la mínima expresión de Bcl-2 se observa hasta la noche del proestro y madrugada del estro. Sin embargo, estas diferencias podrían ser el resultado de que la fracción del tejido endometrial, aunque está enriquecida con células epiteliales, también contiene células estromales y glandulares que no proliferan y mueren al mismo tiempo que el epitelio luminal. Esta contaminación celular podría contribuir a las diferencias encontradas en este trabajo respecto a estudios previos realizados en el endometrio de la rata durante el ciclo estral .

## **VIII. CONCLUSIONES**

Se demostró por primera vez en un modelo fisiológico de proliferación y muerte celular por apoptosis que la máxima localización mitocondrial de P53 se observa durante el diestro y proestro, lo cual correlaciona no solamente con la inducción de la muerte durante el proestro, sino también con el inicio de la proliferación del endometrio de la rata durante el metaestro.

Los cambios en la localización mitocondrial de P53 parecen estar sincronizados con los cambios en la expresión de Bax, Bcl-2 y PCNA en el endometrio total de la rata durante el ciclo estral.

## **IX. PERSPECTIVAS.**

Es necesario determinar la localización submitocondrial de P53 durante el diestro y proestro para diferenciar sus funciones proapoptóticas y las de protección del ADN mitocondrial.

Estudiar la relación de P53 poliubiquitinado vs P53 monoubiquitinado podría otorgar valiosa información para explicar la permanencia de la proteína a lo largo del ciclo y determinar las funciones proapoptóticas, además de su expresión durante el ciclo estral.

Por otra parte sería de gran interés demostrar los cambios en la localización nuclear de P53 para determinar si la expresión constante a lo largo del ciclo estral es para mantener una poza de la proteína y lo que realmente determina sus funciones transcripcionales, proapoptóticas.

## IX. BIBLIOGRAFÍA.

- Ahn, J. y C. Prives (2001). "The C-terminus of p53: the more you learn the less you know." Nat Struct Biol **8**(9): 730-732.
- Attardi, L. D., E. E. Reczek, C. Cosmas, E. G. Demicco, M. E. McCurrach, S. W. Lowe y T. Jacks (2000). "PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family." Genes Dev **14**(6): 704-718.
- Baranda-Ávila, N., C. A. Mendoza-Rodríguez, S. Morimoto, E. Langley y M. Cerbon (2009). "Molecular mechanism of cell proliferation in rodent uterus during the estrous cycle." J Steroid Biochem Mol Biol **113**(3-5): 259-268.
- Barlev, N. A., L. Liu, N. H. Chehab, K. Mansfield, K. G. Harris, T. D. Halazonetis y S. L. Berger (2001). "Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases." Mol Cell **8**(6): 1243-1254.
- Bell, S., C. Klein, L. Muller, S. Hansen y J. Buchner (2002). "p53 contains large unstructured regions in its native state." J Mol Biol **322**(5): 917-927.
- Bouillet P, S. A. (2002). "BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death." J Cell Sci. **Apr 15**;(115(Pt 8)): 1567-1574.
- Bouvard, V., T. Zaitchouk, M. Vacher, A. Duthu, M. Canivet, C. Choisy-Rossi, M. Nieruchalski y E. May (2000). "Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice." Oncogene **19**(5): 649-660.
- Brown-Grant, K., D. Exley y F. Naftolin (1970). "Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrous cycle of the rat." J Endocrinol **48**(2): 295-296.
- Burroughs, K. D., R. Fuchs-Young, B. Davis y C. L. Walker (2000). "Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during myometrial maturation and the development of uterine leiomyomas in the rat." Biol Reprod **63**(5): 1322-1330.
- Butcher, R. L., W. E. Collins y N. W. Fugo (1974). "Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat." Endocrinology **94**(6): 1704-1708.
- Canman, C. E., T. M. Gilmer, S. B. Coutts y M. B. Kastan (1995). "Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis." Genes Dev **9**(5): 600-611.
- Caspari, T. (2000). "How to activate p53." Curr Biol **10**(8): R315-317.
- Corcoran, C. A., Y. Huang y M. S. Sheikh (2006). "The regulation of energy generating metabolic pathways by p53." Cancer Biol Ther **5**(12): 1610-1613.
- Chang, J., D. H. Kim, S. W. Lee, K. Y. Choi y Y. C. Sung (1995). "Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly

