

**LA RESTAURACIÓN DE LA FUNCIÓN  
DE p53 RETRASA EL PROGRESO DE LA  
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA  
CAUSADA POR p210BCR-ABL  
EN UN MODELO MURINO**



**ibfg**



**Talía Velasco Hernández  
Salamanca, 2011**

**D. ÁNGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI**, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

**CERTIFICA**

Que la memoria titulada “**LA RESTAURACIÓN DE LA FUNCIÓN DE p53 RETRASA EL PROGRESO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA CAUSADA POR p210BCR-ABL EN UN MODELO MURINO**”, presentada por la licenciada **Talía Velasco Hernández** para optar al grado de **Doctora en Biología**, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Dionisio Martín Zanca en el Centro Mixto IBFG, Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Salamanca a 25 de Abril de 2011.

Dr. Ángel Domínguez Olavarri  
Director del Departamento de Microbiología y Genética

**D. DIONISIO MARTÍN ZANCA**, CIENTÍFICO TITULAR DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, DEL CENTRO MIXTO INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA, CSIC/UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

**CERTIFICA**

Que la licenciada **Talía Velasco Hernández** ha realizado en el centro mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica CSIC/Universidad de Salamanca, el trabajo titulado “**LA RESTAURACIÓN DE LA FUNCIÓN DE p53 RETRASA EL PROGRESO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA CAUSADA POR p210BCR-ABL EN UN MODELO MURINO**”, bajo mi dirección para optar al grado de **Doctora en Biología**.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Salamanca a 25 de Abril de 2011.

Dr. Dionisio Martín Zanca  
Director de la Tesis

**D. FERNANDO LEAL SÁNCHEZ**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

**CERTIFICA**

Que la licenciada **Talía Velasco Hernández** ha realizado en el centro mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica CSIC/Universidad de Salamanca, el trabajo titulado "**LA RESTAURACIÓN DE LA FUNCIÓN DE p53 RETRASA EL PROGRESO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA CAUSADA POR p210BCR-ABL EN UN MODELO MURINO**", bajo mi tutoría para optar al grado de **Doctora en Biología**.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Salamanca a 25 de Abril de 2011.

Dr. Fernando Leal Sánchez  
Tutor de la Tesis

La investigación en nuestro laboratorio ha estado financiada por proyectos del Instituto de Salud Carlos III, referencias PI04/1418 y PI08/2025.

Durante la realización de mi trabajo doctoral he disfrutado de una beca del Programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (Gobierno de España) referencia AP2005-4392.



INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA  
CSIC/UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

---

**LA RESTAURACIÓN DE LA FUNCIÓN  
DE p53 RETRASA EL PROGRESO DE LA  
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA  
CAUSADA POR p210BCR-ABL EN UN  
MODELO MURINO**

**TALÍA VELASCO HERNÁNDEZ  
SALAMANCA, 2011**

Todo proyecto de investigación es más un trabajo en equipo que una labor individual. La cooperación de numerosas personas que aportan desde conocimiento, labor manual hasta material imprescindible para los experimentos es necesaria para la realización de cualquier trabajo de investigación. Es por ello que quiero manifestar mi agradecimiento a todas las personas que de uno u otro modo han colaborado en este proyecto.

Principalmente quiero agradecer al Dr. Dionisio Martín Zanca el haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la ciencia bajo su tutela. A su lado he aprendido a diseñar experimentos desde la base, a interpretar resultados y a tener la paciencia suficiente para no confiar en ellos hasta haberlos desmenuzado desde todos los ángulos posibles.

Quiero agradecer muy especialmente a la Dr. Laura Andrés Martín por enseñarme a dar mis primeros pasos en un laboratorio y transmitirme toda su experiencia, siempre con una sonrisa.

El desarrollo de este trabajo no hubiera sido posible sin el ratón Sca1-BCR-ABLp210 cedido por el Dr. Isidro Sánchez García, cuyo asesoramiento, discusión de los datos y aportación de material también han sido fundamentales para la realización de este trabajo. Asimismo quiero destacar el asesoramiento científico y técnico del Dr. César Cobaleda Hernández, del Dr. Jesús Pérez Losada y del Dr. Andrés Castellanos Martín.

No puedo olvidarme de la Dr. Carolina Vicente Dueñas, quien no sólo me ha enseñado desde diseccionar un ratón hasta interpretar los resultados de citometría, sino que también se ha encargado del análisis anatómico-patológico de las muestras de los ratones usados en este trabajo junto a la Dr. Teresa Flores. Esto no hubiera sido posible sin la labor de Esther Alonso quien se encargó del corte y tinción de los tejidos recogidos para su posterior análisis.

Quiero mencionar también a todas las personas cuyo trabajo rutinario e invisible han servido para llevar a cabo este trabajo, especialmente al Servicio de Experimentación Animal y al Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca.

No puedo dejar de nombrar a mis compañeros, que han sido los que han vivido día a día todo el proceso de realización de esta memoria, cuyos consejos en los momentos críticos así como su apoyo han sido para mí fundamentales. Entre ellos quiero mencionar a aquellos con los que empecé y a aquellos con los que ahora acabo: Alberto Gómez, Sergio Rincón, Toñi Villar, Mario Pinar, Pedro Coll, Raúl Alonso, Elvira Portales, Inmaculada Castro, Laura Parrilla, Miguel Estravís, Fernando Abollo, Inés González, Isabel Romero, María del Mar Sáez, Lourdes Hontecillas y muy especialmente a María Salgado.

Esta tesis está dedicada a Paula Velasco, Agustina Hernández y Juan Manuel Velasco, a quienes les debo ser quien soy y hacer lo que hago.

*A Paula, Agustina y Juan Manuel*

*"El laberinto es un temor y una esperanza.  
Es un temor porque estamos perdidos, pero hay una esperanza  
de que tenga un centro, que tenga un plano, que tenga una arquitectura".*

*J. L. Borges*

# ÍNDICE

---

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1. LA PROTEÍNA p53.....	9
1.1. El descubrimiento de p53	
1.2. Estructura de p53	
1.3. Activación de p53	
1.4. Regulación de p53	
1.5. Funciones celulares de p53	
1.6. Modelos de estudio	
1.7. El modelo p53ERTAM <sup>KI</sup>	
2. CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS (HSCs) Y CÁNCER.....	27
2.1. Células madre hematopoyéticas (HSCs)	
2.2. Hipótesis de las <i>Cancer Stem Cells</i> (CSCs)	
2.3. ¿Existen realmente las CSCs?	
3. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.....	32
3.1. Etiología de la enfermedad	
3.2. Fases clínicas de la enfermedad	
3.3. Otras alteraciones genéticas	
3.4. Terapia de la LMC	
3.5. Modelos de estudio de LMC	
3.6. El modelo Sca1-BCR-ABLp210	
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
1. GENERACIÓN DE UNA COLONIA DE RATONES p53ERTAM <sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210.....	51

2. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DE LA COLONIA p53ERTAM <sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210.....	51
2.1. El análisis macroscópico de los tejidos muestra el desarrollo de esplenomegalia, hepatomegalia, hidronefrosis, inflamación de los ganglios linfáticos e hiperplasia del timo.	
2.2. El estudio anatómico-patológico de los tejidos muestra una gran infiltración de células hematológicas, en diferentes grados de diferenciación, en su mayoría de linaje mielóide, principalmente en hígado, bazo, pulmón y riñón.	
2.3. El análisis por citometría de flujo revela un aumento de la población mielóide en sangre periférica en los animales p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL adelantado con respecto al experimentado por los animales p53 <sup>+/+</sup> ;p210BCR-ABL.	
2.4. El análisis por citometría de flujo de médula ósea y bazo muestra un aumento de la población mielóide madura en estos tejidos.	
3. SUPERVIVENCIA DE LOS RATONES DE LA COLONIA p53ERTAM <sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210.....	68
3.1. Existe una cooperación entre la expresión del oncogén p210BCR-ABL y la falta de función de p53 que se manifiesta en un aumento de la velocidad de progresión de la enfermedad desarrollada por los individuos de la colonia p53ERTAM <sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210.	
3.2. La restauración transitoria de la funcionalidad de p53, en etapas iniciales de la enfermedad, frena la progresión de la leucemia.	
4. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA RESTAURACIÓN DE p53 SOBRE EL FENOTIPO TUMORAL.....	73
4.1. El fenotipo tumoral no varía al tratar con tamoxifén a los ratones p53ERTAM <sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210.	
4.2. El tratamiento no causa un efecto significativo sobre las poblaciones celulares de sangre periférica de animales enfermos.	
4.3. El tratamiento con tamoxifén no parece ejercer un efecto drástico en la invasión de los órganos periféricos.	
4.4. La restauración de p53 no desencadena senescencia celular para frenar el avance de la LMC en este modelo.	
4.5. La restauración de p53 podría estar induciendo apoptosis para ralentizar la progresión de la LMC.	

5. EFECTO DE LA RESTAURACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE p53 SOBRE LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN ENSAYOS <i>in vitro</i> .....	94
5.1. La restauración de p53 reduce el número de colonias derivadas de células hematopoyéticas de animales enfermos.	
5.2. El tratamiento con 4-OHT disminuye el número de colonias CFU-G.	
5.3. El tratamiento con 4-OHT no desencadena apoptosis en las células hematopoyéticas supervivientes.	
5.4. El tratamiento con 4-OHT restaura la funcionalidad de la proteína p53.	
6. RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE LA RESTAURACIÓN DE p53 EN POBLACIONES CELULARES DETERMINADAS.....	106
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>109</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>119</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>123</b>
1. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	125
1.1. Ratones modelo usados en este trabajo	
1.2. Identificación de los animales enfermos	
1.3. Tratamiento de los ratones	
1.4. Recogida de tejidos	
- Preparación de los cortes histológicos para su estudio anatomopatológico	
- Preparación de los cortes histológicos para el análisis de senescencia	
1.5. Frotis	
2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	129
2.1. Extracción de ADN genómico	
2.2. Genotipado	
-PCR: Amplificación del gen p53	
-Southern blot: Identificación del transgén BCR-ABL y de los alelos de p53	
2.3. Extracción de ARN	
2.4. PCR cuantitativa	
2.5. Western blot	
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	140
3.1. Citometría de flujo o FACS	
- Recuento de poblaciones leucocitarias	
- Tinción anexina V - yoduro de propidio	
- Aislamiento y purificación de poblaciones celulares ( <i>sorting</i> )	

- 3.2. Identificación de células senescentes: tinción  $\beta$  galactosidasa
- 3.3. Ensayo de formación de colonias hematopoyéticas

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....149

## **ANEXOS.....151**

**Anexo 1.** Ratones sacrificados en avanzado estado de la enfermedad usados para la caracterización del fenotipo de la colonia p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210.

**Anexo 2.** Ratones sacrificados en avanzado estado de la enfermedad tras haber sido tratados con tamoxifén utilizados para estudiar si el fenotipo variaba con el tratamiento.

**Anexo 3.** Tamaño (en %) de las poblaciones celulares mieloides de sangre periférica de ratones de 4 meses de edad antes y después del tratamiento con tamoxifén.

**Anexo 4.** Tamaño (en %) de las poblaciones celulares hematológicas de sangre periférica, médula ósea y bazo de ratones enfermos p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL después del tratamiento con tamoxifén o con aceite.

**Anexo 5.** Valores de las poblaciones celulares hematológicas obtenidos por HEMAVET<sup>®</sup> en ratones sanos.

**Anexo 6.** Valores de las poblaciones hematológicas de ratones sanos obtenidas con HEMAVET<sup>®</sup> en dos recuentos separados por un intervalo de 15 días.

**Anexo 7.** Valores de las poblaciones hematológicas de ratones enfermos p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL tratados con tamoxifén o aceite obtenidas con HEMAVET<sup>®</sup> antes y después del tratamiento (intervalo de 15 días).

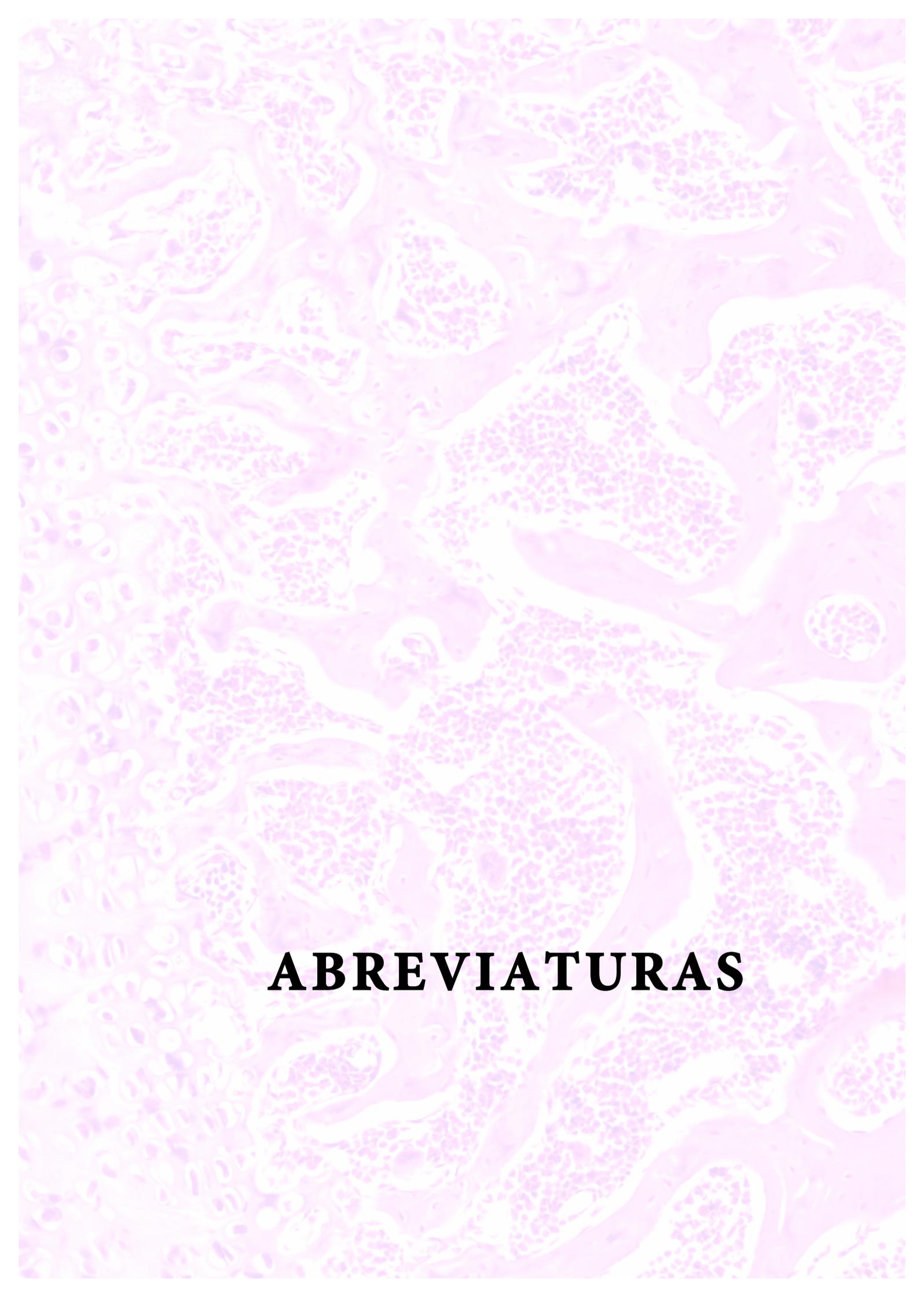
**Anexo 8.** Ratones utilizados para la determinación del mecanismo de actuación de p53 en la ralentización del progreso de la LMC.

**Anexo 9.** Resultados obtenidos por citometría de flujo tras el marcaje de suspensiones celulares de sangre, timo, bazo y médula ósea con anexina V, IP, anti-Sca1 y anticuerpos anti-linaje.

**Anexo 10.** Ratones utilizados para la purificación las poblaciones celulares Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup> y Sca1<sup>-</sup>Lin<sup>+</sup> para su análisis mediante PCR cuantitativa.

**Anexo 11.** Resultados del ensayo de PCR cuantitativa.

## **BIBLIOGRAFÍA.....177**

The background of the page is a dense, repeating pattern of microscopic tissue sections, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows various cellular structures, including nuclei stained in shades of purple and pink, and surrounding connective tissue. The overall appearance is that of a histological slide, with the text overlaid on a semi-transparent white rectangular area.

# **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

---

4-OHT:	4-hidroxitamoxifén
5-FU:	5-Fluouracilo
A:	Aceite
ADN:	Ácido Desoxiribonucleico
ADP:	Adenosina difosfato
AnV:	Anexina V
AP:	<i>Alcaline Phosphatase</i>
APC:	Aloficocianina
ARN:	Ácido Ribonucleico
B:	Bazo
B-ALL:	Leucemia Linfoblástica Aguda de células B
BA:	Basófilos
BFU-E:	Unidad formadora de colonias de eritrocitos
BSA:	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C:	Corazón
cADN:	ADN complementario
cADPR:	ADP Ribosa cíclica
CB:	Crisis Blástica
CCD:	<i>Charge Coupled Device</i>
CFCs:	Células formadoras de colonias
CFU-G:	Unidad formadora de colonias de granulocitos
CFU-GM:	Unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos
CFU-M:	Unidad formadora de colonias de macrófagos
Ci:	Curios
CIA:	Cloroformo-Isoamiloalcohol
CIC:	Centro de Investigación del Cáncer (de Salamanca)
CLPs:	Progenitores Comprometidos Linfoides
CMPs:	Progenitores Comprometidos Mieloides
COND:	Condicional
CSCs:	<i>Cancer Stem Cells</i>
CSIC:	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CT:	Control tratado con tamoxifén
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DFSP:	Dermatofibrosarcoma protuberante
dH <sub>2</sub> O:	Agua destilada
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF:	Dimetilformamida
DMSO:	Dimetil sulfóxido
dNTPs:	Deoxinucleótidos Trifosfato
DTT:	Ditiotritol
dUTP:	2'-Deoxyuridina, 5'-Trifosfato

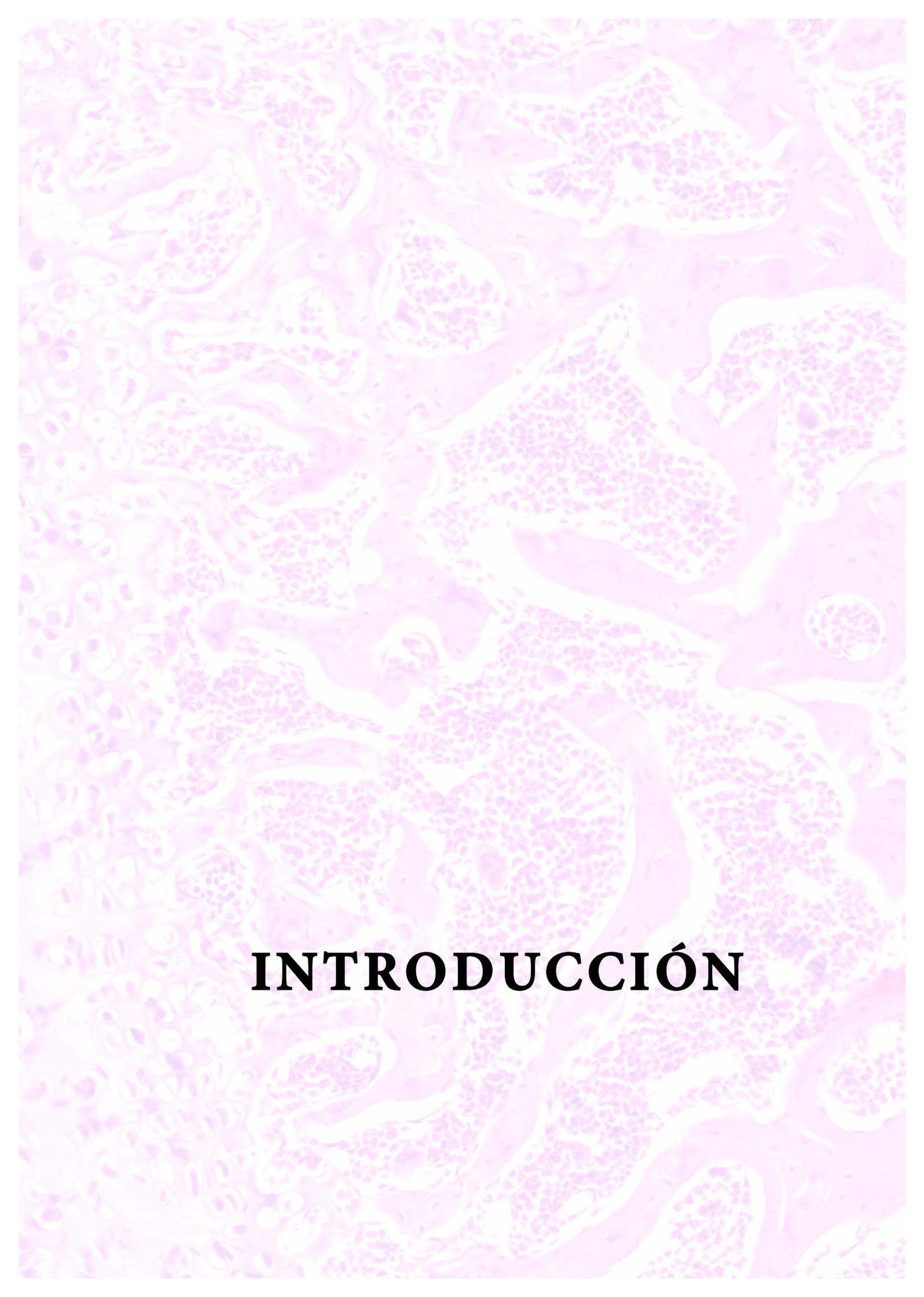
## Abreviaturas

EDTA:	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
EO:	Eosinófilos
EPO:	Eritropoyetina
ER:	Receptor de Estrógenos
ErPs:	Precursores de Eritrocitos
ES:	<i>Embryonic Stem</i>
EtOH:	Etanol
FACS:	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FC:	Fase Crónica
FISH:	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FITC:	Fluoresceína Isotiocianato
FN:	Fecha de Nacimiento
FSC:	<i>Forward Scattered</i>
G:	Ganglio
GAP:	<i>GTPase Activating Protein</i>
GDP:	Guanidina Difosfato
GIST:	Tumor Estromal Gastrointestinal
GMPs:	Precursores de Granulocitos y Macrófagos
GTP:	Guanidina Trifosfato
H:	Hígado
h:	horas
HSCs:	<i>Hematopoietic Stem Cells</i>
I:	Intestino
IL-3:	Interleuquina 3
IL-6:	Interleuquina 6
INF:	Infiltrado
IP:	Ioduro de Propidio
Iscove's MDM:	<i>Iscove's modified DMEM medium</i>
kDa:	kilodalton
KI:	<i>Knock In</i>
KO:	<i>Knock Out</i>
LB:	Luria-Bertani
Lin:	Linaje
lincARNs:	<i>Large intervening non-coding RNAs</i>
LMC:	Leucemia Mieloide Crónica
LOH:	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
LSL:	LoxP-STOP-LoxP
LT-HSCs:	<i>Long-Term Hematopoietic Stem Cells</i>
LY:	Linfocitos
mARN:	ARN mensajero
MC:	Metilcelulosa
MEF:	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
MEPs:	Precursores de Eritrocitos y Megacariocitos
miARN:	microARN
min:	minutos
MkPs:	Precursores de Megacariocitos
MMTV:	<i>Mouse Mammary Tumour Virus</i>
MO:	Médula Ósea
MO:	Monocitos

MOPS:	Ácido 3-(N-morfolino) propanesulfónico
MPD:	Desorden Mieloproliferativo
MT:	Metalotioneína
Mut:	Mutante
NAD:	Nicotinamida adenina dinucleótido
NE:	Neutrófilos
NKs:	<i>Natural Killers</i>
ns:	no significativo
NSCLC:	<i>Non-Small-Cell-Lung Carcinoma</i>
OCT:	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
P:	Pulmón
Pa:	Páncreas
pb:	pares de bases
PBS:	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR:	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PE:	<i>Phycoerythrin</i>
Ph:	Cromosoma de Philadelphia
PNSTs:	<i>Peripheral Nerve Sheath Tumors</i>
PRs:	Proteínas Ribosomales
PTPs:	<i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>
qPCR:	PCR cuantitativa
QUIM:	Quimérico
R:	Riñón
rARN:	ARN ribosómico
RB:	Retinoblastoma
RCLB:	<i>Red Cell Lysis Buffer</i>
rh:	<i>recombinant human</i>
rm:	<i>recombinant mouse</i>
rpm:	revoluciones por minuto
RPMI:	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT:	Retrotranscriptasa
SA-β-Gal:	β galactosidasa asociada a senescencia
Sca1:	<i>Stem cell antigen 1</i>
SCF:	<i>Stem Cell Factor</i>
SDS:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEA:	Servicio de Experimentación Animal (Universidad de Salamanca)
seg:	segundo
shRNA:	<i>short hairpin RNA</i>
SP:	Sangre Periférica
ssADN:	<i>salmon sperm DNA</i>
SSC:	<i>Side Scattered</i>
ST-HSTs:	<i>Short-Term Hematopoyetic Stem Cells</i>
T:	Timo
TAE:	Tris-Acetato-EDTA
TAM:	Tamoxifén
TBST:	<i>Tris Buffer Saline Tween20</i>
TE:	Tris EDTA
TG:	Transgénico
Tm:	Temperatura de <i>melting</i>
TMTC:	<i>Too many to count</i>

## Abreviaturas

tTA:	Transactivador regulable por tetraciclina
TX:	Tamoxifén
UV:	Ultravioleta
V:	voltios
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
W:	watios
WBCs:	<i>White Blood Cells</i>
WHO:	<i>World Health Organization</i>
wt:	<i>wild type</i>

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing various cellular structures and patterns. The image is overlaid with a semi-transparent purple color. The text "INTRODUCCIÓN" is centered at the bottom of the image.

# **INTRODUCCIÓN**

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. LA PROTEÍNA p53

Tras su descubrimiento, la proteína p53 se ha proclamado como uno de las proteínas supresoras clave en el control de las respuestas celulares frente a diversos tipos de estrés. A través de sus vías de señalización, que pueden desencadenar parada del ciclo celular, reparación del ADN, senescencia celular, diferenciación y apoptosis, p53 facilita la reparación y supervivencia de las células dañadas o la eliminación de las gravemente afectadas protegiendo así al organismo. Debido a las múltiples funciones de p53, que pueden perderse por mutaciones en el gen codificante (*TP53* o *Trp53* en su versión murina), esta molécula continúa siendo intensamente estudiada en la investigación biomédica.

### 1.1. El descubrimiento de p53

La proteína p53 fue identificada por primera vez en 1979 debido a su acumulación en células transformadas por el virus SV-40, donde se encontraba asociada al antígeno T grande de este virus (Lane & Crawford, 1979). Sin embargo, fueron hallados altos niveles de la proteína p53 en una gran variedad de líneas celulares tumorales, incluso en líneas no infectadas por virus y más tarde en tumores primarios humanos (Linzer *et al*, 1979; Kress *et al*, 1979; Melero *et al*, 1979; Smith *et al*, 1979; DeLeo *et al*, 1979). El gen codificante de p53 (*TP53*) fue clonado de líneas celulares tumorales en las que la proteína p53 era muy abundante, y se encontró que ésta tenía cierta actividad oncogénica en la transformación de fibroblastos al cooperar con la expresión de *HRAS* (Eliyahu *et al*, 1984; Jenkins *et al*, 1984; Parada *et al*, 1984). Así, fue considerado inicialmente como un oncogén dominante.

Tuvieron que pasar varios años antes de que la comunidad científica reconociera a *TP53* como un gen supresor tumoral. De hecho, ya existían muchas pistas acerca de esta función. El primer indicio fue descubierto por Wolf y Rotter, que en 1984 vieron que *Trp53* estaba inactivado por inserción del virus de la leucemia murina Abelson en líneas de ratón transformadas (Wolf & Rotter, 1984). Observaciones similares fueron realizadas en otros laboratorios (Ben David *et al*, 1988; Mowat *et al*, 1985).

Sin embargo, fue a finales de los años 80 cuando se cambió definitivamente la visión sobre p53. En esta época se descubrió que los trabajos previos con los que se había demostrado la función transformante de p53 habían sido realizados con formas mutantes del gen *TP53* en vez de con el gen

normal (wt). Esto quedó claramente demostrado cuando finalmente se consiguió clonar el gen *Trp53* wt derivado de tejido normal de ratón (Eliyahu *et al*, 1988; Finlay *et al*, 1988). Las mutaciones encontradas en el cADN de los clones mutantes resultaron ser la clave para el descubrimiento de la actividad biológica de p53. La capacidad de p53 de formar tetrámeros permite a su forma mutante comportarse de manera dominante-negativa, es decir, las formas mutantes de p53 anulan la actividad de las formas normales que coexisten en la célula (Brosh & Rotter, 2009). De hecho muchos virus oncogénicos humanos han evolucionado adquiriendo un mecanismo para inactivar las funciones de p53 mediante la unión de diferentes proteínas víricas a p53, como la proteína E1B de los adenovirus o la E6 del papilomavirus, contribuyendo así a la transformación celular vírica. Pronto empezó a observarse que las células tumorales no retenían la funcionalidad normal de p53. Vogelstein y colaboradores observaron que la función del gen *TP53* estaba frecuentemente perdida por deleciones, mutaciones o una combinación de ambas, en tumores colorrectales humanos (Baker *et al*, 1989). Esta característica es una de las que definen a un gen supresor tumoral. Estas observaciones junto con la pérdida de p53 en líneas tumorales humanas y murinas, las investigaciones con los pacientes con el síndrome de Li-Fraumeni (ver más adelante) y el estudio con los ratones *p53 knock out* (ver más adelante) definieron inequívocamente a *TP53* como un supresor tumoral.

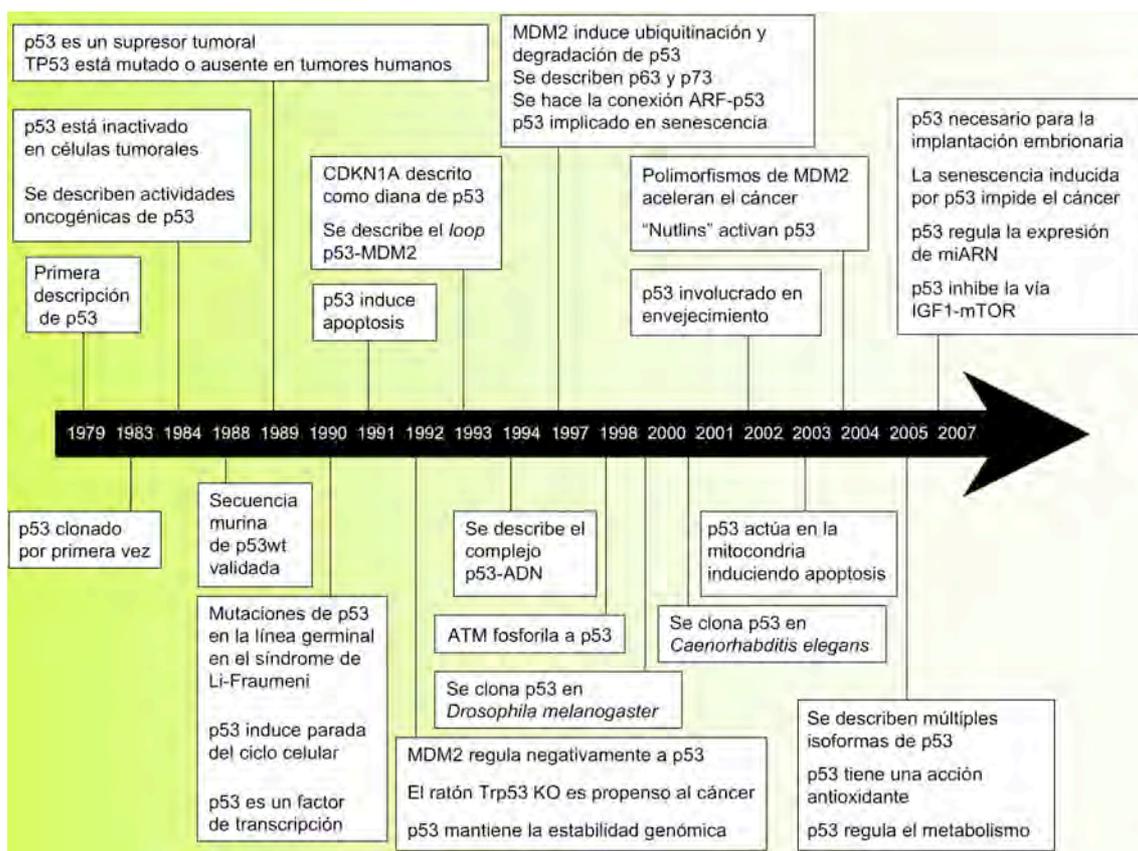
En efecto, el gen *TP53*, el cual ha recibido el seudónimo de “guardián del genoma”, impide a las células entrar o progresar a través del ciclo celular bajo condiciones que podrían generar o perpetuar daño en el ADN. Puesto que con la activación-desactivación de p53 se toman decisiones de vida o muerte, un mecanismo de control muy refinado ha evolucionado para impedir su activación errática y al mismo tiempo posibilitar respuestas rápidas frente a distintos tipos de estrés celular (Toledo *et al*, 2006).

El gen *TP53* se encuentra inactivado en más del 50% de los tumores humanos de todo tipo (más de 50 tipos diferentes de tumores contienen mutaciones en p53). Más aún, muchos tumores con *TP53* intacto poseen mutaciones o amplificaciones de distintos componentes de la ruta de p53, incluyendo tanto elementos reguladores de p53, como ARF o MDM2, así como dianas de p53, como BAX y APAF-1 (Olivier *et al*, 2010).

Era de esperar que mutaciones de este gen en la línea germinal dieran lugar a individuos con una alta predisposición a la aparición de tumores. Efectivamente, existe una enfermedad hereditaria, denominada síndrome de Li-Fraumeni, en la que los afectados heredan un alelo de *TP53* mutado. Este síndrome se caracteriza por la alta susceptibilidad de los pacientes que lo padecen a desarrollar muchos tipos de tumores, incluyendo carcinomas de mama, osteosarcomas, sarcomas de tejidos blandos y meduloblastomas, principalmente. La aparición de tumores en estos pacientes va acompañada frecuentemente de la pérdida del alelo normal de *TP53* (LOH) (Malkin *et al*, 1990).

La proteína p53 tiene múltiples funciones, muchas de las cuales se deben a su actividad como factor de transcripción. Primero se descubrió su implicación en la regulación del ciclo celular y la apoptosis y más tarde en el desarrollo, diferenciación, fertilidad, amplificación de genes, recombinación del ADN, segregación cromosómica y senescencia celular (Brady & Attardi, 2010). A mediados-finales de los años 90 se descubrió que las formas normales de p53 facilitaban la reparación del ADN incluyendo la reparación por excisión de nucleótido y la reparación por excisión de base. Más recientemente se ha visto también una cierta relación entre p53 y envejecimiento. Algunos modelos de ratón con una actividad incrementada de p53 poseen una resistencia a la aparición de tumores que no poseen sus hermanos con unos niveles normales de p53. Interesantemente este fenotipo de resistencia a cáncer va acompañado a veces de un envejecimiento acelerado o retrasado y un tiempo de supervivencia alterado dependiendo del modelo particular (Tyner *et al*, 2002; Maier *et al*, 2004; Garcia-Cao *et al*, 2002; Matheu *et al*, 2007; Tomas-Loba *et al*, 2008).

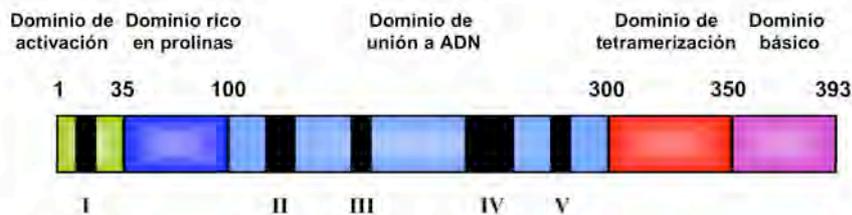
Hoy en día el gen p53 es considerado el principal gen supresor tumoral existente en las células y junto con su proteína, se han convertido en iconos de moda en la investigación biomédica.



**Figura 1. Cronología de los descubrimientos en torno a p53.** ATM: ataxia-telangiectasia mutada, IGF1: *insulin-like growth factor 1*, miARN: microARN. Adaptado de Levine & Oren, 2009.

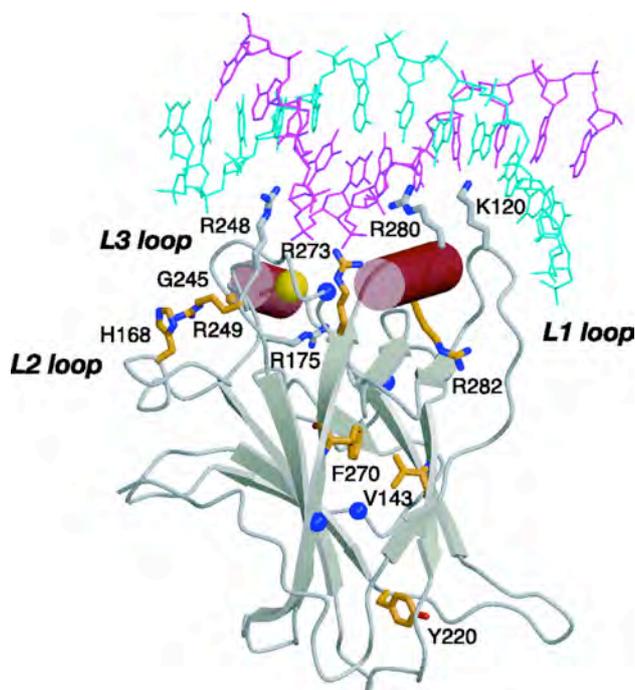
## 1.2. Estructura de p53

El gen codificante de p53 (*TP53*, *Trp53*), localizado en ratón en el cromosoma 11 y en 17p13 en humanos, está estructuralmente conservado y se compone de 11 exones (Bienz *et al*, 1984). La proteína p53 está conservada entre especies y contiene 5 regiones altamente conservadas (I a V) y varios dominios funcionales, incluyendo un dominio de activación de la transcripción en el extremo amino, seguido de una región rica en prolina (dominio de unión a SH3), un dominio hidrofóbico de unión al ADN, un dominio de tetramerización y un dominio básico regulatorio en el extremo carboxilo que incluye señales de localización nuclear y de exportación nuclear (Figura 2) (Ryan *et al*, 2001).



**Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la proteína p53.** En humanos, p53 está compuesto por 393 aminoácidos. La proteína p53 contiene 5 regiones altamente conservadas (I a V) y 5 dominios con funciones diferentes. Sin embargo, hay funciones interdependientes y la regulación de un dominio puede influir profundamente sobre otros. Adaptado de Prives & Hall, 1999.

El nombre de p53 hace referencia a su peso molecular, estimado en 53 kDa según su migración en geles de SDS-poliacrilamida. Sin embargo, como se vio posteriormente, este peso está sobreestimado debido a la región rica en prolina, la cual ralentiza la migración de la proteína en estos geles. Su peso molecular real es de 43,7 kDa, e incluso algo menor en su versión murina.



**Figura 3. Estructura del dominio de unión al ADN de p53 unido a la secuencia consenso de ADN.** Las dos hebras del ADN se muestran en azul y magenta. Como una esfera amarilla se muestra el ión de zinc imprescindible en esta unión. En naranja se muestran residuos cuyas mutaciones son oncogénicas. Adaptado de Joerger *et al*, 2006.

La proteína p53 interacciona con cientos de proteínas celulares y está sujeta a modificaciones post-traduccionales incluyendo fosforilación, acetilación y sumoilación. Estas modificaciones regulan las interacciones proteína-proteína, la unión al ADN, la estabilidad y las funciones bioquímicas de p53.

p53 es un factor de transcripción específico de secuencia que puede activar o reprimir la expresión de genes. La mayoría de sus funciones biológicas están mediadas por esta actividad bioquímica; de hecho, las mutaciones de p53 asociadas a cáncer son principalmente mutaciones puntuales *missense* localizadas entre los exones 5 y 8 que modifican el dominio de unión al ADN y reducen la transcripción dependiente de p53. Esto sugiere que la propiedad de supresor tumoral de p53 está mediada por su capacidad de regular la transcripción de diferentes genes. Sin embargo, se han descrito algunas funciones de p53 independientes de transcripción. Entre estas se encuentran: el tráfico a la superficie celular del receptor FAS (Bennett *et al*, 1998), una señalización directa en la mitocondria (Marchenko *et al*, 2000), la unión y regulación de la traducción de mARNs específicos (Miller *et al*, 2000), la estabilización del ARN mensajero de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (Gorospe *et al*, 1998), la recombinación homóloga del ADN (Saintigny *et al*, 1999) y la autofagia (Tasdemir *et al*, 2008).

### 1.3. Activación de p53

La ruta de señalización de p53 se encuentra normalmente atenuada y se activa únicamente cuando la célula detecta algún tipo de estrés o daño. Las células dañadas suponen una amenaza para el organismo ya que son más susceptibles de contener mutaciones y desregular el ciclo celular que las células sanas, y por tanto, presentan una mayor probabilidad de convertirse en células cancerosas. La proteína p53 se encarga de reducir la multiplicación y expansión de las células estresadas, inhibiendo su progresión a través del ciclo celular. En muchos casos, esto conlleva al desencadenamiento de la muerte programada de la célula o apoptosis en un intento de contener el daño y proteger al organismo. Por todo esto, la proteína p53 proporciona un freno crítico en el desarrollo de los tumores, explicando así por qué está mutada, y por tanto inactivada, tan frecuentemente en los cánceres (Vogelstein *et al*, 2000).

Existen al menos tres rutas independientes de activación de la proteína p53:

Uno de los principales desencadenantes de la activación de p53 es el daño en el ADN, por ejemplo el causado por la radiación ionizante. Una simple rotura en una molécula de ADN puede ser suficiente para poner en marcha la ruta de activación de p53. La activación de esta ruta depende principalmente de dos quinasas: ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) y Chk2. ATM es activada por las roturas de doble hebra del ADN y Chk2 es activada por ATM.

La segunda ruta de activación de p53 se desencadena por señales de crecimiento aberrantes, como las resultantes de la expresión de oncogenes como Ras o Myc. En este caso la vía de señalización depende, en humanos, de la proteína ARF.

La tercera cascada de señalización hacia p53 está inducida por un amplio espectro de sustancias quimioterapéuticas, la luz ultravioleta e inhibidores de las proteín-quinasas. Esta ruta se diferencia de las demás porque no depende de ATM, Chk2 o ARF y puede implicar a dos quinasas llamadas ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) y CK-2 (caseína quinasa II).

Estas tres vías de señalización inhiben la degradación de p53, estabilizándola así a altas concentraciones. El aumento de la concentración de p53 permite a la proteína ejercer su principal función: unirse a secuencias concretas del ADN y activar la transcripción génica (Vogelstein *et al*, 2000).

## 1.4. Regulación de p53

Los niveles de p53 están regulados a nivel transcripcional y a nivel traduccional, siendo la regulación post-traduccional, tanto a nivel de estabilidad como de localización subcelular, el principal mecanismo de control.

Existen varias E3 ubiquitín ligasas que regulan negativamente a p53 manteniendo sus niveles bajos cuando la actividad de p53 no es necesaria. Entre estas ubiquitín ligasas se encuentran PIRH2, COP1, ARF-BP1 y MDM2, siendo ésta última el principal regulador de la estabilidad de p53 (Brooks & Gu, 2006). La proteína MDM2 se une al dominio de activación de la transcripción de p53 y no sólo regula la estabilidad de p53, promoviendo su ubiquitinación y degradación por la vía del proteasoma, sino que también bloquea su función de transactivación impidiendo el reclutamiento de componentes esenciales de la maquinaria transcripcional. La transcripción de *MDM2* está activada por p53 formando así un ciclo regulatorio de manera que, cuando los niveles de p53 aumentan, se activa la transcripción de *MDM2* aumentando también sus niveles y degradando a p53. Los niveles de p53 disminuirán y de la misma manera lo harán los de MDM2, permitiendo de nuevo la acumulación de p53 e iniciando de nuevo el ciclo (Kubbutat *et al*, 1997; Brady & Atardi, 2010).

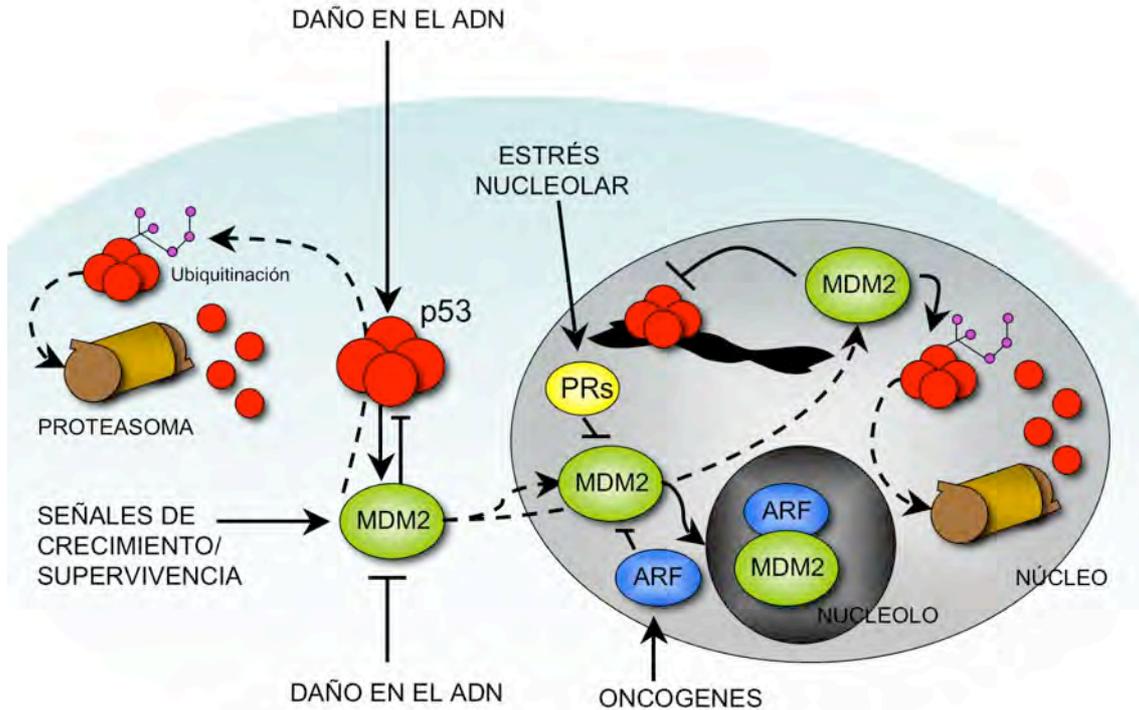
En respuesta a señales de estrés, p53 es activada por la inhibición de MDM2 a través de varios mecanismos (Marine *et al*, 2006; Wade *et al*, 2010):

- Modificaciones post-traduccionales de p53 y MDM2, las cuales rompen la interacción p53-MDM2.

- Los estímulos oncogénicos que promueven el secuestro en el nucleolo de MDM2 por la proteína supresora tumoral ARF.

- El estrés nucleolar que promueve la unión de proteínas ribosomales con MDM2, lo que inhibe la ubiquitinación de p53 mediada por MDM2 (Zhang & Lu, 2009).

El principal papel de MDM2 *in vivo* es regular negativamente a p53, así los ratones nulos para *Mdm2* no son viables debido al exceso de apoptosis dependiente de p53 que presentan, siendo su letalidad rescatada por la inactivación de p53 (Jones *et al*, 1995; Montes de Oca Luna *et al*, 1995).



**Figura 4. Regulación de p53 por MDM2.** p53 y MDM2 forman un ciclo autorregulatorio en el que p53 estimula la expresión de MDM2, mientras que MDM2 inhibe la actividad de p53. MDM2 estimula la degradación de p53 tanto en el núcleo como en el citoplasma, bloquea su actividad transcripcional y promueve su exportación nuclear. Un gran abanico de estímulos nocivos para el ADN o de oncogenes desregulados inducen la activación de p53. El daño en el ADN promueve la fosforilación de p53 y de MDM2, impidiendo así su interacción, y estabilizando a p53. De forma similar, la activación oncogénica induce la expresión de la proteína ARF, la cual secuestra a MDM2 en el nucleolo, impidiendo así la degradación de p53. La interacción de MDM2 con p53 también puede impedirse por la acción de las proteínas ribosomales (PRs) activadas por estrés nucleolar. De forma contraria, las señales de supervivencia promueven la importación nuclear de MDM2, favoreciendo la desestabilización de p53. Adaptado de Moll *et al*, 2003.

La proteína MDMX (también conocida como MDM4) es un miembro de la familia de MDM2 que carece de actividad E3-ligasa pero es un elemento clave en la regulación de la actividad transcripcional de p53, tanto mediante su unión al dominio de activación de la transcripción de p53 como regulando a MDM2 (Wade *et al*, 2010; Brady & Attardi, 2010). MDMX puede interaccionar con MDM2 aumentando la estabilización de MDM2 y promoviendo la degradación de p53, pero todavía se desconocen todas las implicaciones de la interacción MDMX-MDM2 (Wade *et al*, 2010). La dimerización de MDM2 con MDMX puede aumentar la actividad E3-ubiquitin-ligasa de MDM2 (Linke *et al*, 2008). Para complicar más la situación, p53, MDM2 y MDMX pueden ser desubiquitinizadas y estabilizadas por enzimas como HAUSP y defosforiladas por fosfatasas inducidas por p53 como WIP1, lo cual facilita la degradación de p53 mediada por MDM2 y MDMX (Kruse & Gu, 2009; Wade *et al*, 2010).

## 1.5. Funciones celulares de p53

p53 tiene dos principales actividades biológicas a nivel celular:

-p53 bloquea la progresión del ciclo celular en los *checkpoints* de G1 y G2-M en respuesta a estrés, como el daño en el ADN. Esta actividad parece estar mediada principalmente por la inducción del inhibidor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (el-Deiry *et al*, 1993). Otras proteínas reguladoras del ciclo inducidas por p53 son GADD45, 14-3-3 $\alpha$  y REPRIMO. También existen ejemplos de proteínas reguladoras del ciclo inhibidas por p53: CDC2 y la ciclina B (Vogelstein *et al*, 2000). En otros casos p53 responde frente a un estrés agudo induciendo senescencia celular a través de la activación de la transcripción de genes como p21, *PAIL* y *PML* (Riley *et al*, 2008).

-p53 desencadena la apoptosis en respuesta a daño en el ADN, hipoxia y activación oncogénica. p53 participa en el desencadenamiento de la apoptosis actuando tanto a nivel mitocondrial como nuclear. Proteínas como BAX, p53AIP1, NOXA, PUMA y APAF-1 son inducidas por p53. La proteína p53 también promueve la expresión de genes que codifican receptores de muerte como FAS, KILLER/DR5 y proteínas como PIDD que también codifican dominios de muerte. Finalmente p53 estimula la expresión de IGF-BP3, un inhibidor del factor de supervivencia IGF-1; de PERP, que codifica una proteína localizada en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi; y un número de genes denominados PIGs con un papel importante en respuesta al estrés oxidativo (Ryan *et al*, 2001).

Además, p53 puede inducir apoptosis actuando directamente sobre la mitocondria, causando la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP) y la liberación del citocromo c (Vaseva & Moll, 2009). La permeabilización de la membrana externa de la mitocondria está promovida por la interacción de p53 con los reguladores de la apoptosis de la familia BCL-2. Esta familia se compone de tres categorías de proteínas: los efectores proapoptóticos BAX y BAK que pueden oligomerizarse y crear poros en la membrana externa mitocondrial, las proteínas BH3-only (BCL-2 *homology region 3*), y las proteínas antiapoptóticas que se unen a BAX y BAK para impedir su oligomerización, como BCL-2, BCL-X<sub>L</sub> y MCL-1 (Vaseva & Moll, 2009).

Además de estas dos funciones principales la proteína p53 está implicada en otros muchos procesos.

p53 participa en la reparación del ADN induciendo la expresión del gen de la reductasa ribonucleotídica p53R2 y bloquea la formación de vasos estimulando la expresión de inhibidores de la angiogénesis como la trombospondina (TSP1) y BAI1, además de inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis estimulando la señalización del compartimento fibroblástico de los tumores (Bar *et al*, 2009). Otro mecanismo protector de p53 es su capacidad de aumentar la expresión de genes antioxidantes como *SESNI* y *SESN2*, *GPX1* y

*TIGAR*, los cuales impiden la acumulación de especies reactivas de oxígeno, manteniendo así la integridad genómica (Liu *et al*, 2008; Sablina *et al*, 2005).

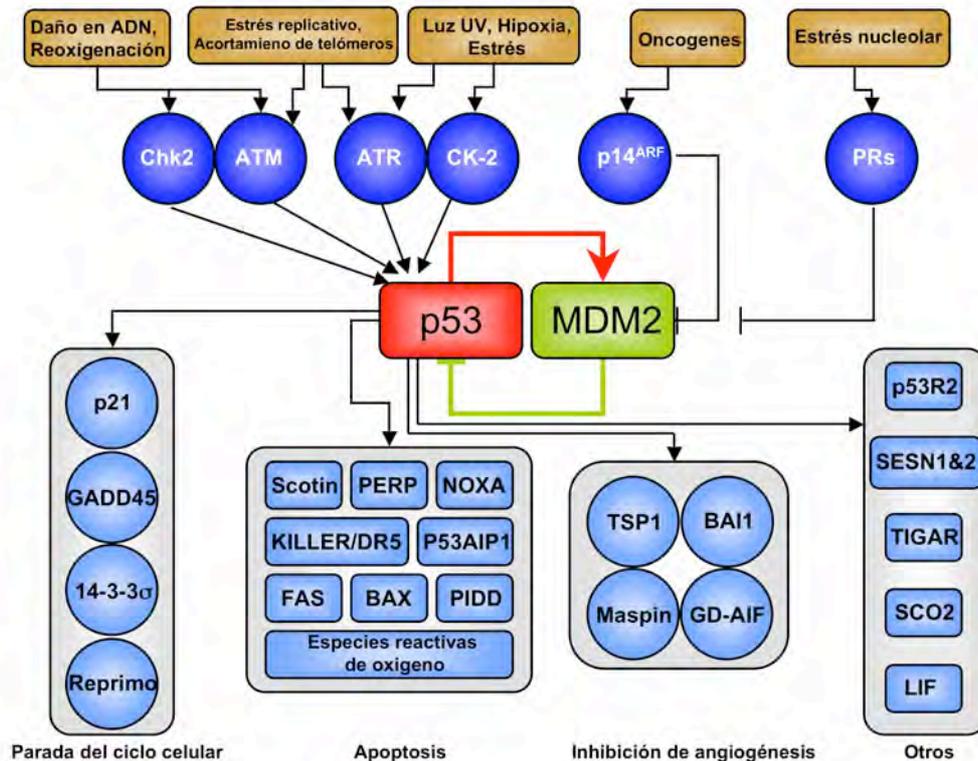
Continúan siendo descubiertos nuevos programas transcripcionales controlados por p53 y desvelados sus papeles en la supresión tumoral. Por ejemplo, p53 inhibe la glicólisis a través de *TIGAR* y promueve la fosforilación oxidativa a través de *SCO2* para proteger a las células de la reprogramación metabólica, conocida como efecto Warburg, el cual se piensa que es fundamental para la transformación celular maligna (Vousden & Ryan, 2009).

La proteína p53 puede también limitar la tumorigénesis a través de la autofagia, lo cual provoca la muerte celular debida a la activación de genes como *AMPK*, *DRAM*, *SESN1* y *SESN2*. Sin embargo, el papel de la autofagia en la supresión tumoral es complejo, ya que puede también tener efectos pro-supervivencia, promoviendo la generación de ATP cuando los nutrientes son limitados (Vousden & Ryan, 2009).

Además de la activación de la transcripción, p53 puede reprimir la expresión de genes. La represión dependiente de p53 puede ocurrir por la unión de p53 a secuencias específicas o el reclutamiento de correpresores, como Sin3a y las desacetilasas de histonas (Riley *et al*, 2008), ocultando los sitios de unión de otros activadores transcripcionales, o a través de mecanismos indirectos, como la activación de microARNs o lincARNs que reprimen la expresión génica (Guttman *et al*, 2009; He *et al*, 2007).

Se han identificado muchos más genes regulados positiva o negativamente por p53 con funciones en fertilidad, envejecimiento, desarrollo, diferenciación, pigmentación, homeostasis,... (Brady & Attardi, 2010).

La elección entre la parada del ciclo celular (reparación del daño existente y supervivencia de la célula) o la apoptosis (no reparación del daño existente y eliminación de la célula) está modulada por un gran número de factores, como el tipo y la intensidad del estímulo estresante, los niveles de p53, los estímulos extracelulares a los que esté sometida la célula en ese momento (como factores de crecimiento y supervivencia o receptores de muerte), el tipo celular y su estado de desarrollo, ... Toda esta información será procesada e integrada a nivel de p53 dando lugar a un gran abanico de respuestas (Vogelstein *et al*, 2000; Brady & Attardi, 2010).



**Figura 5. La ruta de p53.** La activación de esta ruta (por diferentes tipos de estrés como daño en el ADN, luz UV y oncogenes) estimula diferentes actividades enzimáticas que modifican a p53 y a su regulador negativo MDM2. El resultado es un aumento de los niveles de p53 activado en la célula que lleva a la expresión de las dianas de p53. Estas dianas están implicadas en procesos que ralentizan el desarrollo de tumores. Un ciclo de control entre p53 y MDM2 controla esta ruta, mucho más compleja en la realidad de lo que aquí se muestra. Esquema de Vogelstein *et al*, 2000 actualizado.

## 1.6. Modelos de estudio

Las investigaciones biológicas sobre las funciones de p53 desde su descubrimiento han sido complementadas en los últimos 20 años por estudios que incluían ratones manipulados genéticamente. Como se esperaba, los ratones con alelos mutantes del gen *Trp53* desarrollan múltiples tipos de cáncer mucho más rápidamente que sus hermanos con copias normales (wt) de este gen (Donehower & Lozano, 2009).

Durante los años siguientes al descubrimiento del gen *Trp53* se pusieron a punto nuevas tecnologías de manipulación de la línea germinal de ratones, como la transgénesis y la recombinación homóloga en células madre embrionarias (ES). En 1989, el primer ratón transgénico que expresaba una forma mutante de *Trp53* fue descrito por Bernstein y colaboradores (Lavigne *et al*, 1989). Se generaron dos líneas transgénicas diferentes que portaban en su genoma múltiples copias de dos formas mutantes distintas de *Trp53* y que

sobreexpresaban la proteína p53 mutante. Aproximadamente el 20% de los ratones de cada una de estas líneas desarrollaba cáncer a los 18 meses de edad, lo cual era un aumento significativo en la incidencia de tumores, en comparación con los ratones controles no transgénicos. Estos ratones desarrollaban un amplio espectro de tipos tumorales, entre los que predominaban los adenocarcinomas de pulmón, osteosarcomas y linfomas. El amplio espectro observado en este modelo murino proporcionó una importante pista que llevó a la determinación de las bases genéticas del síndrome de Li-Fraumeni (Malikin *et al*, 1990; Srivastava *et al*, 1990).

Los modelos transgénicos que sobreexpresan alelos mutantes de *Trp53* en distintos tejidos continúan siendo una herramienta muy útil para el entendimiento de las funciones de p53. Particularmente, han sido muy útiles en el estudio de las funciones de p53 en tejidos concretos gracias a la utilización de promotores específicos de tejido que regulan la expresión de estas formas mutantes de p53. Sin embargo, estos modelos se basan en la integración al azar de múltiples copias de *Trp53* y, por lo tanto, los niveles de expresión y la actividad de *Trp53* transgénico puede no reproducir los efectos de las formas mutantes endógenas de los tumores humanos. Para resolver estos problemas, y así generar modelos que reproduzcan más fielmente las alteraciones genéticas de *Trp53* adquiridas y heredadas presentes en los tumores, desde los años 90 se ha estado utilizando la tecnología de la recombinación en células ES.

El primer ratón *knock out* (KO) de p53 fue descrito por Donehower y colaboradores en 1992 (Donehower *et al*, 1992) y pronto le siguieron otros modelos semejantes desarrollados en otros laboratorios. Todos estos modelos contenían grandes deleciones del gen *Trp53*, lo cual, efectivamente, daba lugar a alelos nulos y fenotipos de desarrollo y cáncer semejantes en todos ellos. La primera sorpresa fue que los ratones con ambos alelos de *Trp53* delecionados tenían un desarrollo prenatal y postnatal normal. Sin embargo, en 1995 un examen más minucioso realizado por Clarke y Jacks mostró que una pequeña fracción de las hembras nulas para *Trp53* desarrollaba una exencefalia embrionaria letal (Armstrong *et al*, 1995). Como en los ratones transgénicos con *Trp53* mutante, el espectro de tumores desarrollado por los ratones *Trp53* KO era muy variable, predominando los linfomas de células T y los sarcomas de tejidos blandos.

El 80% de las mutaciones de *Trp53* en los tumores humanos son mutaciones *missense*. Experimentos *in vitro* muestran que las proteínas p53 mutantes proporcionan una ventaja de crecimiento a las células tumorales. Esta observación creó la necesidad de generar modelos de p53 *knock in* (KI) y estudiar su fenotipo en el contexto de un organismo entero.

La mutación R172H (R175H en humanos) que interrumpe el dominio de unión a ADN de p53 es una de las mutaciones más agresivas que ha sido estudiada *in vitro*. El primer modelo KI para esta mutación fue descrito en 2000 por Lozano y colaboradores (Liu *et al*, 2000). Sorprendentemente, estos ratones presentaban unas curvas de supervivencia semejantes a las del los ratones KO pero con un potencial de metástasis mucho mayor.

Los ratones anteriormente descritos portan las mutaciones en todas y cada una de las células de su organismo. Estos animales expresan la forma mutante de p53 desde el momento en que son concebidos. Sin embargo, el desarrollo de diferentes avances técnicos ha permitido la generación de alelos *Trp53* condicionales, en los cuales el gen puede ser regulado espacial y temporalmente en los tejidos somáticos de los ratones. Estos modelos permiten delecionar o mutar al gen en tejidos específicos y en un momento determinado de la vida del animal o durante un periodo concreto. Estos modelos condicionales han permitido importantes descubrimientos en las funciones de p53 como supresor tumoral.

En el año 2000 Bern y colaboradores desarrollaron el primer ratón con el alelo condicional *Trp53* (*Trp53<sup>fllox/fllox</sup>*) el cual podía ser delecionado mediante la expresión de la recombinasa Cre (Marino *et al*, 2000). Una variación de este modelo fue desarrollado por Jacks y colaboradores los cuales colocaron un *cassette* Lox-STOP-Lox (LSL) delante la secuencia codificante del alelo mutante de p53<sup>R172H</sup> (Olive *et al*, 2004). De esta manera podían expresar la forma mutante de p53 en tejidos concretos cruzando este modelo con otro que expresara Cre específicamente en el tejido deseado.

Estos modelos se desarrollaron como estrategias para inactivar la función de p53wt o activar una función mutante en un tipo celular concreto o en un momento determinado. Sin embargo, otro tipo de estudios se centraron en restaurar la función wt de *Trp53*. Estos modelos se crearon para estudiar si la restauración de su función en células tumorales puede retrasar o revertir la tumorigénesis. En una de estas estrategias, Evan y colaboradores generaron el modelo *Trp53ER<sup>TAM</sup>* (Christophorou *et al*, 2005, descrito más adelante). Con este modelo obtuvieron resultados que indicaban que la respuesta aguda frente a daño en el ADN tras irradiación, mediada por p53 era irrelevante para la supresión tumoral (Christophorou *et al*, 2006). Más aún, vieron que la resistencia a la aparición de linfomas inducidos por radiación, asociada a una activación de p53 retrasada, era completamente dependiente de ARF, un activador de p53 que responde frente a estrés oncogénico. Así, al menos en este contexto, el modo primario de supresión tumoral de p53 no es a través de la eliminación de las células con daño en el ADN, sino de la supresión mediada por ARF de raros clones activados oncogénicamente tras la irradiación. Estos resultados fueron apoyados por otro trabajo del laboratorio de Serrano (Efeyan *et al*, 2006) en el que concluyen que la señalización oncogénica es el evento crítico del que depende la protección mediada por p53 y que la respuesta frente a daño en el ADN es menos importante.

Estos modelos de p53wt activado condicionalmente fueron usados también por los laboratorios de Evan, Jacks y Lowe para demostrar que la restauración de la función de p53 puede causar regresión tumoral. Cada laboratorio usó diferentes estrategias de activación de p53 y diferentes modelos tumorales, pero en cada caso los tumores desarrollados en ausencia de p53 conservaban la vía de señalización de p53 intacta, la cual era completamente restaurada cuando se reintroducía la función de p53. Evan usó el modelo p53ERTAM<sup>K1</sup> en un modelo de linfoma (Martins *et al*, 2006), Jacks una

estrategia LSL junto con una Cre expresada ubicuamente en el contexto de linfomas y sarcomas desarrollados de forma natural (Xue *et al*, 2007) y Lowe una estrategia basada en un shARN reprimible por doxiciclina para activar a p53 en un modelo de carcinoma de hígado (Ventura *et al*, 2007). Aunque todos los modelos mostraron altos niveles de supresión tumoral tras la reactivación de p53, el mecanismo de supresión tumoral dependía del tipo tumoral. Los linfomas mostraban altos niveles de muerte celular por apoptosis, mientras que los sarcomas y tumores hepáticos mostraban un incremento de células senescentes. Estos resultados apoyan la posibilidad de que la restauración de la funcionalidad de p53wt en muchos tipos de tumores tenga importantes efectos terapéuticos. Esto es sólo una posibilidad, ya que en el modelo de Evan hubo una reaparición de los tumores debido a la pérdida de expresión de ARF y del mismo alelo p53wt inducible. Además, la mayoría de los tumores humanos contienen formas mutantes de p53 y se desconoce si la reintroducción de una forma wt de p53 tendría el mismo efecto supresor tumoral en presencia de estas formas mutantes de p53.

La posibilidad de estudiar y manipular el gen *Trp53* en el ratón, un organismo entero y mamífero como el ser humano, ha facilitado en gran medida el descubrimiento de las funciones de p53, tanto asociadas como no asociadas al cáncer. Es posible que los modelos que se desarrollen en los años venideros permitan una mayor comprensión del funcionamiento de esta proteína que nos lleve a nuevos descubrimientos con potencial terapéutico frente al cáncer.

**Tabla 1. Modelos murinos de p53** (Adaptado de Donehower & Lozano, 2009).

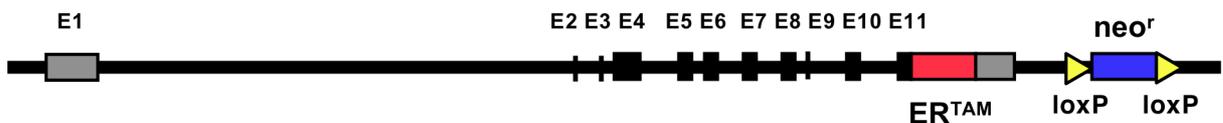
Modelo o mutación	Tipo	Tipo tumoral	Fenotipo	Referencia
Intrón 4 y exón 5	KO	Linfomas y sarcomas	Los ratones <i>Trp53<sup>+/-</sup></i> y <i>Trp53<sup>-/-</sup></i> desarrollan tumores	Donehower <i>et al</i> , 1992
Exones 2-6	KO	Linfomas y sarcomas	Los ratones <i>Trp53<sup>+/-</sup></i> y <i>Trp53<sup>-/-</sup></i> desarrollan tumores	Jacks <i>et al</i> , 1994
Exones 2-6 (Balb/c)	KO	Linfomas, sarcomas y tumores mamarios	El cambio del fondo genético da lugar a un cambio en el espectro de tumores	Kuperwasser <i>et al</i> , 2000
R172H	KI	Linfomas, sarcomas y carcinomas	Cánceres metastáticos indicando una ganancia de función	Lang <i>et al</i> , 2004
S18A (sitio de fosforilación)	KI	Ninguno	Respuesta apoptótica reducida y linfomas tardíos	Sluss <i>et al</i> , 2004
L25Q y W26S	KI	Linfomas y sarcomas	Similar a los ratones <i>Trp53<sup>-/-</sup></i>	Nister <i>et al</i> , 2005
K317R (sitio de acetilación)	KI	No descrito	Apoptosis inducida por radiación aumentada en algunos tejidos	Chao <i>et al</i> , 2006
Hupki	QUIM-WT	Ninguno	Silvestre (Dominio de unión al ADN humano).	Luo <i>et al</i> , 2001
Hupki-R248W	QUIM-Mut	Linfomas y sarcomas	Los ratones homocigóticos desarrollan tumores rápidamente. <i>Checkpoint</i> G2/M alterado.	Song <i>et al</i> , 2007
LSL-p53-VP16	QUIM	No descrito	Apoptosis alterada (Dominio TAD del herpesvirus VP16)	Johnson <i>et al</i> , 2008
<i>Trp53<sup>+m</sup></i> ( $\Delta$ exones1-6)	KI	Resistente	Resistencia al cáncer y envejecimiento prematuro.	Tyner <i>et al</i> , 2002
LSL-R172H	COND	Variable	Algunas diferencias con <i>Trp53<sup>+/-</sup></i> y <i>Trp53<sup>-/-</sup></i>	Olive <i>et al</i> , 2004
LSL-p53wt	COND-WT	Variable	Regresión de los tumores tras la expresión de Cre	Ventura <i>et al</i> , 2007
p53ERTAM <sup>KI</sup>	COND-WT	Linfomas y sarcomas	Retrasa la progresión tumoral tras TAM	Christophorou <i>et al</i> , 2005
p53-R172H	TG-Mut	Tumores mamarios	Aceleración de los tumores mamarios en transgénicos <i>ErbB2</i>	Li <i>et al</i> , 1997
p53-R273H	TG-Mut	Adenocarcinomas de pulmón	La expresión ectópica de p53mut puede inducir tumores de pulmón	Duan <i>et al</i> , 2002
p53 $\Delta$ 236	TG-Mut	Tumores cerebrales	Aceleración de tumores cerebrales	Klein <i>et al</i> , 2000
p44TG	TG-Mut	Resistente	Resistencia al cáncer; envejecimiento prematuro	Maier <i>et al</i> , 2004
Super p53	TG-WT	Resistente	Resistencia al cáncer; no envejecimiento prematuro	García-Cao <i>et al</i> , 2002
Super ARF y p53	TG-WT	Resistente	Resistencia al cáncer; envejecimiento retrasado	Matheu <i>et al</i> , 2007

QUIM, p53 quimérico; COND alelo condicional p53; ER, receptor de estrógenos; Hupki, human p53 knock in; KI, *Knock In*; KO, *Knock Out*; LSL, *LoxP-Stop-LoxP*; Mut, alelo p53 mutante; TAD, dominio de transactivación; TAM, tamoxifén; TG, transgénico; VP16, proteína vírica 16; WT, alelo silvestre.

### 1.7. El modelo p53ERTAM<sup>KI</sup>

La proteína p53 participa en diversos procesos biológicos, lo que hace difícil precisar los mecanismos por los que p53 ejerce su función supresora tumoral en un caso concreto. Frecuentemente, durante la progresión tumoral se produce la inactivación de p53, sugiriendo que desempeña algún papel en aspectos tardíos de la evolución tumoral como la angiogénesis, invasión e inestabilidad genómica. Por otra parte, p53 media la inducción de la apoptosis y la parada del ciclo celular en respuesta a daño en el ADN y a la activación oncogénica, eventos requeridos en la etapas iniciales de la evolución tumoral. Nuestro limitado conocimiento de cómo p53 suprime la tumorigénesis en tejidos *in vivo* hace imposible determinar si la ausencia de la función de p53 es crucial sólo en específicos y transitorios estadios de la evolución tumoral, como cuando la células presentan un daño genotóxico agudo o un evento desestabilizador del genoma, o si por el contrario las células tumorales poseen señales permanentes de activación de p53, con lo que necesitarían una pérdida mantenida de la función de p53 a lo largo de la historia natural del tumor. El establecer cuál de estas dos alternativas es la correcta tendría profundas implicaciones para la utilidad terapéutica de la restauración de p53 en cáncer, ya que sólo las células cancerígenas que poseyeran señales persistentes de activación de p53 serían susceptibles de la influencia supresora tumoral de la restauración de p53.

Para dilucidar cuál de estas hipótesis era la correcta y profundizar en la naturaleza de la supresión de p53 se generó el modelo p53ERTAM *knock in* (KI) (Christophorou *et al*, 2005). En este modelo se insertó, por recombinación homóloga, la secuencia codificadora de un dominio de unión de estrógenos modificado en fase con el extremo 3' codificante del gen *Trp53* de ratón. Este dominio de unión a estrógenos posee la característica de unirse únicamente a estrógenos artificiales, como el 4-hidroxitamoxifén (4-OHT), pero no a los estrógenos naturales presentes en el propio organismo (Littlewood *et al*, 1995).

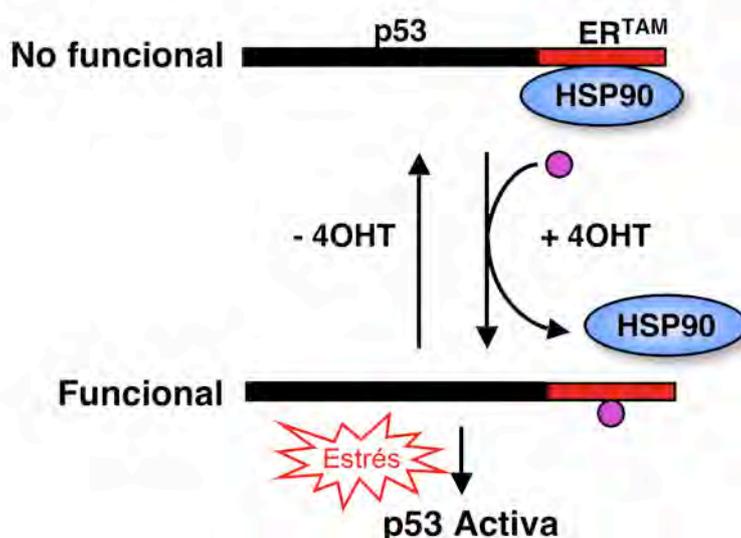


**Figura 6. Esquema del alelo recombinado p53ER<sup>TAM</sup>.** El alelo recombinado p53ER<sup>TAM</sup> conserva las secuencias codificantes y no codificantes del gen endógeno. Los exones se representan como rectángulos, en negro los codificantes y en gris los no codificantes. El dominio de unión a estrógenos (ER<sup>TAM</sup>) se representa en rojo y el gen de resistencia a G418 (neo<sup>r</sup>) está marcado en azul, flanqueado por sitios loxP (representados por triángulos amarillos).

Este gen modificado codifica una proteína de fusión entre p53 y el dominio de unión a estrógenos modificado. Este dominio se une a la proteína HSP90 imposibilitando la función de p53. La presencia de 4-OHT desplaza a la proteína HSP90 volviendo funcional a p53. En este estado, p53 es

completamente competente y podrá ejercer su función en caso de recibir los estímulos adecuados. Cuando el 4-OHT desaparece del sistema, la proteína HSP90 vuelve a unirse al dominio de unión a estrógenos y p53 vuelve a su estado no funcional. De esta manera se consigue un modelo murino en el que la función de p53 puede ser controlada de forma reversible entre un estado funcional y otro no funcional con la administración/retirada de 4-OHT.

La expresión de p53ER<sup>TAM</sup> en el modelo está controlada por las mismas secuencias regulatorias transcripcionales que de forma normal regulan a p53 en cada tejido *in vivo*, pero la proteína expresada, p53ER<sup>TAM</sup>, es funcionalmente competente sólo en la presencia de su ligando: 4-hidroxitamoxifén (4-OHT).



**Figura 7. Esquema de la regulación de la competencia de la proteína p53ER<sup>TAM</sup>.** La proteína p53ER<sup>TAM</sup> expresada en este modelo murino se encuentra en una conformación no funcional al encontrarse el dominio de unión a estrógenos unido a la proteína HSP90 en ausencia de su ligando. Cuando se suministra 4-OHT (4-hidroxitamoxifén) al sistema, éste desplaza a la proteína HSP90 permitiendo el normal comportamiento de la proteína p53. En caso de existir los estímulos adecuados, p53 desencadenará la respuesta oportuna ejerciendo así la acción para la cual está diseñada. En caso de no existir estos estímulos, p53 simplemente se autorregulará con la ayuda de MDM2 para mantener unos niveles basales en la célula. La característica especial de este modelo consiste en que en el momento en que se deje de suministrar el ligando 4-OHT a la célula, la proteína p53ER<sup>TAM</sup> volverá a su conformación no funcional, lo cual permite “encender” y “apagar” la función de p53 a voluntad.

En los estudios *in vivo*, la restauración de p53 se realiza mediante la inyección intraperitoneal de tamoxifén. Esta droga será metabolizada en el hígado de los ratones dando lugar a 4-OHT, que será distribuido a cada una de las células del organismo a través de la sangre. Así, este modelo murino proporciona una herramienta perfecta para el control temporal y altamente específico de la función de p53 tanto en tejidos de ratón *in vivo* como en células primarias derivadas de estos tejidos *in vitro*.

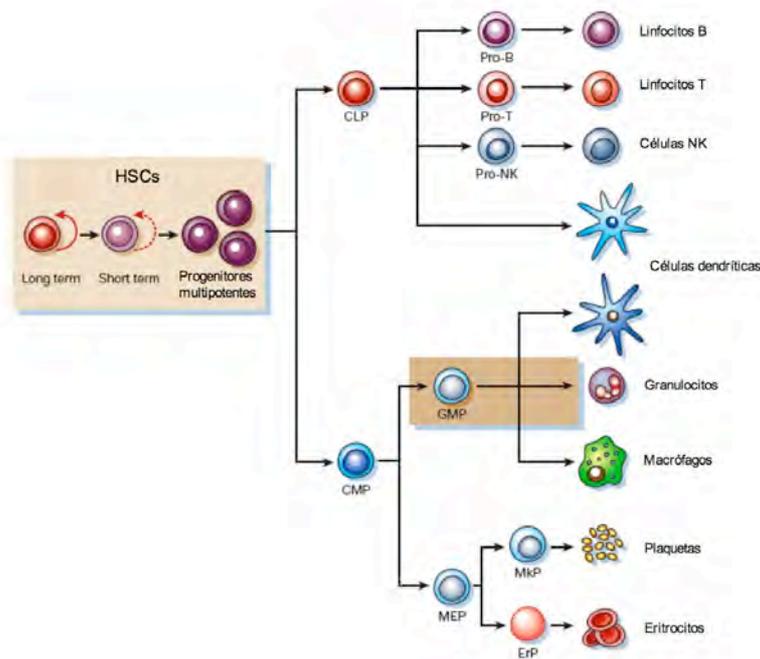
Los ratones  $p53^{ER/ER}$  en ausencia de 4-OHT tienen una alta incidencia de linfomas espontáneos, de forma similar a los ratones  $p53^{-/-}$  isogénicos (C57BL/6 x 129/SvJ). Además, los tejidos radiosensibles, timo, bazo y epitelio intestinal, de los ratones  $p53^{ER/ER}$  no expuestos a tamoxifén se muestran resistentes a la apoptosis inducida por radiación. Sin embargo, una administración sistémica de tamoxifén a los ratones  $p53^{ER/ER}$  rápidamente restaura la función de p53 en estos tejidos, reestableciendo su característica de radiosensibilidad tan pronto como 2 h después de la inyección intraperitoneal de tamoxifén. De forma similar, la competencia de p53 es rápidamente restaurada *in vitro* en timocitos y MEFs después de la adición de 4-OHT al medio de cultivo. El cese del tratamiento con tamoxifén en los ratones o la retirada del 4-OHT de los cultivos celulares los revierte a su estadio de deficientes en p53, demostrando así la reversibilidad rápida y repetible de la función de p53 en el modelo  $p53ERTAM^{KI}$ . Estos análisis muestran también que el 4-OHT por sí mismo no activa a p53, sino que vuelve competente a la proteína para que pueda activarse en respuesta a las señales apropiadas de daño o estrés (Christophorou *et al*, 2005).

## 2. CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS (HSCs) Y CÁNCER

### 2.1. Células Madre Hematopoyéticas (HSCs)

Las células madre se definen como células clonogénicas capaces tanto de la autorrenovación como de la diferenciación en múltiples linajes.

Las células del sistema hematopoyético se generan continuamente en la médula ósea por la autorrenovación y diferenciación de las HSCs (*hematopoietic stem cells*), las cuales han sido aisladas tanto en ratones como en humanos. Las HSCs pueden dividirse en un subgrupo LT-HSC (*long-term HSCs*) de células capaces de autorrenovación indefinida y en otro ST-HSC (*short term HSCs*) que poseen capacidad de autorrenovación durante un intervalo definido. Las ST-HSCs dan lugar a progenitores de múltiples linajes sin capacidad de autorrenovación, los cuales darán lugar a una progenie más diferenciada y finalmente a células funcionales maduras (Passegué *et al*, 2003).



**Figura 8. Diferenciación a partir de las células madre hematopoyéticas (HSCs).** Las HSCs pueden ser subdivididas en LT-HSCs, ST-HSCs y progenitores multipotentes (las flechas rojas indican autorrenovación). Éstos últimos dan lugar a los progenitores comprometidos linfocitos (CLPs) y mielocitos (CMPs) que dan lugar al resto de las células diferenciadas que componen el sistema hematopoyético. GMP: precursor de granulocitos y macrófagos, ErP: precursor de eritrocitos, MEP: precursor de eritrocitos y megacariocitos, Mkp: precursor de megacariocitos, NK: *natural killer*. Adaptado de Reya *et al*, 2001.

Durante o después de la división celular las dos células hijas de una célula madre tienen que decidir su destino. Pueden permanecer en estado indiferenciado como HSCs, pueden diferenciarse o pueden morir por apoptosis. También tienen que elegir entre permanecer en la médula ósea o migrar a la periferia. Este proceso de decisión tiene que ser finamente modulado para mantener un nivel basal de HSCs en la médula ósea y proporcionar constantemente progenitores de todos los linajes hematopoyéticos.

Existen dos tipos de progenitores de múltiples linajes con restricción en la autorrenovación: los progenitores comprometidos linfoides (CLPs), los cuales dan lugar a los linfocitos B, linfocitos T y linfocitos NKs (*natural killers*); y los progenitores comprometidos mieloides (CMPs), precursores de los linajes mielo-eritroides. Los CMPs dan lugar a los progenitores mielomonocíticos (GMPs) que producirán monocitos/macrófagos y granulocitos, y progenitores megacariocíticos/eritroides, que se diferenciarán en megacariocitos/plaquetas y eritrocitos aunque todavía conservarán con baja frecuencia la capacidad de diferenciarse a linfocitos B. Interesantemente tanto los CMPs como los CLPs pueden dar lugar a las células dendríticas, sugiriendo la existencia de vías alternativas convergentes en la diferenciación de estos progenitores. Todos estos procesos de diferenciación están controlados por la expresión de reguladores transcripcionales específicos, factores de crecimiento y receptores de los factores de crecimiento, cuya combinación determina la maduración y el linaje final de la célula (Passegué *et al*, 2003).

Todas estas poblaciones de progenitores pueden identificarse y separarse en poblaciones puras usando marcadores de superficie y se ha visto que poseen una pequeña actividad de autorrenovación tras su trasplante (Na Nakorn *et al*, 2002).

## 2.2. Hipótesis de las *Cancer Stem Cells* (CSCs)

Una reciente hipótesis en la biología del cáncer postula que los tumores están estructurados jerárquicamente como tejidos anormales mantenidos por las células madre tumorales o CSCs (Reya *et al*, 2001; Dalerba *et al*, 2007a). Según esta teoría las CSCs habrían adquirido las características celulares de las células *stem* normales: autorrenovación, vida indefinida, resistencia a insultos químicos y electromagnéticos, capacidad de permanecer quiescentes durante largos periodos y de colonizar otras partes del cuerpo (Clevers, 2011). Esta teoría proporciona una explicación racional a por qué muchas de las estrategias terapéuticas actuales contra el cáncer no dan buenos resultados. Según esta teoría, bastaría que una pequeña población de CSCs resistiera a la terapia para mantener el tumor (Chabner & Roberts, 2005; Huff *et al*, 2006). Diversas evidencias a favor de este modelo han sido recientemente publicadas en leucemias humanas (Cobaleda *et al*, 2000; Cox *et al*, 2004, 2007; Hope *et al*, 2004) y tumores sólidos (Li *et al*, 2007; O'Brien *et al*, 2007; Prince *et al*, 2007). Sin embargo, este concepto emergente ha sido validado escasamente en modelos experimentales (Perez-Caro *et al*, 2009).

Existen algunas evidencias en contra de esta teoría y estudios contradictorios que apoyan o refutan la hipótesis en función del modelo y tipo de cáncer sometido a estudio. Los principales puntos débiles de esta teoría son el uso de los xenotransplantes como único método de demostrar la existencia de las CSCs, la inexistencia de un marcador universal que las identifique en todos los tipos de tumores y el gran número de células *stem* presentes en ciertos tipos de cánceres (ver Clevers, 2011 y referencias).

La validación de la hipótesis de las CSCs *in vivo* y/o *in vitro* tendría importantes consecuencias para nuestro concepto de la biología del cáncer y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en la lucha contra esta enfermedad.

### 2.3. ¿Existen realmente las CSCs?

Estudios recientes han demostrado que las células madre normales y las células cancerígenas comparten la capacidad de autorrenovación, y que muchas de las vías clásicamente asociadas con el cáncer también regulan el desarrollo normal de las células madre. Por ejemplo, la inhibición de la apoptosis por la sobreexpresión del oncogén *bcl-2* da lugar a un incremento del número de HSCs *in vivo*, sugiriendo que la muerte celular programada juega un papel importante en la homeostasis de las HSCs. Otras vías de señalización asociadas con la oncogénesis como las vías de Notch, Sonic hedgehog (Shh) y Wnt pueden estar relacionadas también con la autorrenovación de las HSCs (Reya *et al*, 2001).

Si las vías de señalización que normalmente regulan la autorrenovación de las células madre causan un proceso tumorigénico cuando se desregulan, entonces ¿son las propias células madre las dianas de la transformación oncogénica en ciertos tipos de cánceres?

Hay dos razones para pensar que este podría ser el caso:

- Debido a que las células madre ya disponen de la maquinaria de autorrenovación activa, sería más simple mantener esta activación que “encenderla” *de novo* en una célula más diferenciada.
- Debido a la autorrenovación, las células madre viven más tiempo que las células diferenciadas en tejidos altamente proliferativos. Esto proporciona a las células madre muchas más oportunidades para acumular mutaciones en una única célula que a la mayoría de los tipos celulares diferenciados.

Para la mayoría de los cánceres la célula iniciadora del evento de transformación no se conoce, pero diferentes evidencias indican que ciertos tipos de leucemia aparecen por mutaciones que se acumulan en las HSCs. Esta idea está apoyada por trabajos en leucemias linfoides (George *et al*, 2001) y mieloides crónicas (Mauro *et al*, 2001) donde los reordenamientos cromosómicos clonotípicos asociados a la leucemia han sido también encontrados en células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>, población enriquecida en HSCs.

**CD34:** Es una glicoproteína de la superficie celular que actúa como molécula de adhesión célula-célula. También puede mediar en la adhesión de las células madre a la matriz extracelular de la médula ósea. CD34 también es una molécula de adhesión importante para los linfocitos T necesaria para que éstos entren en los ganglios linfáticos.

Las células CD34<sup>+</sup> se encuentran normalmente en el cordón umbilical y la médula ósea. La proteína CD34 se expresa en células hematopoyéticas, algunas células madre mesenquimales, progenitores endoteliales, células endoteliales de los vasos sanguíneos pero no de los linfáticos (excepto en los vasos linfáticos pleurales), mastocitos, una subpoblación de células dendríticas (factor XIIIa<sup>-</sup>), así como en células de tumores de tejidos blandos como DFSP, GIST, PNSTs, etc.

**CD38:** También conocida como cADP-ribosa hidrolasa es una glicoproteína de la superficie celular de muchas células del sistema inmune, incluyendo las CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, linfocitos B y NKs. La proteína CD38 también funciona como factor de adhesión, transductor de señales y participa en la vía de señalización del calcio. Es una enzima multifuncional que cataliza la síntesis y la hidrólisis de la ADP-ribosa cíclica (cADPR) a partir de NAD<sup>+</sup> a ADP ribosa. Los productos de esta reacción son esenciales para la regulación intracelular del calcio.

La pérdida de la función de CD38 está asociada con un empeoramiento de la respuesta inmune, el funcionamiento metabólico y modificaciones en el comportamiento.

La proteína CD38 es un marcador de la actividad celular, estando relacionada con la infección por VIH, leucemias, mielomas, tumores sólidos, diabetes *mellitus* tipo II y con el metabolismo de los huesos.

Sin embargo, también se ha visto que progenitores comprometidos (GMPs) que carecen del potencial de autorrenovación son capaces de actuar como CSCs y originar una leucemia si se les introduce la fusión MLL-AF9 (Krivtsov *et al*, 2006). Parece que esta fusión induce la expresión aberrante de genes implicados en la autorrenovación proporcionando esta característica a una célula que carecía de ella y, por lo tanto, haciendo que un progenitor mielóide sea capaz de iniciar, mantener y propagar la leucemia.

Por otra parte, se ha generado un modelo murino en el que se restringe la expresión del oncogén p210BCR-ABL al compartimento de los progenitores mieloides dando lugar a la aparición de un desorden mieloproliferativo crónico, demostrando así que una lesión de este tipo puede aparecer sin tener que iniciarse en un célula *stem* (Jaiswal *et al*, 2003).

Un tumor puede ser visto como un órgano aberrante iniciado por una célula cancerígena que ha adquirido la capacidad de proliferar indefinidamente debido a la acumulación de mutaciones. Tanto las células madre como las células tumorales tienen este potencial de proliferación y la capacidad de dar lugar a nuevos tejidos (normales o aberrantes, respectivamente). Tanto los tumores como los tejidos normales están compuestos por poblaciones heterogéneas de células con diferentes características fenotípicas y diferente potencial proliferativo. Debido a que la mayoría de los tumores tienen un origen clonal y que los tumores están compuestos por una masa de células heterogénea, las células originantes de los tumores deben dar lugar a una progenie de diversos fenotipos, incluyendo células con un potencial de proliferación indefinido, así como células con un potencial limitado o inexistente. Esto sugiere que las células cancerígenas realizan procesos que son análogos a la autorrenovación y diferenciación de las células madre normales (Reya *et al*, 2001).

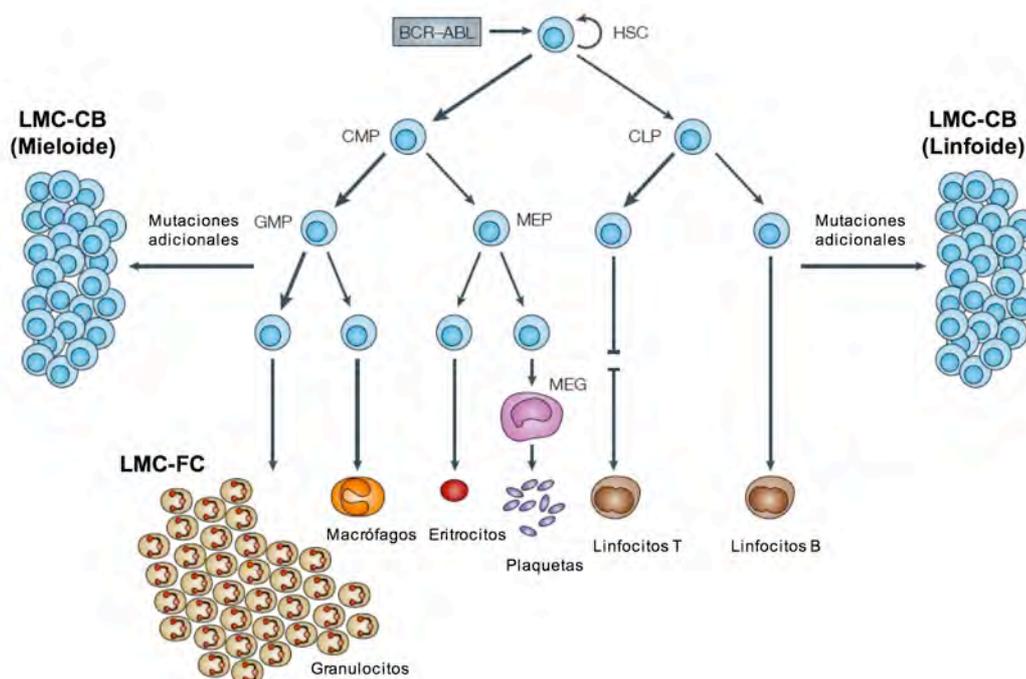
De esta forma, las células tumorigénicas pueden ser consideradas como células madre tumorales (CSCs) que llevan a cabo procesos de organogénesis aberrantes escasamente regulados y análogos a los que suceden en las células madre normales.

El mayor obstáculo para elucidar la aportación de las CSCs en el desarrollo y mantenimiento de los tumores y su grado de adecuación como diana terapéutica es la falta de modelos en los cuales la expresión del oncogén esté dirigida al compartimento de las CSCs (Perez-Caro *et al*, 2009).

### 3. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

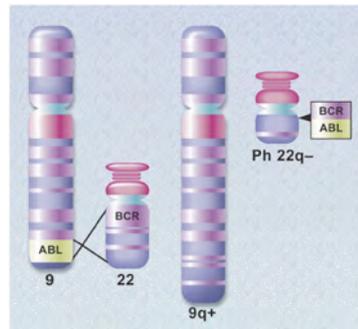
#### 3.1. Etiología de la enfermedad

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad que se origina como consecuencia de la transformación neoplásica de células madre hematopoyéticas (Figura 9). Esta enfermedad aparece debido a una anomalía genética que consiste en una translocación cromosómica recíproca entre el cromosoma 9 y el cromosoma 22: t(9;22)(q34;q11). Esta translocación da lugar a un cromosoma anormal muy pequeño denominado “cromosoma de Philadelphia (Ph)”, el cual fue la primera aberración cromosómica asociada con una enfermedad humana (Figura 10). Esta translocación genera una fusión génica denominada *BCR-ABL*, la cual puede tener diferentes tamaños dependiendo del punto de rotura de los cromosomas y del *splicing* o procesamiento del ARN. De esta forma, la fusión génica resultante dará lugar a proteínas de diferentes masas moleculares, siendo las más abundantes en los pacientes las fusiones p185/p190BCR-ABL, p210BCR-ABL y p230BCR-ABL. Cada una de estas fusiones dará lugar a enfermedades con características propias (Ren, 2005).



**Figura 9. Desarrollo de la Leucemia Mieloide Crónica.** La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad iniciada por la expresión del gen de fusión *BCR-ABL* en las HSCs. La fase inicial de la enfermedad o fase crónica (LMC-FC) se caracteriza por una expansión masiva de la serie granulocítica. La adquisición de nuevas mutaciones genéticas causa la progresión de la enfermedad hasta una fase de crisis blástica (LMC-CB) caracterizada por una acumulación de blastos mieloides (en aproximadamente 2/3 de los pacientes) o de blastos linfocitos (en el otro tercio de los pacientes). Adaptado de Ren, 2005.

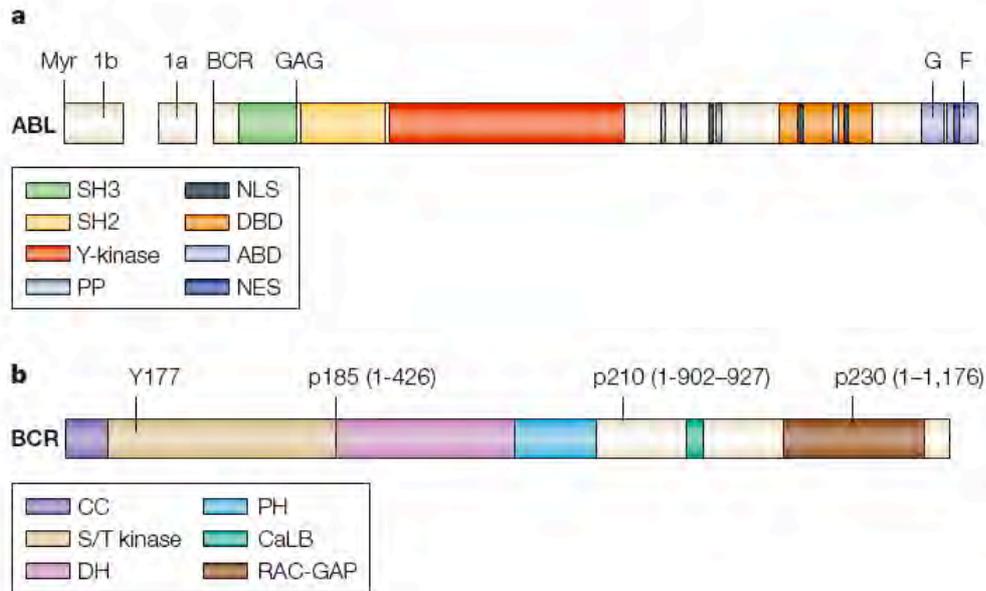
En la fusión génica *BCR-ABL* se yuxtapone la secuencia 3' del protooncogén *ABL* del cromosoma 9 con la secuencia 5' del gen *BCR* del cromosoma 22.



**Figura 10. El cromosoma de Philadelphia (Ph).** Diagrama esquemático de la translocación que crea el cromosoma de Philadelphia. Los genes *ABL* y *BCR* se encuentran en los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, respectivamente. Como resultado de la translocación se forma un gen de fusión *BCR-ABL* en el cromosoma 22 aberrante o cromosoma de Philadelphia. Adaptado de Druker, 2008.

La proteína ABL (145 kDa) es una tirosina kinasa no receptora, que se expresa en la mayoría de los tejidos. La proteína ABL se distribuye tanto por el núcleo como por el citoplasma celulares y puede intercambiarse entre los dos compartimentos. Transduce señales de receptores de adhesión y de factores de crecimiento, desde la superficie celular, para regular la estructura del citoesqueleto. En respuesta al daño en el ADN, activa la cascada proapoptótica cuando el daño es tan grave que no puede ser reparado. Fosforila a PSMA7 lo que conlleva una inhibición del proteasoma y el bloqueo del ciclo celular (Liu *et al*, 2006). Los ratones con una interrupción homocigótica del gen *Abl* están afectados de forma variable, pero entre sus fenotipos se encuentran una mortalidad perinatal incrementada, linfopenia y osteoporosis. Los ratones carentes de ABL son también más pequeños, con un desarrollo anormal de la cabeza y los ojos (Tybulewicz *et al*, 1991). La proteína ABL comparte funciones con su homóloga, ARG, durante el desarrollo. Los ratones deficientes en ARG de desarrollan de forma normal, pero los ratones deficientes en ambas sufren defectos en la neurulación y mueren antes del día embrionario 11 (Koleske *et al*, 1998).

La proteína BCR (*Breakpoint Cluster Region*) también es una proteína de señalización que contiene múltiples dominios modulares. Es una proteína GAP (*GTPase activating protein*) para RAC y CDC42. Incrementa la actividad GTPasa de estas proteínas favoreciendo la hidrólisis del GTP a GDP (Diekmann *et al*, 1991; Maru *et al*, 1991). Los ratones deficientes en BCR se desarrollan normalmente, aunque sus neutrófilos producen niveles excesivos de especies reactivas de oxígeno tras su activación (Voncken *et al*, 1995).



**Figura 11. Las proteínas ABL y BCR.** Las proteínas ABL y BCR contienen varios dominios importantes. **a.** El gen *ABL* codifica dos isoformas que se inician en los exones 1a o 1b, mutuamente excluyentes, mediante el uso de promotores alternativos (Shtivelman *et al*, 1986). El extremo amino 1b contiene un sitio de miristoilación (Myr). La región aminoterminal de ABL contiene un dominio SH3, un dominio SH2 y un dominio tirosina kinasa (Y-kinasa). Estos dominios pueden plegarse en una conformación autoinhibitoria, en la que los dominios SH3 y SH2 funcionan como una pinza que mantiene al dominio tirosina kinasa apagado. La región carboxiterminal contiene 4 dominios de unión a SH3, ricos en prolina (PP), tres señales de localización nuclear (NLS), una señal de exportación nuclear (NES), un dominio de unión a ADN (DBD) y un dominio de unión a actina (ABD). Este dominio de unión a actina contiene sitios de unión tanto a la actina monomérica (G) como a la filamentosa (F). Se señalan los puntos en los que ABL se fusiona con BCR o con GAG (en v-ABL). **b.** La proteína BCR contiene un dominio de oligomerización *coiled-coil* (CC), un dominio serina/treonina kinasa (S/T-kinasa), un dominio de homología a DBL/CDC24 intercambiador de nucleótidos de guanina (DH), un dominio de homología a pleckstrina (PH), un sitio de unión a lípidos dependiente de calcio (CaLB) y un dominio RAC-GAP. p185, p210 y p230 indican los puntos más frecuentes en los que BCR se fusiona con ABL. Estas formas están asociadas con la leucemia linfoblástica aguda, la leucemia mieloide crónica y una forma menos agresiva de leucemia mieloide crónica, respectivamente. El número de aminoácidos aportados por BCR en cada una se indica entre paréntesis (Ren, 2005).

La fusión de las secuencias de *BCR* y *ABL*, en la translocación asociada con la LMC, incrementa la actividad tirosina kinasa de ABL y proporciona nuevos motivos/dominios regulatorios a ABL como el sitio de unión a GRB2 a través de la tirosina 177 (Y177) (Ren, 2005). También sitúa a la proteína de fusión preferentemente en el citoplasma a diferencia de la forma normal de c-ABL que es predominantemente nuclear. Todas estas nuevas propiedades son críticas para la actividad transformante de BCR-ABL (Sawyers, 1999).

Numerosos sustratos y proteínas de unión a BCR-ABL han sido identificados. En la actualidad se está intentando correlacionar estas rutas con las características patológicas de la LMC. Entre estos defectos se incluyen un aumento de la proliferación y una disminución de la apoptosis de las HSCs o de los progenitores que dan lugar a un aumento masivo del linaje mieloides, una liberación prematura de las células mieloides a la circulación, lo cual puede ser debido a un defecto en la adhesión de los progenitores mieloides al estroma de la médula ósea, y una inestabilidad genética dando lugar a la progresión de la enfermedad (Melo, 2004).

La proteína de fusión p210BCR-ABL puede encontrarse en células mieloides, eritroides, linfoides B y ocasionalmente en células linfoides T en la mayoría de los pacientes con LMC, sugiriendo que la translocación original tuvo lugar en las LT-HSCs. El oncogén BCR-ABL también se ha detectado en células endoteliales de pacientes con LMC. Si se confirman, estos datos sugerirían que la célula en la que sucede la translocación se encuentra en un estadio incluso anterior al de LT-HSC, como el de células hemangioblásticas putativas, una población celular muy primitiva con potencial de diferenciación tanto hematopoyético como endotelial (Passegué *et al*, 2003).

### 3.2. Fases clínicas de la enfermedad

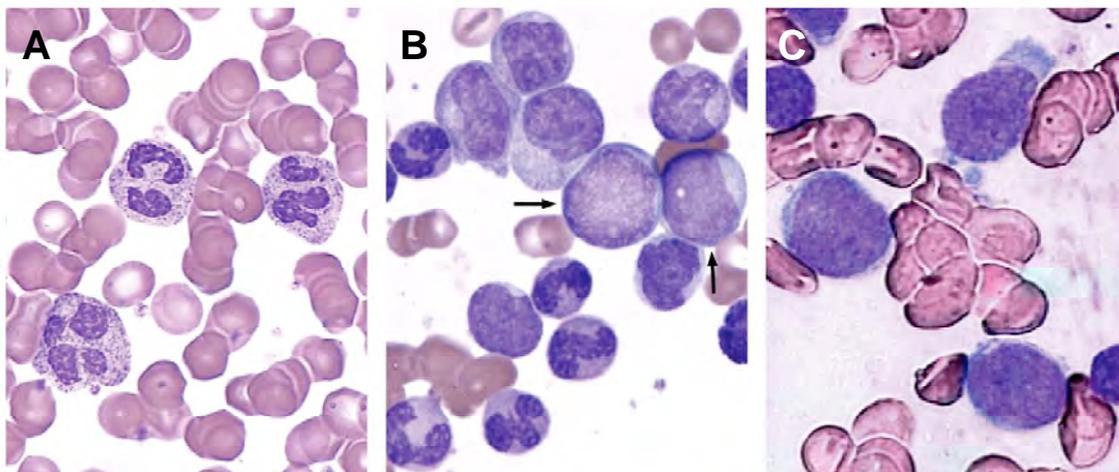
La Leucemia Mieloide Crónica es una enfermedad trifásica que se caracteriza por una expansión masiva de células del linaje granulocítico. Sin embargo, la mayoría de los linajes hematopoyéticos, si no todos, pueden diferenciarse a partir de la célula madre tumoral de la LCM.

Las tres fases clínicas que caracterizan a la LMC son (Melo & Barnes, 2007):

**-Fase crónica:** En esta fase todavía se producen granulocitos maduros, pero los pacientes presentan un elevado número de progenitores mieloides en la sangre periférica. Esta fase es en la que se diagnostica a la mayoría de los pacientes y puede durar entre 3 y 4 años. Entre los síntomas clínicos se encuentran: un aumento del tamaño del bazo, fatiga, pérdida de peso, leucocitosis ( $150 \times 10^6$  leucocitos/mL) predominantemente de neutrófilos en diferentes estadios de maduración, basofilia y eosinofilia. Los blastos suelen representar < 2% de los leucocitos totales. El recuento de plaquetas puede ser normal o estar incrementado.

La adquisición de nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas da lugar a la progresión a las siguientes fases de la enfermedad.