- related to the binding affinity to TATA-binding protein." J Biol Chem **270**(42): 25014-25019.
- Charlot, J. F., J. L. Pretet, C. Haughey y C. Mougín (2004). "Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells." Apoptosis **9**(3): 333-343.
- Chen, D., Z. Yu, Z. Zhu y C. D. Lopez (2006). "The p53 pathway promotes efficient mitochondrial DNA base excision repair in colorectal cancer cells." Cancer Res **66**(7): 3485-3494.
- Debbas, M. y E. White (1993). "Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B." Genes Dev **7**(4): 546-554.
- Draetta, G. y J. Eckstein (1997). "Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation." Biochim Biophys Acta **1332**(2): M53-63.
- Dumont, P., J. I. Leu, A. C. Della Pietra, 3rd, D. L. George y M. Murphy (2003). "The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential." Nat Genet **33**(3): 357-365.
- el-Deiry, W. S., S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K. W. Kinzler y B. Vogelstein (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." Nat Genet **1**(1): 45-49.
- el-Deiry WS, K. S., Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." Nat Genet. **1**(1): 45-49.
- Elledge, S. J., R. Richman, F. L. Hall, R. T. Williams, N. Lodgson y J. W. Harper (1992). "CDK2 encodes a 33-kDa cyclin A-associated protein kinase and is expressed before CDC2 in the cell cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2907-2911.
- Erster, S., M. Mihara, R. H. Kim, O. Petrenko y U. M. Moll (2004). "In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation." Mol Cell Biol **24**(15): 6728-6741.
- Espinosa, J. M. y B. M. Emerson (2001). "Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment." Mol Cell **8**(1): 57-69.
- Farnebo, M., V. J. Bykov y K. G. Wiman (2010). "The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer." Biochem Biophys Res Commun **396**(1): 85-89.
- Ferecatu, I., M. Bergeaud, A. Rodríguez-Enfedaque, N. Le Floch, L. Oliver, V. Rincheval, F. Renaud, F. M. Vallette, B. Mignotte y J. L. Vayssiere (2009). "Mitochondrial localization of the low level p53 protein in proliferative cells." Biochem Biophys Res Commun **387**(4): 772-777.
- Freeman (1988). The ovarian cycle of the rat.
- Fuster, J. J., S. M. Sanz-Gonzalez, U. M. Moll y V. Andres (2007). "Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy." Trends Mol Med **13**(5): 192-199.
- Gottlieb, E., R. Haffner, T. von Ruden, E. F. Wagner y M. Oren (1994). "Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal." EMBO J **13**(6): 1368-1374.

- Green, D. R. y G. Kroemer (2009). "Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53." Nature **458**(7242): 1127-1130.
- Haupt, S., M. Berger, Z. Goldberg y Y. Haupt (2003). "Apoptosis - the p53 network." J Cell Sci **116**(Pt 20): 4077-4085.
- Haupt, Y., Y. Barak y M. Oren (1996). "Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2." EMBO J **15**(7): 1596-1606.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-776.
- Hollstein, M., K. Rice, M. S. Greenblatt, T. Soussi, R. Fuchs, T. Sorlie, E. Hovig, B. Smith-Sorensen, R. Montesano y C. C. Harris (1994). "Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines." Nucleic Acids Res **22**(17): 3551-3555.
- Hopwood, D. y D. A. Levison (1976). "Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium." J Pathol **119**(3): 159-166.
- Howes, K. A., N. Ransom, D. S. Papermaster, J. G. Lasudry, D. M. Albert y J. J. Windle (1994). "Apoptosis or retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53." Genes Dev **8**(11): 1300-1310.
- Hu, W., Z. Feng, G. S. Atwal y A. J. Levine (2008). "p53: a new player in reproduction." Cell Cycle **7**(7): 848-852.
- Jayaraman, J. y C. Prives (1995). "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus." Cell **81**(7): 1021-1029.
- Jeffrey, P. D., S. Gorina y N. P. Pavletich (1995). "Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms." Science **267**(5203): 1498-1502.
- Joerger, A. C. y A. R. Fersht (2008). "Structural biology of the tumor suppressor p53." Annu Rev Biochem **77**: 557-582.
- Ko, L. J. y C. Prives (1996). "p53: puzzle and paradigm." Genes Dev **10**(9): 1054-1072.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky y G. Melino (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.
- Kubbutat, M. H., S. N. Jones y K. H. Vousden (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." Nature **387**(6630): 299-303.
- Kulawiec, M., V. Ayyasamy y K. K. Singh (2009). "p53 regulates mtDNA copy number and mitochekpoint pathway." J Carcinog **8**: 8.
- Lai, M. D., L. R. Lee, K. S. Cheng y L. Y. Wing (2000). "Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus." J Endocrinol **166**(1): 87-93.
- Latonen, L. y M. Laiho (2005). "Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53." Biochim Biophys Acta **1755**(2): 71-89.

- Leblanc, V., M. C. Dery, C. Shooner y E. Asselin (2003). "Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17beta-estradiol at estrus." Reprod Biol Endocrinol **1**: 59.
- Lee H, M. K., Muhandiram R, Park KH, Suk JE, Kim DH, Chang J, Sung YC, Choi KY, Han KH. ( 2000 ;). "Local structural elements in the mostly unstructured transcriptional activation domain of human p53." J Biol Chem. **275**.((38):): 29426-29432.
- Li, M., C. L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer y W. Gu (2003). "Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2." Science **302**(5652): 1972-1975.
- Liu, G., J. A. Schwartz y S. C. Brooks (1999). "p53 down-regulates ER-responsive genes by interfering with the binding of ER to ERE." Biochem Biophys Res Commun **264**(2): 359-364.
- Lowe, S. W., E. M. Schmitt, S. W. Smith, B. A. Osborne y T. Jacks (1993). "p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes." Nature **362**(6423): 847-849.
- Lu, X. (2010). "Tied up in loops: positive and negative autoregulation of p53." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(5): a000984.
- Marchenko, N. D. y U. M. Moll (2007). "The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53." Cell Cycle **6**(14): 1718-1723.
- Marchenko, N. D., A. Zaika y U. M. Moll (2000). "Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling." J Biol Chem **275**(21): 16202-16212.
- Mateu, M. G. y A. R. Fersht (1999). "Mutually compensatory mutations during evolution of the tetramerization domain of tumor suppressor p53 lead to impaired hetero-oligomerization." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3595-3599.
- Meek, D. W. (2004). "The p53 response to DNA damage." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 1049-1056.
- Mendoza-Rodríguez, C. A., M. A. Martínez, O. Vargas, K. Nava, S. Morimoto, M. Espinosa y M. Cerbon (2009). "Mating modifies apoptosis pattern in epithelial cells of the rat uterus." Mol Reprod Dev **76**(6): 564-572.
- Mendoza-Rodríguez, C. A., H. Merchant-Larios, L. Segura-Valdez Md Mde, N. Moreno-Mendoza, M. E. Cruz, P. Arteaga-Lopez, I. Camacho-Arroyo, R. Dominguez y M. Cerbon (2002). "Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle." Mol Reprod Dev **61**(4): 445-452.
- Mendoza-Rodríguez, C. A., H. Merchant-Larios, M. L. Segura-Valdez, N. Moreno-Mendoza, M. E. Cruz, P. Arteaga-Lopez, I. Camacho-Arroyo, R. Dominguez y M. Cerbon (2003a). "c-fos and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium during the estrous cycle." Mol Reprod Dev **64**(4): 379-388.
- Mendoza-Rodríguez, C. A., M. G. Monroy-Mendoza, S. Morimoto y M. A. Cerbon (2003b). "Pro-apoptotic signals of the bcl-2 gene family in the rat uterus occurs in the night before the day of estrus and precedes ovulation." Mol Cell Endocrinol **208**(1-2): 31-39.