**-Fase de aceleración:** es un estadio intermedio en la evolución de la LMC en el que la enfermedad empieza a ser refractaria a la terapia. Suele durar entre 4 y 6 meses. Se caracteriza por un incremento en el tamaño del bazo y del número total de leucocitos. Los blastos representan entre un 10-19% del total de los leucocitos, los basófilos circulantes superan el 20%, hay una trombocitopenia persistente y pueden aparecer nuevas alteraciones citogenéticas clonales.



**Figura 12. Fases de la Leucemia Mieloide Crónica.** **A.** La LMC causa la acumulación en la sangre de un número elevado de células de linaje mieloide que son neutrófilos casi completamente diferenciados (células moradas con el núcleo trilobulado). Las células rosas de la figura son eritrocitos. **B.** Cuando la enfermedad progresa a una fase acelerada, estos neutrófilos son sustituidos progresivamente por unas células menos diferenciadas (marcadas con flechas). **C.** Finalmente esta fase acelerada desemboca en una crisis blástica en la que la sangre periférica contiene un gran número de células blásticas indiferenciadas. Adaptado de “The Biology of Cancer” (Weinberg, 2007).

**-Crisis blástica:** Es el estadio final de la LMC que puede, o no, ir precedido por la fase de aceleración y suele durar pocos meses. Esta fase se caracteriza por un bloqueo en la diferenciación celular hematopoyética, lo que da lugar a la acumulación de células blásticas mieloides o linfoides en la sangre periférica y médula ósea (más del 20%), y/o a la presencia de infiltrados extramedulares de células blásticas y/o a la presencia de grupos de blastos en secciones de la médula ósea. Los pacientes experimentan un empeoramiento de su estado y síntomas como trombocitopenia, anemia y un gran aumento del tamaño del bazo.

### 3.3. Otras alteraciones genéticas

Estudios clínicos y de laboratorio indican que la proteína de fusión BCR-ABL es esencial para la iniciación, mantenimiento y progresión de la LMC, pero el paso de la fase crónica a la fase blástica necesita de nuevas alteraciones genéticas o epigenéticas. Se cree que estas mutaciones secundarias se acumulan tanto en las células *stem* como en los progenitores de los clones leucémicos, hasta que son suficientes para orquestar la transición a la fase blástica. Entre estas alteraciones adicionales se encuentran una aumentada inestabilidad genómica a través de la interferencia con proteínas de vigilancia y reparación del ADN, y un progresivo acortamiento de los telómeros. En la fase crónica, las proteínas supresoras tumorales permanecen funcionales y permiten

a las células entrar en apoptosis o senescencia. Sin embargo, en fases avanzadas de crisis blástica hay evidencias de que esta función supresora tumoral se ha perdido en las células leucémicas (Melo & Barnes, 2007).

Entre los cambios genéticos encontrados en células leucémicas aisladas de pacientes en la fase blástica de LMC se incluyen mutaciones en *TP53*, *RB* y *CDKN2A* (también conocido como p16<sup>INK4A</sup>) y la sobreexpresión de genes como *EVI1* y *MYC*.

Entre el 60 y el 80% de los pacientes desarrollan alteraciones cromosómicas adicionales no aleatorias en las que se encuentran implicados los cromosomas 8, 17, 19 y 22 siendo las más frecuentes la duplicación del cromosoma Ph (38%) o la trisomía del cromosoma 8 (34%) (Calabretta & Perrotti, 2004). Entre las translocaciones cromosómicas adicionales más frecuentes se encuentran t(3;21)(q26;q22) la cual genera la fusión AML1-EVI1, t(8;21)(q22;q22) con la fusión AML1-ETO, t(7;11)(p15;p15) con la fusión NUP98-HOXA9 y inv(16)(p13;q22) con la fusión CBFβ-SMMHC (Ren, 2005).

**Tabla 2. Características de la evolución de la LMC (Melo & Barnes, 2007).**

Característica Afectada	Genes Implicados
Bloqueo de la diferenciación	CEBPα
	HNRNPE2
	NUP98-HOXA9
	AML1-EVI1
Fallo en la vigilancia genómica	ATR
	BRCA1
Deficiencias en la reparación del ADN	DNA-PKcs
	RAD51
	FANCD2
	WRN
	XPB
Fenotipo mutador (Alteración de la estabilidad genómica)	POLB (DNA polimerasa β)
	MLH1, PMS2
Acortamiento de los telómeros	TERT
Pérdida de función supresora tumoral	PP2A
	TP53
	CDKN2A
	INK4A
	ARF
	RB1

La pérdida de la función del gen supresor p53, principalmente por mutaciones inactivadoras o deleciones del gen, se ha encontrado en hasta un 30% de los casos de crisis blástica (ninguna con un fenotipo linfoide, sino principalmente mieloide y en una minoría con fenotipo mixto), pero nunca en la fase crónica de la LMC (Ahuja *et al*, 1989; Feinstein *et al*, 1991). Es más, en algunos pacientes con crisis blástica mieloide sin mutaciones en p53, la pérdida funcional de p53 podría ser debida a un incremento en la degradación de la proteína debido a la activación post-traducciona (Goetz *et al*, 2001) y/o traducciona (Trotta *et al*, 2003), dependiente de BCR-ABL, de su inhibidor MDM2.

La deleción homocigótica del locus CDKN2A ocurre en un porcentaje significativo de los casos (29-50%) de crisis blástica linfoide, pero no de fenotipo mieloide (Sill *et al*, 1995; Hernandez-Boluda *et al*, 2003). Este locus codifica dos proteínas supresoras tumorales INK4A y ARF. Mutaciones de pérdida de función en ARF no se encuentran en la mayoría de los cánceres humanos, como ocurre con las que afectan a INK4A, aunque sí se han descrito en cáncer de colon, melanoma familiar y astrocitoma (Kim *et al*, 2006). Se ha sugerido que el locus CDKN2A puede estar transcripcionalmente silenciado por metilación de su promotor en fases avanzadas de LMC de origen linfoide (Nagy *et al*, 2003), aunque esto es controvertido (Hernandez-Boluda *et al*, 2003). Las razones por las que alteraciones en genes supresores individuales afectan preferentemente a linajes específicos son todavía desconocidas (Melo & Barnes, 2007).

### 3.4. Terapia de la LMC

La única terapia curativa conocida para la LMC es el trasplante alogénico de células madre. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no son susceptibles de recibir este tratamiento debido a su avanzada edad o a la falta de un donante compatible. El descubrimiento de que el oncogén BCR-ABL es necesario para la patogénesis de la LMC y de que la actividad tirosina kinasa de ABL es esencial para la transformación mediada por BCR-ABL han convertido a la tirosina ABL en una diana muy atractiva para la intervención terapéutica. Así, se ha encontrado un compuesto, el imatinib mesilato (también conocido como Glivec, STI571 y CGP 57148), que es un potente inhibidor de las tirosina kinasas ABL, ARG, el receptor de PDGF y KIT. Se ha visto que el imatinib induce una apoptosis selectiva de las células BCR-ABL<sup>+</sup> y ha sido exitoso en el tratamiento de pacientes con LMC (Druker *et al*, 2002).

En pacientes diagnosticados con LMC en fase crónica, el imatinib induce una respuesta citogenética completa (las células mononucleadas de la médula ósea son negativas para t(9;22)(q34;q11) determinado por análisis citogenético o por FISH) en más del 80% de los casos. Los pacientes en fases más avanzadas de la enfermedad también responden al imatinib, pero esto ocurre mucho menos frecuentemente y el tiempo de remisión suele ser de menor duración (Druker *et al*, 2002).

Sin embargo, hay dos inconvenientes principales en la terapia con imatinib. Uno es la persistencia de células BCR-ABL<sup>+</sup>, lo que se conoce como enfermedad residual. El otro problema es la recaída en la enfermedad debido a la aparición de células resistentes al imatinib. Existen numerosos mecanismos de adquisición de resistencia, siendo el más frecuente la aparición de mutaciones puntuales en el gen *BCR-ABL* que disminuyen la unión de la droga a su diana (Ren, 2005)

El hecho de que la resistencia a imatinib va asociada frecuentemente a mutaciones puntuales en el dominio quinasa de BCR-ABL, demuestra la importancia de esta actividad en la patogénesis de la LMC. Por otra parte la persistencia de células BCR-ABL<sup>+</sup> en los pacientes tratados con imatinib indica que la inhibición de la actividad tirosina quinasa de ABL no es suficiente para la completa erradicación de las células leucémicas. Una de las posibles razones de que el imatinib no elimine todas las células leucémicas y que éstas, pasado el tiempo hagan al paciente recaer en la enfermedad, es que las células más resistentes al tratamiento sean células madre tumorales o CSCs. De esta forma estas pocas células supervivientes tendrían la capacidad de volver a generar el tumor con células maduras resistentes al imatinib (Graham *et al*, 2002; Hu *et al*, 2006; Primo *et al*, 2006; Jiang *et al*, 2007).

La identificación de otros componentes esenciales adicionales en la patogénesis de la LMC será crucial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

### 3.5. Modelos de estudio de LMC

Existen numerosos modelos *in vivo* que pretenden mimetizar la LMC humana originada por la expresión de la fusión génica BCR-ABL.

El modelo más común de enfermedad inducida por BCR-ABL consiste en el trasplante de células primarias de médula ósea de ratones tratados con 5-fluoracilo (5-FU) y transducidas con un retrovirus portador de la secuencia de BCR-ABL. Las células transducidas expresan altos niveles de BCR-ABL e inducen rápidamente un desorden mieloproliferativo letal, lo que lo excluye como un buen modelo para el estudio de la progresión de la enfermedad (Pear *et al*, 1998).

En un intento de generar un modelo de enfermedad endógena se han creado numerosos animales transgénicos en los que las fusiones p190 y p210 se han colocado bajo el control de diferentes promotores (Tabla 3).

Uno de estas aproximaciones utiliza el *enhancer*/promotor de la metalotioneína (MT). Las líneas transgénicas MT/p190BCR-ABL desarrollan Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (B-ALL) con infiltración de los órganos hematopoiéticos por linfoblastos pre-B (Voncken *et al*, 1992; Heisterkamp *et al*, 1990). Sin embargo, los ratones transgénicos

MT/p210BCR-ABL desarrollan Leucemia de células B o T y mucho menos frecuente un fenotipo mieloide tras una latencia de 8 a 44 semanas (Honda *et al*, 1995).

Otra estrategia es la generación de ratones transgénicos de BCR-ABL utilizando el promotor *Tec*. (Honda *et al*, 1998). El gen *Tec* codifica una tirosina kinasa citoplasmática involucrada en el control de la supervivencia y diferenciación de células del sistema inmunológico incluyendo progenitores hematopoiéticos de la serie mieloide y megacariocítica. Los individuos fundadores *Tec/p210BCR-ABL* desarrollan una Leucemia de células T mientras que su progenie desarrolla un desorden mieloproliferativo caracterizado por un incremento de megacariocitos (y plaquetas) y granulocitos maduros.

Para estudiar si la LMC se puede iniciar en células que no sean *stem* se generó un modelo transgénico en el que la fusión p210BCR-ABL se encuentra bajo el control del promotor hMRP8 y por tanto se expresa únicamente en los progenitores mieloides y su progenie mielomonocítica. Estos animales desarrollan un desorden mieloproliferativo crónico pero no progresan a crisis blástica (Jaiswal *et al*, 2003).

También se han construido modelos BCR-ABL transgénicos inducibles. Huettner *et al* generaron un modelo en el que la expresión de p210BCR-ABL es inducida en ausencia de tetraciclina mediante el transactivador Tet controlado por el promotor MMTV (*Mouse Mammary Tumour Virus*). Estos ratones transgénicos desarrollan B-ALL en 8-24 días (Huettner *et al*, 2000).

En el mismo laboratorio se generó un modelo parecido en el que el transactivador Tet se encuentra bajo el control de los elementos reguladores del gen CD34 humano. Estos ratones mueren entre los 2 y 14 meses de edad con trombocitosis crónica, incremento en el número de megacariocitos en médula ósea y bazo y esplenomegalia acompañada de linfadenopatía en algunos casos (Huettner *et al*, 2003).

Mediante recombinación homóloga de la secuencia codificante p190BCR-ABL humana en el locus endógeno de *bcr* se generó un modelo *knock in*. A los 4 meses de edad, el 95% de los ratones quiméricos que expresan un alelo p190BCR-ABL desarrollan preB-ALL (Castellanos *et al*, 1997).

Ninguno de estos modelos de enfermedad inducida por la expresión de BCR-ABL mimetiza la LMC humana, por lo que el estudio de los mecanismos de evolución de la enfermedad necesita de la generación de nuevos modelos murinos.

**Tabla 3. Modelos murinos de LMC** (Adaptado de Calabretta & Perrotti, 2004).

Modelo	Promotor	Fusión BCR-ABL	Fenotipo	Referencia
TgMT-p190	MT	p190	B-ALL, Linfoma	Voncken et al, 1992 Heisterkamp et al, 1990
TgMT-p210	MT	p210	T-ALL, B-ALL, Leucemia mieloblástica	Voncken et al, 1998 Honda et al, 1995
TgTec-p210	Tec	p210	T-ALL, LMC	Honda et al, 1998
hMRP8p210BCR-ABL	hMRP8	p210	MPD	Jaiswal et al, 2003
TgMMTV-tTA + tet-p210	MMTV	p210	B-ALL	Huettner et al, 2000
TgCD34-tTA + tet-p210	CD34	p210	~LMC, Trombocitosis	Huettner et al, 2003
KI	bcr endógeno	p190	B-ALL	Castellanos et al, 1997
TgSca1-BCR-ABLp210	Sca1	p210	LMC	Perez-Caro et al, 2009

MPD: Desorden mieloproliferativo.

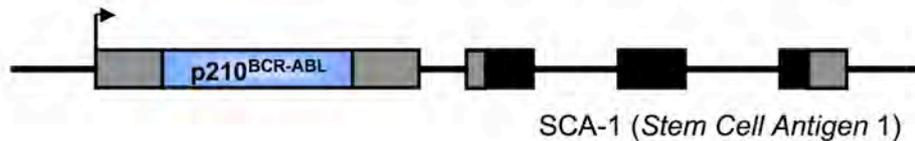
Los modelos de estudio de la LMC se han utilizado para estudiar la biología de la enfermedad e intentar conocer los mecanismos moleculares implicados en la progresión de la misma, así como para validar posibles estrategias terapéuticas.

Debido a que la pérdida de la funcionalidad de p53 es la alteración secundaria más frecuente en pacientes con LMC, se ha estudiado la implicación de esta pérdida en el pronóstico y respuesta a terapia de la LMC (Wendel et al, 2006; Honda et al, 2000). Ya que los agentes quimioterapéuticos convencionales explotan las vías de señalización de p53 para llevar a cabo sus efectos antitumorales, las mutaciones adquiridas en p53 y su ruta durante la tumorigénesis podrían estar causando la resistencia a estas drogas como consecuencia de la evolución tumoral (Schmitt et al, 2002). Esto se ha puesto de manifiesto en trabajos con modelos animales, en los que también se demuestra que p53 contribuye a la dependencia de las células cancerígenas de la expresión continuada del oncogén iniciador, de tal forma que la pérdida de p53 atenúa la respuesta celular a la inactivación del oncogén. (Wendel et al, 2006).

### 3.5. El modelo Sca1-BCR-ABLp210

Numerosas vías de señalización están activas en las células leucémicas BCR-ABL<sup>+</sup>. La mayoría fueron descubiertas en estudios *in vitro*. Pero el desarrollo de LMC es un proceso complejo en el que participan no sólo vías de señalización mediadas por BCR-ABL sino también factores proporcionados por la célula hospedadora y otros componentes del entorno *in vivo*. Por eso, es importante la identificación y validación de potenciales dianas terapéuticas implicadas en el desarrollo de la leucemia, en modelos *in vivo*.

El ratón Sca1-BCR-ABLp210 es un modelo murino transgénico que mimetiza la LMC humana (Perez-Caro *et al*, 2009). En él, el promotor Ly-6E.1 (Sca1) (Miles *et al*, 1997) se utiliza para dirigir la expresión del oncogén p210BCR-ABL humano en el compartimento de las células Sca1<sup>+</sup> en ratones C57BL/6.



**Figura 13. Esquema del transgén utilizado para la generación del modelo Sca1-BCR-ABLp210.** En este vector, la secuencia codificante de la fusión génica humana p210BCR-ABL (representada en un cuadro azul) está bajo el control del *locus control region* del gen Sca1. Los rectángulos representan los exones de Sca1, en negro la región codificante y en gris la no codificante. El sitio de inicio de la transcripción se indica con una flecha.

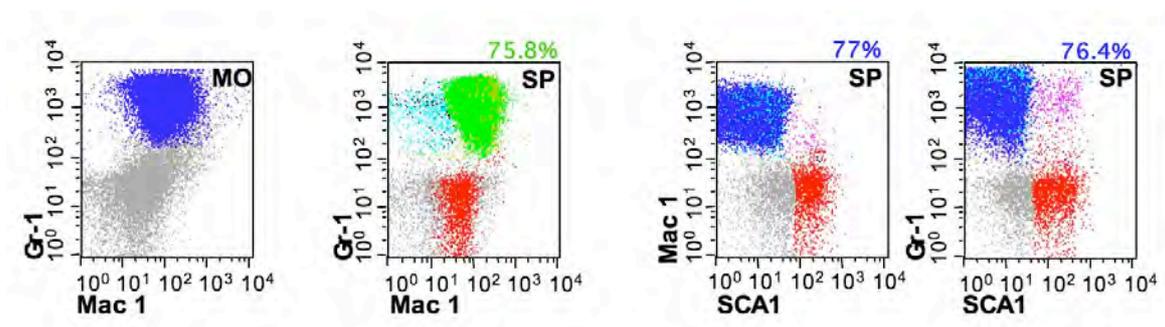
**Sca-1** (*stem cell antigen 1*, Ly-6A/E): Es una proteína de 18 kDa anclada a la membrana mediante fosfatidilinositol que es un miembro de la familia de antígenos Ly-6. Sca-1 es el marcador de HSCs más utilizado en ratón con ambos haplotipos de Ly6, debido a que se expresa en las HSCs multipotentes. Es frecuente la utilización de anticuerpos anti-Sca1 en combinación con la selección negativa de la expresión de diferentes marcadores de superficie característicos de células diferenciadas de los múltiples linajes hematopoyéticos (Lin<sup>-</sup>) para la identificación y aislamiento de HSCs. Las HSCs Sca1<sup>+</sup> pueden encontrarse en el hígado fetal y la médula ósea, la sangre periférica y el bazo del animal adulto.

Se sabe que este promotor tiene expresión heterogénea en las células madre hematopoyéticas (HSCs) de forma que la expresión del transgén está restringida a un porcentaje limitado de las células Sca1<sup>+</sup> (25-50%) (Miles *et al*, 1997). Esto permite que la transformación celular ocurra de una manera similar a lo que sucede en la enfermedad humana, donde las células que expresan el oncogén conviven con células que no lo expresan.

Los animales que sobreexpresan p210BCR-ABL tienen una gestación normal y son perfectamente viables. Los ratones Sca1-BCR-ABLp210 muestran las siguientes características fenotípicas:

-Aumento significativo del número de leucocitos totales (WBCs) y del porcentaje de neutrófilos en la sangre periférica.

-Aumento significativo del número de células positivas para marcadores de superficie mieloides como Gr1 y Mac1 en la médula ósea y sangre periférica, llegando a valores entre el 75-90% de las células de la médula ósea de estos animales. Sin embargo, el porcentaje de células Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> en la médula ósea no se incrementa de forma similar a lo que ocurre en la LMC humana (Jamieson *et al*, 2004) (Figura 14).



**Figura 14. Presencia de células mieloides en sangre periférica y médula ósea en ratones Sca1-BCR-ABLp210.** En la figura se muestran imágenes de un análisis por citometría de flujo de suspensiones celulares de sangre periférica y médula ósea. Se puede observar que hay una gran expansión de las células mieloides (~75%) en ambos tejidos. Sin embargo, este conjunto de células que forman la masa tumoral no son Sca1<sup>+</sup>, a pesar de ser en esta población donde se expresa en oncogén p210BCR-ABL introducido por transgénesis. MO: médula ósea, SP: sangre periférica. Imagen cedida por el Dr. Isidro Sánchez-García.

-El análisis macroscópico de estos ratones muestra esplenomegalia y hepatomegalia en el 79% de los animales. El examen histológico del bazo y del hígado muestra la presencia de megacariocitos en estos órganos, como marcadores de metaplasia mieloides, y expansión de la pulpa roja del bazo predominantemente por células mieloides.

-Infiltración de células mieloides en hígado, ganglios linfáticos y pulmón. La principal causa de muerte de los animales con esta enfermedad es la infiltración de órganos extramedulares y el fallo renal (30%), o la progresión a crisis blástica (70%).

-En los tejidos no hematopoyéticos la expresión del oncogén en las células Sca1<sup>+</sup> da lugar a la aparición de carcinomas (10% de los animales: adenocarcinoma de pulmón, 3%; hepatocarcinoma, 2%; GIST, 2%; osteosarcoma y 2%: tumor de células de Sertoli).

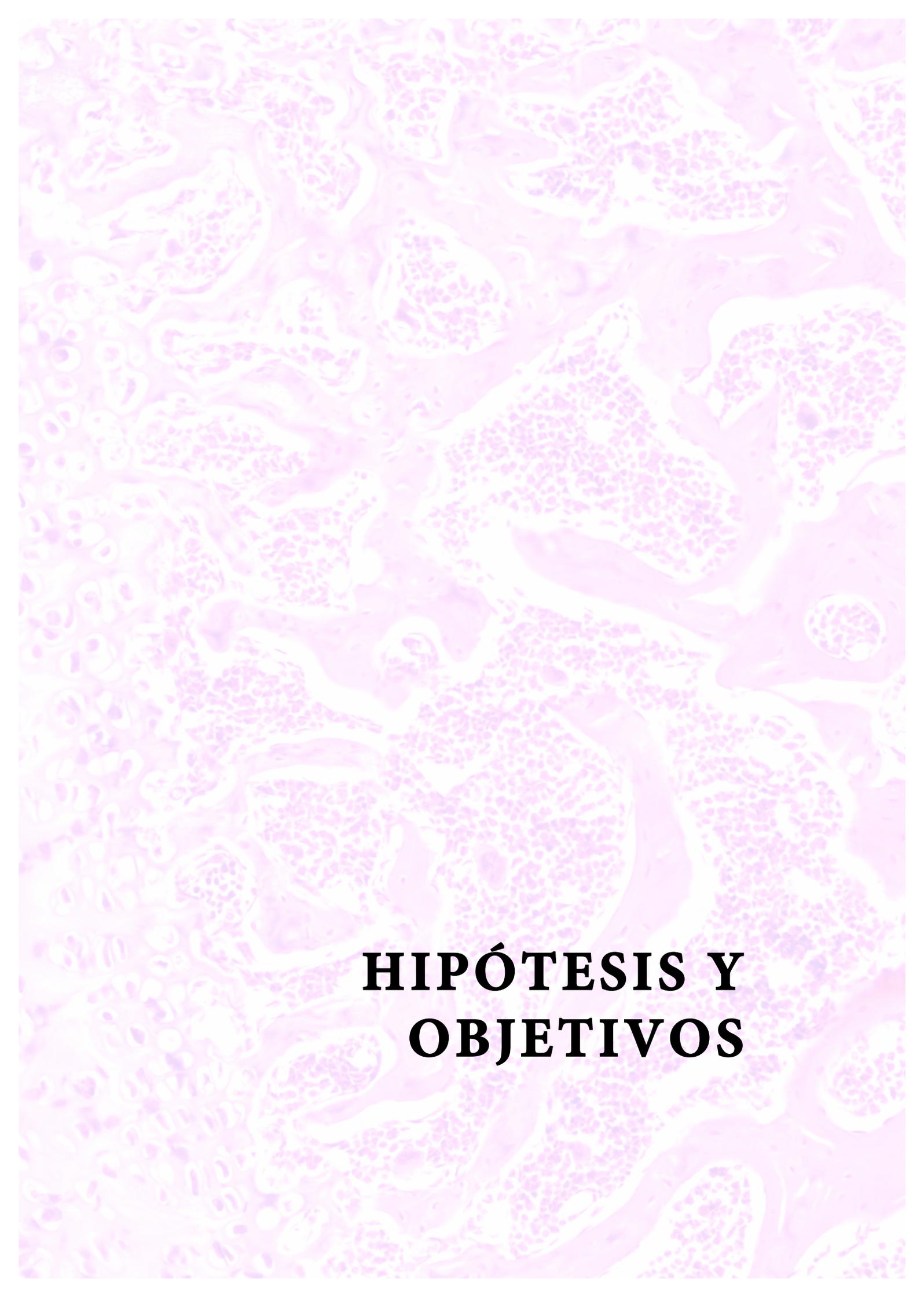
-La supervivencia de los ratones Sca1-BCR-ABLp210 oscila entre los 4 y los 18 meses. Los ratones que sobreviven a la infiltración extramedular progresan espontáneamente a crisis blástica, caracterizada por la aparición de blastos (mieloides o linfoides) en sangre periférica, médula ósea, bazo e hígado. De forma similar a la enfermedad humana esta fase aparece en el contexto de una enfermedad mieloproliferativa.

-El tiempo de transición de la fase crónica a la crisis blástica se reduce con el incremento de los niveles de p210BCR-ABL en las células leucémicas en humanos (Melo & Barnes, 2007; Modi *et al*, 2007). De forma similar cuando se generan ratones transgénicos con una dosis doble del oncogén p210BCR-ABL, la leucemia es detectada a la edad de 1-2 meses.

De esta forma la expresión limitada de p210BCR-ABL en las células Sca1<sup>+</sup> es capaz de reproducir la LMC humana caracterizada también por la progresión de una fase crónica a una fase aguda (crisis blástica), la cual es también invariablemente fatal en los ratones Sca1-BCR-ABLp210 y es dependiente de la dosis de la expresión del oncogén en las células Sca1<sup>+</sup>.

La progresión de la LMC en los ratones Sca1-BCR-ABLp210 no se ve alterada con el tratamiento con imatinib. Sin embargo, la progresión de la LMC por p210BCR-ABL se revierte con la eliminación específica de las células madre tumorales (CSCs) (Perez-Caro *et al*, 2009).

Este modelo demuestra por primera vez, que la expresión limitada de un oncogén en el compartimento de las células *stem* es todo lo que se necesita para reprogramar las células, dando lugar a un tumor completo, específico de este oncogén, con toda la diversidad celular madura que se genera a partir de él y que la eliminación de las CSCs es suficiente para erradicar el tumor completo (Perez-Caro *et al*, 2009).

The background of the slide is a microscopic image of biological tissue. It shows a complex arrangement of cells and structures. There are numerous small, dark, circular or oval structures scattered throughout, which could be nuclei or small cells. Some larger, more irregular, dark masses are also visible, possibly representing larger cellular structures or pathological changes. The overall appearance is that of a histological section stained with a dark dye, likely hematoxylin, against a lighter background.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

La utilización de ratones carentes del gen p53, p53 *knock out* (KO), ha sido muy útil para demostrar el papel esencial de este gen como supresor tumoral *in vivo* y para identificar interacciones entre las vías de p53 y otras lesiones oncogénicas. Sin embargo, una de las limitaciones de los KOs clásicos es que el gen está inactivado de forma constitutiva en todas las células del organismo. Un avance técnico en la manipulación genética de ratones lo constituye la generación de KOs específicos de tejido que utilizan el sistema Cre-loxP, expresando la recombinasa Cre bajo el control de un promotor específico del tejido de interés. Variaciones de este sistema, que utilizan fusiones Cre-ER o la regulación con tetraciclina, permiten controlar temporalmente la inactivación génica. Sin embargo, en todos estos modelos es imposible reactivar el gen una vez que se ha eliminado.

Un avance más para el estudio de p53 ha sido la generación de un modelo de ratón *knock in* (KI): p53ERTAM<sup>KI</sup>, que permite activar p53 de forma reversible en cualquier momento de la vida del animal. La utilización de este modelo permite el estudio de características de la función de p53 que hasta el momento no podían explorarse, como en qué fase de la formación de tumores la función de p53 ejerce su acción supresora tumoral, hasta qué momento del desarrollo de la enfermedad la restauración de su función provoca algún efecto y si estos periodos y los mecanismos de actuación son los mismos en los diferentes tipos de tumores. Para intentar responder a estas preguntas, hemos elegido el contexto de una lesión oncogénica concreta: p210BCR-ABL, causante de la Leucemia Mieloide Crónica. Partiendo de estas premisas los objetivos que se marcaron en este estudio fueron los siguientes:

- a) Caracterizar la cooperación entre la falta de función de p53 y el oncogén p210BCR-ABL en la progresión de la enfermedad causada por este estímulo oncogénico, en nuestro modelo p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210.
- b) Determinar el estadio de la enfermedad en que la restauración de la funcionalidad de p53 ofrece una oportunidad terapéutica frente a la Leucemia Mieloide Crónica.
- c) Determinar si la restauración de p53 modifica fenotípicamente a la enfermedad.
- d) Estudiar las bases de los procesos celulares y moleculares del potencial efecto terapéutico de la restauración de p53.



# **RESULTADOS**

## RESULTADOS

### 1. GENERACIÓN DE UNA COLONIA DE RATONES p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210

Uno de los objetivos de este trabajo es el estudio de la restauración de p53 en un tumor ya desarrollado. El gen p53 es un supresor tumoral que limita la expansión de las células tumorales y por ello se encuentra inactivado en el 50% de los tumores. Por lo tanto, es lógico pensar que la reintroducción de la función de p53 en un tumor existente podría ser una exitosa estrategia terapéutica. Para restaurar la función de p53 en este estudio utilizaremos el ratón modelo p53ERTAM<sup>KI</sup> (Christophorou *et al*, 2005), el cual expresa una proteína p53 cuya función puede ser “encendida” y “apagada” mediante la administración/retirada de 4-hidroxitamoxifén (4-OHT). Estos ratones, nulos para p53 en ausencia de 4-OHT, desarrollan de forma espontánea linfomas y sarcomas, pero en animales de edad avanzada. Para estudiar el efecto de la restauración de p53 en el contexto de un estímulo oncogénico, se cruzó este ratón con otro modelo murino que desarrolla un tumor hematológico: la Leucemia Mieloide Crónica. El modelo Sca1-BCR-ABLp210 (Perez-Caro *et al*, 2009) es un ratón transgénico que mimetiza la Leucemia Mieloide Crónica humana al expresar el oncogén p210BCR-ABL en el compartimento de las células Sca1<sup>+</sup>. La combinación de los modelos Sca1-BCR-ABLp210 y p53ERTAM<sup>KI</sup> da como resultado un modelo mixto que desarrolla la enfermedad y expresa una proteína p53 regulable.

Este trabajo se inició con el cruce de ratones de estos dos modelos. De este cruce se obtuvieron descendientes con 6 posibles genotipos: p53<sup>ER/ER</sup>; p210BCR-ABL, p53<sup>ER/+</sup>; p210BCR-ABL, p53<sup>+/+</sup>; p210BCR-ABL, p53<sup>ER/ER</sup>, p53<sup>ER/+</sup> y p53<sup>+/+</sup>, los cuales se determinaron por PCR y Southern blot.

### 2. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DE LA COLONIA p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210

Los individuos de los genotipos p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL y p53<sup>ER/+</sup>;p210BCR-ABL se siguieron para determinar si desarrollaban la misma enfermedad que los individuos p53<sup>+/+</sup>;p210BCR-ABL del modelo Sca1-BCR-ABLp210. Este modelo desarrolla una Leucemia Mieloide Crónica similar a la enfermedad humana caracterizada por: un aumento del número de leucocitos totales y neutrófilos en sangre periférica; un aumento significativo del número de células mieloides en médula ósea, hasta el 90%, sin aumentar el número de células Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, de forma similar a lo que ocurre en la LMC humana; esplenomegalia y hepatomegalia (79% de los animales); metaplasia mieloide

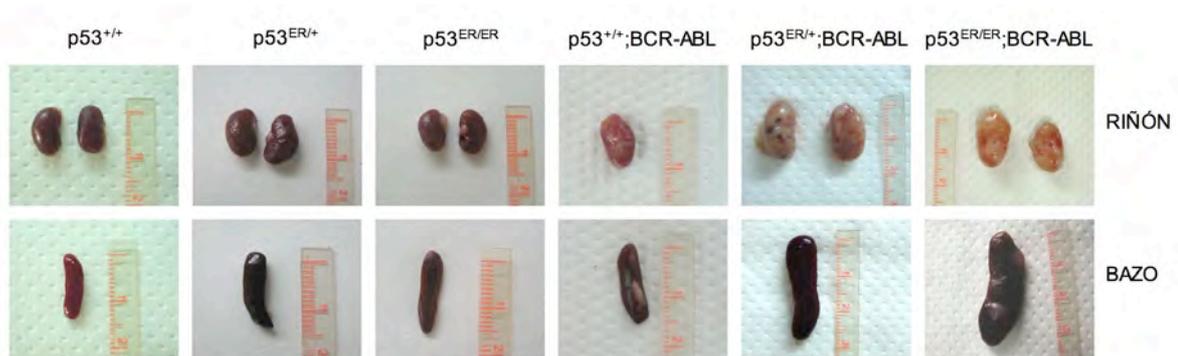
indentificada por la presencia de megacariocitos en bazo e hígado; expansión de la pulpa roja del bazo predominantemente por la acumulación de células mieloides granulosas; e infiltraciones de células mieloides en hígado, nódulos linfáticos y pulmón.

Para la determinación del fenotipo de la colonia mixta p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210 se sacrificaron animales de diferentes edades que visualmente tenían aspecto de estar enfermos: pelo erizado, menor tamaño que sus hermanos, caquexia, menor temperatura corporal, temblores al andar... De estos individuos se recogieron muestras de diversos órganos: corazón, timo, pulmón, hígado, riñón, bazo, páncreas, intestino, testículo u ovario y ganglios linfáticos, para su análisis anatómo-patológico. Las muestras del timo y bazo, así como de sangre periférica y médula ósea se examinaron, además, mediante citometría de flujo.

El estudio de los tejidos recogidos reveló:

**2.1. El análisis macroscópico de los tejidos muestra esplenomegalia, hepatomegalia, hidronefrosis, inflamación de los ganglios linfáticos e hiperplasia del timo.**

El análisis macroscópico de los órganos de los diferentes ratones nos muestra cinco hechos visualmente significativos: i) aumento del tamaño del bazo (en el 75% de los animales) indicando una esplenomegalia cuya grado se correlaciona con la combinación de las modificaciones genéticas de ambos modelos murinos, ii) acumulación de líquido en los riñones (hidronefrosis) (prácticamente en el 100% de los individuos) y desarrollo de carcinomas incipientes, existiendo también un progresivo empeoramiento con la acumulación de las modificaciones genéticas (Figura 15), iii) gran hiperplasia



**Figura 15. Aspecto macroscópico de riñones y bazo de los ratones enfermos.** Se muestran fotografías de los riñones y el bazo de un ratón p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL y otro p53<sup>ER/+</sup>;p210BCR-ABL sacrificados en estadios de enfermedad avanzados (7 meses de edad). Se muestran como controles los mismos órganos de cuatro ratones de genotipo: p53<sup>+/+</sup>, p53<sup>ER/+</sup>, p53<sup>ER/ER</sup> y p53<sup>+/+</sup>;p210BCR-ABL sacrificados a la misma edad. Se observa un progresivo empeoramiento del aspecto de los riñones y un aumento del tamaño del bazo desde los individuos sin el oncogén p210BCR-ABL (con o sin p53 funcional) a los individuos con el oncogén p210BCR-ABL y dos, uno o ningún alelo funcional de p53.

de los ganglios linfáticos, en especial de los nódulos inguinal, axilar y mesentérico; iv) gran aumento del tamaño del hígado y en ocasiones la adquisición de un aspecto “granulado” y de color más claro; v) mal aspecto de los pulmones con presencia de manchas oscuras y consistencia más débil (Figura 16).

En ocasiones también observamos un aumento del tamaño del timo en los ratones enfermos, a veces tan espectacular que el tamaño del timo superaba el del corazón (Figura 16).



**Figura 16. Aspecto macroscópico de pulmón, hígado, ganglios y timo de los ratones enfermos.** En la figura se muestran fotografías de los órganos de un ratón enfermo ( $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$ ) junto con los de un ratón sano ( $p53^{+/+}$ ). Se puede apreciar el incremento en el tamaño de hígado, ganglios y timo en el animal enfermo, así como un peor aspecto externo de los pulmones.

## 2.2. El estudio anatómo-patológico de los tejidos muestra una gran infiltración de células hematológicas, en diferentes grados de diferenciación, en su mayoría de linaje mielóide, principalmente en hígado, bazo, pulmón y riñón.

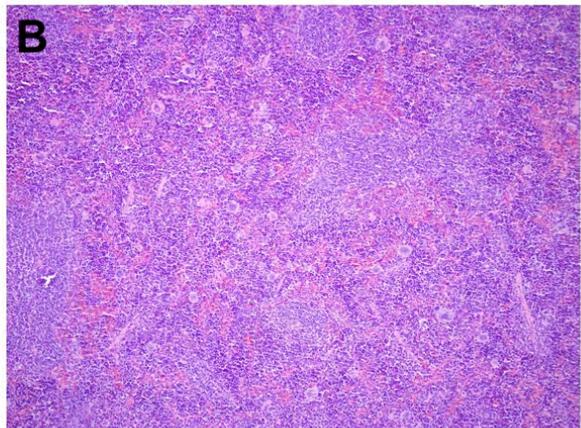
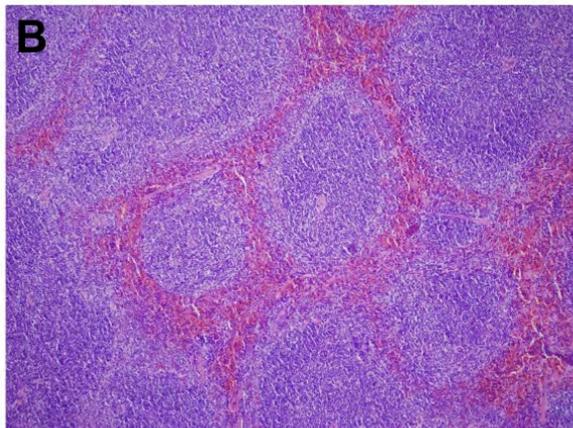
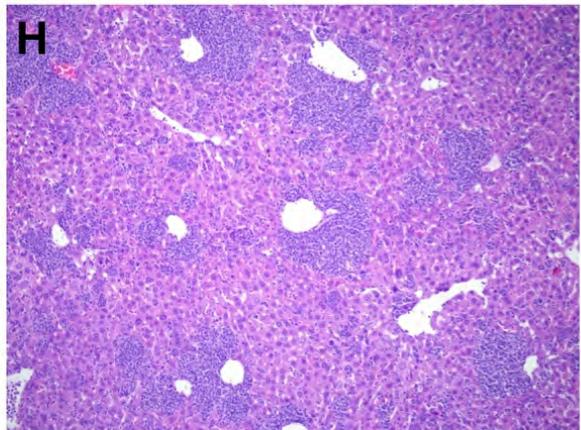
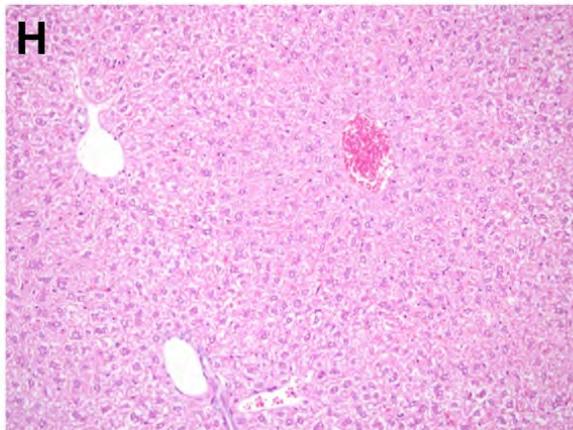
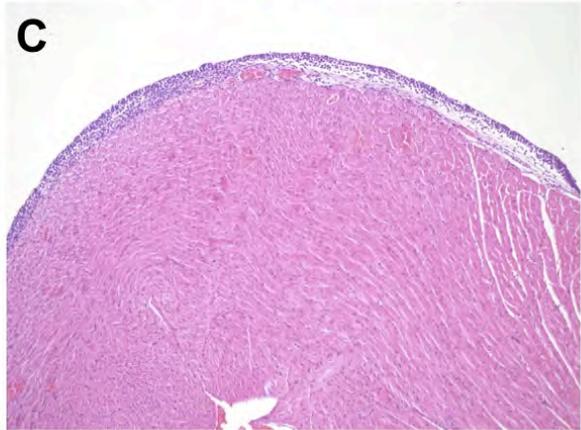
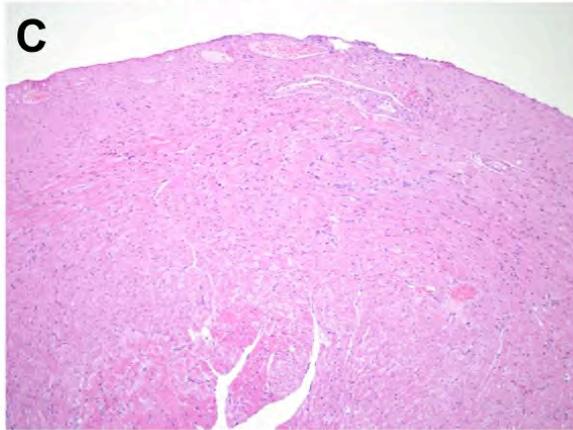
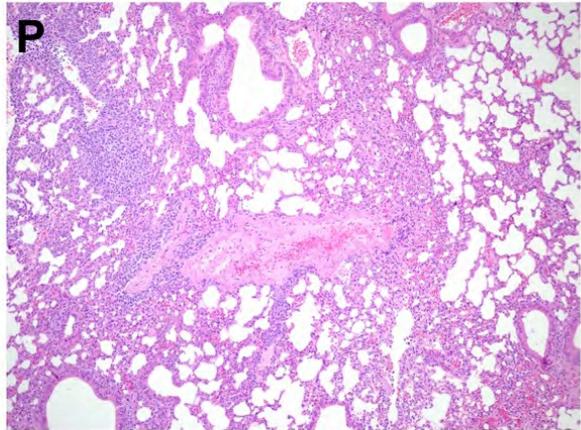
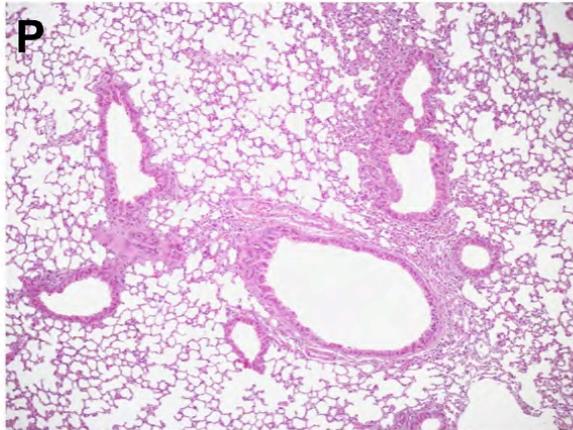
Las muestras recogidas de los diferentes tejidos fueron procesadas para su estudio anatómo-patológico. El estudio microscópico de las muestras reveló el desarrollo de diferentes tipos de neoplasias hematológicas. Se diagnosticaron tumores hematológicos tanto mieloides como linfoides con diferentes grados de diferenciación. Encontramos así tumores con alto grado de diferenciación de las células infiltrantes, lo que permitía su clasificación en mieloides o linfoides, así como tumores más blásticos y por tanto en un estadio más avanzado y más agresivo de la enfermedad. En estos tumores era frecuente la presencia de células blásticas en mitosis en los órganos afectados.

Muchos de estas neoplasias hematológicas pudieron ser clasificadas como Leucemia Mielóide Crónica por la diferenciación y la localización de las células malignas infiltrantes, principalmente células de diferenciación mielóide en sinusoides y espacios porta del hígado (en el 60% de los animales analizados). En algunos casos, incluso se puede observar la presencia de megacariocitos en el hígado (metaplasia mielóide) indicando hematopoyesis extramedular y por tanto, fallo de la médula ósea. Otro de los síntomas de esta enfermedad descritos en los ratones Sca1-BCR-ABLp210 es la hiperplasia de la pulpa roja del bazo. De los animales enfermos analizados de este modelo se encontró que el 55% habían desarrollado hiperplasia de la pulpa roja por la infiltración de células mieloides con diferentes grados de maduración. En la figura 17 se muestra una serie de fotografías de los cortes analizados en las que se muestra la invasión de los órganos afectados por las células tumorales.

**Figura 17. Aspecto microscópico de los tejidos infiltrados.** Se muestran fotografías de cortes histológicos, teñidos con hematoxilina-eosina, de hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, intestino, páncreas y médula ósea infiltrados por las células leucémicas de individuos enfermos (columna de la derecha). Las fotografías de la izquierda muestran en comparación cortes histológicos de los mismos órganos de individuos sanos p53<sup>+/+</sup>. La primera serie de fotografías (páginas 55 y 56) muestra imágenes realizadas con el objetivo de 10 aumentos (10X) excepto las correspondientes al hígado que fueron realizadas con el objetivo de 20 aumentos (20X). Aquí se muestra la estructura del tejido y las zonas de infiltración de las células hematológicas. En la segunda serie de fotografías (páginas 57, 58 y 59) se muestran imágenes de los mismos órganos realizadas con el objetivo de 40 aumentos (40X). En los recuadros se muestran detalles de las fotografías aumentados entre 3 y 4 veces. En estas imágenes se pueden diferenciar las células infiltrantes así como su grado de maduración. Se muestran tres fotografías de infiltración del hígado al ser esta una característica definitoria de la LMC. Se muestra un hígado infiltrado por un tumor indiferenciado y con células en mitosis (H1), otro con un tumor diferenciado y claramente mielóide (H2) y la presencia de megacariocitos en el hígado indicando metaplasia mielóide (H3). P: pulmón, C: corazón, H: hígado, B: bazo, Pa: páncreas, I: intestino, R: riñón, MO: médula ósea, G: ganglio. Con una flecha negra están indicadas células con diferenciación mielóide; con una flecha roja se señalan células blásticas en mitosis; con una flecha azul, células blásticas y con una flecha verde los megacariocitos.

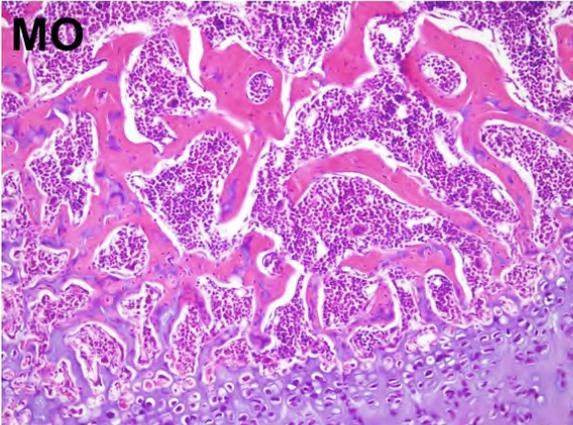
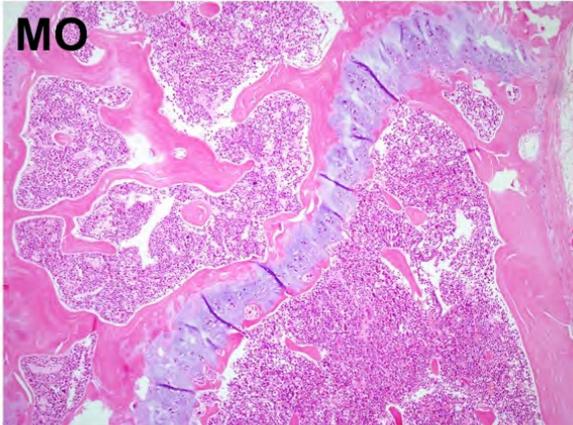
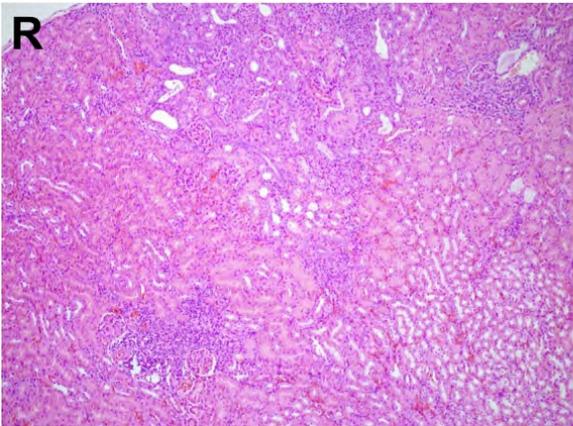
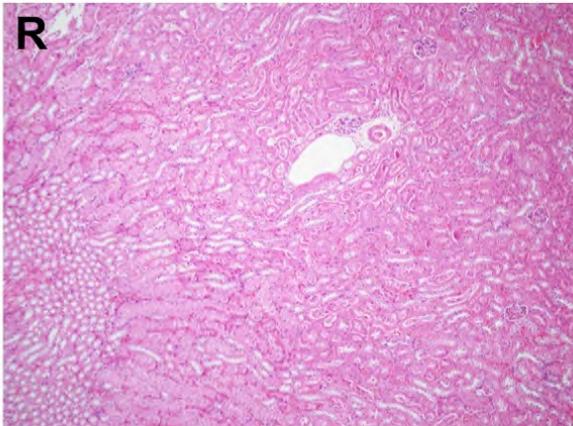
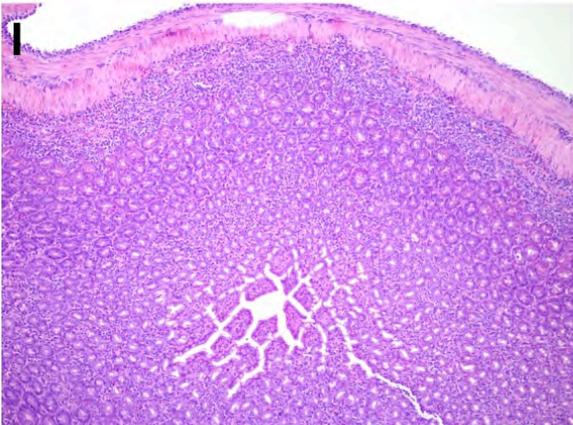
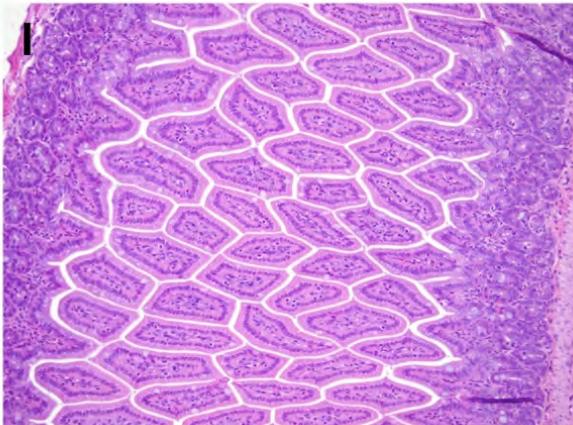
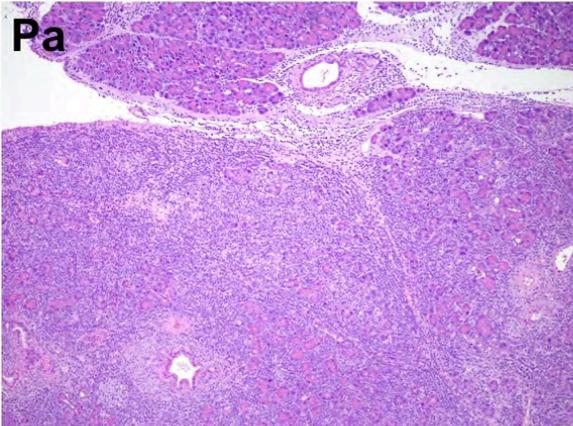
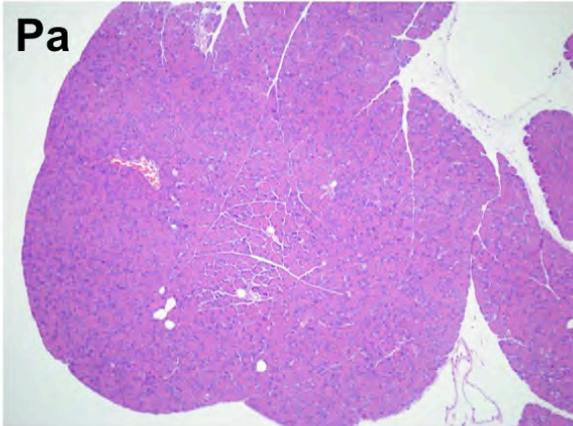
Ratón p53<sup>+/+</sup>

Ratón p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL



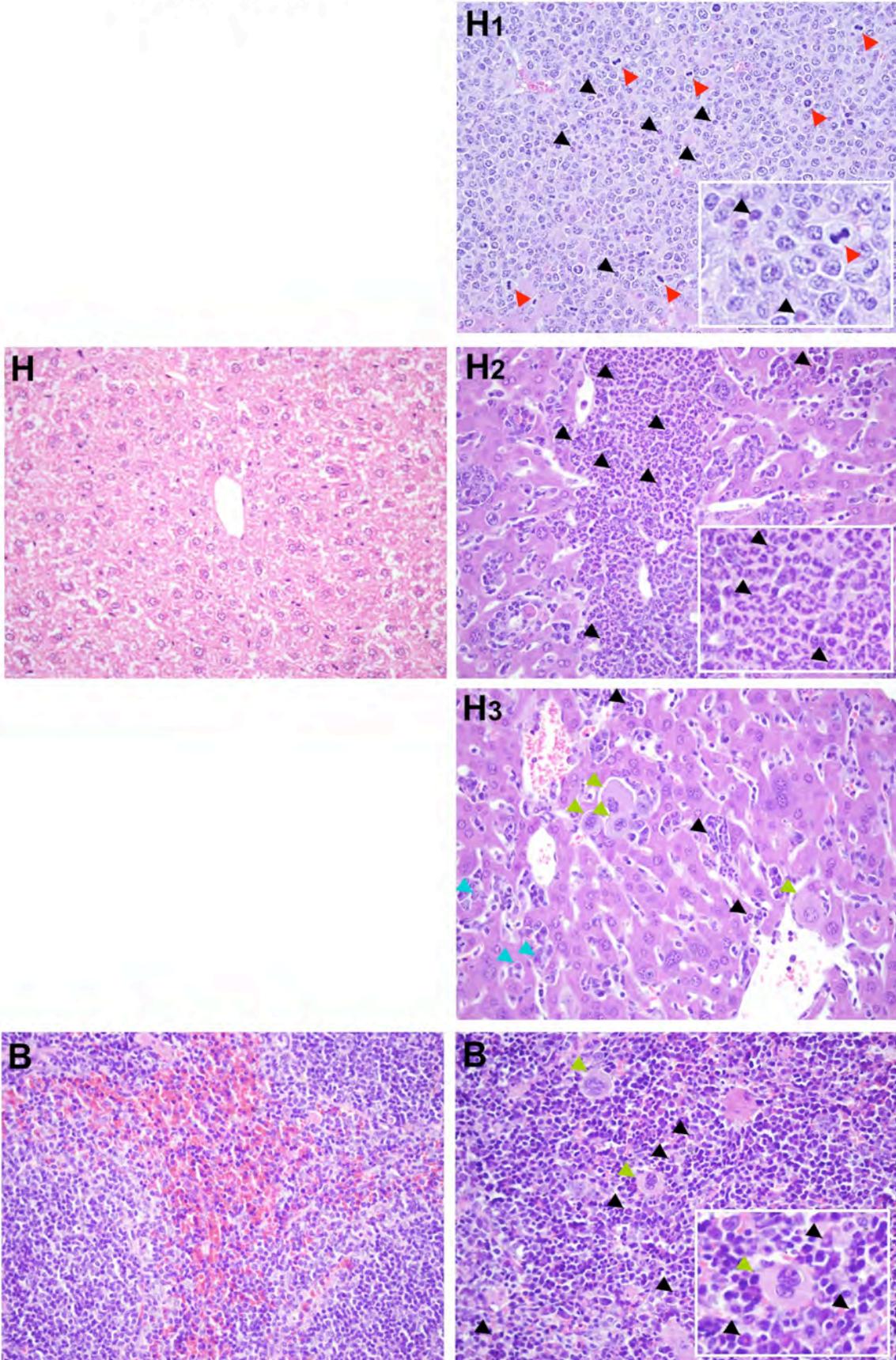
Ratón p53<sup>+/+</sup>

Ratón p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL

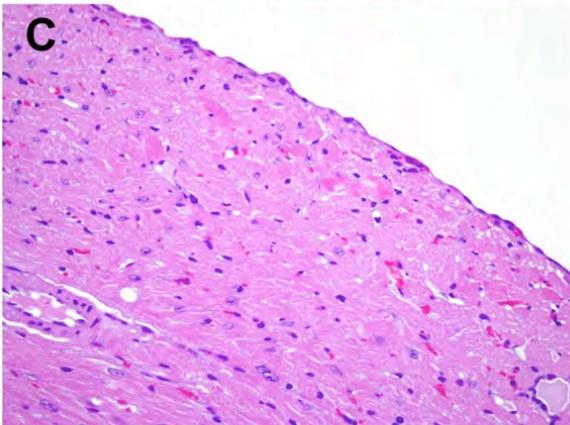
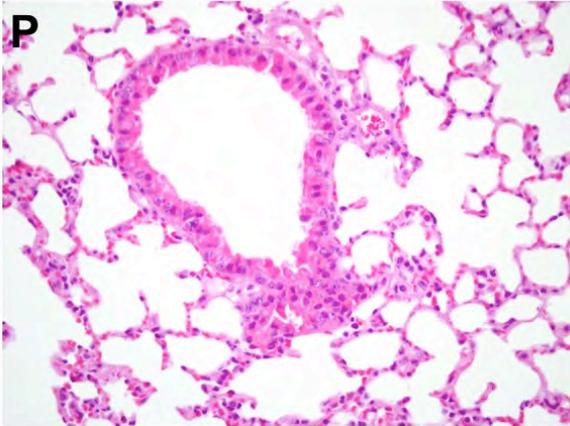


Ratón p53<sup>+/+</sup>

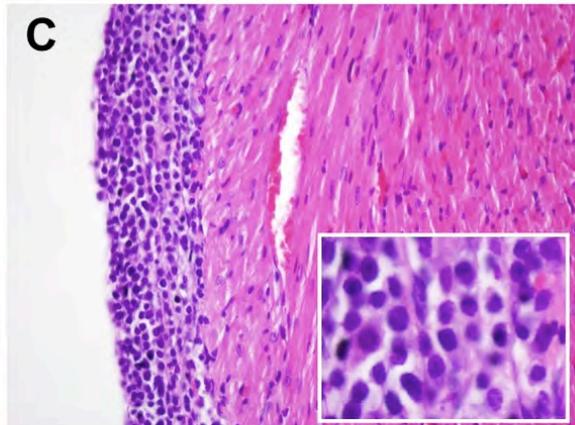
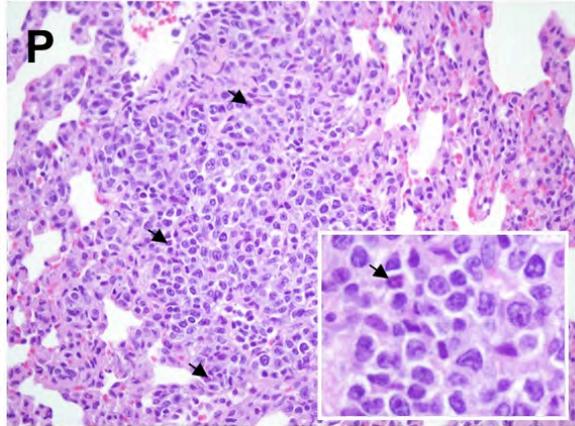
Ratón p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL



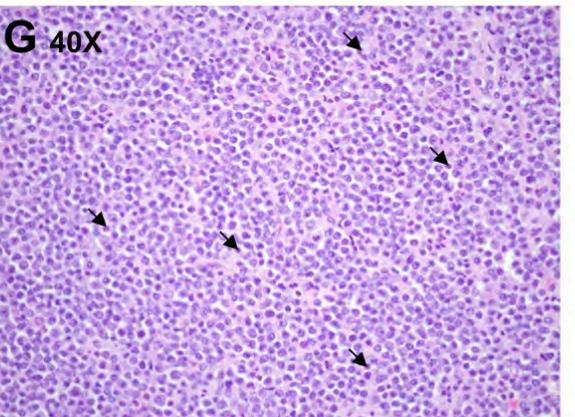
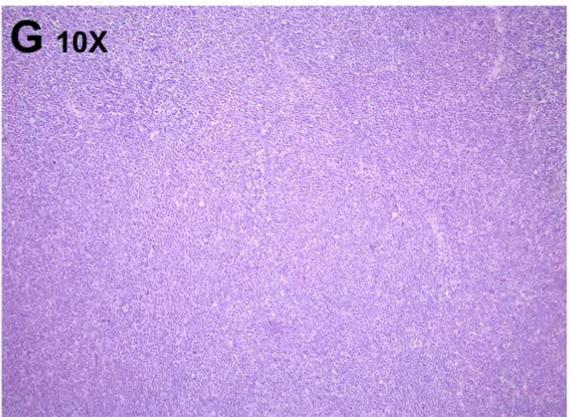
Ratón p53<sup>+/+</sup>



Ratón p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL

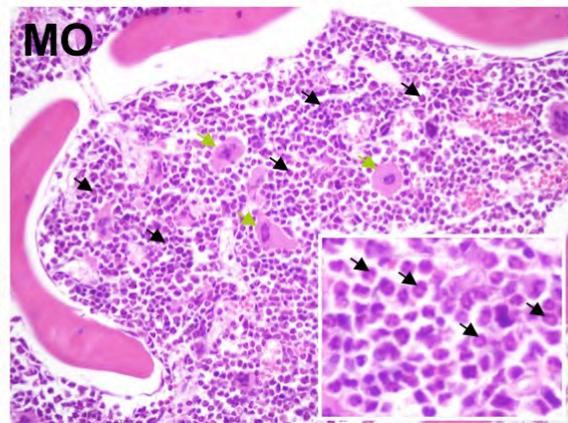
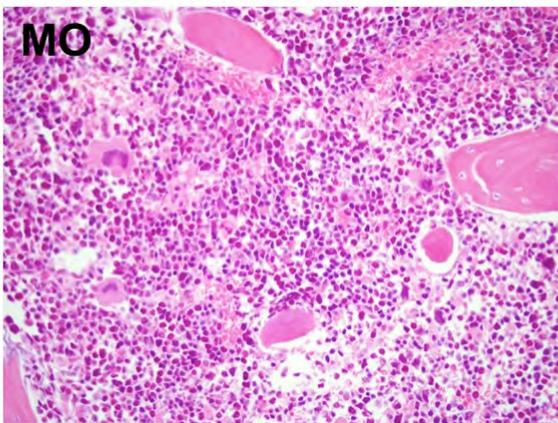
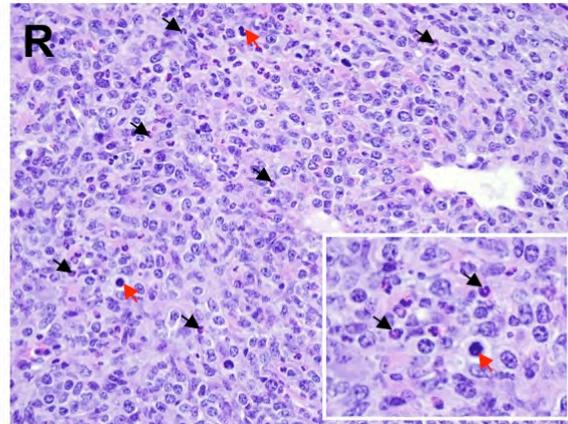
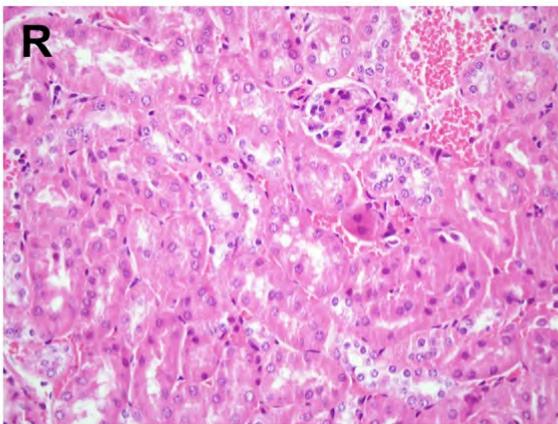
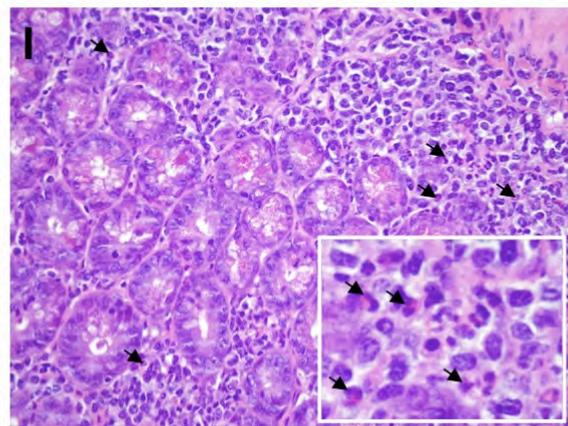
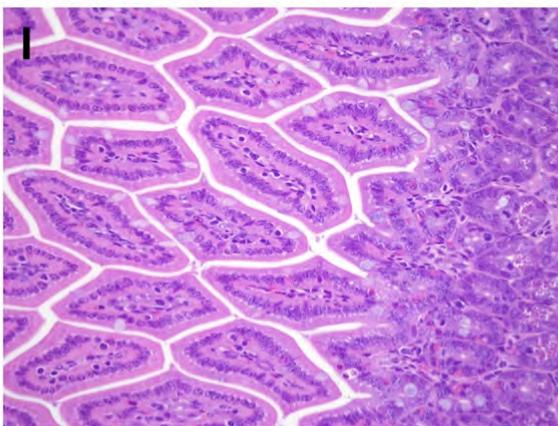
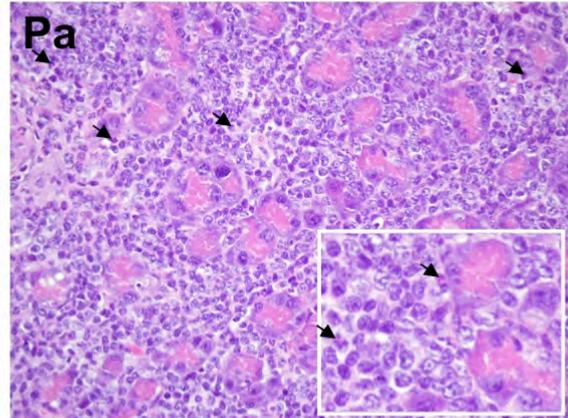
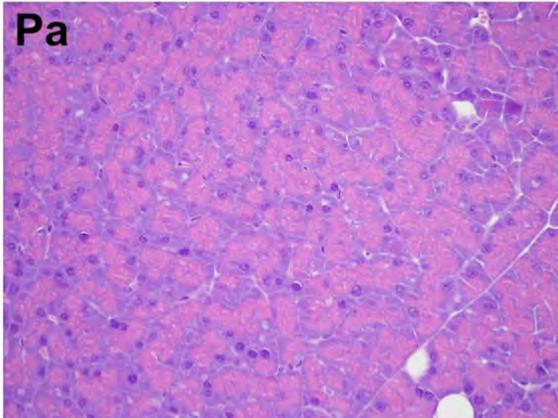


Ratón p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL



Ratón p53<sup>+/+</sup>

Ratón p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL



En casi todos los ratones analizados se observó infiltración de células hematológicas tumorales en pulmón, hígado, bazo, riñón y ganglios linfáticos. El 73% de los animales de genotipo p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL analizados muestran invasión del pulmón, el 66% de hígado, el 80% de bazo, el 73% de riñón y el 66% de los ganglios. Estas cifras varían un poco al compararlas con las correspondientes de ratones con un alelo normal de p53 (p53<sup>ER/+</sup>;p210BCR-ABL): 59%, 94%, 94%, 59% y 47%. Ratones con ambos alelos normales de p53 (p53<sup>+/+</sup>;p210BCR-ABL) sacrificados como controles a edades equivalentes muestran un estadio de enfermedad menos avanzado, presentando los siguientes porcentajes de infiltración en los diferentes tejidos analizados: 57%, 57%, 57%, 57% y 42%, respectivamente.

En la tabla 4 se muestran los diagnósticos anatomo-patológicos y sus respectivas frecuencias de los ratones analizados; en la tabla 5 se enumeran los tejidos infiltrados por las células hematológicas malignas en estos mismos ratones.

**Tabla 4. Diagnósticos anatomo-patológicos de los ratones enfermos.**

Genotipo	Número de ratones sacrificados	Diagnóstico	Afectados/Porcentaje
p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	(22 semanas)	Tumor Mieloide (LMC)	10 (9) 66,6% (60%)
		Tumor Linfoide	5 33%
		Carcinoma	1 6,6%
		Infiltración leve	1 6,6%
p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	(35 semanas)	Tumor Mieloide (LMC)	14 (5) 82% (29%)
		Sarcoma Mieloide	1 5,8%
		Linfoma	3 17,4%
		Infiltración leve	1 5,8%
p53 <sup>+/+</sup> ;p210BCR-ABL	(36 semanas)	Tumor Mieloide	3 43%
		Neoplasia Hematológica	1 14%
		Tumor Linfoide	1 14%
		Infiltración leve	3 43%

La edad media a la que estos ratones fueron sacrificados se indica entre paréntesis. El número de afectados indica el número de ratones cuyo diagnóstico fue el que se indica a la izquierda. El porcentaje está calculado en función del número de ratones analizados de cada genotipo. Algunos de los individuos analizados desarrollaron a la vez más de un tipo de tumor. En el anexo 1 se muestran los diagnósticos individuales de cada ratón analizado, así como la edad a la que fueron sacrificados.

**NEOPLASIA HEMATOLÓGICA:** Las neoplasias hematológicas son procesos malignos que afectan a las diversas células del sistema hematopoyético. Dentro de ellas, las neoplasias linfoides afectan a los distintos tipos celulares y grados madurativos que conforman la línea linfoide tanto B como T.

**SARCOMA MIELOIDE:** Masa tumoral extramedular de células mieloides. Puede preceder u ocurrir simultáneamente con una leucemia mieloides aguda o crónica, o con otros tipos de procesos mieloproliferativos o síndromes mielodisplásicos.

Tabla 5. Órganos infiltrados por las células leucémicas.

Genotipo	Número de ratones sacrificados	Tejidos Infiltrados	Afectados/Porcentaje	
p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	15 (22 semanas)	Timo	5	33%
		Pulmón	11	73%
		Corazón	3	20%
		Hígado	10	66%
		Bazo	12	80%
		Páncreas	4	27%
		Riñón	11	73%
		Intestino	2	13%
		Testículo/Ovario	2	13%
		Ganglios Linfáticos	10	66%
Médula	0			
p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	17 (35 semanas)	Timo	1	6%
		Pulmón	10	59%
		Corazón	0	
		Hígado	16	94%
		Bazo	16	94%
		Páncreas	1	6%
		Riñón	10	59%
		Intestino	2	12%
		Testículo/Ovario	0	
		Ganglios Linfáticos	8	47%
Médula	0			
p53 <sup>+/+</sup> ;p210BCR-ABL	7 (36 semanas)	Timo	1	14%
		Pulmón	4	57%
		Corazón	0	
		Hígado	4	57%
		Bazo	4	57%
		Páncreas	0	
		Riñón	4	57%
		Intestino	0	
		Testículo/Ovario	0	
		Ganglios Linfáticos	3	42%
Médula	0			

Entre paréntesis se indica la edad media a la que los ratones fueron sacrificados. El número de afectados indica el número de ratones en los que se encontró infiltración en el órgano correspondiente. El porcentaje está calculado en función del número de ratones analizados de cada genotipo.

### 2.3. El análisis por citometría de flujo revela un aumento de la población mielóide en sangre periférica en los animales p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL adelantado con respecto al experimentado por los animales p53<sup>+/+</sup>;p210BCR-ABL.

Se realizaron análisis por citometría de flujo de muestras de sangre periférica, timo, médula ósea y bazo de ratones sacrificados a los 2, 4 y 6 meses de edad (Figuras 18, 19 y 20); es decir, en estadios “pre-enfermedad” (2 meses), “enfermedad incipiente” (4 meses) y “enfermedad evidente” (6 meses) según el aspecto externo de los animales de los genotipos p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL y p53<sup>ER/+</sup>;p210BCR-ABL.

Los análisis de la sangre periférica mostraron un aumento de la población Gr1<sup>+</sup>Mac1<sup>+</sup> (serie mielóide) a lo largo del tiempo (de los 2 a los 6 meses), indicando una anormal proliferación de las células maduras del linaje mielóide en los ratones p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL. La sangre de los ratones p53<sup>ER/+</sup>;p210BCR-ABL muestra también este aumento de las células mieloides maduras pero en menor medida dentro de este rango de edades. Sin embargo, los ratones p53<sup>+/+</sup>;p210BCR-ABL de 6 meses de edad todavía no presentan esta acumulación de células Gr1<sup>+</sup>Mac1<sup>+</sup> en este fondo genético, acumulación que sí se describió en el modelo original Sca1-BCR-ABLP210.

Un efecto secundario de esta acumulación de células mieloides en sangre periférica es que las poblaciones linfoides tanto B (B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> y B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>) como T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) se ven disminuidas en relación inversa al aumento de la población mielóide.

**Gr-1:** El antígeno Gr-1 también llamado Ly-6G es una proteína integral de membrana unida a GPI, de 21-25 kDa. Gr-1 se expresa en las células de linaje mielóide de manera regulada a lo largo de su desarrollo. Mientras los monocitos sólo expresan Gr-1 de forma transitoria durante su maduración en la médula ósea, Gr-1 se encuentra siempre presente en los granulocitos de la médula y neutrófilos periféricos.

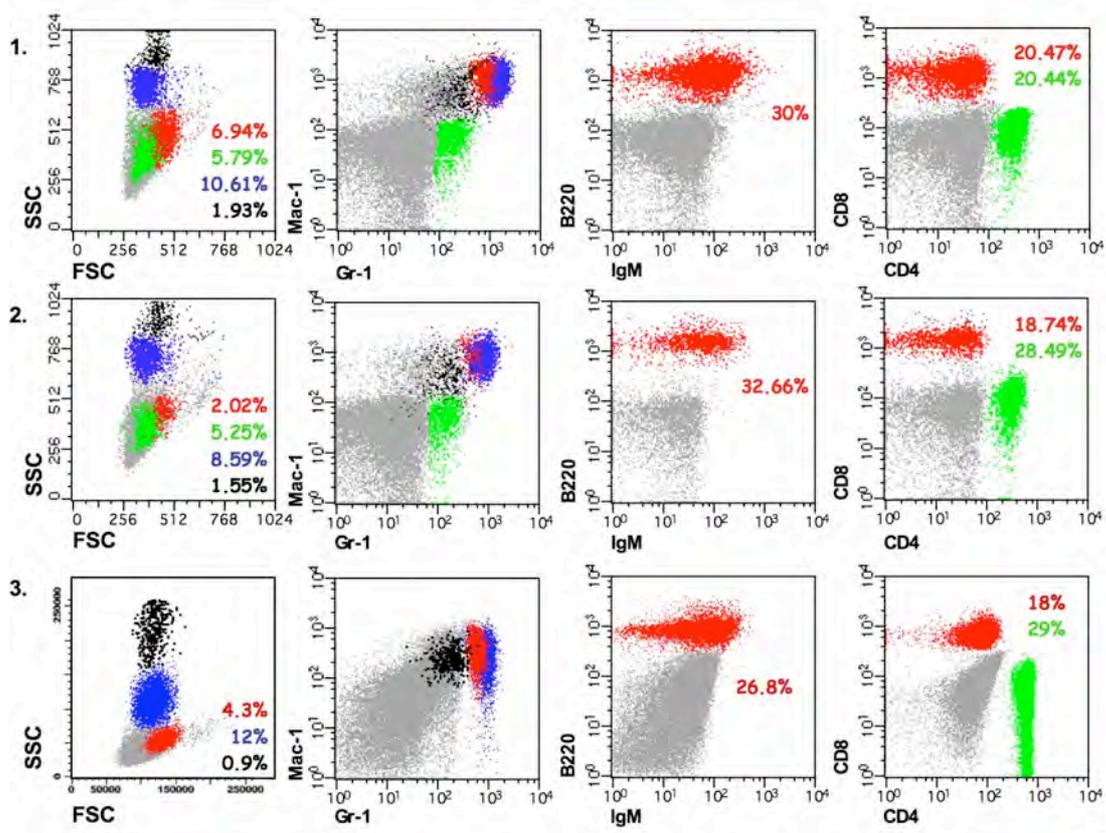
**Mac-1:** También llamado CD11b/CD18 o  $\alpha$ M $\beta$ 2, es un miembro de la familia de las integrinas que está involucrado en funciones de adhesión y migración de los leucocitos y que media en la unión de los PMNs (células polimorfonucleares) a las células endoteliales y la matriz extracelular. Mac-1 también se encuentra presente en monocitos, macrófagos y células NKs.

**CD4:** Es una glicoproteína de membrana de 55 kDa de los linfocitos T que interacciona con antígenos MHC de clase II y que también es el receptor del virus VIH. Este gen se expresa no solamente en linfocitos T, sino también en algunas células B, macrófagos y granulocitos. También se expresa en regiones específicas del cerebro. Esta proteína participa en la iniciación de la fase temprana de la activación de los linfocitos T y puede funcionar como mediador de daño neuronal en enfermedades infecciosas e inmunes del sistema nervioso central.

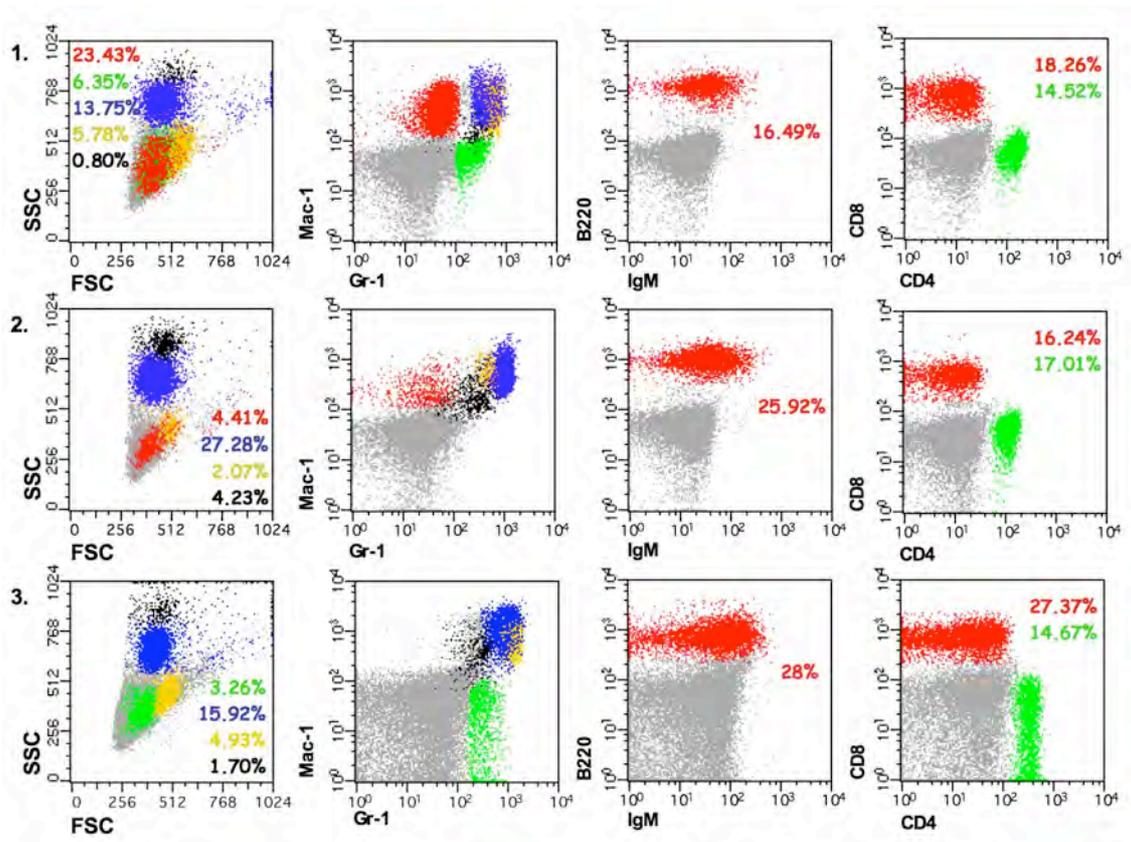
**CD8:** El antígeno CD8 es una glicoproteína de la superficie celular presente en la mayoría de los linfocitos T citotóxicos que participa en las interacciones célula-célula del sistema inmune. El antígeno CD8 interviene como co-receptor en la estabilización de la adhesión del receptor de linfocitos T (TCR) a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I). Está implicado también en la maduración tímica de linfocitos T y en la transmisión de señales intracelulares durante la activación del HLA I. Un subgrupo de células NK también expresan la molécula CD8 en su superficie.

**B220:** Esta proteína de 220 kDa (también conocida como CD45R) es un miembro de la familia de las proteínas tirosín fosfatasas (PTP). Las PTPs son moléculas de señalización que regulan una gran variedad de procesos celulares incluyendo crecimiento celular, diferenciación, ciclo mitótico y transformación oncogénica. Esta proteína se expresa específicamente en las células hematopoyéticas y es un regulador esencial de la señalización antígeno-receptor en células B. B220 se expresa en todas las células B, en estado de reposo o activadas, tan temprano en la diferenciación como en el estadio de célula pro-B.

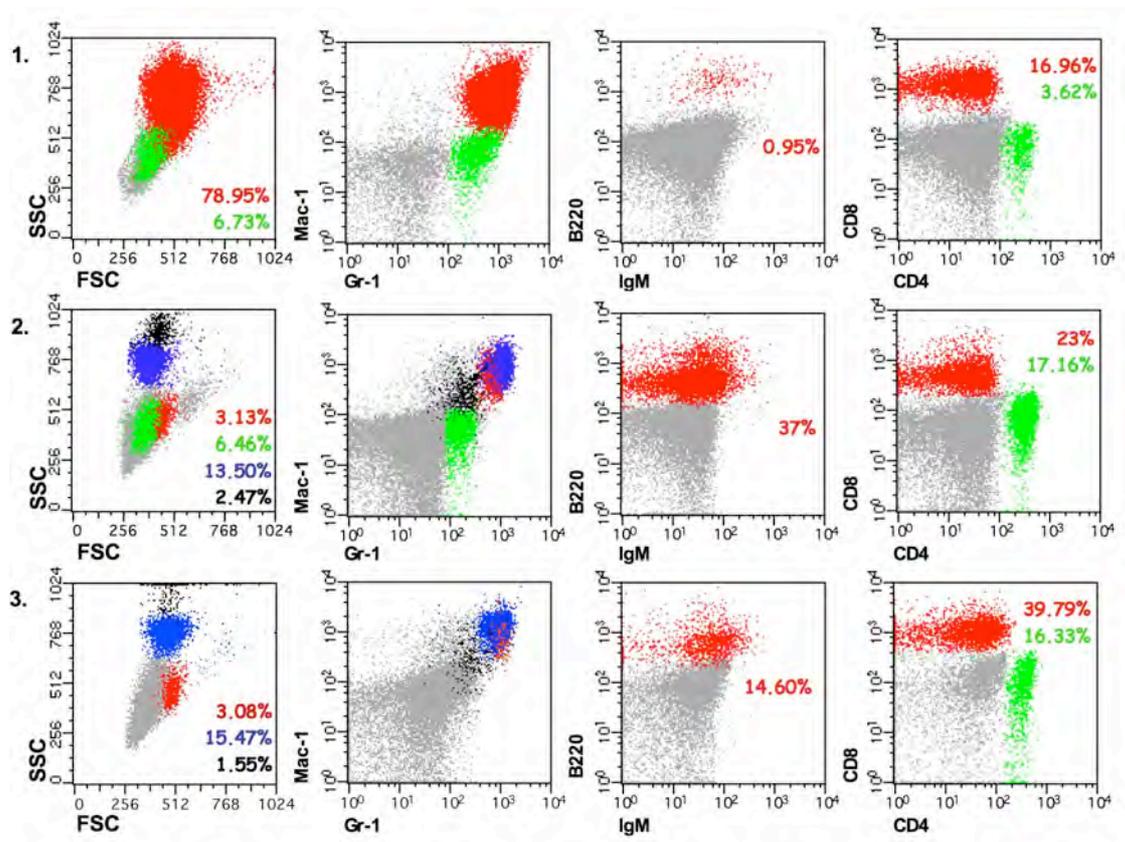
**IgM:** La proteína IgM normalmente constituye el 10% de la inmunoglobulinas del suero. La IgM es predominante en respuestas inmunes tempranas frente a la mayoría de los antígenos. La proteína IgM se expresa en la superficie celular de las células B y regula su función interaccionando con CD40 en la superficie celular. La IgM (junto a IgD) es la inmunoglobulina mayoritariamente expresada en la superficie de las células B.



**Figura 18. Poblaciones celulares hematológicas de tres ratones de 2 meses de edad.** Gráficos correspondientes a células de sangre periférica marcadas con Gr-1 y Mac-1 (linaje mieloide), IgM y B220 (linaje linfoide B) y CD4 y CD8 (linaje linfoide T). Los gráficos de la izquierda representan el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) de las células analizadas correspondientes a las muestras marcadas con Gr1-Mac1, de forma que se identifican las diferentes poblaciones celulares. 1: Ratón BA191, genotipo  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  (FN: 29.1.07). 2: Ratón BA192, genotipo  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  (FN: 29.1.07). 3: Ratón BA1508, genotipo  $p53^{+/+};p210BCR-ABL$  (FN: 7.12.10).



**Figura 19. Poblaciones celulares hematológicas de tres ratones de 4 meses de edad.** Gráficos correspondientes a células de sangre periférica marcadas con Gr-1 y Mac-1 (linaje mieloide), IgM y B220 (linaje linfoide B) y CD4 y CD8 (linaje linfoide T). Los gráficos de la izquierda representan el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) de las células analizadas correspondientes a las muestras marcadas con Gr1-Mac1, de forma que se identifican las diferentes poblaciones celulares. 1: Ratón BA68, genotipo  $p53^{ER/ER}$ ;p210BCR-ABL (FN: 24.11.06). 2: Ratón BA69, genotipo  $p53^{ER/+}$ ;p210BCR-ABL (FN: 24.11.06). 3: Ratón BA173, genotipo  $p53^{+/+}$ ;p210BCR-ABL (FN: 28.11.06).

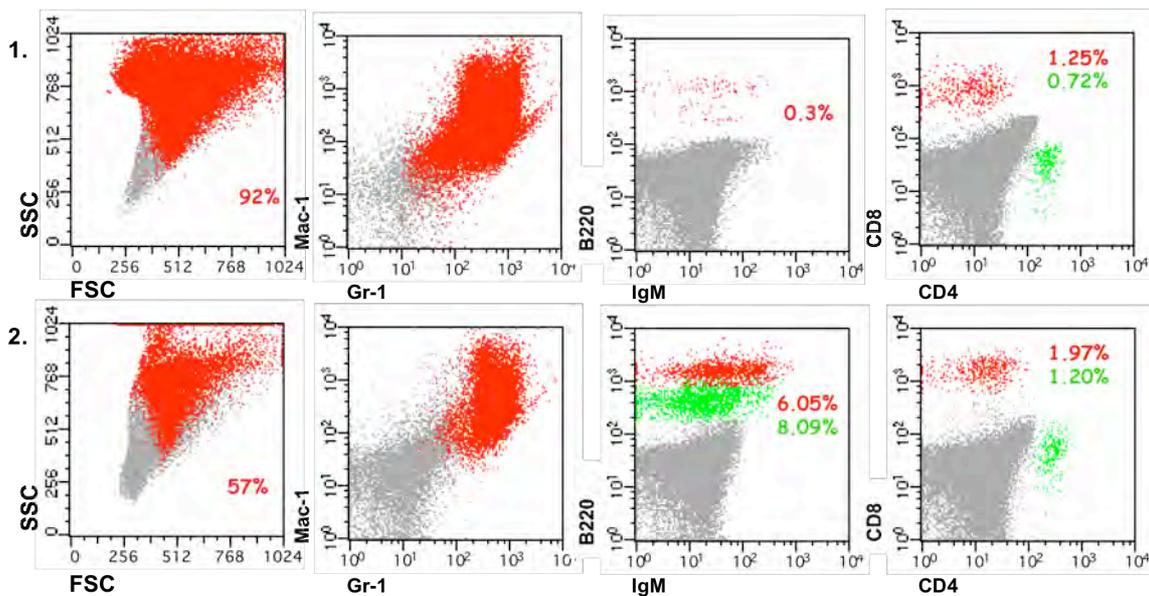


**Figura 20. Poblaciones celulares hematológicas de tres ratones de 6 meses de edad.** Gráficos correspondientes a células de sangre periférica marcadas con Gr-1 y Mac-1 (linaje mielóide), IgM y B220 (linaje linfóide B) y CD4 y CD8 (linaje linfóide T). Los gráficos de la izquierda representan el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) de las células analizadas correspondientes a las muestras marcadas con Gr1-Mac1, de forma que se identifican las diferentes poblaciones celulares. 1: Ratón BA65, genotipo  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  (FN: 17.1.07). 2: Ratón BA165, genotipo  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  (FN: 3.5.07). 3: Ratón BA182, genotipo  $p53^{+/+};p210BCR-ABL$  (FN: 26.2.07)

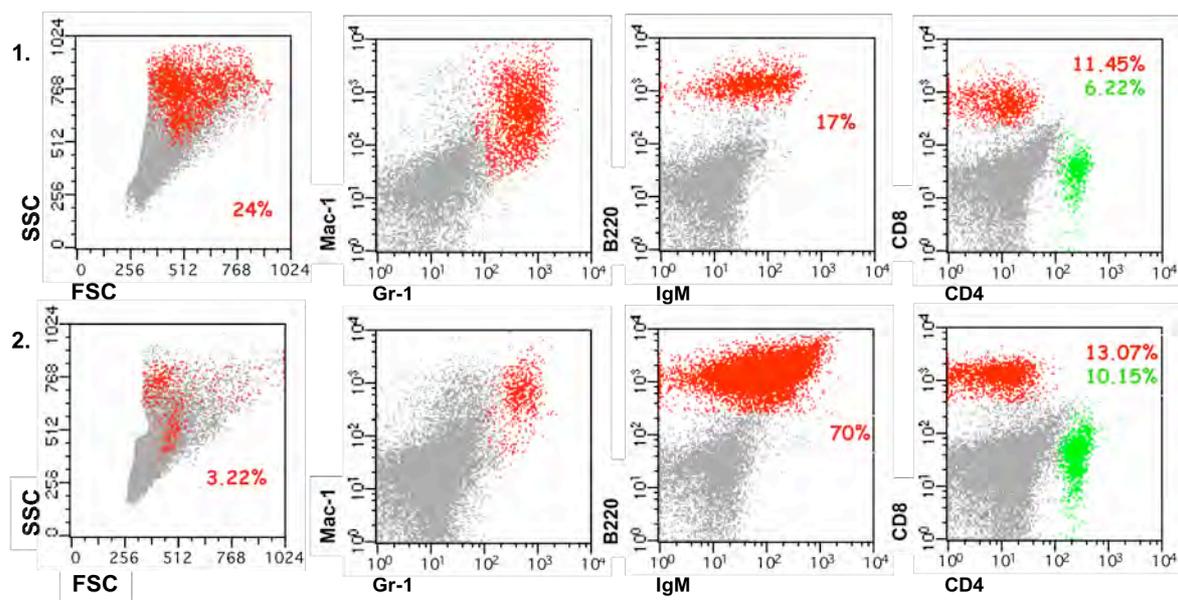
**2.4. El análisis por citometría de flujo de médula ósea y bazo muestra un aumento de la población mieloide madura en estos tejidos.**

El análisis por citometría de flujo de los otros tejidos estudiados (médula ósea, bazo y timo) mostró este mismo aumento de células Gr1<sup>+</sup>Mac1<sup>+</sup> (células mieloides maduras) tanto en la médula ósea como en el bazo. Se encontraron valores de esta población en la médula ósea de hasta un 96% (valores medios de los animales analizados 89% ± 6,8 para un n=7), siempre a costa de una drástica disminución de las otras dos poblaciones celulares (linfocitos B y T) (Figura 21). Los valores normales para esta población en médula ósea son del 51,4% ± 7,3 (n=6).

En el bazo, compartimento en el que la población mieloide es minoritaria, encontramos valores de hasta un 58% (valor medio del 35% ± 21, n=5) acompañados de una disminución de la población mayoritaria en este órgano, los linfocitos B, reducidos hasta un 7% (valores medios 16% ± 7,8, n=5). Figura 22. Los valores normales para la población mieloide en bazo están situados en un 4% ± 1,5 (n=5) mientras que la población de linfocitos B se sitúa alrededor del 63,8% ± 5,5 (n=5).



**Figura 21. Poblaciones celulares hematológicas de la médula ósea de un ratón enfermo y uno sano.** Gráficos correspondientes a las células marcadas con Gr-1 y Mac-1 (linaje mieloide), IgM y B220 (linaje linfocito B) y CD4 y CD8 (linaje linfocito T). Los gráficos de la izquierda representan el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) de las células analizadas correspondientes a las muestras marcadas con Gr1-Mac1, de forma que se identifican las diferentes poblaciones celulares. 1: Ratón enfermo, BA65, genotipo p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL, 6 meses de edad (FN: 17.1.07). 2: Ratón sano, BA192, genotipo p53<sup>+/+</sup>;p210BCR-ABL, 8 meses de edad (FN: 1.3.07).



**Figura 22. Poblaciones celulares hematológicas del bazo de un ratón enfermo y uno sano.** Gráficos correspondientes a las células marcadas con Gr-1 y Mac-1 (linaje mieloide), IgM y B220 (linaje linfocito B) y CD4 y CD8 (linaje linfocito T). Los gráficos de la izquierda representan el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) de las células analizadas correspondientes a las muestras marcadas con Gr1-Mac1, de forma que se identifiquen las diferentes poblaciones celulares. 1: Ratón enfermo, BA65, genotipo p53<sup>ER/ER</sup>; p210BCR-ABL, 6 meses de edad (FN: 17.1.07). 2: Ratón sano, BA192, genotipo p53<sup>+/+</sup>; p210BCR-ABL, 8 meses de edad (FN: 1.3.07).

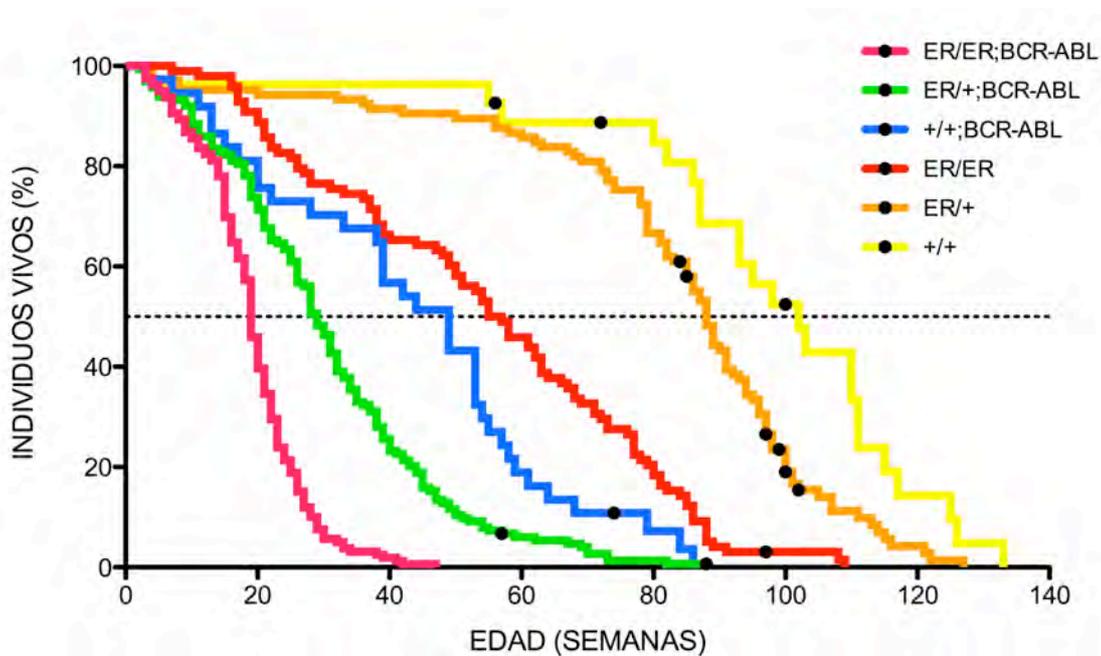
Según este estudio, los ratones p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL y p53<sup>ER/+</sup>;p210BCR-ABL presentan el siguiente fenotipo: aumento del número de células Gr1<sup>+</sup>Mac1<sup>+</sup> (células mieloides) en sangre periférica a partir de los 4 meses de edad, aumento significativo del número de células mieloides en la médula ósea (población mieloide de hasta un 96%) y en bazo (población mieloide de hasta un 57%), esplenomegalia (75%) y hepatomegalia, hidronefrosis, metaplasia mieloide (megacariocitos en bazo e hígado), expansión de la pulpa roja en el 55% de los animales analizados, e infiltraciones de células hematológicas principalmente mieloides en pulmón, bazo, hígado (en el 60% infiltración en sinusoides y espacios porta), riñón y nódulos linfáticos. Este fenotipo es muy similar al descrito para los animales del modelo Sca1-BCR-ABLp210.

Con todos estos datos podemos concluir que la enfermedad que desarrolla la cohorte de ratones p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210, resultante del cruce de ambos modelos murinos y de fondo genético mixto, es la misma descrita para los ratones del modelo Sca1-BCR-ABLp210: Leucemia Mieloide Crónica. Sin embargo, existe una diferencia en la velocidad de progresión de la enfermedad. La velocidad de aparición y desarrollo de la enfermedad depende de las copias funcionales (o normales) de p53 que posean los individuos afectados. La enfermedad evoluciona más rápidamente en aquellos ratones con los dos alelos de p53 modificados (p53<sup>ER/ER</sup>), y por lo tanto no funcionales, que en aquellos con sólo uno modificado (p53<sup>ER/+</sup>) o con ambos alelos normales (p53<sup>+/+</sup>).

### 3. SUPERVIVENCIA DE LOS RATONES DE LA COLONIA $p53ERTAM^{KI}$ x Sca1-BCR-ABLp210.

#### 3.1. Existe cooperación entre la expresión del oncogén p210BCR-ABL y la falta de función de p53 que se manifiesta en una aceleración de la progresión de la enfermedad desarrollada por los individuos de la colonia $p53ERTAM^{KI}$ x Sca1-BCR-ABLp210.

Tras establecer el fenotipo del modelo mixto  $p53ERTAM^{KI}$  x Sca1-BCR-ABLp210 y haber encontrado un adelantamiento del inicio y una progresión más rápida de la enfermedad en ratones de diferentes genotipos, se quiso correlacionar esta aceleración con la supervivencia de los animales. Para ello, se realizó una curva de supervivencia de tipo Kaplan-Meier (Figura 23) de los ratones que habían muerto de forma natural, es decir, sin ser sacrificados.



**Figura 23. Supervivencia de los individuos de diferentes genotipos de la colonia  $p53ERTAM^{KI}$  x Sca1-BCR-ABLp210.** Curva de Kaplan-Meier que representa el porcentaje de individuos vivos a lo largo del tiempo.  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  n=159;  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  n=164;  $p53^{+/+};p210BCR-ABL$  n=37;  $p53^{ER/ER}$  n=98;  $p53^{ER/+}$  n=105 y  $p53^{+/+}$  n=27. Los puntos marcados en negro en la gráfica indican ratones que seguían vivos en el momento de la realización de la curva de supervivencia.

Esta gráfica nos muestra que la supervivencia de los ratones disminuye con la combinación de alteraciones genéticas (el alelo  $p53^{ER}$  y el oncogén p210BCR-ABL), siendo los ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  los que mueren más rápidamente.

Los ratones  $p53^{ER/+}$  y  $p53^{+/+}$  son los que tienen una mayor supervivencia media (88 ó 102 semanas, respectivamente) al tener ambos genotipos al menos una copia funcional de p53. Efectivamente, la segunda copia funcional de los ratones  $p53^{+/+}$  se ve reflejada en una mayor longevidad. Ambas curvas de supervivencia son estadísticamente diferentes (p-valor = 0,0033). La cinética de muerte de los ratones  $p53^{ER/ER}$  se aleja bastante de la de los 2 genotipos anteriores, situando su supervivencia media en torno a las 56 semanas de edad. Esta cinética es curiosamente semejante a la de los individuos con ambas copias funcionales de p53 pero que expresan la oncoproteína p210BCR-ABL,  $p53^{+/+};p210BCR-ABL$  (supervivencia media de 49 semanas). A pesar de su semejanza, las diferencias de supervivencia entre estos dos genotipos son estadísticamente significativas (p-valor = 0,0059).

Al combinar ambas alteraciones genéticas en un mismo genoma, la supervivencia de los individuos se ve drásticamente reducida, siendo esta disminución ligeramente menor si existe al menos una copia funcional de p53. Así, la supervivencia media de los individuos  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  y de los  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  se sitúa en 19 y 29 semanas respectivamente. Estos genotipos también tienen una cinética de muerte significativamente diferente entre ambos (p-valor < 0,0001).

La carga de alteraciones genéticas se correlaciona no sólo con la mayor o menor supervivencia media de los ratones, sino también con la longevidad de cada genotipo. Así los ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  tienen una vida mucho más corta que sus hermanos; los ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  viven 47 semanas mientras que los  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  y los  $p53^{+/+};p210BCR-ABL$  llegan a vivir 88 y 86 semanas respectivamente.

En vista de estos resultados, concluimos que existía cooperación entre la oncoproteína p210BCR-ABL y la falta de función de p53. Esta cooperación se manifiesta en una aceleración del desarrollo de la enfermedad causada por la expresión del oncogén p210BCR-ABL y en un acortamiento de la vida de los individuos.

### **3.2. La restauración transitoria de la funcionalidad de p53, en etapas iniciales de la enfermedad, frena la progresión de la leucemia.**

Para ver si la cooperación entre p210BCR-ABL y la falta de función de p53 se mantenía una vez establecida la enfermedad, así como determinar el momento en el que esta interacción dejaba de influir sobre la progresión de la misma, se aprovechó la característica regulable del modelo  $p53ERTAM^{KI}$ .

La inyección de tamoxifén a los animales enfermos restablecería la funcionalidad de la proteína p53 y ésta actuaría allá donde existiera un estímulo estresante capaz de activarla. Asumiendo que en los animales enfermos este estímulo es la actividad oncogénica de p210BCR-ABL en las células  $Sca1^+$ , hipotetizamos que es en estas células donde p53 actuará y ejercerá su función antitumoral.

Puesto que existe una cooperación entre p53 y p210BCR-ABL cabe esperar que la restauración de p53 tenga algún efecto en la progresión de la enfermedad. Para averiguar si esta hipótesis era correcta se determinaron tres periodos o “ventanas” de tiempo en los que se reestableció la funcionalidad de p53.

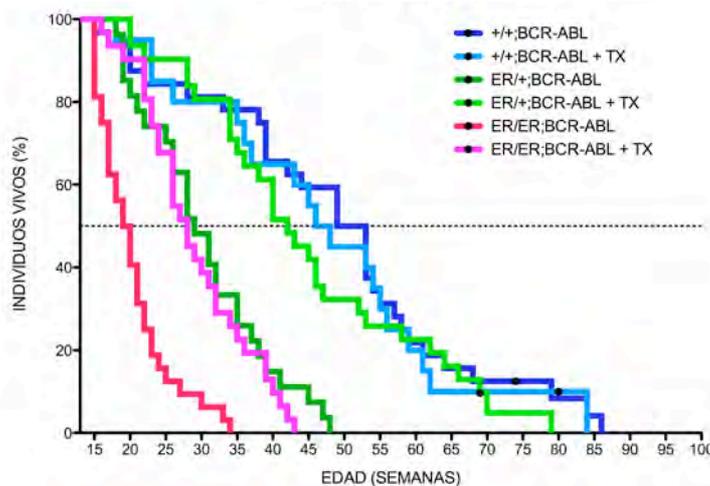
Los periodos elegidos fueron:

-Periodo 1: 15 semanas de edad. Los ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  han empezado a desarrollar la enfermedad y la mortalidad es del 30%.

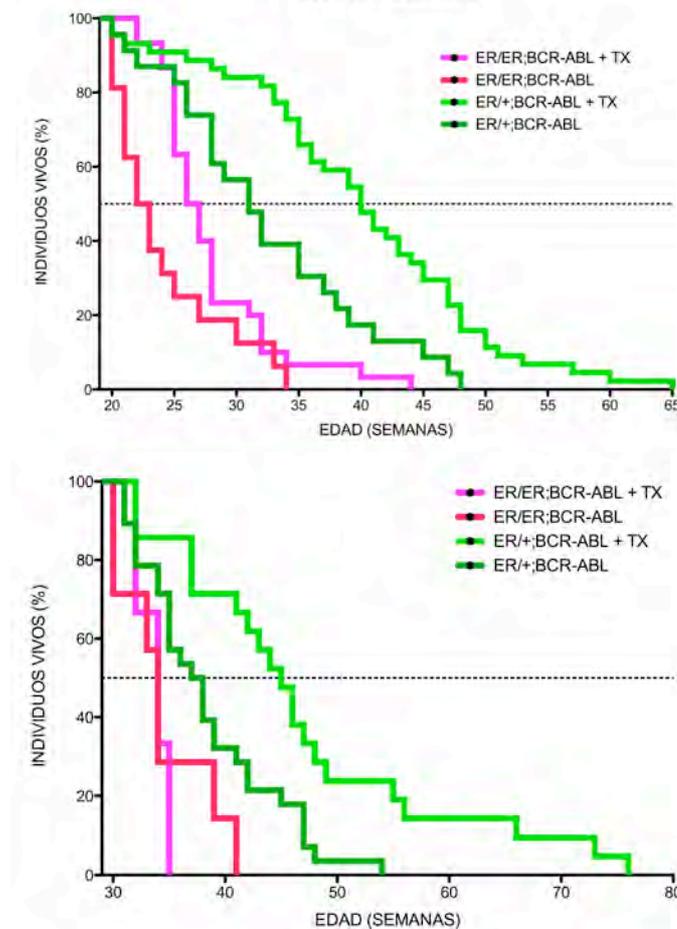
-Periodo 2: 20 semanas de edad. La mortalidad se acelera en los ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  (60%).