- Mignotte, B. y J. L. Vayssiere (1998). "Mitochondria and apoptosis." Eur J Biochem **252**(1): 1-15.
- Mihara, M. y U. M. Moll (2003). "Detection of mitochondrial localization of p53." Methods Mol Biol **234**: 203-209.
- Moudgil, V. K., S. Dinda, N. Khattree, S. Jhanwar, P. Alban y C. Hurd (2001). "Hormonal regulation of tumor suppressor proteins in breast cancer cells." J Steroid Biochem Mol Biol **76**(1-5): 105-117.
- Narita, M., S. Shimizu, T. Ito, T. Chittenden, R. J. Lutz, H. Matsuda y Y. Tsujimoto (1998). "Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14681-14686.
- Nurse, P. (1990). "Universal control mechanism regulating onset of M-phase." Nature **344**(6266): 503-508.
- Okumura, N., S. Saji, H. Eguchi, S. Hayashi y S. Nakashima (2002). "Estradiol stabilizes p53 protein in breast cancer cell line, MCF-7." Jpn J Cancer Res **93**(8): 867-873.
- Prives, C. y J. L. Manley (2001). "Why is p53 acetylated?" Cell **107**(7): 815-818.
- Sakamuro, D., P. Sabbatini, E. White y G. C. Prendergast (1997). "The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest." Oncogene **15**(8): 887-898.
- Sandow, B. A., N. B. West, R. L. Norman y R. M. Brenner (1979). "Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium." Am J Anat **156**(1): 15-35.
- Sato, T., Y. Fukazawa, H. Kojima, M. Enari, T. Iguchi y Y. Ohta (1997). "Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina." Anat Rec **248**(1): 76-83.
- Spornitz, U. M., B. P. Rinderknecht, A. Edelmann, B. Scheidegger y F. Cairoli (1994). "Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium." Anat Rec **238**(2): 163-176.
- Stommel, J. M., N. D. Marchenko, G. S. Jimenez, U. M. Moll, T. J. Hope y G. M. Wahl (1999). "A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking." EMBO J **18**(6): 1660-1672.
- Taylor, W. R. y G. R. Stark (2001). "Regulation of the G2/M transition by p53." Oncogene **20**(15): 1803-1815.
- Terada, N., R. Yamamoto, T. Takada, T. Miyake, N. Terakawa, H. Wakimoto, H. Taniguchi, W. Li, Y. Kitamura y K. Matsumoto (1989). "Inhibitory effect of progesterone on cell death of mouse uterine epithelium." J Steroid Biochem **33**(6): 1091-1096.
- Vousden, K. H. (2002). "Switching from life to death: the Miz-1 link between Myc and p53." Cancer Cell **2**(5): 351-352.
- Waga S, H. G., Beach D, Stillman B. (1994). "The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA." Nature. **16.369**((6481):): 574-578.
- Wagner, A. J., J. M. Kokontis y N. Hay (1994). "Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1." Genes Dev **8**(23): 2817-2830.

- Walker, K. K. y A. J. Levine (1996). "Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15335-15340.
- Waterman, J. L., J. L. Shenk y T. D. Halazonetis (1995). "The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding." EMBO J **14**(3): 512-519.
- Westwood, F. R. (2008). "The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging." Toxicol Pathol **36**(3): 375-384.
- Wolff, S., S. Erster, G. Palacios y U. M. Moll (2008). "p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity." Cell Res **18**(7): 733-744.
- Wu, X., J. H. Bayle, D. Olson y A. J. Levine (1993). "The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop." Genes Dev **7**(7A): 1126-1132.
- Wu, X. y A. J. Levine (1994). "p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3602-3606.