-Periodo 3: 30 semanas de edad. Casi todos los individuos  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  han muerto (95%) y sólo unos pocos resistentes sobreviven (5%).

Ratones de los genotipos  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  y  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  fueron tratados con 1 mg de tamoxifén diario durante 7 días en los periodos establecidos. Como controles también se trataron ratones de genotipo  $p53^{+/+};p210BCR-ABL$  cuya proteína p53 no es regulable por tamoxifén. Con los datos de supervivencia se elaboraron las correspondientes curvas de Kaplan-Meier (Figuras 24 y 25).



**Figura 24. Restauración de p53 en el periodo 1 (15 semanas de edad).** Los ratones fueron tratados durante una semana con 1 mg de tamoxifén a las 15 semanas de edad y se realizó un seguimiento de su supervivencia a lo largo del tiempo. Se elaboró una curva de supervivencia de tipo Kaplan-Meier de los animales tratados y de los no tratados de los mismos genotipos.  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  n=32;  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL + TX$  n=31;  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  n=27;  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL + TX$  n=31;  $p53^{+/+};p210BCR-ABL$  n=32;  $p53^{+/+};p210BCR-ABL + TX$  n=20. Los puntos marcados en negro en la gráfica indican ratones que seguían vivos en el momento de la realización de las curvas de supervivencia.



**Figura 25. Restauración de p53 en el periodo 2 (20 semanas de edad) y en el periodo 3 (30 semanas de edad).** Los ratones fueron tratados durante una semana con 1 mg de tamoxifén a las 20 ó 30 semanas de edad respectivamente y se realizó un seguimiento de su supervivencia a lo largo del tiempo. Se elaboró una curva de supervivencia de tipo Kaplan-Meier de los animales tratados y de los no tratados de los mismos genotipos.

Periodo 2:  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  n=16;  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL + TX$  n=30;  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  n=23;  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL + TX$  n=44.

Periodo 3:  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  n=7;  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL + TX$  n=3;  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  n=28;  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL + TX$  n=21.

Los puntos marcados en negro en la gráfica indican ratones que seguían vivos en el momento de la realización de las curvas de supervivencia.

La restauración de la funcionalidad de p53, durante tan sólo una semana, en animales sometidos a un estímulo oncogénico determinado (p210BCR-ABL), aumenta la supervivencia de los mismos.

En el periodo 1 (a las 15 semanas de edad), la supervivencia del 50% de la población de los ratones de genotipo  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  se incrementa en 9 semanas (de la semana 19 a la semana 28) y la de los ratones de genotipo  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  en 15 semanas (de la semana 29 a la 44). Aplicando el test de Mantel-Cox a la supervivencia de los ratones con y sin tratamiento, las diferencias observadas tanto en el genotipo  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  como en el  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$ , son altamente significativas (p-valor < 0,0001 en ambos casos).

Sin embargo, las curvas de supervivencia con y sin tratamiento correspondientes al genotipo  $p53^{+/+};p210BCR-ABL$  no son significativamente diferentes (p-valor = 0,7436). Esto nos indica que el tratamiento con tamoxifén (o su excipiente) no está actuando sobre la evolución de la enfermedad vía  $p210BCR-ABL$ , ya que no afecta a la supervivencia de los ratones que únicamente poseen la alteración oncogénica  $p210BCR-ABL$ . Es lógico pensar entonces, que el efecto observado del tratamiento se debe a la actuación del tamoxifén sobre la proteína  $p53^{ER}$ , es decir, que el retraso de la progresión de la enfermedad es debido a la actuación de  $p53$ .

Curiosamente, podemos observar que la supervivencia de los ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  al ser tratados pasa a ser semejante a la de los ratones heterocigóticos ( $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$ ) sin tratar (p-valor = 1,000) y la supervivencia de los individuos heterocigóticos tratados pasa a ser como la de los individuos normales para  $p53$  ( $p53^{+/+};p210BCR-ABL$ ) (p-valor = 0,2959). Esto sugiere que el tratamiento con tamoxifén podría estar reactivando a la proteína  $p53^{ER}$  hasta una dosis equivalente a una copia normal del gen.

En el periodo 2 (a las 20 semanas de edad), el aumento de la supervivencia media de los ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  tratados con tamoxifén no es tan grande como en los tratados en el periodo 1 (4 semanas, de 22,5 a 26,5), aunque sí lo suficiente como para ser significativamente diferentes las curvas de supervivencia de tratados y no tratados en este periodo (p-valor = 0,0165).

En el caso de los ratones  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$ , que a esta edad todavía no han llegado a un estadio tan avanzado de la enfermedad como los  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$ , el aumento de la supervivencia media es de 9 semanas (de 31 a 40 semanas) siendo las curvas de tratados y no tratados también significativamente diferentes (p-valor = 0,0009).

En el periodo 3 (a las 30 semanas de edad), prácticamente todos los individuos  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  han muerto y por lo tanto es muy difícil conseguir un número representativo de animales tratados y sin tratar. Con los pocos individuos disponibles, se elaboró la gráfica de supervivencia siendo ésta prácticamente igual en ratones tratados y sin tratar (p-valor = 0,7346). Este resultado sugiere que a esta edad en este genotipo la enfermedad está tan avanzada que es prácticamente imposible ejercer efecto alguno con el tratamiento que evite o ralentice la progresión de la misma.

Sin embargo, en los ratones  $p53^{ER/+};p210BCR-ABL$  en los que la enfermedad todavía no está en un estadio tan avanzado, el efecto del tamoxifén puede apreciarse, pasando la supervivencia media de 37,5 a 45 semanas (7,5 semanas de diferencia). Las curvas de los animales tratados y no tratados son, de nuevo, diferentes significativamente (p-valor = 0,0030).

En vista de estos resultados, podemos concluir que la restauración de p53 en ratones enfermos de LMC tiene un efecto que se opone a la normal progresión de la enfermedad, lo cual se traduce en un alargamiento significativo de la vida de estos animales. No obstante, este efecto no se manifiesta en todos los estadios de la enfermedad, causando un mayor efecto cuanto menos avanzada esté la leucemia, de manera que, a partir de un punto crítico, restablecer p53 no causa ningún impacto sobre su progresión.

Por todo ello, la “ventana” de tiempo en la cual la restauración transitoria de p53 tiene un mayor efecto supresor tumoral en los ratones p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210 se sitúa en torno a las 15 semanas de edad. Además esta reactivación parece tener un efecto similar al de una dosis monoalélica de p53wt, es decir, equivale a la dosis normal de una copia funcional más de p53.

#### **4. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA RESTAURACIÓN DE p53 SOBRE EL FENOTIPO TUMORAL.**

##### **4.1. El fenotipo tumoral no varía al tratar con tamoxifén a los ratones p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210.**

Para determinar el efecto de la restauración de p53 sobre el fenotipo tumoral, ratones enfermos se trataron con tamoxifén o aceite durante 7 días. Tras finalizar el tratamiento fueron sacrificados y sus tejidos fueron analizados para comprobar si el fenotipo que desarrollaban era el mismo que el de los ratones de su mismo genotipo que no habían sido sometidos a tratamiento con tamoxifén. Los diagnósticos anatómo-patológicos revelaron los mismos tumores hematológicos infiltrantes anteriormente descritos en los animales no tratados. El análisis macroscópico de los ratones tratados también revelaba las mismas anomalías registradas previamente: esplenomegalia, hidronefrosis e hiperplasia de los ganglios linfáticos, principalmente. Por tanto podemos afirmar que el tratamiento no varía el fenotipo tumoral de estos ratones, siendo la ralentización de la progresión de la enfermedad el único hecho apreciable.

En la tabla 6 se muestra un resumen de los diagnósticos anatómo-patológicos de estos ratones. La información referente a estos individuos se resume en el anexo 2.

**Tabla 6. Diagnósticos anatómo-patológicos de los ratones tratados con tamoxifén.**

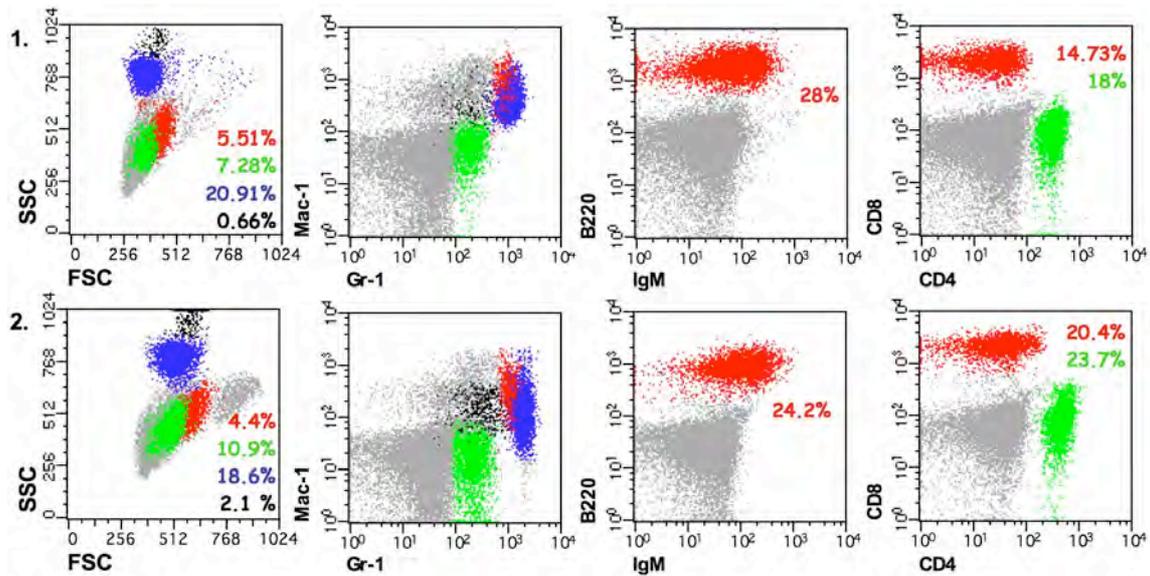
Genotipo	Número de ratones sacrificados	Diagnóstico	Afectados/Porcentaje	
p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	10 (32 semanas)	Tumor Mieloide (LMC)	10 (4)	100% (40%)
p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	8 (43 semanas)	Tumor Mieloide	5	62%
		Tumor Linfoide	2	25%
		Infiltración leve	1	12,5%

La edad media a la que estos ratones fueron sacrificados se indica entre paréntesis. El número de afectados indica el número de ratones cuyo diagnóstico fue el que se indica a la izquierda. El porcentaje está calculado en función del número de ratones analizados de cada genotipo. En el anexo 2 se muestran los diagnósticos individuales de cada ratón analizado, así como la edad a la que fueron sacrificados.

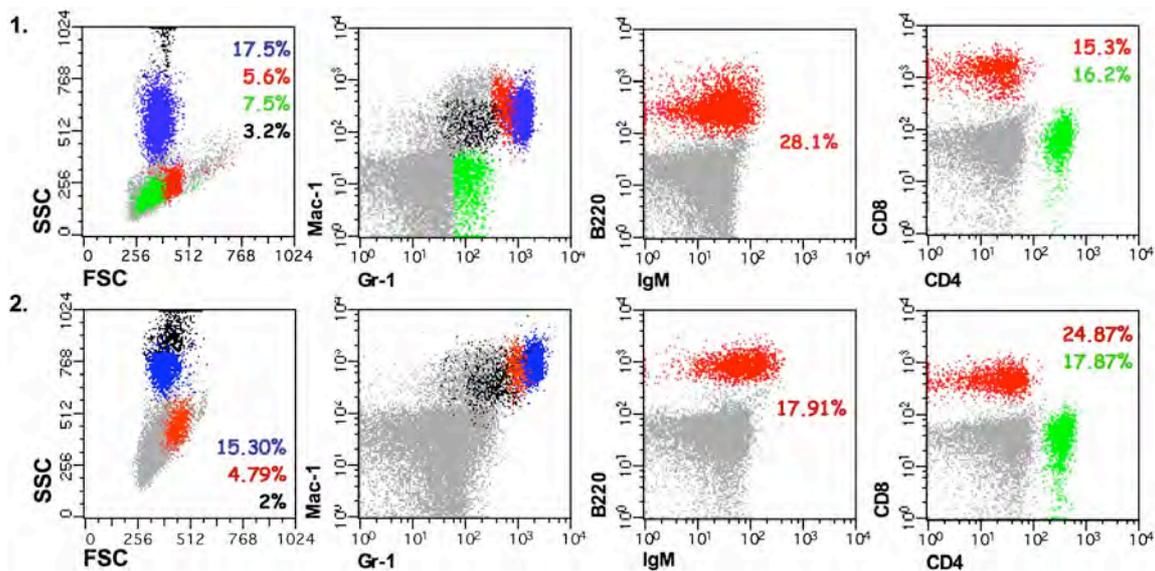
#### 4.2. El tratamiento no causa un efecto significativo sobre las poblaciones celulares de sangre periférica de animales enfermos.

Se examinó el efecto del tratamiento con tamoxifén sobre las poblaciones leucocitarias en sangre periférica de los ratones p53<sup>ERTAM</sup><sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210. Puesto que los ratones enfermos sobreviven más tiempo tras el tratamiento, una hipótesis obvia es que la población de células mieloides maduras aumentada durante el desarrollo de la LMC, que es la población que causa la muerte en los ratones, es reducida por el tratamiento con tamoxifén vía p53. Otra hipótesis es que la población que está siendo afectada por p53 es la población inmadura, las células Sca1<sup>+</sup>, que origina la población madura infiltrante en la enfermedad. Si esta población progenitora se ve disminuida por algún mecanismo, entonces la población madura derivada de ella no aumentará pero tampoco desaparecerá de inmediato, manteniéndose la masa de células tumorales ya existentes en el individuo. El aumento de la supervivencia en esta segunda hipótesis sería debido no a la disminución súbita de las células invasoras sino a la parada transitoria en su expansión.

Para averiguar cuál de estas hipótesis era cierta, hicimos un análisis por citometría de flujo a ratones de genotipo p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL antes del tratamiento y una semana después de haberlo finalizado (intervalo de tiempo entre ambos análisis de 15 días). Como controles del experimento utilizamos ratones del mismo genotipo tratados con aceite.



**Figura 26. Poblaciones celulares hematológicas de la sangre periférica de un ratón  $p53^{ER/ER}$ ;  $p210BCR-ABL$ , antes y después del tratamiento con tamoxifén a los 4 meses de edad (15,5 semanas).** Gráficos correspondientes a las células marcadas con Gr-1 y Mac-1 (linaje mieloide), IgM y B220 (linaje linfóide B) y CD4 y CD8 (linaje linfóide T). Los gráficos de la izquierda representan el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) de las células analizadas correspondientes a las muestras marcadas con Gr1-Mac1, de forma que se identifican las diferentes poblaciones celulares. Muestras del ratón BA216, genotipo  $p53^{ER/ER}$ ;  $p210BCR-ABL$  (FN: 9.3.07). 1: Resultados antes del tratamiento. 2: Resultados obtenidos una semana después de la finalización del tratamiento.



**Figura 27. Poblaciones celulares hematológicas de la sangre periférica de un ratón  $p53^{ER/ER}$ ;  $p210BCR-ABL$ , antes y después del tratamiento con tamoxifén a los 5 meses de edad (19 semanas).** Gráficos correspondientes a las células marcadas con Gr-1 y Mac-1 (linaje mieloide), IgM y B220 (linaje linfóide B) y CD4 y CD8 (linaje linfóide T). Muestras del ratón BA256, genotipo  $p53^{ER/ER}$ ;  $p210BCR-ABL$  (FN: 27.5.07). 1: Resultados antes del tratamiento. 2: Resultados obtenidos una semana después de la finalización del tratamiento.

En las figuras 26 y 27 se muestran los resultados de dos parejas de ratones en representación de todos los ratones analizados. Se puede observar cómo las diferentes poblaciones mieloides de la sangre periférica de cada ratón no sufren cambios significativos tras el tratamiento con tamoxifén. Los resultados obtenidos de todos los ratones analizados se resumen en la tabla 7.

**Tabla 7. Poblaciones mieloides presentes en la sangre periférica de los ratones antes y después del tratamiento con tamoxifén.**

	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup> SSC <sup>high</sup>	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup> SSC <sup>int</sup>	Eosinófilos	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>-</sup>	Gr1 <sup>d</sup> Mac1 <sup>+</sup>
<b>p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL</b>					
<b>Antes (n=8)</b>	19,54%±15,5	4,43%±1,2	5,18%±9,4	6,39%±5,9	5,55%±6,2
<b>Después (n=5)</b>	17,24%±8,4	9,17%±2,0	2,22%±1,2	11,18%±8,8	5,06%±0,9
<b>p53<sup>ER/+</sup>;p210BCR-ABL</b>					
<b>Antes (n=14)</b>	9,87%±3,2	3,44%±1,0	1,10%±0,79	10,5%±8,0	5,30%±4,3
<b>Después (n=8)</b>	14,09%±3,3	5%±1,7	1,5%±0,7	11,59%±5,5	5,9%±1,3

Se muestran los porcentajes medios de las distintas poblaciones mieloides analizadas mediante citometría de flujo de ratones de 4 meses de edad tratados con tamoxifén, antes y después del tratamiento. A cada valor le acompaña la desviación estándar del grupo experimental. Los datos completos de estos análisis se muestran en el anexo 3.

Como no todos los animales desarrollan la enfermedad a la misma edad, es posible que estemos tratando a animales en estadios muy iniciales e incluso previos a la enfermedad, por lo que no vemos ningún efecto al tratarlos. Esto nos llevó a realizar otro estudio con animales de genotipo p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL diagnosticados como enfermos utilizando un HEMAVET<sup>®</sup> HV950FS (Drew Scientific, Inc.). Estos ratones fueron tratados con tamoxifén o su excipiente (aceite de cacahuete) durante 7 días y sacrificados 1, 3 ó 5 días tras finalizar el experimento. En el anexo 4 se muestran los valores de las poblaciones mieloides obtenidos en este estudio.

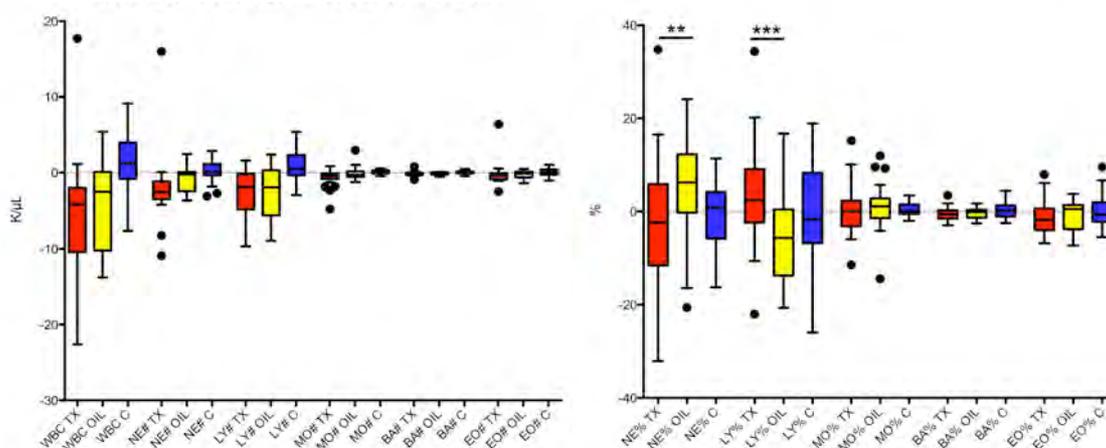
**Tabla 8. Poblaciones mieloides presentes en la sangre periférica de ratones enfermos p53<sup>ER/ER</sup>; p210BCR-ABL tras el tratamiento con tamoxifén o aceite.**

	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup> SSC <sup>high</sup>	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup> SSC <sup>int</sup>	Eosinófilos	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>-</sup>	Gr1 <sup>d</sup> Mac1 <sup>+</sup>
<b>+ TX (n=17)</b>	41,07%±16,7	6,82%±4,8	1,58%±1,5	5,12%±4,5	2,56%±3,1
<b>+Aceite (n=10)</b>	45,72%±15,2	3,62%±3,8	2,59%±3,1	10,99%±12,8	5,28%±6,3

Se muestran los valores medios, en porcentaje, de las distintas poblaciones mieloides analizadas mediante citometría de flujo de ratones diagnosticados como enfermos con HEMAVET<sup>®</sup> tratados con tamoxifén (TX) o con aceite. A cada valor le acompaña la desviación estándar del grupo experimental.

Como se puede ver en la tabla 8 los valores obtenidos para las poblaciones mieloides de ambos grupos experimentales son muy similares y tienen una gran dispersión. En 4 de las 5 poblaciones analizadas los valores correspondientes a los animales tratados con tamoxifén son ligeramente menores que los tratados con aceite, pero las diferencias entre ellos no son estadísticamente significativas ( $p$ -valor = 0,4014, 0,1524, 0,4146, 0,1024 y 0,2969 respectivamente). Esto nos lleva a pensar que o bien el tratamiento no está ejerciendo ningún tipo de efecto sobre las células maduras mieloides de la sangre periférica resultantes de la enfermedad del ratón o bien el efecto ha sido tan precedero que durante el tiempo transcurrido entre la finalización del tratamiento y el segundo análisis la población madura mieloides ha vuelto a los niveles pre-tratamiento.

Otra forma de analizar los cambios sufridos en las poblaciones leucocitarias de la sangre periférica es el recuento de las células sanguíneas con HEMAVET®. Se sometió a un análisis periódico a los ratones de genotipo  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  a partir de las 15 semanas de edad hasta que éstos mostraron unos valores anormales de los parámetros sanguíneos. Consideramos a estos individuos como enfermos y los tratamos con tamoxifén o aceite durante 7 días. Una vez terminado el tratamiento, se volvió a analizar su sangre. Para determinar si las diferencias observadas en las diferentes poblaciones sanguíneas se debían a la propia extracción de sangre y manipulación de los animales, se extrajo sangre a animales sanos de genotipo  $p53^{ER/ER}$  en el mismo intervalo de tiempo.



**Figura 28. Recuento de las poblaciones leucocitarias mediante HEMAVET®.** Se representan las diferencias de los valores de las distintas poblaciones sanguíneas entre el momento post-tratamiento y el pre-tratamiento tanto de los ratones inyectados con tamoxifén ( $n=27$ , en rojo) como con aceite ( $n=18$ , en amarillo). También se muestran los datos correspondientes a animales sanos sin tratar ( $n=22$ , en azul) a los que se aplicó el mismo protocolo de análisis de sangre para descartar variaciones debidas a la manipulación. WBC: Leucocitos totales ( $K/\mu L$ ), NE#: Neutrófilos ( $K/\mu L$ ), LY#: Linfocitos ( $K/\mu L$ ), MO#: Monocitos ( $K/\mu L$ ), EO#: Eosinófilos ( $K/\mu L$ ), NE%: Neutrófilos (%), LY%: Linfocitos (%), MO%: Monocitos (%), EO%: Eosinófilos (%), BA%: Basófilos (%). \*\*: diferencias altamente significativas ( $p$ -valor < 0,01). \*\*\*: diferencias altamente significativas ( $p$ -valor < 0,001).

Con los resultados (anexo 7) se elaboraron las gráficas que se muestran en la figura 28, en las que se representan las diferencias de los valores de las distintas poblaciones celulares en el momento post- y en el pre-tratamiento.

Al comparar los valores celulares absolutos y relativos de las poblaciones leucocitarias de cada ratón al inicio del tratamiento y al finalizar el mismo, observamos que el número de células correspondientes a todas las poblaciones ha disminuido tras el tratamiento (diferencia negativa), tanto en los animales tratados con tamoxifén como con aceite. Esta disminución no parece deberse a la propia manipulación ni a la extracción de un pequeño volumen de sangre unos días antes, ya que los animales control no parecen experimentar la disminución de ninguna población. Como vemos en la figura 28 estas diferencias se sitúan en torno a 0.

A pesar de que en los dos grupos experimentales (tamoxifén y aceite) se observa una disminución, el análisis estadístico muestra que ésta no es igual en ambos (Figura 29). En las poblaciones de leucocitos totales, neutrófilos, monocitos y basófilos, esta diferencia es estadísticamente significativa en las poblaciones de ratones tratados con tamoxifén mientras en la población tratada con aceite no lo es. En la población de linfocitos, a pesar de ser también significativa la disminución en los animales tratados con aceite es más significativa en los animales tratados con tamoxifén. La única población que no parece experimentar cambios significativos en ambos grupos experimentales son los eosinófilos.

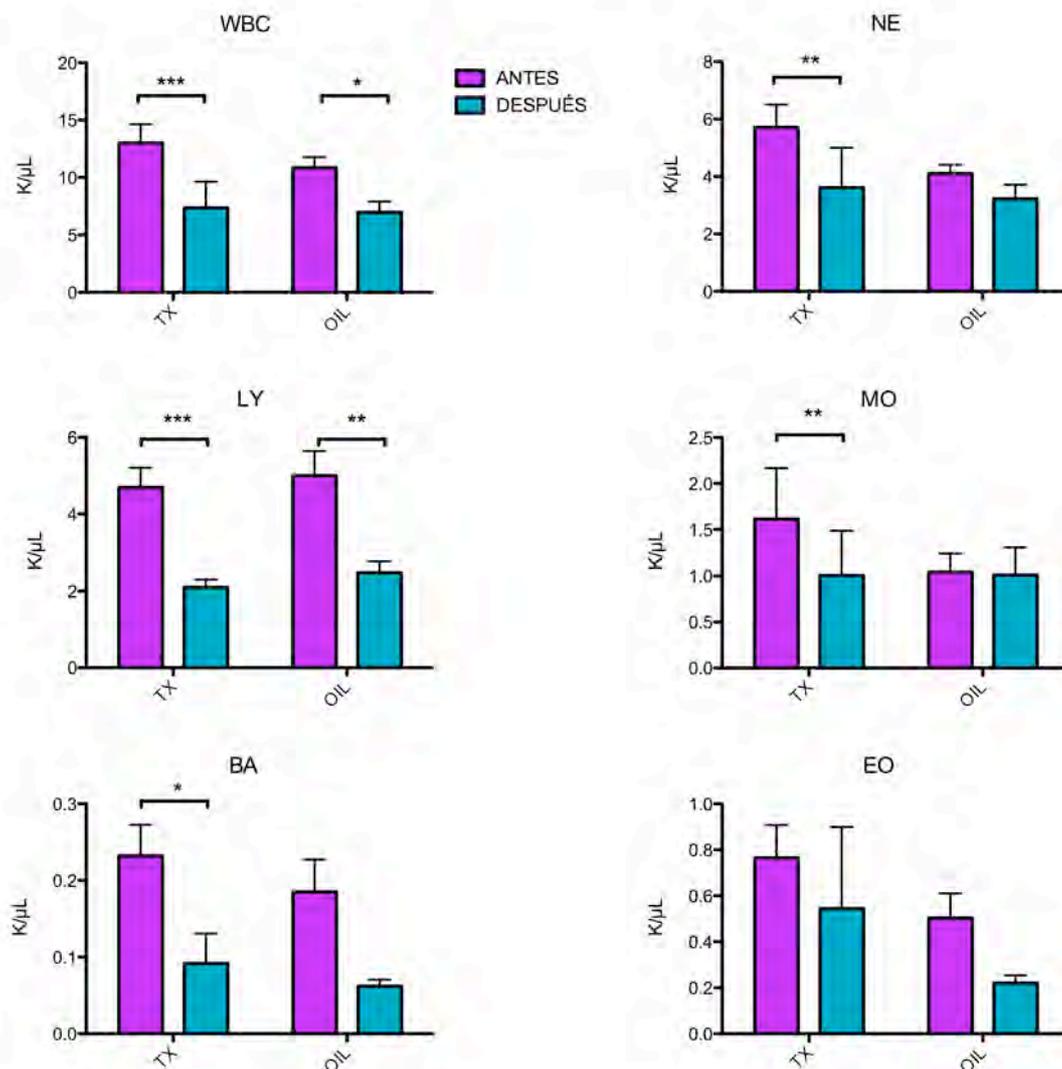
Cuando analizamos los porcentajes de las distintas poblaciones celulares (Figura 30), hemos de destacar el distinto comportamiento de neutrófilos y linfocitos: en el tratamiento con aceite los neutrófilos aumentan y los linfocitos disminuyen mientras que en los animales tratados con tamoxifén, los neutrófilos disminuyen ligeramente y los linfocitos aumentan.

Los monocitos tienden a mantenerse en la población tratada con tamoxifén mientras que aumentan en los animales tratados con aceite. Eosinófilos y basófilos disminuyen en ambos grupos experimentales pero de forma más acusada en el de los ratones tratados con tamoxifén.

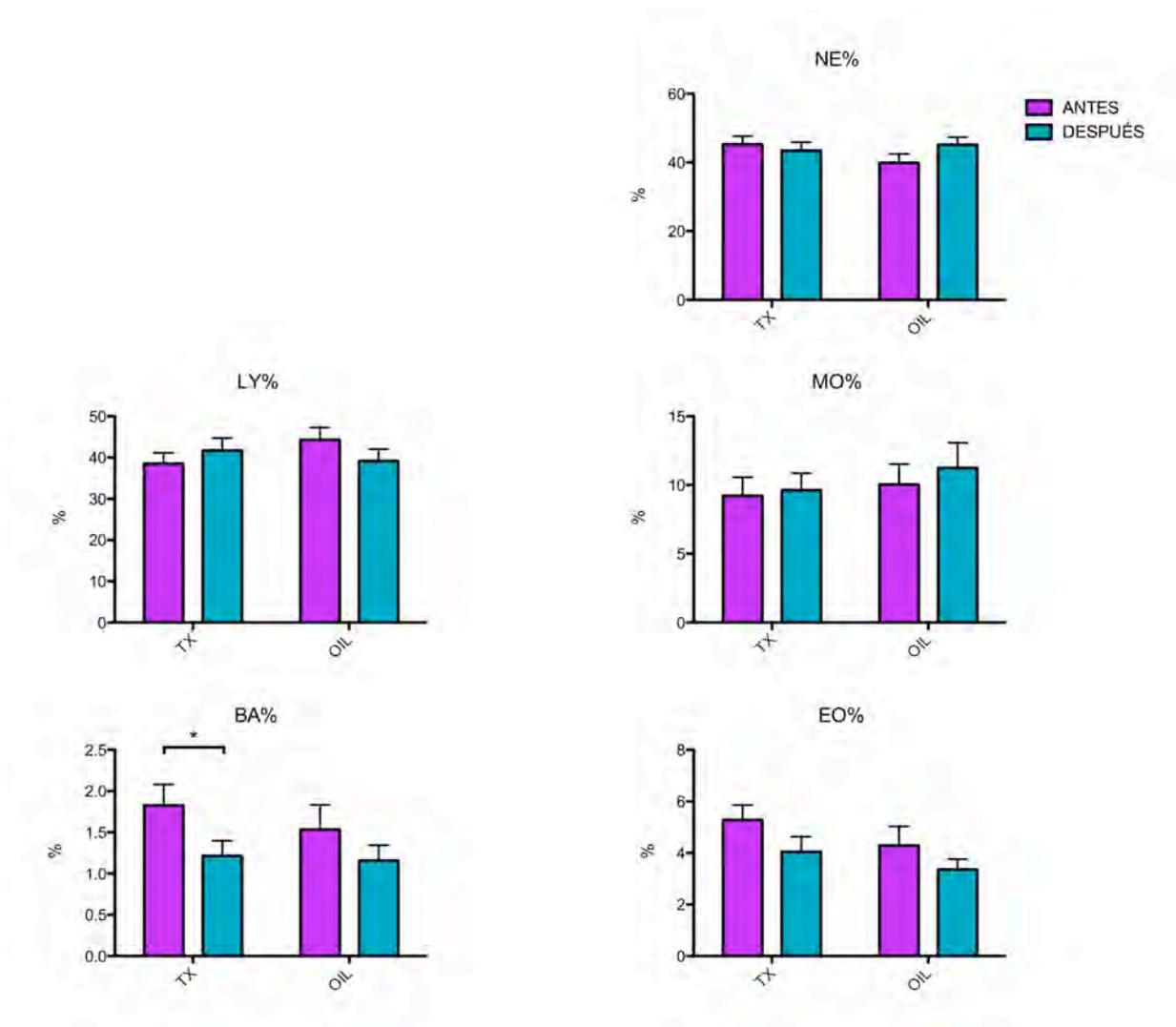
Al ser estos datos porcentuales hemos de tener en cuenta que un aumento o disminución no significa necesariamente que la población haya aumentado o disminuido de forma absoluta sino que ha aumentado o disminuido su proporción relativa en el conjunto de las células blancas.

Estas variaciones sólo pueden considerarse como una tendencia de la población ya que al hacer un análisis de los datos ninguna de ellas es estadísticamente significativa.

Estos datos indican que, aunque tanto el tratamiento con tamoxifén como con aceite provocan una disminución general del número total de células blancas, parece que el tratamiento con tamoxifén ralentiza la explosión de neutrófilos y monocitos (células mieloides) y en menor medida de eosinófilos y basófilos (también células del linaje mieloides).



**Figura 29. Variación de las poblaciones sanguíneas en valores absolutos tras el tratamiento.** En morado se representan los valores pre-tratamiento y en verde los valores post-tratamiento. Con los datos recogidos se realizó un análisis de tipo ANOVA de dos vías para ver la influencia del tratamiento en la variación de la población sanguínea. El nivel de significación se obtuvo utilizando el test de Bonferroni. \*: variaciones estadísticamente significativas (p-valor < 0,05). \*\*: variaciones altamente significativas (p-valor < 0,01).

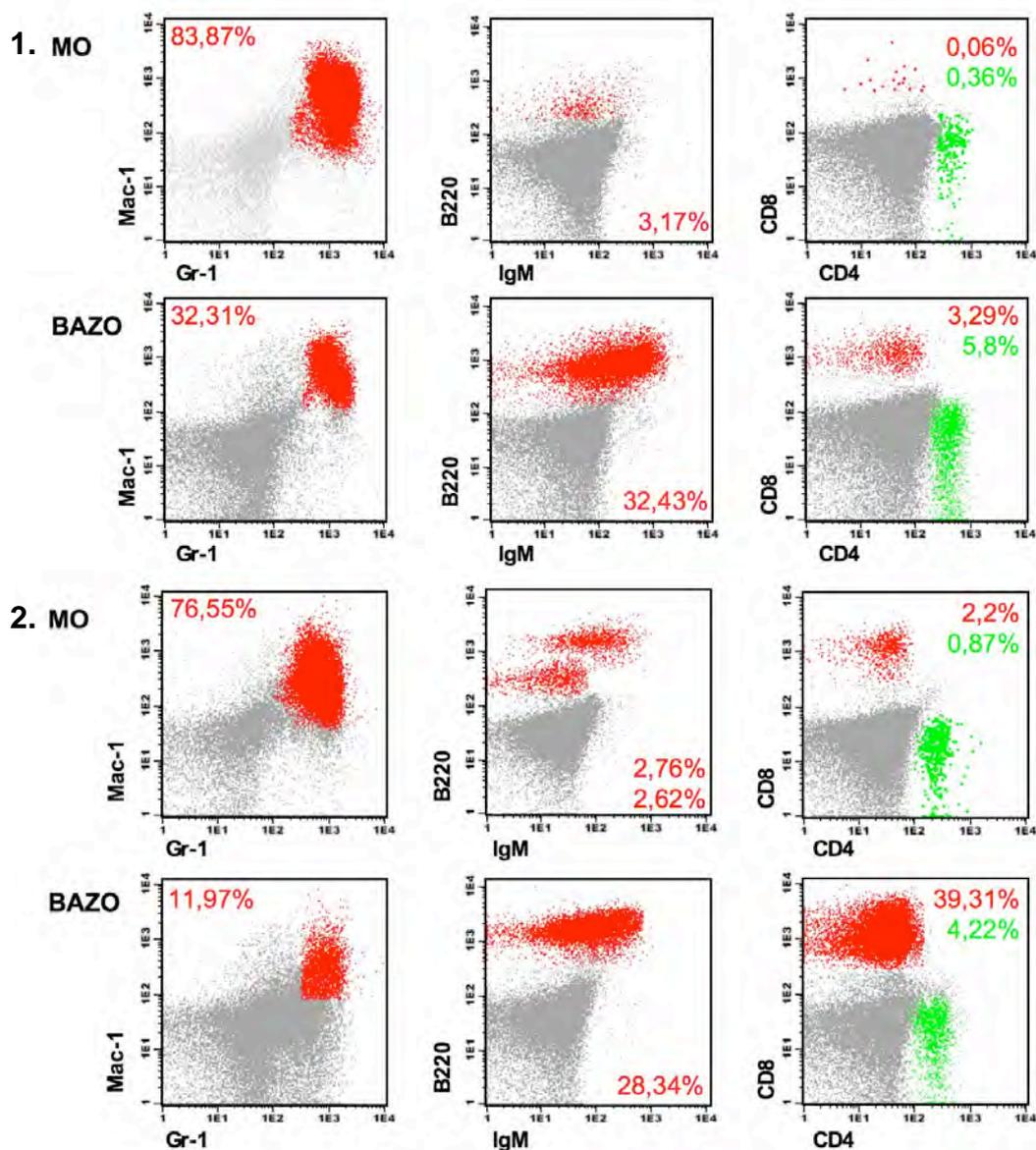


**Figura 30. Variación de las poblaciones sanguíneas en valores porcentuales tras el tratamiento.** En morado se representan los valores pre-tratamiento y en verde los valores post-tratamiento. Con los datos recogidos se realizó un análisis de tipo ANOVA de dos vías para ver la influencia del tratamiento en la variación de la población sanguínea. El nivel de significación se obtuvo utilizando el test de Bonferroni. \*: variaciones estadísticamente significativas (p-valor < 0,05).

Estos resultados sugieren que la reactivación de p53 no está actuando directamente sobre las poblaciones maduras de leucocitos. De ser así, se vería una disminución significativa en el número de células mieloides Gr1<sup>+</sup>Mac1<sup>+</sup> en el análisis por FACS, aunque los ratones analizados mediante esta técnica (de 4 ó 5 meses de edad) parecen estar en etapas iniciales de la enfermedad. En los análisis con HEMAVET® la caída debería ser mucho más significativa ya que los ratones analizados estaban enfermos de manera confirmada y, por tanto, con la enfermedad más avanzada que en los individuos analizados por FACS. Estos datos sugieren que la reactivación de p53 puede estar actuando directamente sobre las células progenitoras expuestas al estímulo oncogénico (las células Sca1<sup>+</sup>) haciendo que esta población disminuya y su descendencia madura se reduzca con el tiempo, o al menos no aumente, ralentizando así la progresión de la enfermedad.

### 4.3. El tratamiento con tamoxifén no parece ejercer un efecto drástico en la invasión de los órganos periféricos.

Otro hecho que apoya la hipótesis de que p53 no está actuando sobre la población de células maduras infiltrantes es que esta población tampoco se ve reducida en bazo y médula ósea. Como se mostró anteriormente, los ratones p53ERTAM<sup>K1</sup> x Sca1-BCR-ABLp210 al desarrollar la enfermedad experimentan un aumento de la población mieloide en médula ósea y bazo, órgano donde va acompañado de una drástica disminución de la población de linfocitos B. Al examinar estos linajes hematológicos en animales



**Figura 31. Poblaciones celulares hematológicas en bazo y médula ósea.** Se muestran imágenes del estudio por citometría de flujo de suspensiones celulares de bazo y médula ósea (MO) de dos ratones. Gráficos correspondientes a las células marcadas con Gr-1 y Mac-1 (linaje mieloide), IgM y B220 (linaje linfoide B) y CD4 y CD8 (linaje linfoide T). 1: BA679 (FN: 24.2.09) enfermo y tratado con tamoxifén a los 4 meses de edad. 2: BA860 (FN: 23.7.09) enfermo y tratado con aceite a los 4 meses de edad.

p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL diagnosticados como enfermos con HEMAVET® y tratados con tamoxifén o aceite, vemos este mismo patrón invasivo. Puesto que el animal es sacrificado para poder hacer un estudio de estas poblaciones, es imposible poder comparar resultados antes y después del tratamiento; por ello, comparamos poblaciones celulares de ratones tratados con tamoxifén *versus* tratados con aceite.

Al analizar los resultados obtenidos en este tipo de experimentos (Tabla 9) vemos cómo las poblaciones mieloides de médula ósea y bazo en ambos grupos experimentales son muy semejantes. Esto parece indicar que las células malignas infiltrantes en estos tejidos no disminuyen tras el tratamiento con tamoxifén.

**Tabla 9. Poblaciones celulares presentes en médula ósea y bazo de ratones enfermos p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL tras el tratamiento con tamoxifén o aceite.**

	Células Mieloides en MO	Células Mieloides en bazo	Linfocitos B en bazo
+ TX (n=17)	75,9% ± 8,2	20,3% ± 18,9	29,1% ± 13,7
+ Aceite (n=10)	76,5% ± 9,9	26,1% ± 20,5	32,0% ± 22,2

Se muestran los porcentajes medios de las distintas poblaciones analizadas mediante citometría de flujo de ratones diagnosticados como enfermos con HEMAVET® tratados con tamoxifén (TX) o con aceite. A cada valor le acompaña la desviación estándar del grupo experimental. MO: médula ósea.

#### 4.4. La restauración de p53 no desencadena senescencia celular para frenar el avance de la LMC en este modelo.

Las curvas de supervivencia de la colonia de los ratones p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABL-p210 así como los datos obtenidos del análisis de sus poblaciones hematológicas en sangre periférica, bazo y médula ósea sugieren que el restablecimiento de p53 estaría induciendo algún proceso que frena el avance de la enfermedad. Teniendo en cuenta que p53 actúa frente a los estímulos oncogénicos induciendo parada del ciclo celular, apoptosis o senescencia principalmente, hipotetizamos que p53 ralentiza la LMC por alguno de estos procesos. Para discernir el mecanismo de actuación de p53 en esta situación concreta se diseñó el siguiente experimento:

Se trataron con tamoxifén o con aceite, durante 7 días, animales p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL diagnosticados como enfermos con HEMAVET®, de al menos 15 semanas de edad. Los animales tratados fueron sacrificados 1, 3 ó 5 días tras finalizar el tratamiento y se recogieron muestras de sus órganos para realizar ensayos de citometría de flujo, de actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-Gal) y análisis anatómo-patológico como se describe en los materiales y métodos.

Se utilizaron para este experimento 28 ratones, 10 tratados con aceite y 18 tratados con tamoxifén, de edades comprendidas entre las 16 y las 23 semanas. Todos los ratones analizados, excepto uno, mostraron anatómicopatológicamente el desarrollo de una tumor hematológico bien del tipo mielóide, linfóide o ambos, con infiltraciones de células hematológicas más o menos maduras en diferentes órganos, principalmente pulmón, hígado, bazo, ganglios mesentéricos y riñón. En el anexo 8 se muestra toda la información referente a los ratones utilizados en este experimento. Las muestras recogidas de sus órganos fueron utilizadas para determinar la existencia de senescencia y apoptosis.

A pesar de haber establecido que el tamoxifén está retrasando la evolución de la enfermedad, desconocemos en qué momento, tras la reactivación de p53, este efecto será celular o molecularmente visible. Por eso, en el diseño del experimento se sacrificaron los individuos a las 24 h, a los 3 días o a los 5 días tras la finalización del tratamiento. En los experimentos *in vivo* se ha comprobado que el efecto del tamoxifén persiste de uno a tres días en los diferentes tejidos (timo, intestino y bazo) (Christophorou *et al*, 2005), por eso buscamos un posible efecto en este rango de tiempo.

Uno de los procesos que desencadena p53 es la senescencia. Para determinar si la restauración de p53 induce senescencia celular en los ratones enfermos, secciones histológicas de los mismos se sometieron a la tinción  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ -Gal). Las células senescentes aparecen de color azul al ser sometidas a este tipo de tinción (Figura 32).

Se realizó una estimación del número de células senescentes (azules) en cada órgano haciendo recuentos en secciones consecutivas del órgano analizado. Para ello, se establecieron cuatro categorías para cuantificar la presencia de células senescentes en cada muestra: i) alguna célula senescente en algún campo, ii) alguna célula senescente en todos los campos, iii) más de 5 células senescentes en todos los campos o muchas células senescentes en algún campo y iv) muchas células senescentes en todos los campos. La cuantificación se realizó visualmente al microscopio utilizando un objetivo 20X. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10. Estimación del número de células senescentes en los distintos órganos de ratones enfermos tratados con tamoxifén o con aceite.**

INDIVIDUO	TEJIDO					
	HÍGADO	BAZO	TIMO	RIÑÓN	MÉDULA	PULMÓN
BA679	INF	INF		INF		
BA683				INF		
BA643		INF	INF			INF
BA697	INF		INF			
BA657	INF	INF	INF	INF		INF
BA720	INF					
BA751		INF	INF	INF		
BA822	INF	INF		INF		
BA847	INF		INF	INF		
BA818	INF	INF	INF	INF		
BA856		INF	INF			
BA881	INF	INF		INF		INF
BA863		INF	INF	INF		
BA831		INF	INF	INF		
BA871		INF	INF	INF		
BA678	INF	INF	INF	INF		INF
BA653	INF	INF	INF			INF
BA719	INF	INF				
BA841		INF	INF	INF		
BA845	INF	INF	INF	INF		INF
BA860	INF	INF	INF	INF		
BA869		INF				
BA890						

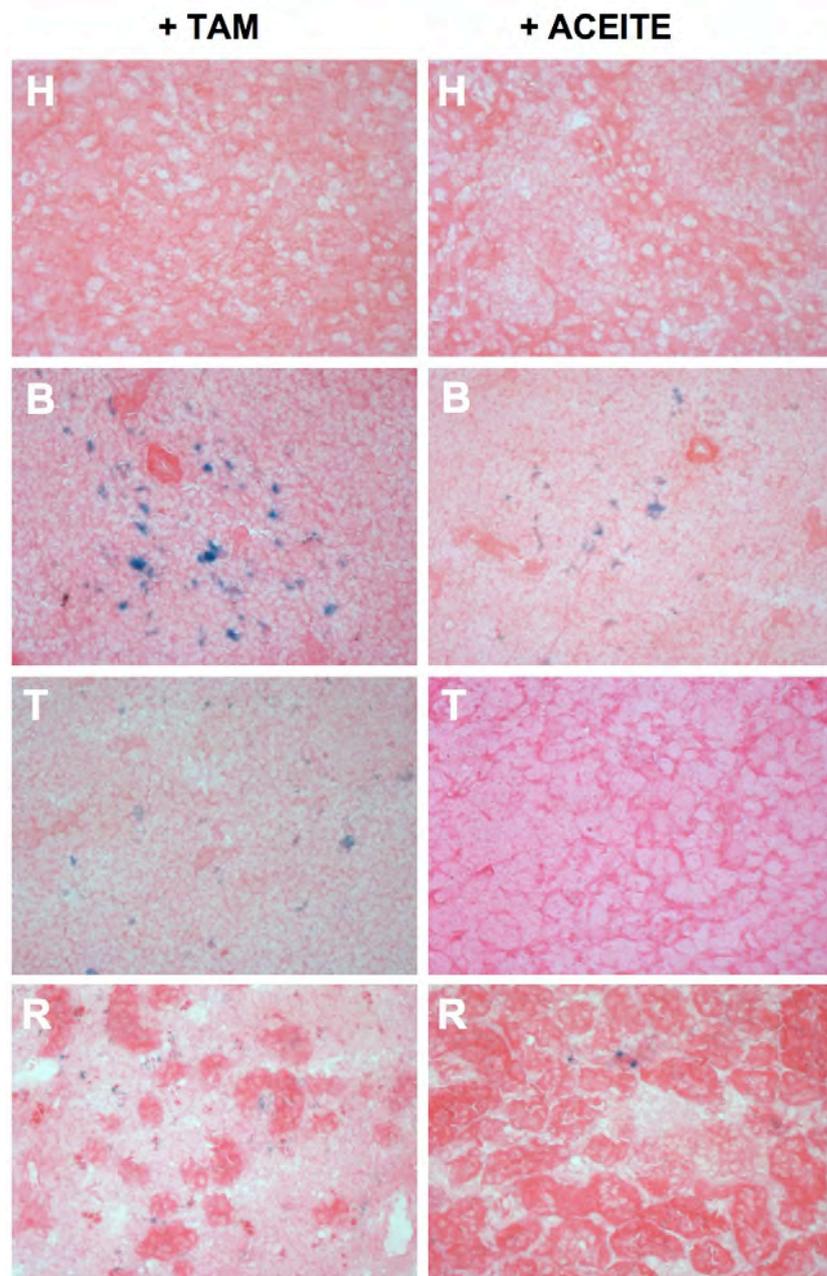
Alguna célula senescente en algún campo  
 Alguna célula senescente en todos los campos  
 Bastantes (más de 5) células senescentes en todos los campos o muchas en un campo.  
 Muchas células senescentes en todos los campos.

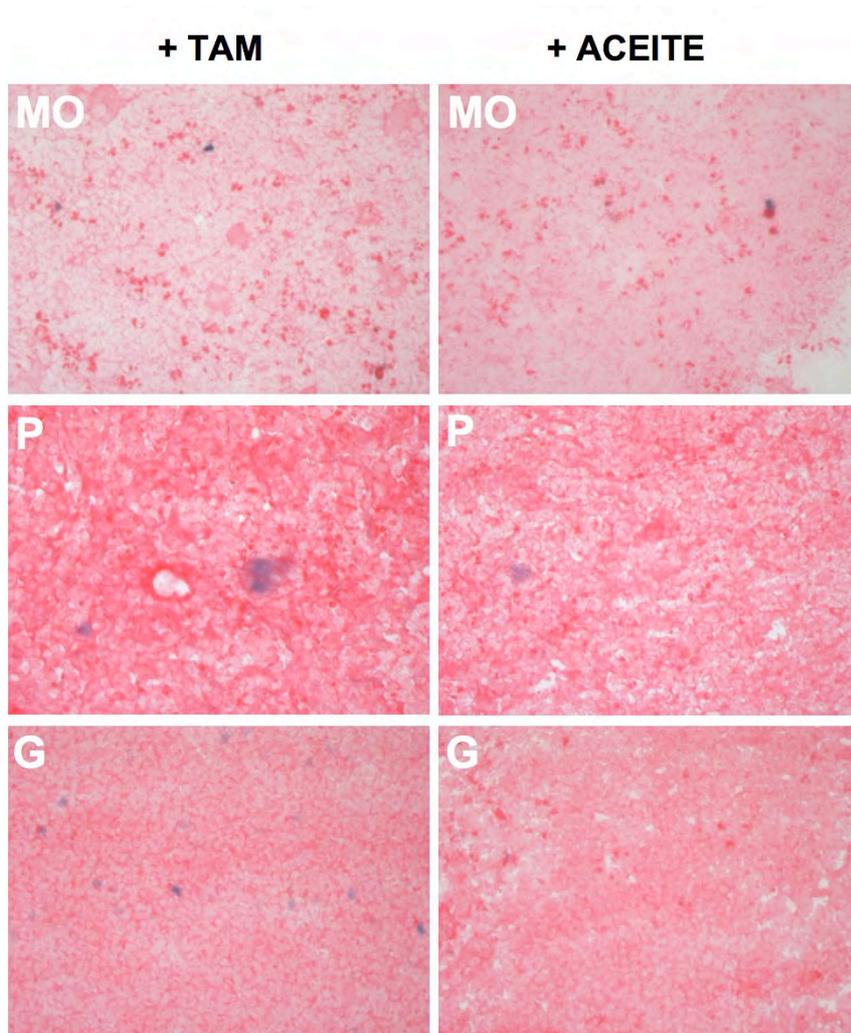
A la izquierda se muestra el número de identificación de cada ratón y se indica su tratamiento con el color de fondo: tratado con tamoxifén, fondo morado; tratado con aceite, fondo verde. Los colores indican el número de células senescentes según el código especificado en la base de la tabla. Las casillas en blanco son muestras no analizadas. Con la abreviatura INF se indican los tejidos que según los diagnósticos de Anatomía Patológica se encuentran infiltrados.

Como podemos ver en la tabla 10 no se encontraron diferencias significativas en el número de células senescentes presentes en los tejidos de los ratones tratados con tamoxifén en comparación con los tratados con aceite. En bazo y en riñón encontramos numerosas células senescentes prácticamente en todas las muestras. Curiosamente, en las muestras de bazo las células senescentes parecían localizarse de forma preferente en los alrededores de los vasos sanguíneos, hecho que encaja muy bien con la posibilidad de que sean células tumorales infiltradas. Esto se observa tanto en muestras de animales tratados con tamoxifén como de animales tratados con aceite, lo que sugiere que se trata de un nivel de senescencia basal en estos animales. En hígado no encontramos prácticamente ninguna célula senescente en ninguna de las muestras recogidas tanto de animales tratados con tamoxifén como con aceite. Es en las muestras de pulmón, timo y médula ósea donde podría haber alguna diferencia entre los dos tratamientos, aunque el resultado tampoco es muy claro al no comportarse de la misma manera todas las muestras recogidas de cada uno de los dos grupos experimentales.

Se intentó hacer una correlación entre estas observaciones y los diagnósticos de Anatomía Patológica en los que se indicaban los tejidos infiltrados por las células tumorales. Es lógico pensar que son precisamente los tejidos infiltrados en los que deberían encontrarse las células senescentes, si este fuera el proceso desencadenado por p53 en respuesta al estímulo oncogénico. Asimismo, los tejidos de ratones enfermos y tratados con tamoxifén, pero no invadidos por las células tumorales, no deberían presentar células senescentes. Sin embargo, los datos muestran la existencia de senescencia tanto en tejidos infiltrados como no infiltrados, tanto en ratones tratados con tamoxifén como con aceite; y al revés, hay tejidos infiltrados con y sin presencia de senescencia clara.

Estos resultados sugieren que la senescencia no es el proceso desencadenado por p53 para frenar la progresión de la LMC en estos ratones.





**Figura 32. Tinción SA-β-Gal de los diversos tejidos de ratones enfermos tratados con tamoxifén o aceite.** Se muestran secciones de los diferentes órganos de ratones tratados con tamoxifén o con aceite. Las imágenes mostradas son un ejemplo representativo de los resultados obtenidos en cada órgano y grupo experimental. Las fotografías fueron realizadas al microscopio con el objetivo 20X. H: hígado, B: bazo, T: Timo, R: riñón, MO: médula ósea, P: pulmón, G: ganglio.

#### 4.5. La restauración de p53 podría estar induciendo apoptosis para ralentizar la progresión de la LMC.

Otro de los procesos que puede desencadenar p53 frente a estímulos oncogénicos es la apoptosis. Existen diversas técnicas que permiten la detección de células apoptóticas en los tejidos. Para averiguar si tras la restauración de p53 se estaba induciendo apoptosis en nuestro modelo de estudio decidimos llevar a cabo la tinción con anexina V y yoduro de propidio de poblaciones celulares derivadas de sangre periférica, timo, bazo y médula ósea.

Se sometieron a este tipo de estudio muestras de sangre periférica, bazo, timo y médula ósea de los ratones enfermos tratados con tamoxifén o con aceite usados en el apartado anterior. Las suspensiones celulares de estos órganos fueron marcadas con anexina V y yoduro de propidio, así como con anticuerpos anti-Sca1 y anti-linaje marcados con diferentes fluorocromos. Para determinar el efecto del tamoxifén en ausencia del oncogén p210BCR-ABL se incluyeron en el experimento 5 ratones de genotipo p53<sup>ER/ER</sup> que fueron tratados con tamoxifén durante el mismo periodo.

En la figura 33 se muestra el porcentaje de células apoptóticas en sangre periférica, bazo, timo y médula ósea de animales tratados con tamoxifén o aceite tras haber manifestado síntomas de enfermedad. Las células sometidas a este ensayo de detección de muerte celular fueron también marcadas con anticuerpos para identificar su grado de diferenciación. Las células fueron divididas en tres poblaciones celulares: Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (células indiferenciadas), Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup> (células parcialmente comprometidas) y Sca1<sup>-</sup>Lin<sup>+</sup> (células maduras). Se analizó el porcentaje de apoptosis en cada una de estas tres poblaciones en sangre periférica (Figura 34), bazo (Figura 35), timo (Figura 36), y médula ósea (Figura 37). Los datos de los distintos ratones individuales se representan con histogramas en las figuras 38 y 39. El porcentaje de apoptosis, tanto temprana como tardía, en la población Sca1<sup>-</sup>Lin<sup>+</sup> (células maduras) está en torno al 0%.

Podemos observar un aumento en el número de células apoptóticas en las poblaciones Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> y Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup> de los ratones tratados con tamoxifén en comparación con los ratones control (tratados con aceite o de genotipo p53<sup>ER/ER</sup> tratados con tamoxifén).

La población Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de sangre periférica es el compartimento donde el aumento es más aparente. Podemos observar cómo en las muestras de los animales tratados con aceite o de los ratones control p53<sup>ER/ER</sup> el porcentaje de apoptosis, tanto temprana (AnV<sup>+</sup>IP<sup>-</sup>) como tardía (AnV<sup>+</sup>IP<sup>+</sup>), no supera el 5% de las células Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (células más indiferenciadas) salvo en dos casos. Sin embargo, los porcentajes de células apoptóticas superan el 5% en 6 de los 10 animales analizados, rebasando el 15% en dos casos, en los animales enfermos tratados con tamoxifén.

En las muestras de timo, la apoptosis no supera el 2% en la población  $Sca1^{+}Lin^{-}$  de los animales control, mientras que en 7 de los 10 animales enfermos tratados con tamoxifén la población apoptótica, tanto temprana como tardía, es mayor que en los controles, superando en 3 casos el 6%.

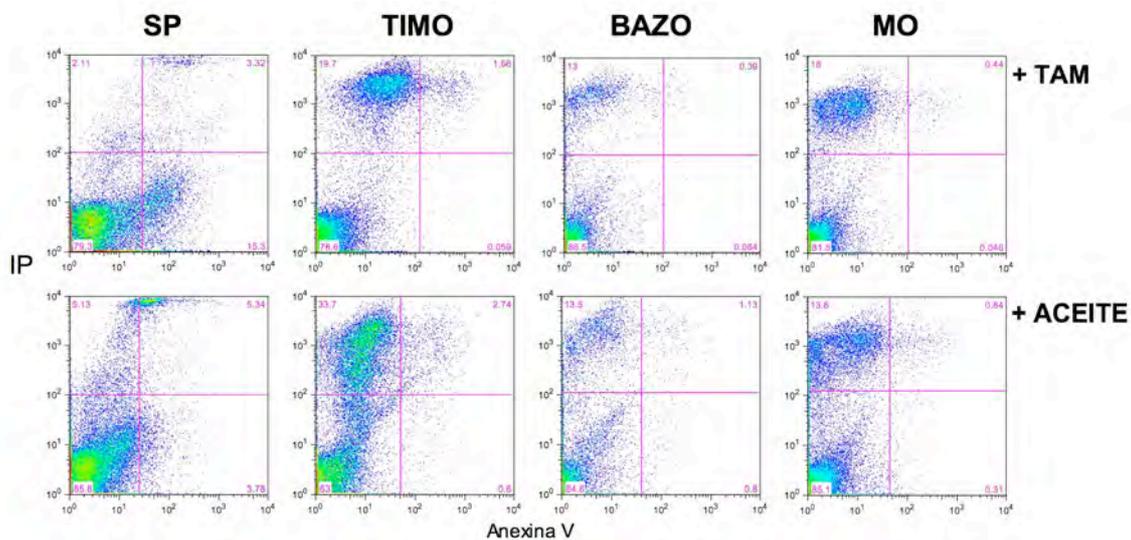
Las muestras de bazo y médula ósea muestran un ligero aumento de células apoptóticas en la población  $Sca1^{+}Lin^{-}$  de los animales tratados con tamoxifén, sin embargo, esta tendencia es menos evidente.

Un hecho observable tanto en las muestras de sangre y timo como en bazo y médula ósea es que el aumento de apoptosis deja de verse en los animales analizados 5 días tras finalizar el tratamiento, mientras que los analizados 1 ó 3 días después de la última inyección sí muestran un incremento de las poblaciones apoptóticas.

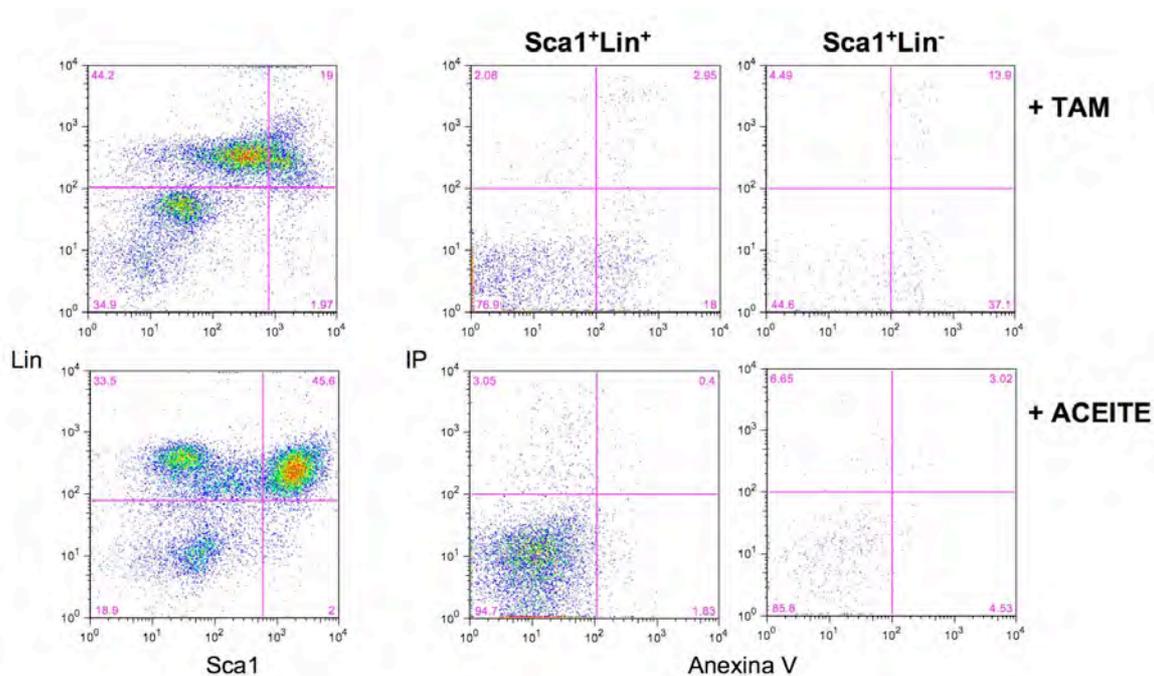
En la población  $Sca1^{+}Lin^{+}$  de sangre periférica y timo podemos ver un aumento de apoptosis en los animales tratados con tamoxifén respecto a los animales control. De hecho, en cinco de los animales analizados observamos una apoptosis superior al 8%, mayor que en cualquiera de las muestras control, y sólo en dos casos los niveles de apoptosis son mínimos ( $< 2\%$ ) en las muestras de sangre periférica.

En las muestras de timo, los niveles de apoptosis de casi todas las muestras se encuentran en unos niveles basales ( $\sim 2\%$ ), como en los controles, salvo en tres casos donde los niveles de apoptosis se elevan hasta el 8, 12 y 18% respectivamente.

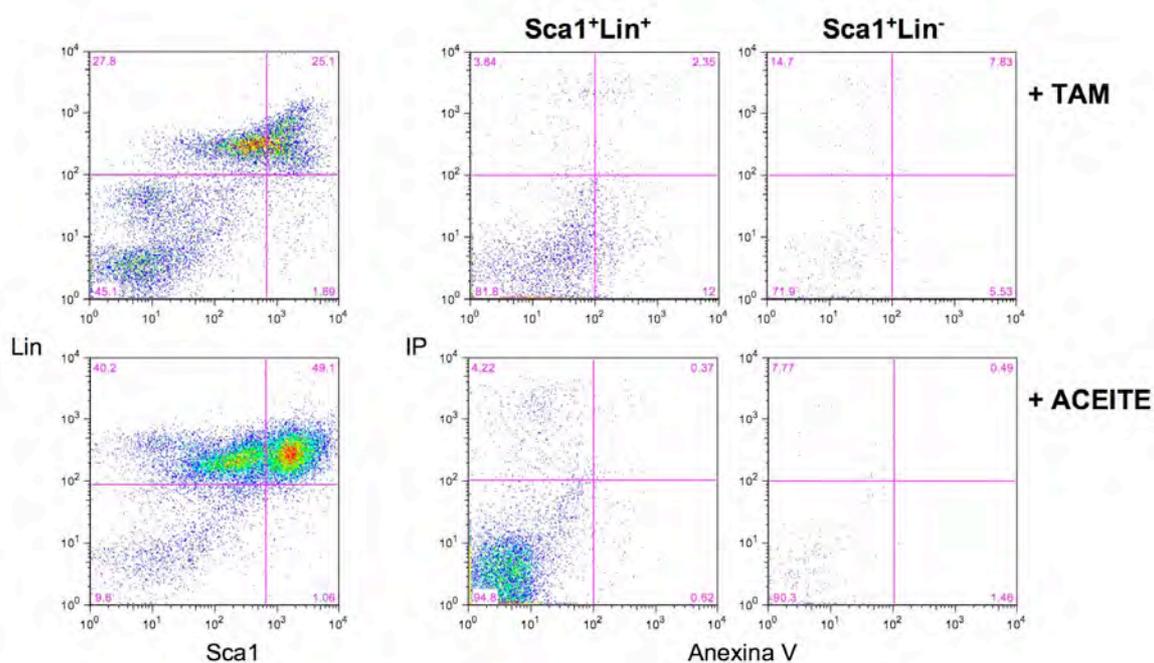
Por último, en bazo y médula ósea, el tratamiento con tamoxifén no parece tener un efecto claro en esta población celular concreta.



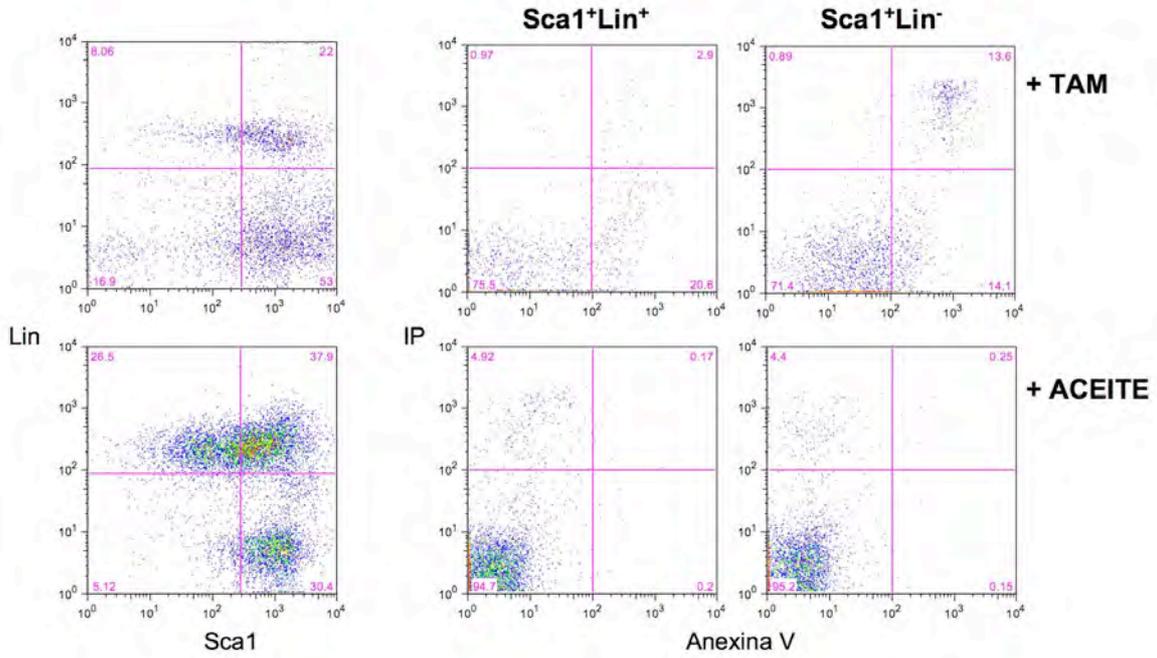
**Figura 33. Análisis por citometría de flujo de suspensiones celulares de sangre periférica, timo, bazo y médula ósea marcadas con anexina V y IP de animales tratados con tamoxifén o con aceite. SP: sangre periférica, MO: médula ósea, TAM: tamoxifén, IP: ioduro de propidio.**



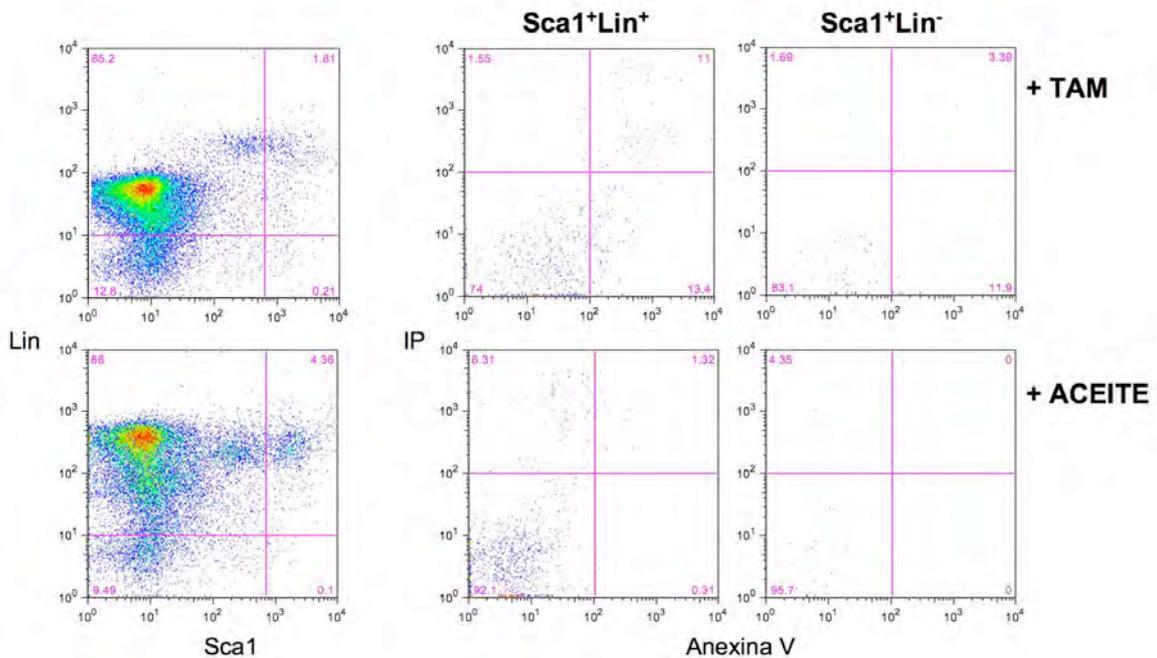
**Figura 34.** Análisis por citometría de flujo de suspensiones celulares de sangre periférica de animales tratados con tamoxifén o con aceite, marcadas con anexina V, IP y anticuerpos específicos para la identificación de las poblaciones celulares  $Sca1^{+}Lin^{-}$  y  $Sca1^{+}Lin^{+}$ . El porcentaje de células de cada población se muestra en los cuadrantes correspondientes.



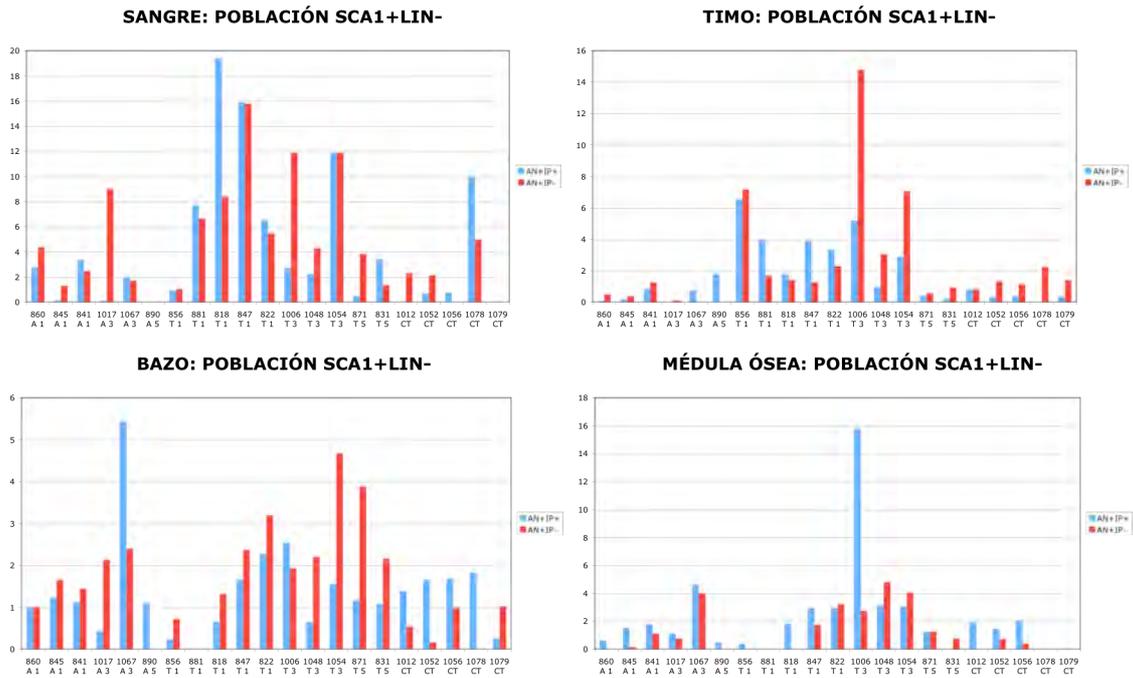
**Figura 35.** Análisis por citometría de flujo de suspensiones celulares de bazo de animales tratados con tamoxifén o con aceite, marcadas con anexina V, IP y anticuerpos específicos para la identificación de las poblaciones celulares  $Sca1^{+}Lin^{-}$  y  $Sca1^{+}Lin^{+}$ . El porcentaje de células de cada población se muestra en los cuadrantes correspondientes.



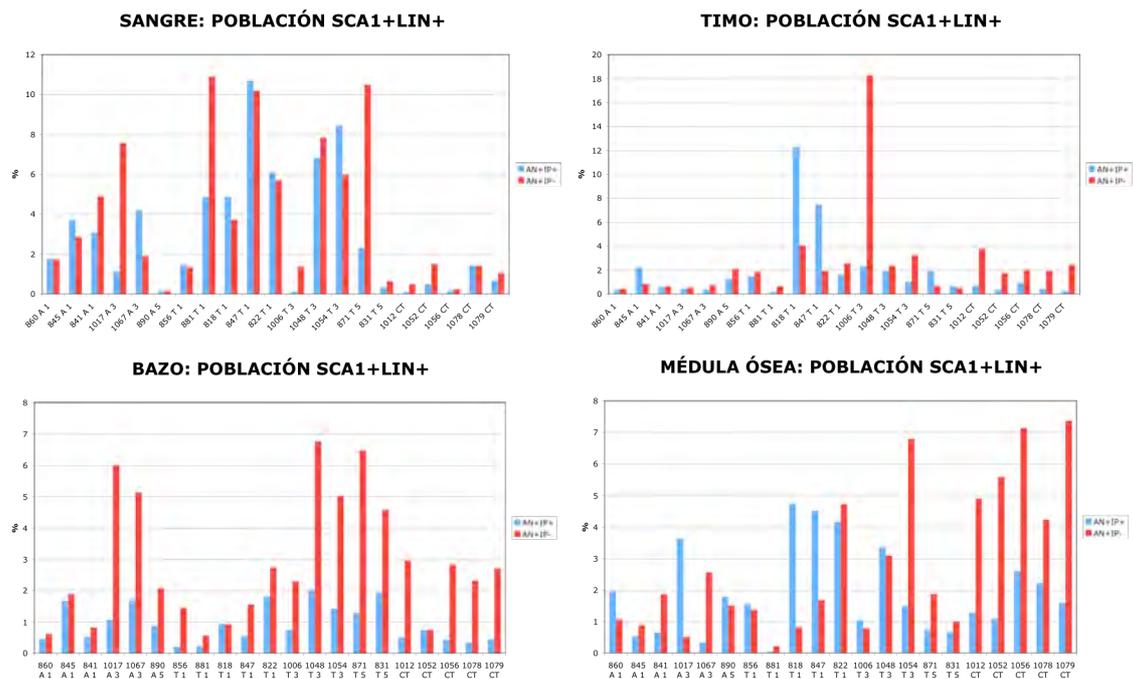
**Figura 36.** Análisis por citometría de flujo de suspensiones celulares de timo de animales tratados con tamoxifén o con aceite, marcadas con anexina V, IP y anticuerpos específicos para la identificación de las poblaciones celulares Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> y Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup>. El porcentaje de células de cada población se muestra en los cuadrantes correspondientes.



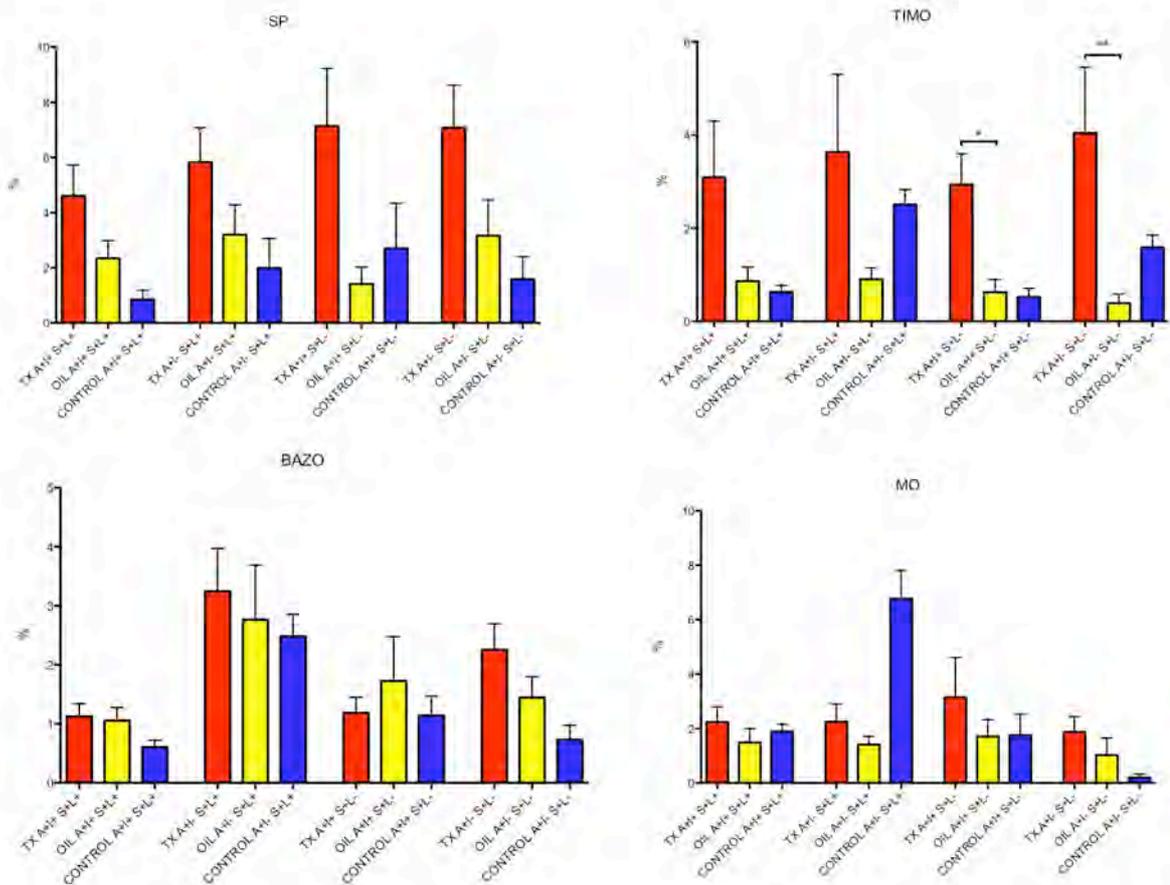
**Figura 37.** Análisis por citometría de flujo de suspensiones celulares de médula ósea de animales tratados con tamoxifén o con aceite, marcadas con anexina V, IP y anticuerpos específicos para la identificación de las poblaciones celulares Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> y Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup>. El porcentaje de células de cada población se muestra en los cuadrantes correspondientes.



**Figura 38. Histogramas de los porcentajes de células apoptóticas en la población Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de los diferentes órganos de ratones individuales.** A: Individuo tratado con aceite, T: Individuo tratado con tamoxifén, CT: Individuo control (p53<sup>ER/ER</sup>) tratado con tamoxifén. El número que se indica a continuación del tratamiento hace referencia al número de días entre la finalización del tratamiento y el sacrificio del animal. El número que se indica sobre el tratamiento es la identificación del animal. Se representa en azul la población anexina V<sup>+</sup> IP<sup>+</sup> (AnV<sup>+</sup>IP<sup>+</sup>) o apoptosis tardía, y en rojo la población anexina V<sup>+</sup> IP<sup>-</sup> (AnV<sup>+</sup>IP<sup>-</sup>) o apoptosis temprana.



**Figura 39. Histogramas de los porcentajes de células apoptóticas en la población Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup> de los diferentes órganos de ratones individuales.** A: Individuo tratado con aceite, T: Individuo tratado con tamoxifén, CT: Individuo control (p53<sup>ER/ER</sup>) tratado con tamoxifén. El número que se indica a continuación del tratamiento hace referencia al número de días entre la finalización del tratamiento y el sacrificio del animal. El número que se indica sobre el tratamiento es la identificación del animal. Se representa en azul la población anexina V<sup>+</sup> IP<sup>+</sup> (AnV<sup>+</sup>IP<sup>+</sup>) o apoptosis tardía, y en rojo la población anexina V<sup>+</sup> IP<sup>-</sup> (AnV<sup>+</sup>IP<sup>-</sup>) o apoptosis temprana.



**Figura 40. Análisis estadístico de los datos de muerte celular por apoptosis de las diferentes poblaciones celulares analizadas.** Se representan los valores correspondientes a animales tratados con tamoxifén (en rojo), con aceite (en amarillo) y los controles (en azul). SP: sangre periférica, MO: médula ósea, A: anexina V, I: IP, S: Sca1, L: Lin.

Los valores de muerte celular se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de una vía, para estudiar las diferencias entre los porcentajes de células apoptóticas (tempranas y tardías) en las poblaciones Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> y Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup>, de animales tratados con tamoxifén, con aceite o los animales control. El test estadístico llevado a cabo para analizar la significación de las diferencias fue el test de comparaciones múltiples de Dunn (*Dunn's Multiple Comparison Test*).

Según este estudio, al comparar las muestras tratadas con tamoxifén con las tratadas con aceite, las únicas diferencias estadísticamente significativas se observan en la población Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> del timo, tanto en la apoptosis temprana (p-valor = 0,0042) como tardía (p-valor = 0,0135).

No existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de apoptosis de animales tratados con tamoxifén *versus* aceite en el resto de los órganos. Sin embargo, podemos observar una tendencia al aumento de las células apoptóticas (AnV<sup>+</sup>IP<sup>-</sup> y AnV<sup>+</sup>IP<sup>+</sup>) de las poblaciones Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> y Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup> en las muestras de sangre periférica y timo de animales tratados con tamoxifén frente a los tratados con aceite. Esto no sucede de forma tan clara en bazo y médula ósea. En las muestras de bazo, parece que hay un aumento de células en apoptosis temprana en las poblaciones Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> y Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup>, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Las muestras de la médula ósea muestran también una ligera tendencia al alza en la apoptosis, tanto temprana como tardía, en la población Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>. El resto de las poblaciones de estos dos órganos muestran unos valores similares en el porcentaje de células apoptóticas independientemente del tratamiento recibido.

Estos resultados parecen indicar que el retraso en la progresión de la LMC originada por el oncogén p210BCR-ABL al restaurar la funcionalidad de la proteína p53 está mediado por el desencadenamiento de la muerte celular por apoptosis en el compartimento de las células madre hematopoyéticas, es decir, las células Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> principalmente en sangre periférica y timo, y en menor medida en las células progenitoras cuya diferenciación está parcialmente comprometida (las células Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup>) en sangre y timo. Las células que expresan el marcador Sca1 son las únicas que expresan el oncogén p210BCR-ABL, aunque no el 100% de ellas (Miles *et al*, 1997). Es posible que el pequeño porcentaje de células con el estímulo oncogénico sean las que están sufriendo el proceso de apoptosis. Si son estas células transformadas las que está matando el tratamiento vía p53, entonces el retraso observado en la progresión de la enfermedad vendría ocasionado no por un descenso de la población mielóide madura acumulada en los diversos órganos del individuo enfermo sino por una disminución de la producción de nuevas células invasoras. Es curioso que este efecto no se vea de manera más drástica en la médula ósea, ya que es allí donde cabría esperar que hubiera más progenitores mieloides malignos al ser el órgano hematopoyético principal de este linaje. No obstante, el aumento de células blásticas en sangre periférica observado en los individuos enfermos de LMC es coherente con que sea en este tejido donde se observa un mayor nivel de apoptosis y precisamente, en estas células indiferenciadas.

## 5. EFECTO DE LA RESTAURACIÓN DE p53 SOBRE LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN ENSAYOS *in vitro*

### 5.1. La restauración de p53 reduce el número de colonias derivadas de células hematopoyéticas de animales enfermos.

Como hemos observado en el apartado anterior, la restauración de p53 induce apoptosis de las células Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> en animales enfermos (*in vivo*). Para confirmar esta observación en experimentos *in vitro* y así determinar si el tratamiento con tamoxifén afecta a la capacidad de expansión de los progenitores hematopoyéticos, se llevó a cabo un ensayo de formación de colonias.

En este ensayo se cultivan células del bazo, médula ósea y sangre periférica sobre un medio semisólido en el cual sobreviven solamente los progenitores, dividiéndose hasta formar colonias visibles. El número de colonias que aparezca será proporcional al número de progenitores de partida que han sobrevivido y proliferado en presencia del tratamiento con 4-hidroxitamoxifén (4-OHT) o su excipiente (etanol). Al comparar las colonias crecidas en presencia/ausencia de 4-OHT, podremos averiguar si la reactivación de p53, vía 4-OHT, está efectivamente inhibiendo la capacidad de expansión de estos progenitores.

La ventaja de este experimento frente a los ensayos *in vivo* es que las células de un mismo ratón, con su carga génica particular y única, pueden cultivarse tanto en presencia como en ausencia de 4-OHT. Es decir, en este experimento se comparan los efectos de los distintos tratamientos (4-OHT *versus* etanol) sobre una misma muestra de células, en lugar de comparar los efectos sobre poblaciones celulares de distintos ratones, con la variación individual que eso supone.

Las células recogidas se cultivaron en presencia de 4-OHT o etanol durante una semana. Se realizaron recuentos del número de colonias los días 4 y 7 de cultivo. Tras el periodo de cultivo se recogieron las células y se contaron en una cámara de Neubauer.

Se sometieron a este experimento 13 ratones de genotipo p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL que mostraron síntomas de enfermedad mediante recuento leucocitario con HEMAVET<sup>®</sup>, y 4 ratones control de genotipo p53<sup>+/+</sup> hermanos de los anteriores y de aspecto sano.

En la siguiente tabla (Tabla 11) se muestran el número de colonias visibles los días 4 y 7 de incubación. En el caso de los ratones BA1150 y BA1157 este recuento se realizó los días 6 y 9 debido al lento crecimiento de las colonias, intentando realizar el conteo cuando las colonias tenían un aspecto semejante al que presentaban las demás los días 4 y 7.

**Tabla 11. Número de colonias hematopoyéticas por placa contadas los días 4 y 7 de incubación.**

## DÍA 4

ÓRGANO	BAZO	BAZO	MÉDULA ÓSEA	MÉDULA ÓSEA	SANGRE	SANGRE
4-OHT	+	-	+	-	+	-
BA1150 <sup>(1)</sup>	85	76	80	103	13	13
BA1151	113	107	8	8	11	25
BA1177	253	232	104	98	35	49
BA1190	650	630	127	145	32	24
BA1234	37	53	328	328	5	0
BA1254	57	74	36	57	9	9
BA1256	220	236	169	166	10	10
BA1264	145	167	136	147	13	15
BA1356	71	90	73	70	15	19
BA1372	92	124	104	106	14	30
BA1434	79	124	97	85	29	19
BA1438	21	22	38	45	13	16
BA1449	10	22	35	67	1	1
BA1157 <sup>(1)</sup>	37	18	78	82	10	10
BA1238	5	6	34	33	2 <sup>(2)</sup>	1 <sup>(2)</sup>
BA1463	0	1	41	56	1	3
BA1464	20	17	31	27	7	2

## DÍA 7

ÓRGANO	BAZO	BAZO	MÉDULA ÓSEA	MÉDULA ÓSEA	SANGRE	SANGRE
4-OHT	+	-	+	-	+	-
BA1150 <sup>(1)</sup>	89	76	88	102	9	9
BA1151	82	71	14	15	26	29
BA1177	218	248	96	115	35	60
BA1190	TMTC	TMTC	109	109	25	20
BA1234	48	49	TMTC	TMTC	6	7
BA1254	50	53	40	43	17	18
BA1256	124	150	71	100	10	15
BA1264	147	177	99	117	11	20
BA1356	69	97	43	75	8	15
BA1372	69	100	61	88	13	20
BA1434	75	95	63	73	30	35
BA1438	25	46	40	71	22	22
BA1449	21	28	54	102	2	3
BA1157 <sup>(1)</sup>	36	26	60	77	7	10
BA1238	10	11	37	37	4 <sup>(2)</sup>	3 <sup>(2)</sup>
BA1463	4	3	50	56	5	1
BA1464	23	16	37	33	9	9

En rosa se marcan los ratones de genotipo p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL y en amarillo los ratones p53<sup>+/+</sup>.

<sup>(1)</sup> Colonias contadas los días 6 y 9 en vez de 4 y 7 debido al lento crecimiento de las colonias.

<sup>(2)</sup> Colonias procedentes de un tercio de células iniciales en comparación con las demás muestras debido al escaso número de células recogidas.

TMTC: Demasiadas colonias para ser contadas.

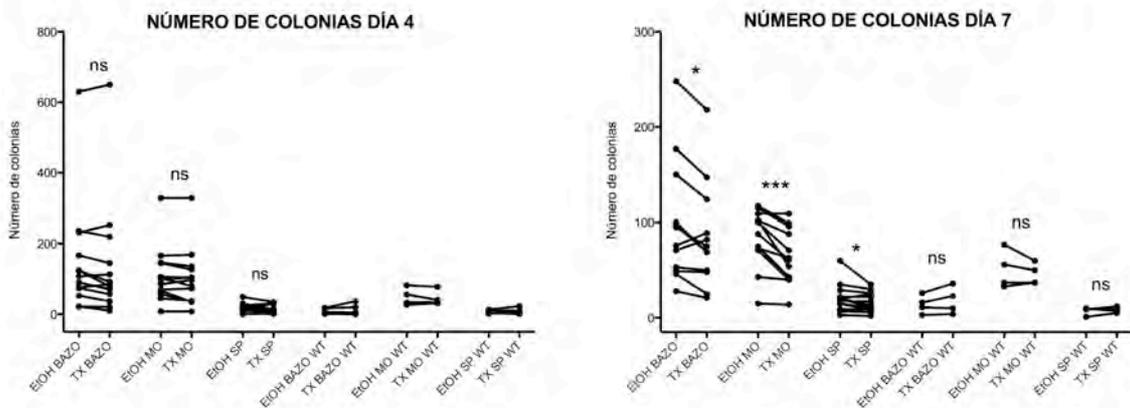
Debido a la gran variabilidad intrínseca de este experimento, asociada a la manipulación y conteo de las células, pequeñas variaciones en el número de colonias no pueden atribuirse inequívocamente al efecto del tratamiento.

Analizando gráficamente el número de colonias podemos observar (Figura 41):

-El número de colonias obtenidas a partir de células de ratones  $p53^{+/+}$  es mucho menor que el obtenido de los ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  enfermos, y además no varía con el tratamiento.

-A día 4 no vemos una variación en el número de colonias entre las placas tratadas con 4-OHT y las tratadas con etanol. En el gráfico vemos cómo las líneas que unen los datos del mismo ratón con/sin 4-OHT son prácticamente horizontales. El análisis estadístico (test de Wilcoxon para datos apareados) nos indica que las diferencias no son significativas (bazo, p-valor = 0,1421; médula ósea, p-valor = 0,1422; sangre periférica, p-valor = 0,4065).

-A día 7 vemos cómo el número de colonias procedentes de muestras de ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  enfermos es menor en las placas tratadas con 4-OHT que en sus parejas tratadas con etanol. Estas diferencias son significativas en las muestras derivadas de los diferentes órganos (bazo, p-valor = 0,0206; médula ósea, p-valor = 0,001; sangre periférica, p-valor = 0,018). Sin embargo, las diferencias no son significativas cuando se analizan muestras de ratones control  $p53^{+/+}$  (bazo, p-valor = 0,2693; médula ósea, p-valor = 0,500; sangre periférica, p-valor = 0,5862).

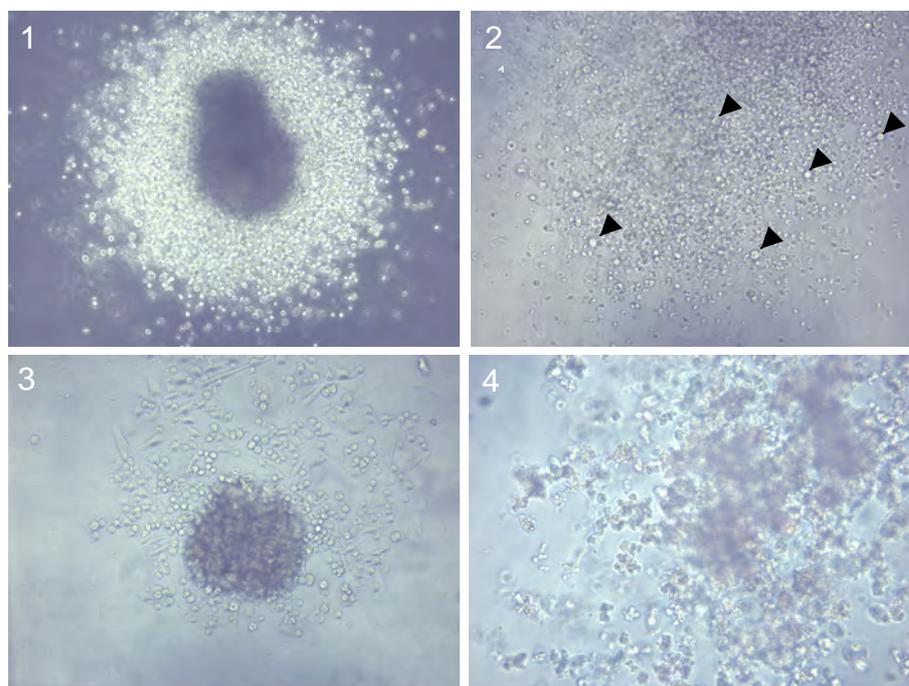


**Figura 41. Análisis estadístico del número de colonias hematopoyéticas contadas a día 4 y día 7.** Las líneas unen los números de colonias derivadas del mismo ratón tratados con 4-OHT (TX) o con etanol (EtOH). WT: datos correspondientes a los ratones de genotipo  $p53^{+/+}$ . Se representan aquí los datos de la tabla 11. ns: diferencias no significativas. \*: diferencias significativas. \*\*\*: diferencias altamente significativas ( $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$ , n= 13;  $p53^{+/+}$ , n= 4).

## 5.2. El tratamiento con 4-OHT disminuye el número de colonias CFU-G.

En 9 de los ratones analizados se realizó un conteo del número de colonias teniendo en cuenta el tipo de progenitores del que derivaban, para averiguar si el tratamiento estaba afectando a algún tipo en concreto. El

recuento se realizó el día 7 de cultivo. En las placas se encontraron 4 tipos diferentes de colonias (Figura 42): CFU-G (Unidad formadora de colonias de granulocitos), CFU-M (Unidad formadora de colonias de macrófagos), CFU-GM (Unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos) y BFU-E (Unidad formadora de colonias de eritrocitos). Los resultados del conteo de los distintos tipos de colonias se muestran en la tabla 12 y en la figura 43.



**Figura 42. Microfotografías de los cuatro tipos de colonias observadas en el ensayo de formación de colonias. 1: CFU-G (10X), 2: CFU-GM (10X), 3: CFU-M (10X), 4: BFU-E (40X). Las flechas negras señalan los macrófagos (células más grandes) en la colonia mixta de granulocitos y macrófagos.**

**Tabla 12. Número de colonias de cada tipo contadas tras 7 días de cultivo.**

BA1238						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	4	3	8	9	35	31
BFU-E	0	0	0	0	0	0
CFU-M	0	0	0	1	0	1
CFU-GM	0	0	2	1	2	4

BA1463						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	2	1	3	3	43	49
BFU-E	3	0	0	0	1	2
CFU-M	0	0	0	0	0	2
CFU-GM	0	0	1	0	6	3

BA1464						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	3	4	14	9	35	29
BFU-E	5	5	6	4	1	1
CFU-M	1	0	1	0	1	2
CFU-GM	0	0	2	3	0	1

## Resultados

BA1254						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	15	12	36	34	31	37
BFU-E	1	3	6	8	1	2
CFU-M	0	0	3	3	0	0
CFU-GM	1	3	5	7	8	4

BA1256						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	7	11	68	82	57	85
BFU-E	2	1	21	39	0	3
CFU-M	1	0	3	5	9	9
CFU-GM	0	0	32	24	5	3

BA1234						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	6	5	39	38	TMTc	TMTc
BFU-E	0	1	4	6		
CFU-M	0	0	2	1		
CFU-GM	0	1	4	5		

BA1264						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	9	13	118	152	88	107
BFU-E	0	3	13	9	1	1
CFU-M	2	2	10	11	7	9
CFU-GM	0	2	6	5	3	0

BA1356						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	4	10	52	84	42	71
BFU-E	4	5	5	6	1	1
CFU-M	0	0	7	5	0	2
CFU-GM	0	0	5	2	0	1

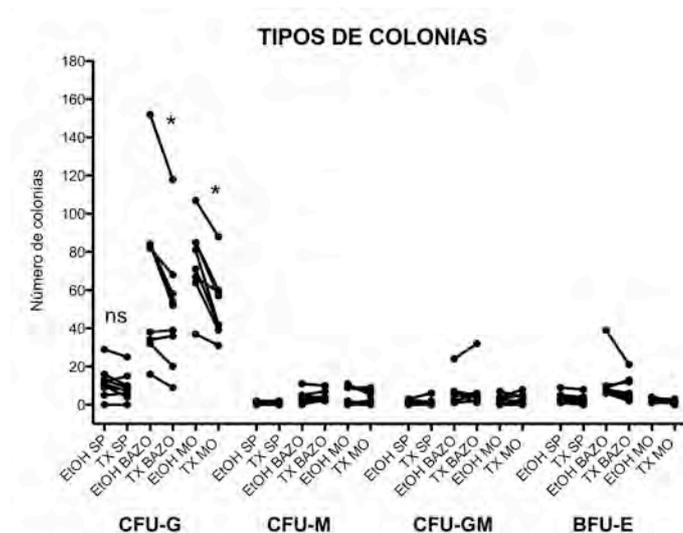
BA1372						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	10	16	54	84	60	85
BFU-E	3	3	6	7	1	1
CFU-M	0	1	4	4	0	2
CFU-GM	0	0	5	5	0	0

BA1434						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	25	29	58	84	59	67
BFU-E	3	5	12	10	2	4
CFU-M	0	1	3	0	2	1
CFU-GM	2	0	2	1	0	1

BA1438						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	8	9	20	32	39	64
BFU-E	8	9	2	6	0	4
CFU-M	0	1	2	2	0	0
CFU-GM	6	3	1	6	1	3

BA1449						
	SANGRE +	SANGRE -	BAZO +	BAZO -	MO +	MO -
CFU-G	0	0	9	16	42	81
BFU-E	1	1	3	6	3	3
CFU-M	0	1	4	2	5	11
CFU-GM	1	1	5	5	4	7

CFU-G: Unidad formadora de colonias de granulocitos, CFU-M: Unidad formadora de colonias de macrófagos, CFU-GM: Unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos, BFU-E: Unidad formadora de colonias de eritrocitos. TMTc: Demasiadas colonias para ser contadas.



**Figura 43. Análisis estadístico por tipo de colonias.** El día 7 de incubación se contaron los diferentes tipos de colonias que habían crecido en las placas tratadas con 4-OHT o con EtOH. Se representan aquí los datos de la tabla 10. ns: diferencias no significativas. \*: diferencias significativas (n= 9).

Estos resultados nos indican que las variaciones observadas en el número total de colonias se deben a las variaciones del número de CFU-G. Estas variaciones son muy evidentes en las muestras de bazo y médula ósea, órganos que generaron un gran número de colonias. (bazo, p-valor = 0,0195; médula ósea, p-valor = 0,0142). En este gráfico (figura 43) se puede apreciar también cómo el número de CFU-M, CFU-GM y BFU-E permanece más o menos constante tanto en las placas tratadas con 4-OHT como en las tratadas con etanol.

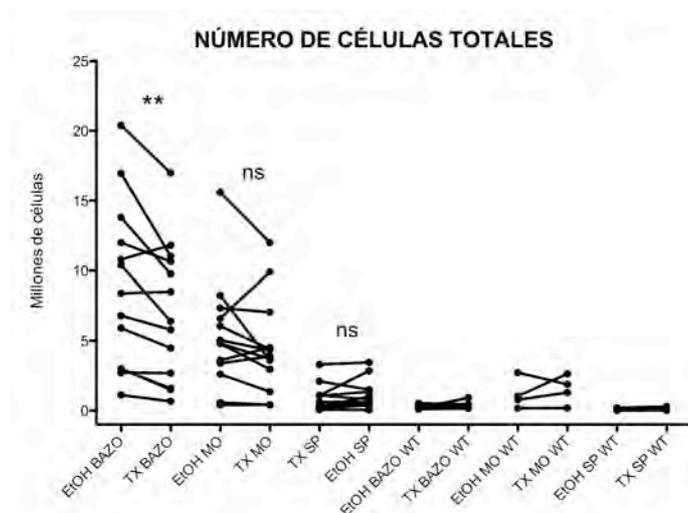
Una vez finalizado el ensayo de formación de colonias se recogieron las células crecidas en las diferentes condiciones. En la tabla 13 se indica el número de células que se recuperaron.

El análisis estadístico (test de Wilcoxon para datos apareados) de estos datos nos indica que existe una diferencia significativa (p-valor = 0,0071) entre el número de células obtenidas de las placas procedentes del bazo tratadas con 4-OHT en comparación con las tratadas con etanol (figura 44). Esta significación no existe en las células de la médula ósea ni de la sangre periférica. El número de células de la sangre periférica es prácticamente invariable con/sin 4-OHT. Sin embargo, las células de la médula ósea muestran una tendencia similar a la de las células del bazo.

**Tabla 13. Número de células recogidas al finalizar el experimento de ensayo de formación de colonias.**

ÓRGANO	BAZO	BAZO	MÉDULA ÓSEA	MÉDULA ÓSEA	SANGRE	SANGRE
4-OHT	+	-	+	-	+	-
BA1151	9,75	13,80	3,60	8,25	0,28	1,00
BA1150	5,80	6,80	0,42	0,40	0,26	0,46
BA1177	8,50	8,40	7,05	7,35	3,30	3,45
BA1190	10,65	12,00	9,90	6,60	2,10	1,50
BA1254	1,60	2,98	1,36	2,60	1,06	1,36
BA1256	17,00	20,40	0,42	0,57	0,62	0,59
BA1264	11,80	10,80	4,40	6,05	1,09	0,80
BA1234	1,50	3,00	12,00	15,60	0,27	0,51
BA1356	6,40	10,40	3,88	3,40	0,20	0,49
BA1372	11,04	16,96	4,52	3,60	0,37	0,49
BA1434	4,48	5,92	3,72	4,80	0,15	0,39
BA1438	2,68	2,72	2,96	4,80	1,08	2,84
BA1449	0,67	1,11	4,32	5,04	0,06	0,05
BA1157	0,45	0,52	0,19	0,17	0,29	0,20
BA1238	0,25	0,35	1,29	0,78	0,01	0,12
BA1463	0,15	0,11	1,88	2,72	0,03	0,00
BA1464	0,92	0,15	2,64	1,03	0,21	0,01

Valores expresados en millones de células. En rosa se indican los ratones de genotipo  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  y en amarillo los de genotipo  $p53^{+/+}$ .



**Figura 44. Número total de células recogidas de las colonias hematopoyéticas cultivadas en presencia/ausencia de 4-OHT.** Comparación realizada mediante una t-Student apareada entre los valores 4-OHT y EtOH de cada ratón y tejido analizados. Se representan aquí los datos de la tabla 13. ns: diferencias no significativas. \*\*: diferencias altamente significativas ( $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$ , n= 13;  $p53^{+/+}$ , n= 4).

En vista de estos resultados podemos afirmar que:

-Los ratones de genotipo  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  poseen muchos más progenitores hematopoyéticos tanto en sangre, como en bazo y timo que los ratones sanos  $p53^{+/+}$ .

-El tratamiento con 4-OHT disminuye el número de progenitores hematopoyéticos con capacidad proliferativa sólo en los casos en que su genotipo es  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$ .

-La disminución total del número de progenitores se debe a la reducción de un tipo concreto de ellos: CFU-G.

-Estos efectos son sobre todo apreciables en las células procedentes del bazo y la médula ósea, donde más progenitores hematopoyéticos residen.

Utilizando las células recogidas de este experimento se quiso contestar a dos preguntas: ¿existe apoptosis en las células crecidas en presencia de 4-OHT? y ¿el tratamiento con 4-OHT está realmente restaurando la función de  $p53$ ?

Se usaron las muestras de algunos ratones para ver apoptosis mediante tinción con anexina V-IP (y contestar así a la pregunta 1) y las muestras de los demás ratones para extracción de proteínas (pregunta 2). No se pudo someter a todas las muestras a ambos procedimientos por ser insuficiente el número de células recogidas.

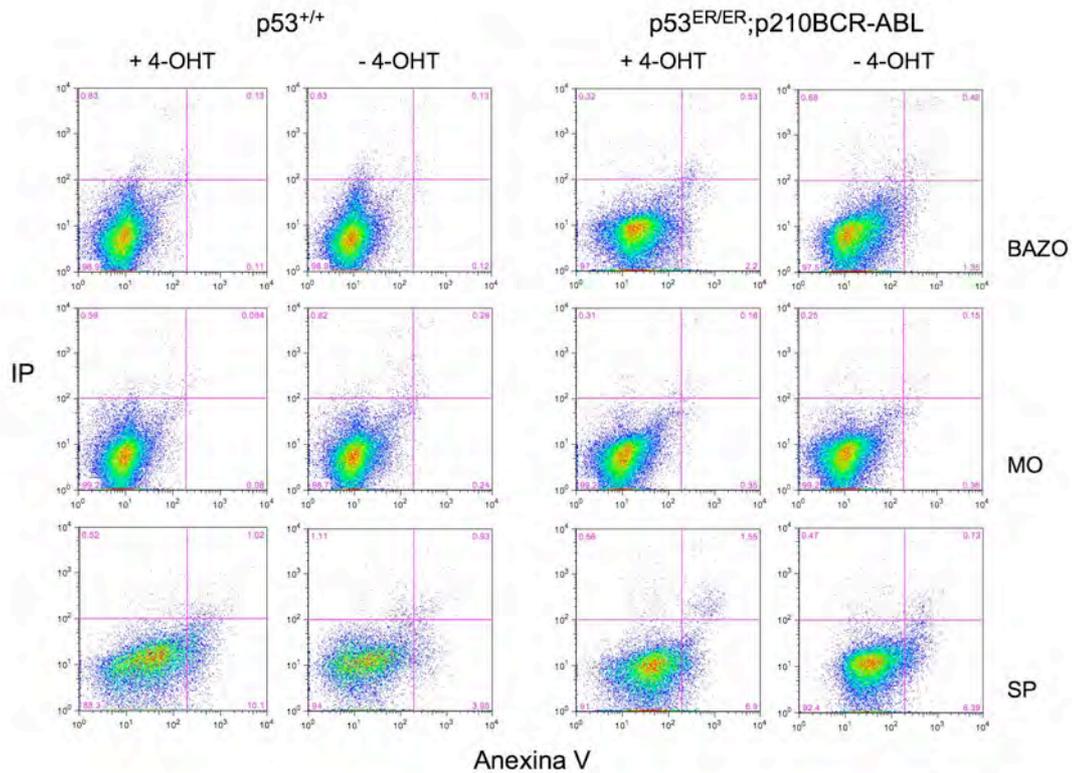
### **5.3. El tratamiento con 4-OHT no desencadena apoptosis en las células hematopoyéticas supervivientes.**

La tinción anexina V-IP se realizó con las células recogidas de los ratones BA1150, BA1157, BA1238, BA1254 y BA1256 (Figura 45). En la tabla 14 se muestran los valores de apoptosis (en porcentaje), tanto temprana ( $AnV^{+}IP^{-}$ ) como tardía ( $AnV^{+}IP^{+}$ ), en las poblaciones  $Sca1^{+}Lin^{-}$  y  $Sca1^{+}Lin^{+}$  de las muestras recogidas del ensayo de formación de colonias de sangre periférica, bazo y médula ósea.

**Tabla 14. Porcentaje de apoptosis de las células recogidas tras el ensayo de formación de colonias.**

SANGRE PERIFÉRICA	BA1150		BA1157		BA1238		BA1254		BA1256	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
% Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	56,9	37,1	66,3	93,5	17,8	38,1	26,4	31,3	16,8	33,9
% Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>+</sup>	18,2	15,4	16,6	5,86	9,87	14	18,9	14,9	10,5	10,7
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>+</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	0,83	5,92	1,78	0,25	15,1	10,9	20,8	12,9	16	7,61
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>-</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	16,9	8,46	0,99	0,96	58,6	25,5	19,2	13,9	22	10,8
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>+</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>+</sup>	13,3	15,3	34,6	18,3	39,9	22	32,7	29,3	28,5	26,6
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>-</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>+</sup>	12,5	4,84	0,81	8,43	56,5	56,2	26,3	21,9	29,5	27,3
BAZO										
	BA1150		BA1157		BA1238		BA1254		BA1256	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
% Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	22,7	13,4	42,9	41,9	25,6	42,8	22	18	16,2	13,5
% Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>+</sup>	11,4	18,2	5,26	10,6	5,48	6,65	14,7	14,3	2,4	2,54
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>+</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	1,49	7,21	2,3	0,66	30,9	21,4	26,7	28,8	65,2	46,9
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>-</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	0,078	0,33	3,89	1,19	11,9	12	7,85	4,87	10,6	5,68
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>+</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>+</sup>	3,26	29,8	52,9	18,1	35,5	17,9	54,2	41,3	50,5	37,2
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>-</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>+</sup>	0,24	1,01	4,97	5,57	13,2	15,2	15,2	12,3	27	16,3
MÉDULA ÓSEA										
	BA1150		BA1157		BA1238		BA1254		BA1256	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
% Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	19,8	17,7	30	20,9	27,6	21,6	12,7	14,1	11,6	16,5
% Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>+</sup>	10,7	20,3	8,56	10,1	16,2	17,2	24	13,9	18,5	15,1
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>+</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	3,94	4,36	0,83	1,58	17,9	43,1	24,7	27,3	29,2	12,8
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>-</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	0,22	0,44	0,23	0,024	4,63	16,1	4,37	2,39	8,17	4,07
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>+</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>+</sup>	16,1	2,39	9,28	5,16	37,2	32,5	37,2	37,1	60,8	50,6
% AnV <sup>+</sup> IP <sup>-</sup> en Sca1 <sup>+</sup> Lin <sup>+</sup>	1,03	0,25	1,19	0,77	14,9	4,29	18,4	10,3	13,9	11,6

Los valores de la tabla corresponden a los porcentajes de las poblaciones indicadas en la columna de la izquierda. En la tinción se incluyeron los anticuerpos Sca1-PE y Lin-APC para identificar el grado de diferenciación de las células, anexinaV-FITC y IP para identificar las células en apoptosis. +: Células tratadas con 4-hidroxitamoxifén, -: Células tratadas con etanol (excipiente). En amarillo se indican los ratones de genotipo p53<sup>+/+</sup> y en rosa los ratones de genotipo p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL.



**Figura 45. Apoptosis de las células del ensayo de formación de colonias.** Al finalizar el ensayo de formación de colonias se recogieron las células y se marcaron con anexina V y IP para averiguar el porcentaje de éstas que estaban en apoptosis mediante citometría de flujo. En la figura se muestran los resultados de las células de los ratones BA1150 ( $p53^{+/+}$ ) y BA1157 ( $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$ ).

Según estos resultados los valores de apoptosis en las muestras tratadas con 4-OHT son muy semejantes a las de los controles y por tanto, no podemos afirmar que haya un aumento de apoptosis debida al tratamiento. Es cierto que en algunas poblaciones sí se detecta un aumento del porcentaje de células apoptóticas en las muestras crecidas en presencia de 4-OHT, pero debemos descartar que este efecto sea debido a la restauración de p53 ya que podemos observar este mismo incremento en las muestras control pertenecientes a los animales  $p53^{+/+}$ , que no deberían responder al tratamiento.

En este modelo, al igual que en la enfermedad humana, no todos las células progenitoras hematopoyéticas expresan el oncogén p210BCR-ABL. En base a esta consideración, se puede hipotetizar que el pequeño porcentaje de progenitores que sí expresan el oncogén, y que da lugar a la enfermedad, sería el que no está creciendo en este ensayo en presencia de 4-OHT y por lo tanto en presencia de una proteína p53 funcional. La desaparición o no proliferación de este pequeño porcentaje de células progenitoras da lugar a las variaciones en el número de colonias que observamos, sobre todo de colonias CFU-G, progenitores de los neutrófilos, principales células expandidas en la enfermedad descrita en estos ratones. Los progenitores que no expresan el oncogén y por tanto no tienen una señal oncogénica que active a la proteína

p53 funcional, estarían creciendo normalmente y formando colonias sin experimentar ningún grado significativo de apoptosis, como vemos en las gráficas de tinción anexina V-IP.

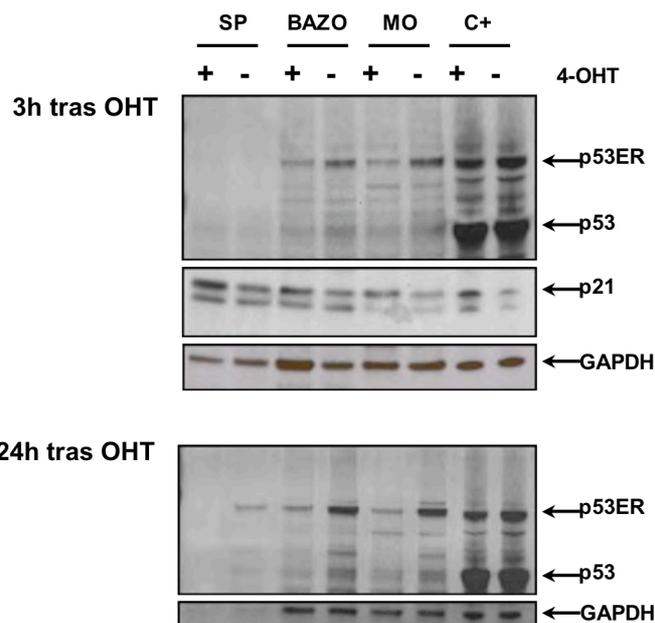
La restauración de p53 puede reducir el número de progenitores por dos posibles mecanismos. La primera posibilidad es que la existencia de una proteína p53 funcional en las células con el estímulo oncogénico p210BCR-ABL esté desencadenando la muerte de estas células por apoptosis. Esta muerte ocurriría al inicio del periodo de cultivo de las células con lo que no detectaríamos esta apoptosis al analizarla al finalizar el mismo. El aumento de apoptosis observado en los experimentos de reactivación de p53 *in vivo* es consistente con esta posible explicación.

La segunda posibilidad sería que p53 en vez de provocar la muerte de estos progenitores estuviera inhibiendo su proliferación. De esta manera no observaríamos colonias derivadas de ellos y tampoco una muerte significativa por apoptosis.

#### **5.4. El tratamiento con 4-OHT restaura la funcionalidad de la proteína p53.**

Para comprobar que el tratamiento con 4-OHT estaba efectivamente restableciendo la funcionalidad de p53 se recogieron las células en cultivo tras la finalización del ensayo de formación de colonias y se analizó la expresión de p53ER y de una de sus dianas, p21, mediante western blot. Como control de carga se analizó GAPDH y como control positivo del ensayo se usaron extractos proteicos de células ES p53<sup>ER/+</sup>. En la figura 46 se muestran los resultados obtenidos con las muestras de dos de los ratones analizados, BA1177 y BA1234. Podemos ver como el tratamiento con 4-OHT hace que disminuyan los niveles de p53ER. La proteína p53 autorregula su propia degradación, acumulándose en la célula en su estado no funcional. Por eso, la disminución observada en los niveles de p53ER en las células tratadas con 4-OHT es un indicador de que la proteína se vuelve competente por efecto de la droga.

Otra prueba de que está recuperando su funcionalidad es que una de sus principales dianas, p21 aumenta en las células crecidas en presencia de 4-OHT. Esta activación podemos observarla únicamente en las células tratadas con 4-OHT y no en las tratadas con el excipiente.



**Figura 46. Restablecimiento de la funcionalidad de p53ER tras el tratamiento con 4-OHT.** Western blot de extractos proteicos de células hematopoyéticas derivadas de ratones  $p53^{ER/ER}$ ; p210BCR-ABL cultivadas en metilcelulosa y tratadas con 4-OHT (+) o con etanol (-). Los filtros fueron incubados con anticuerpos  $\alpha$ -p53,  $\alpha$ -p21 y  $\alpha$ -GAPDH como se indica en los materiales y métodos. En la figura se muestran los resultados de las células de BA1177 que fueron recogidas 3 h tras la última dosis de 4-OHT y las de BA1234 recogidas 24 h tras la última dosis. C+: células ES derivadas de un ratón  $p53^{ER/+}$ .

Por todo ello podemos concluir que el tratamiento con 4-OHT y por tanto, el restablecimiento de p53, en cultivos de progenitores hematopoyéticos en metilcelulosa está provocando la muerte o la parada del ciclo celular de algunos de los progenitores que podrían ser los que expresan el oncogén p210BCR-ABL. Esto hace que el número de colonias que finalmente observamos sea menor en las muestras tratadas con 4-OHT. Además, el hecho de que la disminución del número total de colonias se deba a la reducción de las colonias CFU-G, concuerda con la biología de la enfermedad que desarrollan estos ratones, en los que a partir de una célula transformada indiferenciada se produce una gran expansión de células diferenciadas de linaje mielóide, principalmente neutrófilos, que derivan de los progenitores CFU-G.

El hecho de que la reactivación de p53 esté causando una reducción en el número de células progenitoras hematopoyéticas posiblemente malignas podría dar lugar al efecto curativo pasajero en los individuos enfermos que se observa *in vivo*.

## 6. RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE LA RESTAURACIÓN DE p53 EN POBLACIONES CELULARES DETERMINADAS.

Una vez determinada la existencia de cierto nivel de apoptosis en la población  $Sca1^{+}Lin^{-}$  en los animales enfermos en los que se ha reinstaurado la función de p53, se quiso determinar cuáles eran los mecanismos a través de los cuales estaba actuando p53 para desencadenar esta apoptosis. Para ello, se estudiaron cuatro dianas conocidas de p53, tres de ellas implicadas en el desencadenamiento de la apoptosis. Junto con estas cuatro dianas también incluimos el estudio de la expresión del mismo p53.

Ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  que se habían diagnosticado como enfermos mediante recuento leucocitario con HEMAVET<sup>®</sup> fueron tratados con tamoxifén o aceite durante 7 días. El día siguiente a la finalización del tratamiento fueron sacrificados y se recogió su sangre, bazo, médula ósea y timo. Las poblaciones celulares  $Sca1^{+}Lin^{-}$ ,  $Sca1^{-}Lin^{+}$  y  $Sca1^{+}Lin^{+}$  de estos cuatro tejidos fueron separadas y recogidas mediante citometría de flujo (*sorting*). Se purificó el ARN de estas muestras y con él se llevó a cabo un estudio de PCR cuantitativa. Los genes analizados en este estudio fueron: *Puma*, *Bax*, *p21* y *Fas*. También se analizó la expresión del gen p53 el cual no cabe esperar que sufra ningún cambio con los diferentes tratamientos. Como control endógeno de la técnica se utilizó el gen *Gusb*.

Según estos resultados podemos afirmar que:

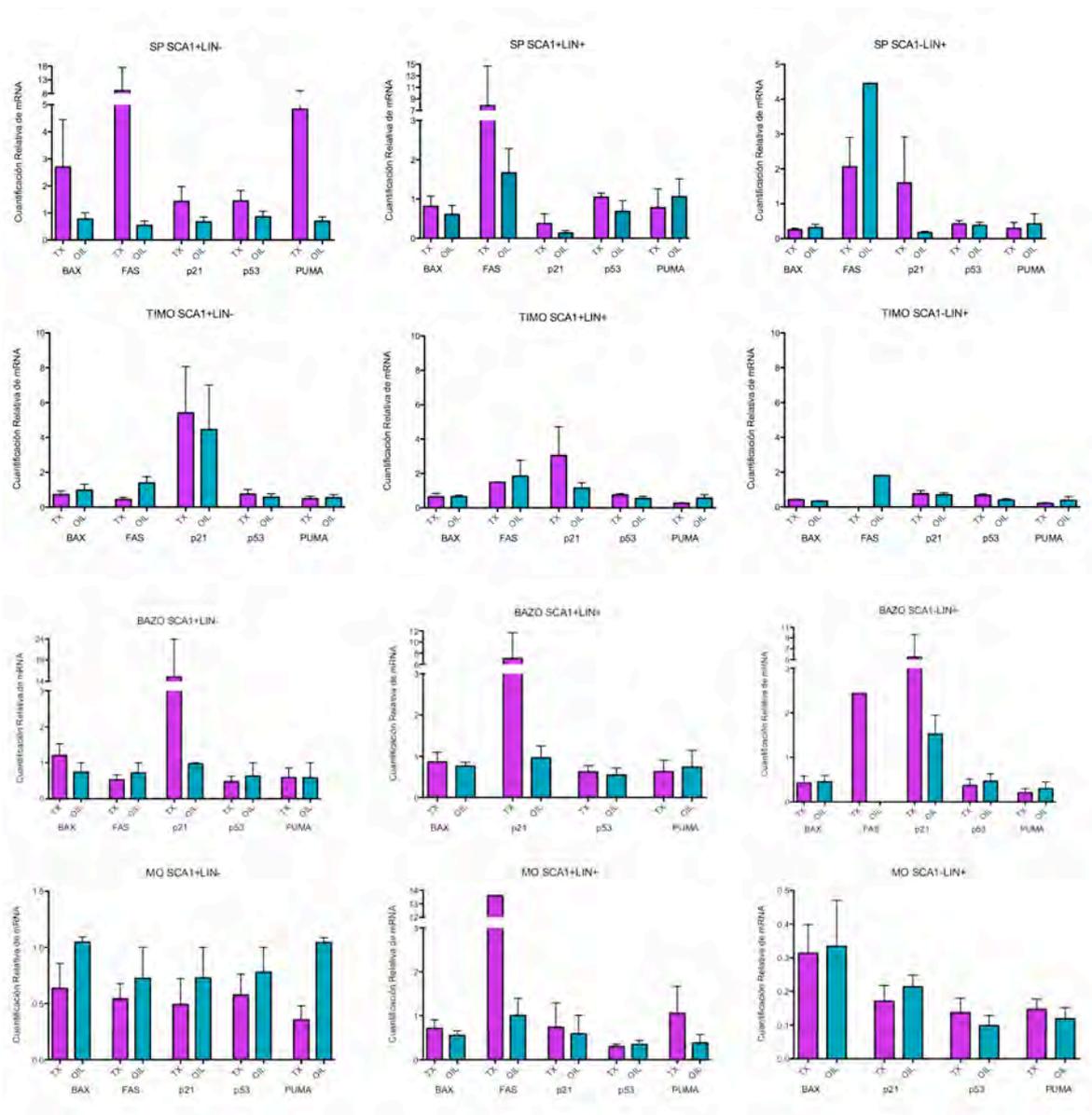
-La expresión de p53 es estable en las diferentes poblaciones, manteniendo unos niveles constantes con o sin tratamiento con tamoxifén.

-La expresión de p21 aumenta en las tres poblaciones celulares ( $Sca1^{+}Lin^{-}$ ,  $Sca1^{+}Lin^{+}$  y  $Sca1^{-}Lin^{+}$ ) del bazo de los animales tratados con tamoxifén. También vemos un aumento en la población  $Sca1^{-}Lin^{+}$  de sangre periférica de los animales tratados con tamoxifén.

-La expresión de *Fas* en la población  $Sca1^{+}Lin^{+}$  de médula ósea se ha analizado en un solo animal tratado con tamoxifén, por tanto el aumento observado con respecto a los tratados con aceite no puede considerarse significativo. Lo mismo ocurre con la población  $Sca1^{-}Lin^{+}$  en bazo.

-En sangre periférica, que es el tejido donde se esperaba ver más claramente la activación de dianas de p53, vemos un aumento de la expresión de *Fas* en las poblaciones  $Sca1^{+}$  ( $Sca1^{+}Lin^{-}$  y  $Sca1^{+}Lin^{+}$ ).

-En la población  $Sca1^{+}Lin^{-}$  de sangre periférica vemos un aumento de la expresión de *Puma* y *Bax*, que no vemos en las otras dos poblaciones ni en ninguno de los otros tejidos.



**Figura 47. Cuantificación de la expresión de cuatro dianas de p53 en las poblaciones celulares Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup> y Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup> de sangre periférica, timo, bazo y médula ósea de ratones enfermos p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL tratados con tamoxifén o con aceite.** La expresión de los diferentes genes analizados (p21, p53, *Bax*, *Puma* y *Fas*) se normalizó respecto a un control endógeno: *Gusb* ( $\beta$  glucuronidasa) y todos los datos se relativizaron respecto a la expresión de una muestra calibradora, para la que se eligió un ratón sin tratar del mismo genotipo.

El análisis de estos datos, muestra que la restauración de p53 afecta de forma diferente a la expresión de genes diana en las tres poblaciones celulares de los tejidos analizados.

En timo, no vemos ningún cambio en la expresión de estos genes al comparar muestras de animales tratados con tamoxifén frente a muestras de animales tratados con aceite.

En bazo, se observa un aumento de p21 en las tres poblaciones celulares analizadas.

En médula ósea, vemos que *Fas* podría estar aumentado en la población  $Sca1^{+}Lin^{+}$ , aunque este efecto podría no ser representativo al haber sólo una muestra analizada.

Este mismo aumento de *Fas* puede observarse también en las poblaciones a  $Sca1^{+}Lin^{-}$  y  $Sca1^{+}Lin^{+}$  de sangre periférica. La población  $Sca1^{+}Lin^{-}$  de sangre periférica muestra además un aumento de los niveles de *Bax* y *Puma*.

**GUSB:** Este gen codifica una hidrolasa que degrada glucosaminoglucanos, incluyendo el heparán sulfato, el dermatán sulfato y el condroitín-4,6-sulfato. Esta enzima forma un homotetrámero que se localiza en los lisosomas.

**FAS:** La proteína codificada por este gen es un miembro de la superfamilia de los receptores de TNF. Este receptor contiene un dominio de muerte que se ha visto que juega un papel central en la regulación fisiológica de la muerte celular programada y también se encuentra implicado en la patogénesis de varios tipos de cáncer y enfermedades del sistema inmune. La interacción de este receptor con su ligando permite la formación de complejos de señalización inductores de muerte que incluyen a FADD, la caspasa 8 y la caspasa 10.

**p21:** Este gen codifica un potente inhibidor de kinasas dependiente de ciclinas. La proteína p21 se une e inhibe a los complejos ciclinas-CDK2 o -CDK4 y así actúa como un regulador de la progresión del ciclo celular. La expresión de este gen está estrechamente controlada por la proteína p53, a través del cual esta proteína media la parada del ciclo celular en G1 dependiente de p53 en respuesta a una variedad de estímulos estresantes para la célula. p21 puede interactuar con PCNA, la cual juega un papel regulador importante en la fase S, la replicación del ADN y la reparación del daño en el ADN.

**BAX:** La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de proteínas BCL2, las cuales forman hetero- u homodímeros y actúan como reguladores anti- o proapoptóticos. BAX forma un heterodímero con BCL2 y funciona como un activador apoptótico. Se sabe que BAX interactúa (y aumenta la apertura) de VDAC, el canal de aniones dependiente de voltaje de la mitocondria, lo cual conlleva una pérdida del potencial de membrana de la mitocondria y la liberación del citocromo c. La expresión de este gen está regulada por la proteína p53.

**PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*):** La proteína codificada por PUMA se ha encontrado exclusivamente en la mitocondria e interacciona con BCL2 y BCL-X<sub>L</sub> a través de un dominio BH3. PUMA es esencial para la apoptosis dependiente e independiente de p53. PUMA es necesaria para la apoptosis p53-dependiente inducida por daño en el ADN, hipoxia y señales oncogénicas. También es necesaria para la apoptosis independiente de p53 causada por falta de suero, glucocorticoides, inhibidores de las kinasas y ésteres de forbol.

El efecto transcripcional del tratamiento sobre estas cuatro dianas es muy variable en las distintas poblaciones y tejidos. El hecho de que haya tres dianas de p53 cuya expresión aumenta en las células  $Sca1^{+}Lin^{-}$  de sangre periférica apoya la hipótesis de que sean éstas las células afectadas por el tratamiento. Es decir, la restauración de p53 estaría afectando a las células progenitoras de las células leucémicas, retrasando así la progresión de la enfermedad.

The background of the page is a microscopic image of biological tissue, likely showing glandular or ductal structures. The image is overlaid with a vertical gradient that transitions from a light purple at the top to a soft pink at the bottom. The text 'DISCUSIÓN' is centered in the lower half of the page.

# **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

La inactivación de la ruta de señalización de la proteína supresora tumoral p53 es una de las principales características comunes en la mayoría de los cánceres humanos. Este hecho sugiere que la restauración de p53 y su ruta de señalización podría ser una estrategia terapéutica contra el cáncer. Para explorar esta posibilidad se han desarrollado modelos murinos que, utilizando diferentes estrategias, permiten la reintroducción de la función de p53 en las células tumorales. Una de estas herramientas de estudio es el modelo p53ERTAM<sup>KI</sup> (Chistophorou *et al*, 2005). Este modelo permite el control reversible de la funcionalidad de p53 mediante la administración-retirada de tamoxifén a los animales. En este trabajo hemos utilizado el modelo p53ERTAM<sup>KI</sup> en conjunción con el modelo Sca1-BCR-ABLp210 que reproduce la enfermedad humana conocida como Leucemia Mieloide Crónica (Perez-Caro *et al*, 2009). Combinando ambos modelos, se generó uno nuevo al que denominamos p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210. Este modelo compuesto desarrolla también Leucemia Mieloide Crónica, con una cinética de aparición y de progresión de la enfermedad diferente respecto al modelo original Sca1-BCR-ABLp210. La velocidad de progresión depende del número de copias funcionales, o *wild type* (wt), de p53 que posean los individuos afectados. De esta manera, la enfermedad aparece antes en animales p53<sup>ER/ER</sup>, con ambos alelos p53 nulos en ausencia de tamoxifén, que en animales heterocigóticos (p53<sup>ER/+</sup>); y antes en éstos que en los homocigóticos wt (p53<sup>+/+</sup>).

Se ha visto que la inactivación de la proteína p53 es una de las principales alteraciones secundarias asociadas a la progresión de la Leucemia Mieloide Crónica (Ahuja *et al*, 1991). La inactivación genética de p53 es detectada en ~30% de los pacientes que progresan a crisis blástica indicando que la pérdida funcional de p53 es importante en la progresión de la LMC (Feinstein *et al*, 1991). En nuestro modelo de estudio, el carecer de copias funcionales de p53 facilita el avance de la enfermedad, existiendo un efecto dosis dependiente de p53 en la supervivencia de los animales (Figura 23).

Un efecto similar ha sido observado por otros dos laboratorios en otros modelos de LMC (Wendel *et al*, 2006; Honda *et al*, 2000). Ambos grupos de trabajo observaron que la pérdida de p53 era necesaria para la progresión de la LMC a crisis blástica, así como que los ratones que carecían de copias funcionales de p53 desarrollaban la enfermedad antes que los animales con una o dos copias de p53. En estos trabajos se utilizaron modelos de LMC muy diferentes. Honda *et al* usaron un ratón transgénico en el que la expresión de p210BCR-ABL estaba controlada por el promotor Tec. El estatus de p53 estaba determinado mediante cruces con un modelo KO de p53. Por otra parte,

Wendel *et al* utilizaron células HSCs de hígado fetal de ratones con diferente estatus de p53 y las infectaron con un retrovirus que contenía el oncogén p210BCR-ABL. Posteriormente las inyectaron en ratones receptores irradiados letalmente.

La falta de función de p53 acelera la Leucemia Mieloide Crónica causada por p210BCR-ABL sin cambiar su fenotipo, es decir, facilita la reprogramación de las células *stem* hematopoyéticas (HSCs) por el oncogén en el proceso leucémico.

La restauración transitoria de la funcionalidad de p53 durante una semana, en estadios iniciales e intermedios de la enfermedad, aumenta significativamente la supervivencia media y la longevidad de los animales tanto de genotipo p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL como p53<sup>ER/+</sup>;p210BCR-ABL (Figura 24 y 25). Sin embargo, en estadios muy avanzados de la enfermedad, esta restauración no causa ningún efecto observable en la supervivencia de los animales p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL. Además, este efecto parece tener un cierto componente cuantitativo, de forma que la restauración de p53 equivaldría a la reintroducción en las células de una copia wt de p53. Tan es así, que la gráfica de supervivencia de los animales p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL tratados con tamoxifén se asemeja mucho a la de los ratones p53<sup>ER/+</sup>;p210BCR-ABL; y la de los tratados de este genotipo a la de los p53<sup>+/+</sup>;p210BCR-ABL no siendo éstas significativamente diferentes.

Estudios recientes sugieren que la restauración de la función de p53 en varios modelos de tumores sólidos es una potente estrategia terapéutica. El contexto tumoral en estos modelos de estudio era de linfomas (un ratón transgénico *Eμ-myc*) (Martins *et al*, 2006), linfomas y sarcomas (desarrollo espontáneo de tumores tras irradiación) (Ventura *et al*, 2007) y hepatocarcinomas (hepatoblastos infectados con retrovirus que expresan *Hras*<sup>V12</sup> introducidos en ratones desnudos) (Xue *et al*, 2007). En estos modelos el proceso desencadenado por p53 en respuesta al estrés oncogénico era la apoptosis o la senescencia. En dos de estos tres modelos (Martins *et al*, 2006 y Xue *et al*, 2007), la restauración de p53 conlleva una prolongación de la supervivencia de los animales y en todos ellos se vio cómo la restauración de p53 reducía el tamaño de los tumores. Sin embargo, estudios más recientes han puesto de manifiesto que el efecto curativo de la restauración de p53 depende del grado de desarrollo del tumor. En estos trabajos se utilizó un modelo murino que desarrolla tumores de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) debido a la expresión de un alelo mutante *knock in* de *Kras* (*Kras*<sup>G12D</sup>) (Feldser *et al*, 2010; Junttila *et al*, 2010). Ambos trabajos sugieren que la regresión tumoral en respuesta a la activación de p53 es casi indetectable cuando el gen *Kras* mutado se expresa a niveles fisiológicos. Además observan que los adenocarcinomas, o estadios más avanzados del tumor, responden a la restauración de la actividad de p53 (bien por apoptosis o parada del ciclo celular), mientras que las lesiones oncogénicas menos avanzadas permanecen inalteradas.

Estos resultados contrastan con nuestra observación de que la supervivencia de los individuos del modelo p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210 se ve aumentada en mayor medida cuanto más al inicio de la enfermedad restauramos la función de p53. Estas discrepancias en las respuestas a la restauración de p53 pueden deberse al distinto tipo celular afectado por el tumor. También hay que tener en cuenta que, en nuestro modelo, el estímulo oncogénico que desencadena la acción de p53 se encuentra únicamente en las células Sca1<sup>+</sup> que son las que expresan BCR-ABL y no en la masa de células que conforman el tumor. En los otros modelos, las células que conforman la masa tumoral expresan el oncogén correspondiente y, por tanto, son blancos de la acción directa de p53.

Otro hecho importante a considerar es que en nuestro modelo transgénico el gen p210BCR-ABL se encuentra en múltiples copias en las células, por lo que probablemente se exprese a niveles más altos que la fusión oncogénica p210BCR-ABL causante de la enfermedad humana. Además se encuentra regulado por un promotor diferente al que lo controla en la translocación cromosómica que da lugar a la enfermedad.

El hecho de que los modelos murinos utilizados en la generación del modelo p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210 fueran de diferente linaje introduce una variabilidad en el estudio de su supervivencia, ya que no todos los individuos desarrollan la enfermedad en el mismo momento de su vida y, por tanto, no todos se encuentran en el mismo estadio de la enfermedad a la misma edad. Al utilizar la edad de los ratones para determinar los periodos de restauración de p53, se introduce una heterogeneidad en el estadio de la enfermedad de los diferentes individuos, que se trata de corregir aumentando el tamaño poblacional del estudio. Por otra parte, la variabilidad en la dotación genética de la población de estudio recrea la variabilidad genética existente en la población humana y mimetiza el impacto que la restauración de p53 podría tener en pacientes, disminuyendo el efecto de genes moduladores que pudieran predominar en un fondo genético homogéneo.

El aumento de la supervivencia de los ratones enfermos causado por la restauración transitoria de p53 debe ser reflejo de su actividad a nivel celular y molecular. Sobre qué células está actuando p53 y qué mecanismo de acción está utilizando para ralentizar la enfermedad son las siguientes incógnitas planteadas en nuestro estudio.

La proteína p53 ejerce sus funciones supresoras tumorales induciendo principalmente senescencia, parada del ciclo celular o apoptosis de las células afectadas por algún tipo de estrés, como el causado por los oncogenes (Lowe *et al*, 2004; Harris *et al*, 2005). En nuestro modelo el estímulo oncogénico lo proporciona la expresión de la fusión p210BCR-ABL. El diseño del modelo murino de LMC, hace que el estímulo oncogénico se ejerza en una población celular concreta, la Sca1<sup>+</sup>, y no en la totalidad de esta población, sino únicamente en un pequeño porcentaje de células (Perez-Caro *et al*, 2009). Por

ello es un buen modelo de estudio de las células iniciadoras de los tumores, ya que reproduce el evento iniciador de la enfermedad humana, que como se cree, ocurre en una célula *stem* con capacidad de expansión y diferenciación (Dalerba *et al*, 2007; Reya *et al*, 2001; Pardal *et al*, 2003).

La restauración de p53 puede frenar la progresión de la LMC actuando sobre dos poblaciones celulares diferentes. Una posibilidad es que p53 actúe sobre la población tumoral madura, que se incrementa con la progresión de la enfermedad e invade los órganos periféricos causando la muerte del individuo. Actuar sobre esta población podría causar el aumento observado en la supervivencia de los ratones. Tras restaurar la funcionalidad de p53 durante un breve periodo de tiempo, una vez que esta función volviera a “apagarse” desaparecería el freno de contención de la masa tumoral, la cual sería repuesta por las células iniciadoras del tumor, ajenas a la acción de p53.

La segunda posibilidad es que p53 esté ejerciendo su acción sobre la población inmadura de células madre que mantienen el tumor. De ser así, la masa tumoral madura no desaparecería de forma evidente, pero no aumentaría al mismo ritmo, al menos durante el periodo en que la función de p53 esté restaurada. La acción de p53 disminuiría la población de células madre tumorales reduciendo así la progenie tumoral. De esta manera, también se observaría un aumento transitorio en la supervivencia de los ratones. Sin embargo, esta segunda posibilidad tendría el efecto de ralentizar el agravamiento de la enfermedad más que hacerla desaparecer, con lo que dependiendo del estadio de la enfermedad, el efecto curativo podría ser más o menos evidente. Si la enfermedad está muy avanzada, aunque tras restaurar la función de p53 no aumentara la masa de células tumorales, el daño que éstas están causando al invadir los diferentes órganos podría ser suficiente para que la progresión de la enfermedad no se ralentizara. Sin embargo, en estadios iniciales de la enfermedad, en los que las células invasoras son menos abundantes, un freno en su incremento sí daría lugar a una lentificación evidente de la progresión de la enfermedad.

Nuestros datos apoyan esta segunda posibilidad. Así, la población mieloide madura de la sangre periférica de los ratones enfermos está aumentada tanto en los ratones en los que se restauró la funcionalidad de p53 como en los que no. Como vemos en los análisis por citometría de flujo, las células mieloides están invadiendo otros órganos como el bazo y la médula ósea y no experimentan ningún cambio apreciable al restaurar la función de p53. Es decir, esta población no disminuye con el tratamiento, pero tampoco aumenta durante el periodo de restauración de p53.

Hemos observado que al evolucionar la enfermedad aumenta principalmente el porcentaje de neutrófilos circulantes, seguido del porcentaje de monocitos y eosinófilos, todas ellas células de linaje mieloide, siempre a costa de la reducción del porcentaje de linfocitos. Tras la restauración de p53 observamos una tendencia contraria en estas poblaciones celulares en los animales tratados con tamoxifén frente a los tratados con aceite (Figura 30). Sin embargo, la ligera tendencia a la reducción del número de neutrófilos y al aumento de linfocitos no es estadísticamente significativa. Esto podría deberse

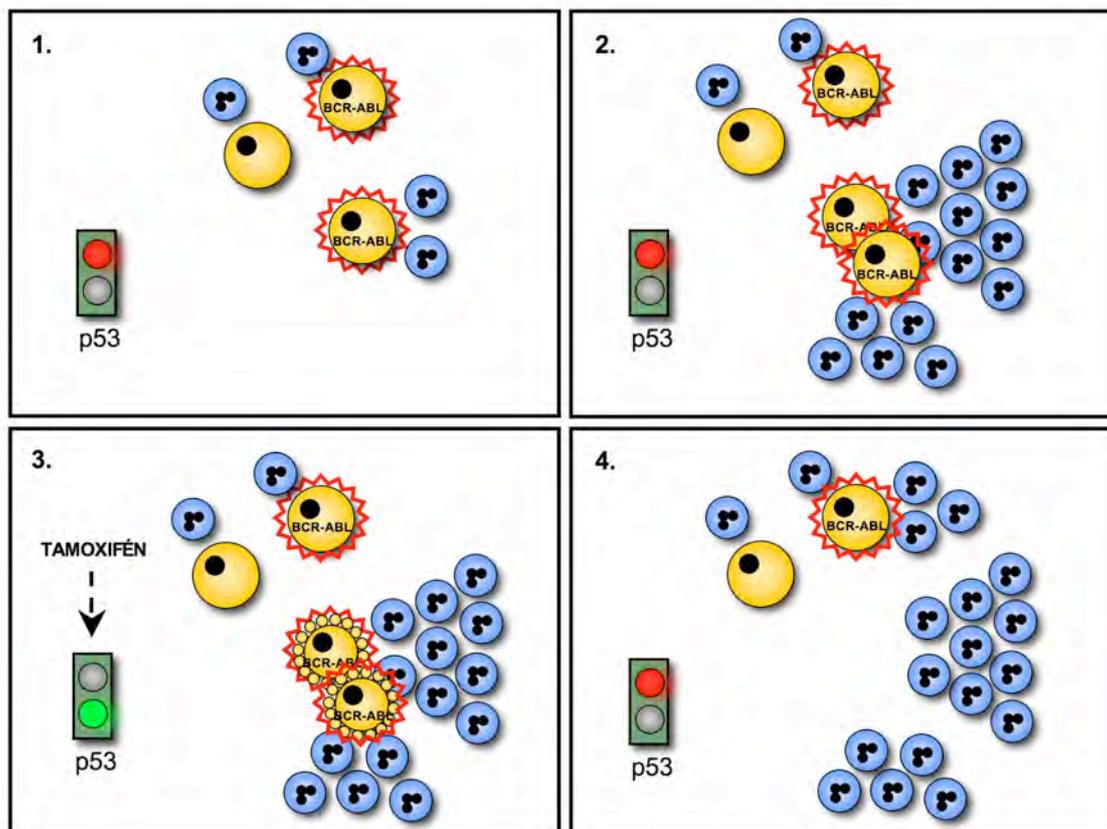
a la variabilidad en el estadio de evolución de la enfermedad en cada ratón, antes comentada, a pesar de haberse tratado a los individuos en el momento de detección de la enfermedad. También puede deberse a la variabilidad genética de los ratones, al ser de un linaje mixto, y a la variabilidad intrínseca de las células tumorales, ya que la leucemia en cada ratón no tendrá la misma carga de alteraciones genéticas.

Sin embargo, al no observarse un efecto significativo de reducción de las poblaciones mieloides anormales de los ratones enfermos, podemos pensar que el impacto de la restauración de p53 no está recayendo en la población mieloides que aumenta en el transcurso de la enfermedad. Es posible entonces que la población afectada por p53 sea la de las células madre cancerígenas. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que la población mieloides madura tampoco aumenta durante el periodo de restauración de p53.

El hecho de que las células tumorales no estén desapareciendo de los órganos infiltrados nos llevó a pensar una explicación alternativa. Es posible que el proceso desencadenado por p53 no sea la muerte celular sino la senescencia. Para explorar esta posibilidad se examinaron cortes de los órganos infiltrados de animales tratados con tamoxifén o con su excipiente tras teñirlos para detectar actividad SA- $\beta$ -Gal. Encontramos células senescentes en número variable tanto en animales tratados con tamoxifén como con aceite y tanto en órganos infiltrados como no infiltrados. Si la senescencia es el proceso desencadenado por p53 en estas células, este ensayo no es suficiente para demostrarlo.

En nuestro modelo de estudio las células iniciadoras de la enfermedad son las células Sca1<sup>+</sup>, en una pequeña proporción de las cuales se expresa el oncogén p210BCR-ABL. Como se ha dicho anteriormente, este diseño permite imitar el comienzo de la enfermedad en humanos, donde el evento iniciador es la translocación cromosómica que ocurre en una célula que se acepta que tiene características de célula madre (Hope *et al*, 2004, Miyamoto *et al*, 2000; Cobaleda *et al*, 2000). El análisis por citometría de flujo del marcador de superficie Sca1 enfrentado a marcadores que identifican los linajes mieloides y linfoides maduros (Lin) nos permitió el estudio de esta población celular concreta.

La muerte celular por apoptosis es el principal proceso desencadenado por p53 en respuesta a un estímulo oncogénico (Yonish-Rouach *et al*, 1991; Shaw *et al*, 1992; Fridman & Lowe, 2003), por lo cual es posible que la restauración de p53 cause muerte celular en nuestro modelo p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210



**Figura 48. Modelo de la actuación de p53 al ser restaurado en el contexto de la LMC.** 1. En nuestro modelo murino  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  algunas células madre hematopoyéticas ( $Sca1^+$ , en amarillo en la figura) expresan el oncogén p210BCR-ABL (borde estrellado en rojo). 2. Estas células madre anormales, con capacidad de autorrenovación, dan lugar a una gran población de células de linaje mielóide (en azul en la figura) causando la LMC en el individuo. 3. Al restaurar p53 en las células mediante la administración de tamoxifén, las células madre de la leucemia, y no la masa de células diferenciadas derivadas de ellas, sufren la acción de p53, entrando algunas en apoptosis (representadas con el borde de círculos). 4. Al retirar el tamoxifén, la funcionalidad de p53 es “apagada” permitiendo la evolución de la enfermedad a partir de otras células madre malignas que suman su descendencia diferenciada a la ya existente en el individuo enfermo. El semáforo representado en la figura indica el estatus de p53: “apagado” en rojo y “encendido” en verde.

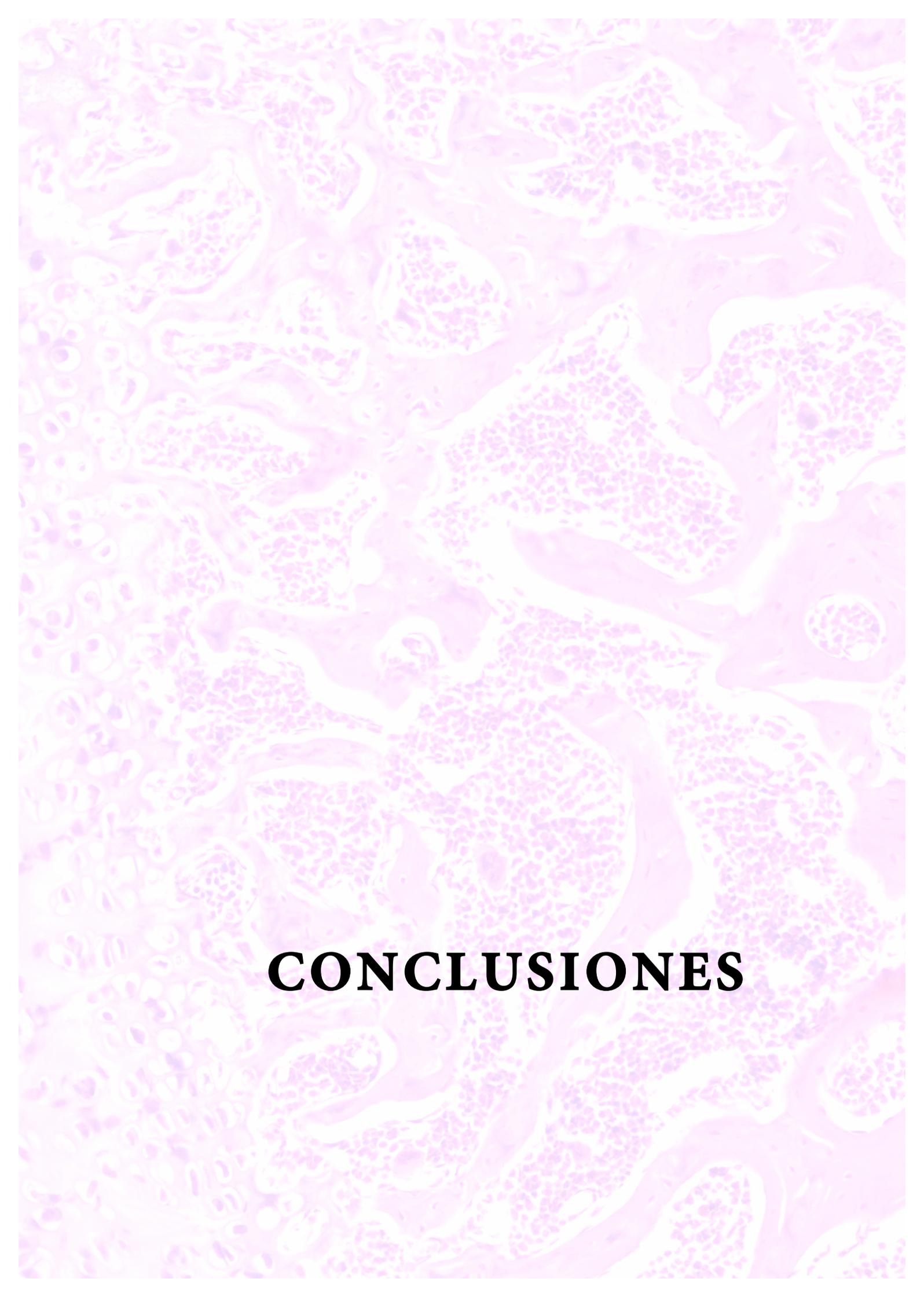
Aunque los resultados obtenidos mostraron una gran heterogeneidad, parece existir un ligero incremento de células apoptóticas en la población  $Sca1^+$  tanto indiferenciada como parcialmente comprometida ( $Lin^-$  y  $Lin^+$ ), en las muestras de sangre periférica y timo de los ratones en los que se había restaurado p53. Hemos de tener en cuenta que este pequeño incremento de apoptosis, aunque pueda parecer insuficiente para contener la progresión de la enfermedad, está medido en un momento concreto. La pequeña proporción de células apoptóticas observada podría tener un gran impacto si este efecto fuera continuado durante la semana en la que p53 es funcional.

El estudio *in vitro* de formación de colonias nos permite el análisis de los progenitores hematopoyéticos existentes en un órgano y ratón concreto mediante su crecimiento sobre medio semisólido. Este ensayo evita la gran heterogeneidad que existe entre los diferentes individuos y sus grados de enfermedad, ya que las muestras sometidas a tratamientos en comparación (4-OHT y etanol) proceden del mismo ratón, con la misma dotación genética y, por tanto, en el mismo estadio de la enfermedad. De esta manera podemos determinar si realmente p53 al ser restaurado está actuando sobre los progenitores hematopoyéticos. El número de progenitores supervivientes a la restauración de p53 era significativamente menor que si p53 permanecía “apagado” en las muestras de médula ósea, bazo y sangre periférica. Otro hecho que apoya la hipótesis de que las células sobre las que está actuando p53 son las células indiferenciadas, es que la reducción del número total de colonias es paralela a la disminución de las colonias CFU-G, de las que derivan los neutrófilos, principales células expandidas en la enfermedad.

Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la restauración de p53 está desencadenando la eliminación, posiblemente mediante apoptosis, de un tipo celular indiferenciado, ralentizando de esta manera la progresión de la LMC, caracterizada por la expansión de células mieloides maduras. Esto concuerda con la teoría de que las células que mantienen la leucemia sean células con características de células madre, con gran capacidad de expansión y potencial para la diferenciación. La reintroducción en el sistema de la proteína p53, hasta ese momento no funcional, es crítica y pone un freno transitorio a la progresión de la enfermedad. Hemos de tener en cuenta que en nuestros experimentos p53 es funcional durante tan sólo una semana. Es posible que una restauración más prolongada de la función de p53 hiciera evolucionar a la leucemia de otra manera, e incluso que se produjera una selección a favor de células sin p53 como ocurre en la enfermedad humana (Ahuja *et al*, 1989; Kelman *et al*, 1989; Nakai *et al*, 1995; Mashal *et al*, 1990; Feinstein *et al*, 1991).

El aumento en la supervivencia de los ratones causado por la restauración de p53, posiblemente vía apoptosis, debería verse reflejado en el patrón de expresión génica de las células diana de la acción de p53. Estudiamos, pues, la expresión de cuatro genes regulados por p53 implicados en apoptosis (*Bax*, *Puma* y *Fas*) y control del ciclo celular (*p21*) en las poblaciones hematológicas  $Scal^{+}Lin^{-}$ ,  $Scal^{+}Lin^{+}$  y  $Scal^{-}Lin^{+}$  en sangre periférica, timo, bazo y médula ósea. Este estudio no mostró el mismo patrón de expresión de las dianas estudiadas en los diferentes tejidos y poblaciones analizados. Una diferencia que sí observamos es un aumento en la expresión de *Fas*, *Puma* y *Bax* en la población de células más indiferenciada en las muestras de sangre en los animales tratados con tamoxifén y de *p21* en todas las poblaciones celulares en las muestras de bazo. Actualmente estamos realizando estudios de expresión global para caracterizar la respuesta transcripcional de la restauración de p53 en nuestro modelo de LMC.

Una de las diferencias de este trabajo con otros anteriores en los que se ha estudiado el papel de p53 en la progresión de la LMC es la posibilidad de restaurar la función de p53 durante un periodo de tiempo definido. Este estudio ha confirmado las observaciones hechas en otros modelos y en la enfermedad humana de que la pérdida de p53 coopera con el oncogén p210BCR-ABL en el avance de la enfermedad. No obstante, la restauración transitoria de su función en varios momentos concretos de la vida de los animales nos ha llevado a resultados diferentes a los observados en otros modelos murinos de cáncer. La restauración de p53 durante una semana en estadios iniciales de la LMC causa un retraso en la progresión de la enfermedad que no observamos en estadios más avanzados de la enfermedad. Sin embargo, los trabajos realizados en otros modelos murinos demuestran que es precisamente en los estadios más tardíos donde el efecto de la restauración de p53 sobre los tumores es más apreciable. Desconocemos los motivos de esta discrepancia. De cualquier manera, nuestro trabajo apoya la hipótesis de que la restauración de p53 podría ser una importante estrategia terapéutica contra el cáncer, esta vez en un modelo tumoral no sólido.

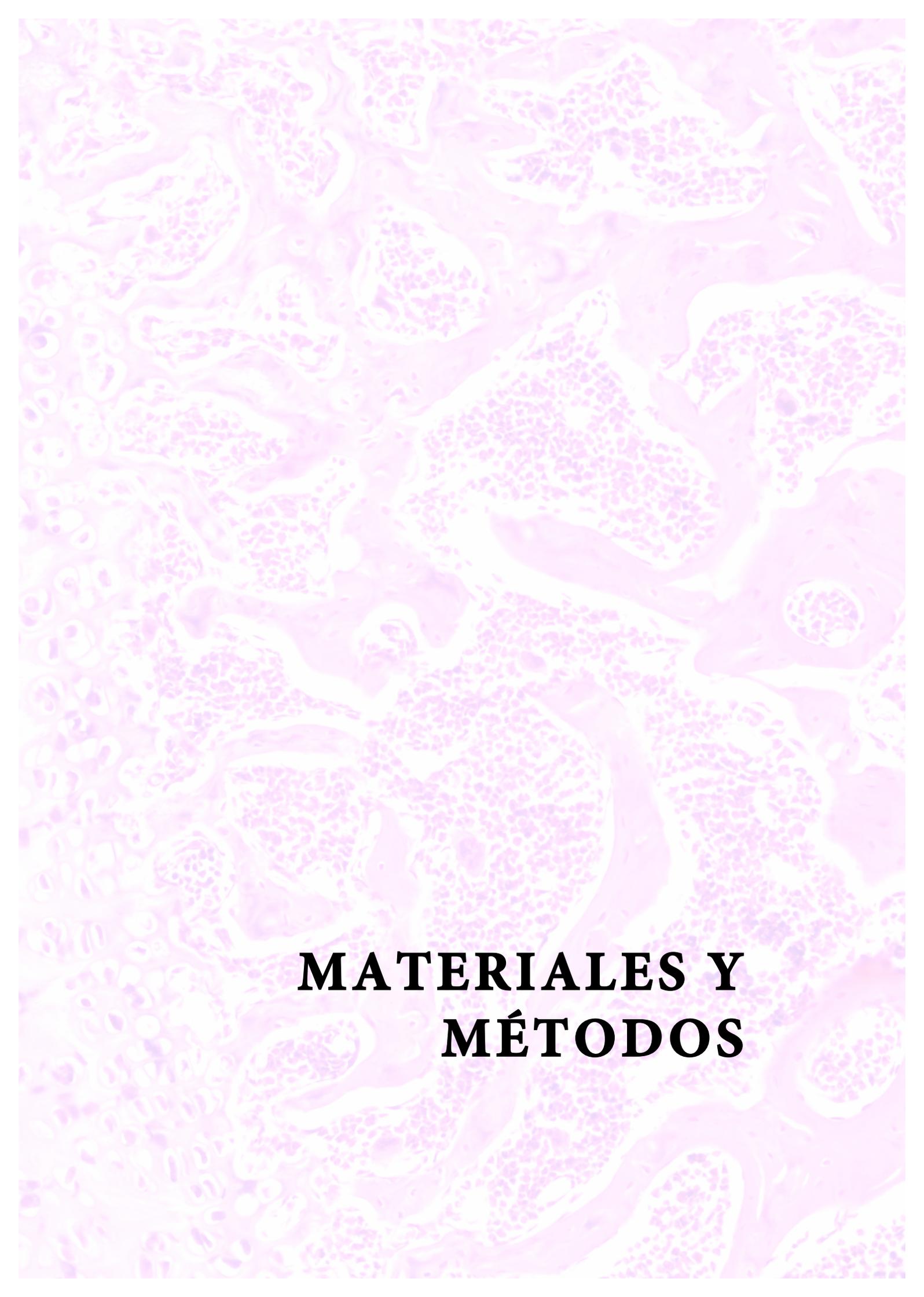
The background of the slide is a microscopic image of biological tissue, likely a histological section, showing various cellular structures and patterns. The image is overlaid with a semi-transparent purple and pink color scheme. The text "CONCLUSIONES" is centered in the lower half of the image.

# **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

---

1. Los ratones del modelo p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210 desarrollan Leucemia Mieloide Crónica semejante a la del modelo Sca1-BCR-ABLp210.
2. La leucemia aparece a edades más tempranas y progresa más rápidamente en el modelo p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210; es decir, la falta de p53 facilita la reprogramación de las HSCs por el oncogén.
3. La restauración transitoria de p53 en etapas tempranas de la enfermedad retrasa la progresión de la misma y alarga la vida de los ratones.
4. Las poblaciones leucémicas diferenciadas presentes en sangre periférica y las que infiltran los diferentes órganos no se ven alteradas por la restauración de p53.
5. El restablecimiento de p53 no induce senescencia celular de células leucémicas infiltrantes.
6. Al restaurar p53 se produce un aumento del porcentaje de células apoptóticas en la población Sca1<sup>+</sup> de sangre periférica y timo. Puesto que estas células son las que mantienen el tumor, su reducción podría explicar el efecto terapéutico del restablecimiento de p53.
7. La restauración de p53 en cultivos primarios de progenitores hematopoyéticos de animales enfermos reduce el número de colonias CFU-G, precisamente el tipo celular cuya expansión caracteriza a la LMC.
8. El restablecimiento de p53 da lugar a un modesto aumento de la expresión de algunas dianas implicadas en el proceso de apoptosis en células Sca1<sup>+</sup> de sangre periférica.



**MATERIALES Y  
MÉTODOS**

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

### 1.1. Ratones modelo usados en este trabajo

Para la realización de este trabajo se han utilizado los siguientes ratones modelo:

-p53ERTAM<sup>KI</sup>: linaje mixto C57BL/6 x 129/SvJ retrocruzado 8 veces con C57BL/6 (Christophorou *et al*, 2005).

-Sca1-BCR-ABLp210: linaje mixto CBA x C57BL/6J (Perez-Caro *et al*, 2009) proporcionado por el laboratorio del Dr. Isidro Sánchez García (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca).

Estos ratones se mantuvieron durante su estudio en *racks* ventilados bajo unas condiciones constantes de temperatura (20°C) y humedad relativa (65%) con agua y alimento *ad libitum* en el Servicio de Experimentación Animal (Universidad de Salamanca). Los animales fueron sacrificados para la obtención de muestras o ante la evidencia de sufrimiento de acuerdo con las *Guidelines for Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research*.

A los 21 días de edad los individuos fueron separados por sexos y marcados para su identificación. Al mismo tiempo se les cortó el extremo de la cola (~ 3 mm) para la extracción de ADN. Las camadas obtenidas de los cruces de ambas cepas fueron genotipadas por PCR y Southern blot como se describe más adelante.

Las técnicas empleadas con los ratones para la realización de este trabajo fueron:

- Extracción de sangre periférica del plexo orbital.
- Inyección intraperitoneal.
- Sacrificio mediante dislocación cervical.

La experimentación con los animales se realizó de acuerdo con las normas establecidas por el Comité de Bioética y el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca.

## 1.2. Identificación de los animales enfermos

Para identificar los individuos que empezaban a desarrollar la enfermedad se realizó un recuento leucocitario utilizando una máquina HEMAVET® HV950FS (Drew Scientific, Inc.).

Para ello, se extrajeron ~ 50 µL de sangre del ratón del plexo orbital con una pipeta Pasteur de vidrio y fueron recogidos en un tubo con 6 µL de 0,5 M EDTA tripotásico (Sigma). Tras una breve agitación manual, las muestras se analizaron en el HEMAVET® en la hora siguiente a su recogida.

## 1.3. Tratamiento de los ratones

Los ratones “problema” se trataron con 1 mg de tamoxifén (Sigma) diario, durante 7 días. La forma de administración fue por inyección intraperitoneal. El tamoxifén fue disuelto en aceite de cacahuete (Sigma), con ayuda de un homogeneizador, a una concentración de 10 mg/mL y almacenado a -20°C.

Los ratones control fueron tratados de la misma manera con 100 µL de aceite de cacahuete.

## 1.4. Recogida de tejidos

Los animales enfermos fueron sacrificados por dislocación cervical y se les practicó una necropsia durante la cual se llevó a cabo un análisis macroscópico de los diferentes órganos. Durante el procedimiento se tomaron fotografías con una cámara Canon Power Shot S3 IS.

Se recogieron muestras de los animales de tres formas diferentes:

-Un tercio de los diferentes órganos (timo, corazón, pulmón, hígado, bazo, páncreas, intestino, riñón, testículo u ovario y ganglios, en caso de estar hipertrofiados) se fijó en formaldehído 3,7-4% tamponado a pH 7 y estabilizado con metanol DC (Panreac) durante al menos 24 h. Las rodillas se fijaron en formaldehído 3,7-4% más un 6% de ácido nítrico (Panreac) con lo que se consigue la descalcificación del hueso de forma que estos tejidos puedan ser cortados con el microtomo.

-Otro tercio se incluyó en OCT *Compound* (Tissue-Tek<sup>R</sup>) y se colocó inmediatamente sobre hielo seco. Estas muestras se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Muestras de la médula ósea fueron extraídas del interior del fémur y de la tibia y conservadas por este mismo procedimiento.

-El último tercio se congeló en un vial en hielo seco y se almacenó a -70°C.

Las células de la médula ósea fueron extraídas de los fémures y tibias de los ratones. Se practicó un corte del fémur a nivel de la cadera y otro

inmediatamente por encima de la rodilla. Con una jeringuilla de 1 mL se bombeó PBS + 1% FBS (Lonza) por el interior del hueso (*flushing*) recogiendo las células del interior sobre un *cell-strainer* (BD Falcon) humedecido con PBS + 1% FBS sobre un tubo de 50 mL. Del mismo modo se procedió con la tibia cortando por debajo de la rodilla y por encima del tobillo.

Se recogió también una parte del timo y del bazo sobre un *cell-strainer* humedecido con PBS + 1% FBS sobre un tubo de 50 mL.

PBS	
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Con las células recogidas de estos tres tejidos (médula ósea, bazo y timo) se prepararon suspensiones celulares homogeneizándolas con el émbolo de una jeringuilla de 1 mL sobre el *cell-strainer*. Estas muestras se usaron para llevar a cabo análisis por citometría de flujo como se describe más adelante.

### 1) Preparación de los cortes histológicos para su estudio anatómo-patológico

Los tejidos fijados en formaldehído fueron incluidos en bloques de parafina y cortados en secciones de 3  $\mu$ m con un microtomo. Las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas y teñidas con hematoxilina-eosina. Posteriormente, estas secciones fueron examinadas por un anatómo-patólogo para su diagnóstico histológico.

#### Inclusión de los órganos en parafina:

Una vez fijados, y con el fin de aumentar la dureza de las muestras para posteriormente obtener cortes de los diferentes órganos y tejidos, estos fueron incluidos en parafina. Para ello, las muestras se procesaron en el Tissue-tek VIP (Miles Scientific), un sistema en el que tras varios pasos, las muestras son embebidas en parafina líquida. Al ser la parafina un medio hidrófobo, las muestras se deshidrataron previamente con solventes orgánicos. Las muestras se mantuvieron a 40°C durante 30 min en formol al 10% (2 baños), etanol al 70%, etanol al 80%, etanol al 90%, etanol absoluto (3 baños) y xileno (2 baños). Una vez deshidratadas y fijadas, las muestras se incluyeron en parafina mediante 3 baños de 30 min a 60°C en parafina (Histosec; Merck). Por último, las muestras se montaron en un molde metálico con parafina líquida, que se dejó solidificar hasta que se obtuvieron los bloques con las muestras listas para ser cortadas con el microtomo (Leica RM 2135). Se realizaron cortes de 3  $\mu$ m de los diferentes tejidos.

#### Desparafinado y rehidratación de las muestras:

Una vez preparados los cortes de las muestras, y antes de proceder a la tinción de los mismos, éstos se desparafinaron y rehidrataron para que el tejido estuviera accesible y reactivo a los diferentes colorantes. Para desparafinar los

cortes, estos se incubaron a 80°C durante 20 min en una estufa seca para licuar la parafina y, posteriormente, se realizaron 3 baños sucesivos de 10 min a temperatura ambiente en xilol (Merck) para disolverla. A continuación, se rehidratan los tejidos tratándolos con solventes orgánicos, pero de forma inversa al tratamiento de deshidratación, es decir, los cortes se trataron sucesivamente a temperatura ambiente durante 5 min con etanol absoluto, etanol al 90%, etanol al 80% y etanol al 70%. Por último, los cortes se lavaron abundantemente con agua y se dejaron secar, estando ya listos para la tinción histológica.

### **Tinción con hematoxilina-eosina:**

La tinción con hematoxilina-eosina permite visualizar de manera general el estado de los tejidos, y por ello es la tinción más utilizada. Este método consta de una fase inicial en la que se colorean los núcleos celulares con hematoxilina, y una segunda fase de contraste citoplasmático y de tinción de los componentes extracelulares con la eosina. El procedimiento técnico es el que se detalla a continuación: los cortes desparafinados y rehidratados se sumergieron en hematoxilina de Carazzi (Merck) durante 7 min a temperatura ambiente y, tras lavarlos abundantemente con agua, se pasaron a una solución de etanol al 80%:ácido acético al 35% (200:1) durante 3 seg con el fin de decolorar y limpiar el tejido. A continuación, tras lavar los cortes con abundante agua, se sumergieron en una solución acuosa con carbonato de litio a saturación (Merck) durante 3 seg, lo que hace que el tejido coja un color azul intenso. Tras lavar los cortes con agua, se tiñeron con eosina, eosina 1% (Merck) en etanol 80% (Merck), durante 2 min y finalmente se deshidrataron con un tratamiento sucesivo con solventes orgánicos: etanol al 70%, etanol al 80%, etanol al 90%, etanol absoluto 3 seg, y con una solución etanol:xilol (1:1) durante 10 seg. Por último las muestras fueron montadas con el cubreobjetos y un medio especial (EUKITT, Panreac).

### **Definición anatómo-patológica y fotografiado de las muestras:**

Una vez teñidas las muestras, fueron analizadas con el asesoramiento de los patólogos humanos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca y, muy especialmente, de la Dra. Teresa Flores Corral. El diagnóstico patológico se basa en la clasificación de tumores de la Organización Mundial de la Salud (Jaffe *et al*, 2001).

De la misma manera, las fotografías de las muestras histológicas de los ratones en estudio se han realizado con el asesoramiento del mismo Departamento de Anatomía Patológica, utilizando una cámara Olympus (DP70) adaptada a un microscopio Olympus (BX41).

## **2) Preparación de los cortes histológicos para el análisis de senescencia**

Los tejidos incluidos en OCT *Compound* y congelados a -70°C fueron cortados en secciones de 5 µm que se colocaron con un criotomo (Leica CM 1900) sobre portaobjetos tratados con polilisina (Menzel-Gläser). Estas secciones fueron sometidas a la tinción de β-galactosidasa asociada a senescencia (ver más adelante).

## 1.5. Frotis

Se realizaron frotis sanguíneos de los animales sacrificados para ver la progresión de su enfermedad. Se colocaron 5  $\mu$ L de la sangre extraída del animal sobre el extremo de un portaobjetos y con otro portaobjetos se realizó la extensión de la gota de sangre. Las células sanguíneas se fijaron durante 2 min con la solución May-Grünwalds (Merck). El fijador se lavó con abundante agua y los frotis se tiñeron durante 20 min con una dilución (3 gotas/mL de agua) de Giemsa (Merck). El colorante se lavó con abundante agua y las muestras se dejaron secar antes de su observación al microscopio.

## 2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.1. Extracción de ADN genómico

La purificación de ADN de las muestras se realizó mediante lisis con proteinasa K, extracción con fenol y cloroformo y posterior precipitación con isopropanol de la siguiente manera:

El tejido (los ~3 mm de la parte final de la cola de los ratones recién destetados) se lisó en 700  $\mu$ L de buffer de lisis, a 55°C, con agitación suave durante 2-16 h.

Tampón de Fornace	Buffer de Lisis
8,56% Sacarosa	85% tampón de Fornace
50 mM Tris pH 8	10 mM EDTA pH 8
25 mM KCl	50 $\mu$ g/ml Proteinasa K
5 mM MgCl <sub>2</sub>	1% SDS

Tras una breve centrifugación se añadió 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 para favorecer la posterior precipitación del ADN y se extrajo con 1 volumen de fenol (Sigma) equilibrado con Tris 1M pH 8,5. Se realizó una segunda extracción con cloroformo (Merck):isoamiloalcohol (Merck) (24:1) y se precipitó con un volumen de isopropanol (Merck) frío. Se realizaron 2 lavados del *pellet* con etanol al 70% (Merck) y tras dejarlo secar, se resuspendió en 100  $\mu$ L de TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) durante al menos 12 h a temperatura ambiente.

### 2.2. Genotipado

Para identificar la dotación alélica de p53 de los diferentes individuos, utilizamos tanto la técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) como la de Southern blot.

**1) PCR: Amplificación del gen p53**

La técnica de PCR es un método de síntesis enzimática, *in vitro*, de secuencias específicas de ADN usando dos oligonucleótidos que hibridan en las hebras opuestas de la cadena de ADN y flanquean la región de interés en el ADN molde.

Los alelos de p53 se amplificaron por PCR mediante el protocolo descrito en Christophorou *et al*, 2005, utilizando como molde unos 50 ng de ADN genómico. Se utilizó la enzima *Super Hot Taq* DNA polimerasa (BIORON) que está acoplada a un anticuerpo que la inactiva hasta que se libera después de la incubación a 94°C durante 10 min (actividad *hot start*).

Los oligonucleótidos utilizados en la PCR fueron los siguientes:

- intron10.1 5'-TGAGGGACAAGGTATGGTGTC-3'
- mer550rev 5'-TGGCACTCTCTTTGCCAGTTG-3'
- #904L 5'-AACCTAGAAGTAGGGGTG-3'

La mezcla utilizada para realizar la reacción de amplificación fue la siguiente:

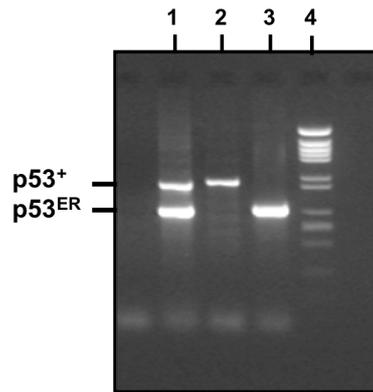
<b>Reacción de PCR (25 µl)</b>	
0,6 µL	ADN molde
2,5 µL	Buffer 10X (15 mM Mg <sup>2+</sup> )
1 µL	dNTPs 10 mM
0,25 µL	oligo intron10.1 (20 µM)
0,07 µL	oligo mer550rev (20 µM)
0,25 µL	oligo #904L (20 µM)
0,3 µL	enzima (5 U/µL)

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes:

	Activación del enzima	Amplificación			Extensión final
		40 ciclos			
		Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	
Temperatura	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C
Tiempo	4 min	1 min	1 min	2 min	10 min

Se utilizó el termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems). El tamaño de los fragmentos amplificados se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,8% en tampón TAE.

<b>TAE</b>	
40 mM	Tris-acetato
1 mM	EDTA



**Figura 49. Determinación del genotipo de los ratones por PCR.** Fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. 1: Individuo  $p53^{ER/+}$ , 2: Individuo  $p53^{+/+}$ , 3: Individuo  $p53^{ER/ER}$ , 4: Marcador de peso molecular  $\phi 29$  HaeIII.

## 2) Southern blot: Identificación del transgén BCR-ABL y de los alelos p53

Se empleó la técnica de Southern blot para identificar aquellos individuos que poseían el transgén p210BCR-ABL en su material genético. También se utilizó para determinar la dotación alélica de p53 de los ratones por considerarlo un método más fiable que la PCR.

Esta técnica consiste en la separación electroforética del ADN en geles de agarosa, seguida de su transferencia por capilaridad a una membrana y la detección de las moléculas de interés con sondas radioactivas adecuadas (Southern, 1975).

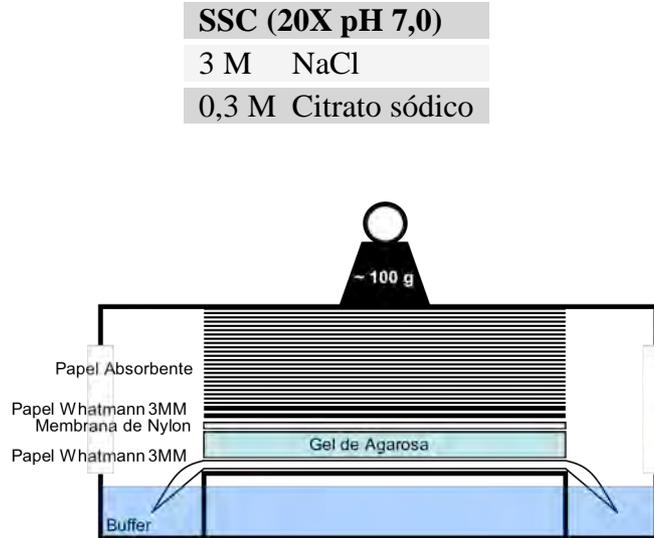
### Electroforesis y transferencia:

Los ADNs genómicos (10  $\mu\text{g}$ ) fueron digeridos con la enzima EcoRV durante al menos 12 h a 37°C. La mezcla utilizada para realizar la reacción de digestión fue la siguiente:

Reacción de digestión (70 $\mu\text{L}$ )	
38,9-28,9 $\mu\text{L}$	dH <sub>2</sub> O
7 $\mu\text{L}$	Tampón D 10X (Promega)
0,7 $\mu\text{L}$	DTT 0,1 M
0,7 $\mu\text{L}$	Espermidina 100 mM
0,7 $\mu\text{L}$	BSA 10 mg/mL (Promega)
2 $\mu\text{L}$	EcoRV 5 U/ $\mu\text{L}$ (Promega)
20-30 $\mu\text{L}$	ADN

La electroforesis del ADN digerido se realizó en geles de agarosa del 1% en TAE durante 4 h a 86 V. Tras la electroforesis, los geles de agarosa se sumergieron en 3 volúmenes de solución desnaturalizante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) durante 1 h, con agitación suave, a temperatura ambiente.

Para la transferencia, se utilizaron membranas de nylon cargadas positivamente (*Immobilon<sup>TM</sup>-Ny<sup>+</sup>*, Millipore). El ADN genómico se transfirió a la membrana por capilaridad utilizando la solución desnaturante, durante 16h a temperatura ambiente (transferencia alcalina). Por último, las membranas se neutralizaron con SSC 2X (*Saline Sodium Citrate*) durante 5 min.



**Figura 50. Técnica de Southern blot.** Esquema del montaje de transferencia tipo puente, usado para la realización del Southern blot.

El ADN transferido a la membrana se fijó mediante *Crosslinking* con luz UV en un *Stratalinker* (Stratagene).

### Sondas utilizadas:

Como sonda para el reconocimiento del gen p53, se utilizó un fragmento de ADN de 656 pb del plásmido pDM146 digerido con las enzimas de restricción NcoI y BamHI.

Como sonda para el reconocimiento del gen *ABL*, y por tanto del transgén, se utilizó un fragmento de 836 pb purificado a partir del plásmido E1A2 (proporcionado por el laboratorio del Dr. Isidro Sánchez García, CIC) digerido con la enzima de restricción Bsu36I.

### -PLÁSMIDOS UTILIZADOS:

El plásmido pDM146 está formado por el vector pUC120 más un inserto NcoI-BamHI de 656 pb que contiene el intrón 6 de p53.

El plásmido E1A2 está formado por el vector pCD1a que contiene el cADN de p190BCR-ABL.

### -PREPARACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS:

Los plásmidos utilizados para la obtención de las sondas fueron amplificados en bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

Las bacterias con el plásmido incorporado fueron seleccionadas en medio LB con ampicilina. El plásmido fue extraído de las bacterias mediante el

kit *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham) a partir de un cultivo de 5 mL de LB con 100 µg/mL de ampicilina crecido a 37°C con agitación ~15 h. Se comprobó que el plásmido era el adecuado mediante diferentes digestiones con enzimas de restricción y se cuantificó en un gel de agarosa antes de usarse para la obtención de las sondas.

#### -PURIFICACIÓN DE LAS SONDAS:

Para la purificación de las sondas los plásmidos pDM146 y E1A2 fueron digeridos con las enzimas NcoI y BamHI o Bsu36I respectivamente. Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa del 1,2% o 1,5% y los fragmentos de 656 pb o 836 pb fueron purificados con el kit *Ilustra™ DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

#### -MARCAJE DE LAS SONDAS:

Entre 20 y 40 ng de las sondas se marcaron radiactivamente siguiendo las especificaciones técnicas del kit *Random Primed DNA Labeling Kit* (Roche). El isótopo radioactivo utilizado fue  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP con una actividad específica de 3000 Ci/mmol (Amersham). Las sondas marcadas se purificaron mediante columnas de Sephadex™ G-50 (*ProbeQuant™ G-50 Micro Columns*, Amersham).

#### **Prehibridación, hibridación y lavado de las membranas:**

Durante la prehibridación, la membrana se incubaba al menos 1 h a 65°C con el *buffer* de Church & Gilbert (Church & Gilbert, 1984) suplementado con 150 µg/mL de ADN de esperma de salmón (ssADN, Roche), desnaturalizado a 100°C durante 10 min.

La hibridación se realiza en el *buffer* de Church & Gilbert al que se añaden 150 µg/mL de ssADN y la sonda radiactiva, ambos desnaturalizados. El tiempo de hibridación es de 16-24 h a 65°C con agitación.

#### **Buffer de Church & Gilbert**

1% BSA (Fracción V, Sigma)

1 mM EDTA (Sigma)

0,5 M Tampón fosfato pH 7,1-7,2

7% SDS (BioRad)

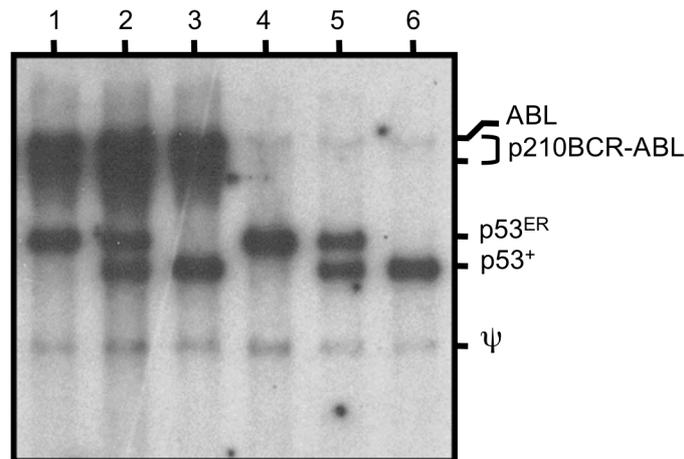
Tras la hibridación, las membranas se lavan al menos 3 veces durante 30 min con abundante volumen de la solución de lavado, a 65°C.

#### **Solución de Lavado**

0,1 % SDS

0,1 % SSC

La detección de la señal se realiza mediante 15 h de exposición en una pantalla BAS-III "revelada" en un Phosphorimager (Bio-imaging analyzer BAS-1500, Fujifilm) o mediante la exposición durante 10 días de una película de autorradiografía (Kodak Biomax MR) a -70°C revelada en un revelador automático (M35 X-OMAT Processor, Kodak).



**Figura 51. Determinación del genotipo de los ratones mediante Southern blot.** Imagen de la exposición en una autorradiografía Kodak 10 días a  $-70^{\circ}\text{C}$ . 1: Individuo  $p53^{\text{ER/ER}};p210\text{BCR-ABL}$ , 2: Individuo  $p53^{\text{ER/+}};p210\text{BCR-ABL}$ , 3: Individuo  $p53^{+/+};p210\text{BCR-ABL}$ , 4: Individuo  $p53^{\text{ER/ER}}$ , 5: Individuo  $p53^{\text{ER/+}}$ , 6: Individuo  $p53^{+/+}$ .  $\psi$  = pseudogén p53.

### 2.3. Extracción de ARN

La extracción de ARN total se llevó a cabo a partir de poblaciones celulares mediante el método de “un sólo paso” descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). Este método consiste en la lisis de las células con una solución que contiene tiocianato de guanidina, seguida de una homogeneización que, en este caso, se realizó de forma suave con la pipeta.

Solución de guanidina
4 M Tiocianato de Guanidina (Fluka)
100 mM Tris pH 7,0 (Merck)
0,5% Sarcosyl (Sigma)
0,1 M $\beta$ -Mercaptoetanol (Merck)
H <sub>2</sub> O MilliQ

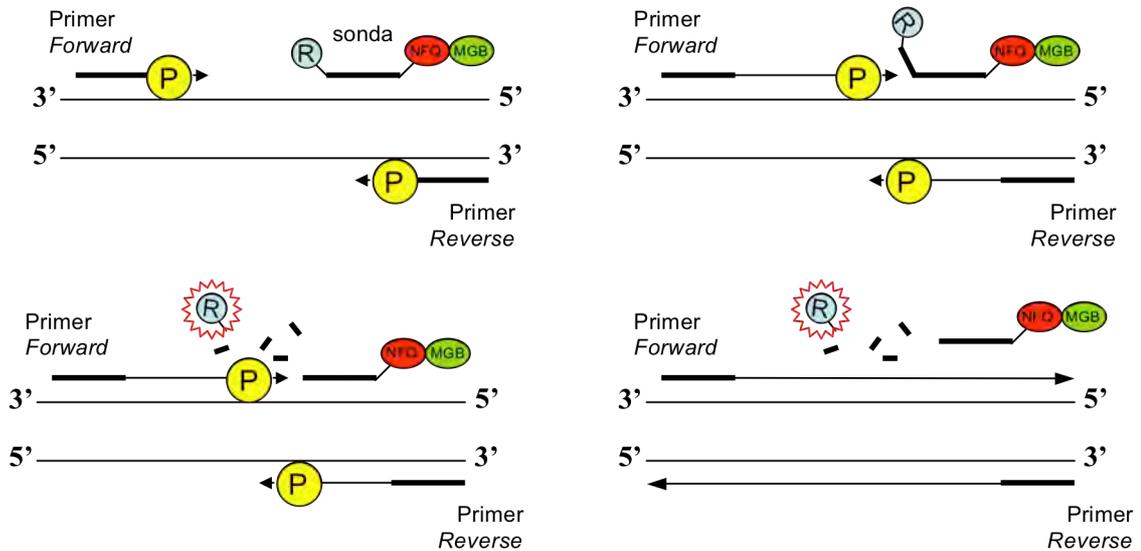
Tras la lisis se añade al homogenado 1/10 de su volumen de 2 M acetato sódico pH 4, y se extrae con fenol:cloroformo (1 volumen de fenol y 1/10 del volumen final de CIA). En estas condiciones de pH, el ADN de alto peso molecular no es soluble en la fase acuosa, mientras que el ARN sí lo es. Para ayudar a la precipitación de todo el ARN, añadimos a la fase acuosa recogida 1  $\mu\text{L}$  de glicógeno (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , Roche). El ARN extraído se precipita con un volumen de isopropanol (Merck) a  $-20^{\circ}\text{C}$  y el precipitado se disuelve en agua tratada con dietilpirocarbonato (H<sub>2</sub>O DEPC) para inactivar las ribonucleasas.

## 2.4. PCR cuantitativa

La técnica de PCR cuantitativa (qPCR) nos permite hacer una determinación de la cantidad de un ARN mensajero concreto que existe en una muestra determinada. Los datos que se obtienen con esta técnica pueden darse en valor absoluto, previa construcción de una curva *standard*, o en valores relativos en referencia a un ARN mensajero presente en todas las muestras y que, por definición, no debe variar con las diversas variantes del estudio. Se suelen usar como genes controles los llamados genes *housekeeping* como GAPDH,  $\beta$  actina o el rARN.

La técnica se inicia con la extracción del ARN de la muestra sometida a estudio. Este ARN tiene que ser convertido en ADN complementario (cADN), en una reacción en la que se utiliza la enzima retrotranscriptasa (RT).

El siguiente paso es llevar a cabo una reacción de PCR en la que además de incluir los oligonucleótidos o *primers* específicos de la secuencia a amplificar, se incluye una sonda (sonda TaqMan<sup>®</sup>) marcada en su extremo 5' por un fluorocromo *reporter* (como, por ejemplo, FAM<sup>™</sup>) y en su extremo 3' por la proteína MGB (*minor groove binder*) junto a un *quencher* no fluorescente (NFQ). La proteína MGB incrementa la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) de la sonda (Afonina *et al*, 1997; Kutyaivin *et al*, 1997).



**Figura 52. Técnica de PCR cuantitativa.** Esquema del proceso de amplificación del cADN y detección de la señal en la técnica de PCR cuantitativa utilizando sondas TaqMan<sup>®</sup> (adaptado de About TaqMan<sup>®</sup> Chemistry, Applied Biosystems).

Durante cada ciclo de PCR la sonda se unirá a su secuencia diana, la cual se encuentra entre las secuencias reconocidas por los *primers forward* y *reverse*. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del *quencher* al fluorocromo *reporter* hace que la emisión de fluorescencia de éste sea suprimida, principalmente por transferencia de energía de tipo Förster. La

ADN polimerasa empieza la extensión a partir de uno de los *primers* y, gracias a su actividad 5' exonucleasa, digiere la sonda al llegar a ella. Esto sólo ocurre con sondas que estén hibridadas con la cadena molde, liberando el fluorocromo *reporter* que se separa del *quencher*. De esta forma, el fluorocromo *reporter* emite fluorescencia que es detectada por una cámara CCD. Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto. Además, debido a estos requerimientos, las amplificaciones inespecíficas no son detectadas por el sistema.

El ARN de las muestras recogidas se resuspendió en 12 ó 22  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC en función del número de células recogidas en cada caso. Se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de la suspensión para su cuantificación mediante un espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000. Como blanco, se utilizó una muestra sin células, procesada con el mismo protocolo de extracción de ARN que las demás. Para comprobar el grado de integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa de las muestras más concentradas.

### Síntesis de cADN:

El ARN extraído se utilizó para sintetizar cADN mediante el *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Applied Biosystems).

Como de algunas muestras teníamos una cantidad muy pequeña de ARN, realizamos una primera prueba para averiguar la cantidad mínima de ARN a partir de la cual se podía sintetizar cADN y obtener unos resultados fiables. Elegimos varias muestras y las sometimos al ensayo completo partiendo de 500 ng y de 50 ng. Los resultados obtenidos fueron semejantes, por lo que decidimos realizar el ensayo a partir de 100 ng para todas las muestras.

La mezcla utilizada para llevar a cabo la reacción de síntesis fue la siguiente:

Reacción de síntesis de cADN (20 $\mu\text{L}$ )	
7 $\mu\text{L}$	$\text{H}_2\text{O}$ DEPC
10 $\mu\text{L}$	2X RT <i>buffer</i>
1 $\mu\text{L}$	<i>Enzyme Mix</i>
2 $\mu\text{L}$	ARN (100 ng ARN + $\text{H}_2\text{O}$ DEPC hasta 2 $\mu\text{L}$ )

La reacción se llevó a cabo en una termociclador programando el siguiente ciclo:  
60 min a 37°C, 5 min a 95°C y enfriamiento hasta 4°C.

Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis.

### Preamplificación:

Las muestras con escaso RNA para realizar una qPCR fueron preamplificadas tras su conversión a cADN mediante el kit *TaqMan<sup>®</sup>PreAmp Master Mix Kit* (Applied Biosystems). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes:

	Activación del enzima		Preamplificación	
			14 ciclos	
			Desnaturalización	Anillamiento/Extensión
Temperatura	95°C		95°C	60°C
Tiempo	10 min		15 seg	4 min

Una vez preamplificadas las muestras se diluyeron 10 veces con TE y se utilizaron 5µL para llevar a cabo la reacción de qPCR.

**qPCR:**

Para llevar a cabo el ensayo de PCR cuantitativa se utilizaron *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) de los siguientes genes:

- Puma* (Mm00519268\_m1)
- Bax* (Mm00432050\_m1)
- p21 (Mm00432448\_m1)
- p53 (Mm01731287\_m1)
- Fas* (Mm01204974\_m1)
- Gusb* (Mm01197698\_m1), usado como control endógeno.

Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Las muestras con el cADN se llevaron hasta 32 µL con H<sub>2</sub>O DEPC para poder realizar 21 reacciones de qPCR (7 ensayos por triplicado). Las reacciones que se realizaron fueron las siguientes:

Reacción de qPCR (20 µL)	
7,5 µL	H <sub>2</sub> O DEPC
10 µL	2X TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
1 µL	20X TaqMan® Gene Expression Assays
1,5 µL	cADN

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de RT-PCR ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción fueron:

	Activación del enzima		Amplificación	
			40 ciclos	
			Desnaturalización	Anillamiento/Extensión
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	1 min

Los datos obtenidos fueron analizados con el software SDS (Applied Biosystems). Los resultados fueron normalizados respecto a la expresión del control endógeno *Gusb* y las cantidades relativas de expresión se dieron con referencia a una muestra calibradora. Las muestras calibradoras fueron el ARN de cada población de un ratón sin tratamiento.

## 2.5. Western blot

La técnica de western blot es una técnica similar a la de Southern blot, utilizada para proteínas en vez de para ADN. En ambas técnicas, los componentes de las muestras son separados electroforéticamente y transferidos de un gel a un soporte sólido (una membrana) donde son hibridados con reactivos específicos para una secuencia concreta de aminoácidos (western blot) o nucleótidos (Southern blot). En el caso del western blot, las sondas usadas son anticuerpos que reconocen específicamente epítopos antigénicos de las proteínas diana unidas a la membrana. Así, esta técnica es extremadamente útil para la identificación y cuantificación de proteínas concretas en extractos proteicos complejos.

El análisis de proteínas se realizó de acuerdo a los protocolos descritos en *Antibodies. A Laboratory Manual*. (Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) y *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (Third Edition, Sambrook and Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

La extracción de las proteínas se realizó mediante la lisis de las células recogidas y congelas a  $-20^{\circ}\text{C}$  con un *buffer* de lisis: 2,5% SDS, 250 mM Tris pH 6,8. Se añadieron  $\sim 100\ \mu\text{L}$  de *buffer* de lisis calentado a  $100^{\circ}\text{C}$  por cada  $10^6$  células recogidas. Las muestras se hirvieron 5 min a  $100^{\circ}\text{C}$  y posteriormente fueron sonicadas para romper el ADN durante 20 min en un sonicador (Fisher Scientific FB 15050). Las muestras fueron centrifugadas 10 min en frío y el sobrenadante, con las proteínas, fue recogido para su cuantificación.

La concentración de proteínas se realizó empleando el método colorimétrico *DC Proteín Assay* (BioRad), basado en el método descrito por Lowry y colaboradores (Lowry *et al*, 1951). Los extractos de proteína se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

El análisis de las proteínas se realizó empleando geles de gradiente del 4 al 12% *NuPAGE<sup>®</sup> Novex<sup>®</sup> Bis-Tris Mini Gels* (Invitrogen). La electroforesis para la separación de las proteínas se realizó en *buffer* MOPS (Invitrogen) a 100 V constantes durante 2,5 h. Se cargaron un máximo de 50  $\mu\text{g}$  de proteína por carril. En el caso de las muestras de sangre cuya concentración no permitió cargar 50  $\mu\text{g}$  se cargaron entre 30 y 45  $\mu\text{g}$  de proteína total. Las muestras se cargaron en el gel junto con un volumen adecuado de *buffer* de carga.

### Buffer de carga de proteínas (6X)

300 mM Tris-HCL pH 6,8

12% SDS

60% Glicerol

300 mM DTT

0,24% Azul de bromofenol

Las proteínas se transfirieron a una membrana de Immobilon P (Millipore) mediante transferencia húmeda en *buffer* de transferencia aplicando una corriente de 100 V constantes durante 1,5 h.

**Buffer de Transferencia**

25 mM Tris-HCl

192 mM Glicina

10% Metanol

Tras la transferencia la membrana se bloqueó 1 h con TBST + 3% BSA (A-7030 Sigma) para evitar uniones inespecíficas, en el caso del anticuerpo anti-p53 y anti-GAPDH y con PBS + 10% FBS en el caso del anticuerpo anti-p21.

**TBST**

10 mM Tris pH 7,5

100 mM NaCl (0,8%)

1 mM EDTA

0,1% Tween-20 (Sigma)

La incubación con el anticuerpo primario se realizó en un volumen de 4 mL de la solución de bloqueo correspondiente durante toda la noche, a 4°C, en agitación. Se utilizaron los anticuerpos anti-p53 (NCL-p53-CM5, Leica) a una dilución 1:500, anti-p21 (BD Pharmingen) a una dilución 1:1000 y anti-GAPDH (AMBION) a una dilución 1:40000.

Tras la incubación las membranas se lavaron con TBST repetidamente (3 veces durante 5 min y 2 veces durante 15 min) y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-conejo o anti-ratón, BioRad) a una dilución 1:8000, 1 h, a temperatura ambiente en agitación.

Las membranas se lavaron nuevamente antes de realizar el revelado.

El revelado de la señal se realizó por quimioluminiscencia empleando el *ECL Western Blotting Reagents and Analysis System* (Amersham) siguiendo las especificaciones técnicas del fabricante. Este método está basado en la oxidación de un compuesto denominado luminol a una forma excitada que emite luz a 428 nm cuando vuelve a su estado basal. Esta reacción está catalizada por la peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario en presencia de peróxido de hidrógeno. Para la detección de la señal se utilizaron *films Hyperfilm™ ECL* (Amersham).

**Reutilización de las membranas (*stripping*):**

Las membranas fueron hibridadas con diferentes anticuerpos previa eliminación del anterior de la siguiente manera.

Se eliminó el exceso de líquido revelador lavando las membranas 2 veces con dH<sub>2</sub>O. Seguidamente las membranas se lavaron 15 min en glicina 100 mM pH 2,5, dH<sub>2</sub>O 2 veces, 15 min 1% SDS, dH<sub>2</sub>O 2 veces, TBST 3 veces durante 5 min. Tras estos lavados las membranas se bloquearon y se incubaron con el nuevo anticuerpo primario.

### 3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

#### 3.1. Citometría de flujo o FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)

En los organismos multicelulares todas las células poseen idéntica dotación genética pero la carga proteica varía enormemente de unas a otras. La técnica de FACS permite diferenciar células en función de las proteínas que expresan, así como separar las distintas poblaciones celulares.

Esta técnica consiste en marcar con uno o varios fluorocromos una suspensión celular que se hace circular en forma de gotas microscópicas. Las células pasan por un campo de detección atravesado por un rayo láser. Al incidir este láser sobre las células se produce una dispersión de la luz en función de las características ópticas de la célula y una activación de la fluorescencia de los fluorocromos con los que se haya marcado a dicha célula. Así, mediante sensores específicos se analizan y cuantifican las poblaciones en estudio en función de sus propiedades físicas, como el tamaño (FSC, *forward scattered*) y la complejidad interna (SSC, *side scattered*), y del marcaje efectuado. Para la separación celular este aparato lleva acoplado un sistema que carga eléctricamente a las células y unas placas deflectoras que realizan su separación.

Se sometieron a este tipo de ensayo células de la sangre periférica, el timo, el bazo y la médula ósea de los ratones problema y control.

Se recogieron unos 200  $\mu$ L de sangre periférica extraída del plexo orbital de los ratones sobre 15 mL de RCLB (*Red Cell Lysis Buffer*) frío.

RCLB
155 mM NH <sub>4</sub> Cl (Merck)
10 mM KHCO <sub>3</sub> (Panreac)
10 mM EDTA (Panreac)

Se recogieron ~ 200 $\mu$ L de sangre de los ratones sobre 10  $\mu$ L de EDTA tripotásico 0,5 M. En caso de recoger un volumen de sangre mayor, se recogió en varios viales manteniendo estas proporciones. Del volumen de sangre recogido se usaron ~ 200  $\mu$ L para la lisis de los eritrocitos en 15 mL de RCLB, 20  $\mu$ L para el análisis mediante HEMAVET<sup>®</sup> y 5  $\mu$ L para hacer un frotis.

La sangre añadida al *buffer* RCLB se agitó para su completa homogeneización y lisis de los eritrocitos y se mantuvo 15-20 min en hielo. Las muestras se centrifugaron 10 min a 500g. Se decantó el sobrenadante y el *pellet* se lavó con 15 mL de PBS + 1% FBS.

Las células de timo, bazo y médula ósea se recogieron como fue descrito anteriormente. Fueron centrifugadas 10 min a 500g. Se decantó el sobrenadante y el *pellet* se lavó con 10 mL de PBS + 1% FBS.

Los *pellets* de las células de sangre periférica, timo, bazo y médula ósea de resuspendieron en ~1 mL de PBS + 1% FBS.

### 1) Recuento de las poblaciones leucocitarias

Se distribuyeron 180  $\mu$ L de cada una de las suspensiones en 5 tubos de FACS (BD Falcon) sobre hielo a los que se añadieron 1  $\mu$ L de los siguientes anticuerpos (BD Pharmingen) según el siguiente esquema:

Fluorocromo	FITC	PE
Tubo 1	Gr1	Mac1
Tubo 2	IgM	B220
Tubo 3	CD4	CD8
Tubo 4	Gr1, Mac1, IgM, B220, CD4, CD8	CD45
Tubo 5	Ninguno	Ninguno

Los células se incubaron con los anticuerpos durante 30 min en hielo y en oscuridad. Finalmente, las suspensiones celulares se analizaron con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson).

Los resultados se analizaron en el Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca usando el software CellQuest (Becton Dickinson) y con el software FlowJo (Tree Star Inc.).

### 2) Tinción anexinaV - yoduro de propidio

Este protocolo se basa en el cambio de la distribución de la fosfatidilserina de la membrana celular durante el proceso de apoptosis, en el que este fosfolípido pasa de estar en la hemimembrana celular interna a la externa, y también en la gran afinidad y especificidad que tiene la proteína anexina V con este componente de la membrana.

En las células vivas, la fosfatidilserina no es accesible a la anexina V, pero conforme transcurre la apoptosis pasa a estar en el exterior celular, permitiendo la unión con la anexina V en la etapa conocida como apoptosis temprana. El avance de la apoptosis provocará además una progresiva pérdida de la integridad de la membrana, con lo que el yoduro de propidio (IP) podrá penetrar en la célula e intercalarse en su ADN. Esta fase se conoce como apoptosis tardía en la cual ambos compuestos (anexina V y IP) marcarán las células. Finalmente, en la fase de muerte más avanzada, la membrana estará desintegrada y sólo habrá unión del yoduro de propidio al ADN.

Las células de sangre, timo, bazo y médula ósea sometidas al marcaje con anexina V-yoduro de propidio, se contaron con una cámara de Neubauer tras ser lavadas con 10 mL de *Binding Buffer* para asegurar una completa conversión del *buffer* y se resuspendieron en un volumen de *Binding buffer* + 1% FBS adecuado para que las células estuvieran a una concentración de  $40 \times 10^6$  células/mL. De esta suspensión se distribuyeron 200  $\mu$ L por tubo para el marcaje anexina V-IP.

<b><i>Binding Buffer</i></b>
10 mM Hepes/NaOH pH 7,4
140 mM NaCl
2,5 mM CaCl <sub>2</sub>

El marcaje con anexina V-IP se realizó de dos formas diferentes; el marcaje 1 para detectar únicamente las células apoptóticas de las muestras, y el marcaje 2 en el que, además de detectar las células apoptóticas, se realizó un marcaje para identificar su grado de diferenciación.

**MARCAJE 1**

Las muestras fueron marcadas con 2 µl de anexina V-FITC (BD Pharmingen) y 10 µL de IP 50 µg/mL (Sigma) durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Antes de pasar las muestras por el citómetro de flujo se añadieron 500 µL de *Binding buffer* + 1% FBS.

**MARCAJE 2**

Las muestras fueron marcadas con 1 µL de FcBlock CD16/CD32 (BD Pharmingen) para impedir la unión inespecífica de los anticuerpos, durante 10 min, a temperatura ambiente.

Posteriormente las muestras se marcaron con 1,5 µL de anexina V-FITC, 1 µL de Sca1-PE y 1 µL de cada anticuerpo de Lin-APC (Mac1, Gr1, B220, CD4 y CD8) durante 20 min a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de anticuerpos mediante el lavado de las muestras con 2 mL de *Binding buffer* + 1% FBS. El *pellet* de células se resuspendió en 75 µL de IP 2X (10 µg/mL IP en *Binding buffer*).

La lectura de las muestras se realizó en la hora siguiente al marcaje. Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star Inc.).

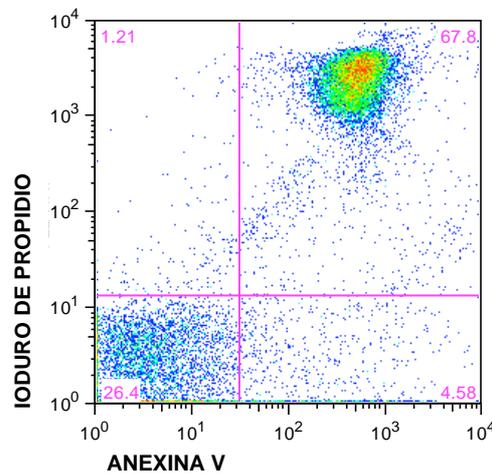
Como controles de la compensación de los fluorocromos en el citómetro, se usaron 5 tubos con células del bazo del animal control teñidas de la siguiente manera:

	<b>ANTICUERPOS</b>	<b>MARCAJE IP</b>
Tubo 1: UNSTAINED	Ninguno	No
Tubo 2: FITC	1µL CD4-FITC	No
Tubo 3: PE	1µL CD4-PE	No
Tubo 4: APC	1µL CD4-APC	No
Tubo 5: IP	Ninguno	Sí

Como control de la población Sca1<sup>+</sup>, se marcaron 4 tubos con células de cada tejido del animal problema con 1 µL de Sca1-PE y 1 µL de Gr1-APC o B220-APC.

Como control positivo de apoptosis y del marcaje, se usaron células de sangre de un ratón  $p53^{+/+}$  recogida el día anterior, lisada y lavada de la forma anteriormente descrita. Las células del *pellet* se resuspendieron en medio RPMI + 20% FBS y se cultivaron en una placa de cultivo ~15 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se recogieron las células en un tubo, se centrifugaron a 1500 rpm (500g), se lavaron primero con PBS + 1% FBS y después con *Binding buffer* + 1% FBS, y finalmente se resuspendieron en 200 µL de *Binding buffer* + 1% FBS para su marcaje.

Medio RPMI + 20% FBS
RPMI 1640 (Lonza)
20% FBS inactivado (Lonza)
1% L-Glutamina (Lonza)
1% Estreptomicina-Penicilina (Lonza)



**Figura 53. Control positivo de apoptosis.** Muestra de sangre de un ratón  $p53^{+/+}$  cultivada durante ~15 h en medio RPMI + 20% FBS y posteriormente marcada con anexina V-IP. Se indica el porcentaje de eventos captados en el cuadrante correspondiente.

### 3) Aislamiento y purificación de poblaciones celulares (*sorting*)

Para analizar la expresión diferencial de genes concretos entre los animales tratados y los controles se purificaron las poblaciones celulares  $Sca1^{+}Lin^{-}$ ,  $Sca1^{+}Lin^{+}$  y  $Sca1^{+}Lin^{+}$  de sangre periférica, timo, bazo y médula ósea por citometría de flujo.

Tras el sacrificio del ratón, se recogió el mayor volumen de sangre posible, se lisaron los eritrocitos en 30 mL de RCLB y se lavó con PBS + 1% FBS.

Las células del bazo, timo y médula ósea se procesaron de la misma forma descrita anteriormente.

Las células disgregadas y recogidas de estos cuatro tejidos se resuspendieron en un volumen de unos 200  $\mu$ L para su marcaje y separación en el citómetro de flujo.

El marcaje se realizó con 2  $\mu$ L de cada anticuerpo durante 30 min en hielo. Para el marcaje Sca1 se utilizó Sca1-PE (BD Pharmingen) y para Lin se usaron Gr1, Mac1, CD4, CD8 y B220-FITC (BD Pharmingen). Tras el marcaje, las suspensiones celulares se pasaron por un filtro para romper posibles agregados para lo cual se usaron tubos FACS con tapón separador de células (BD Falcon).

Las poblaciones se separaron en el Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca con un citómetro de flujo FACSVANTAGE (Becton Dickinson). Las células recogidas fueron posteriormente reanalizadas para comprobar que la pureza de la población fuera superior al 98% en todos los casos. Estas poblaciones se recogieron sobre 500  $\mu$ L de RNAlater (Ambion). La extracción de ARN total de las poblaciones celulares recogidas se realizó el mismo día de su separación mediante el método de “un sólo paso” descrito anteriormente.

### 3.2. Identificación de células senescentes: tinción $\beta$ -galactosidasa

La capacidad de replicación limitada es una característica definitoria de la mayoría de las células, cuya vida suele culminar en un estadio de senescencia, una situación de parada en el que las células son viables pero presentan patrones anormales de expresión de genes y proteínas.

El estado de senescencia está caracterizado por una falta de respuesta a los factores de crecimiento, una actividad metabólica sostenida y cambios en la morfología de la célula. Las bases moleculares para esta respuesta han sido ampliamente estudiadas y en la actualidad se consideran una combinación de al menos tres mecanismos: acortamiento de los telómeros, sobreexpresión del locus CDKN2A (el cual codifica INK4A y ARF) y una acumulación de daño en el ADN (Collado *et al*, 2010).

La mayoría de las células expresan una  $\beta$ -galactosidasa lisosomal que es óptimamente activa a pH 4. De este modo las células presenescentes y senescentes se tiñen a este pH. Sin embargo, únicamente las células senescentes son teñidas a pH 6, con lo que la tinción a este pH se conoce como SA- $\beta$ -Gal ( $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia) (Dimri *et al*, 1995).

La tinción de las células senescentes se realizó siguiendo el protocolo descrito en Dimri *et al*, 1995.

Para la realización de esta técnica se utilizaron secciones realizadas a partir de los tejidos conservados en OCT *Compound* y conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las secciones realizadas con el criotomo se colocaron sobre portaobjetos, recogiendo muestras cada 100  $\mu\text{m}$  de espesor del tejido. En estos portaobjetos

se había colocado previamente una sección de las células utilizadas como control positivo (ver más adelante).

Las muestras fueron lavadas en PBS durante 2 min. Posteriormente se fijaron 5-10 min a temperatura ambiente con la solución de fijación recién preparada.

Solución de Fijación
2% Formaldehído (Panreac)
0,2% Glutaraldehído (TAAB)
PBS

Se lavaron 2 veces con PBS para eliminar los restos de la solución de fijación y se incubaron 48 horas a 37°C en una cámara humidificadora con la solución de tinción fresca.

Solución de Tinción
1 mg/mL X-Gal (Sigma) (stock: 20 mg/mL en DMF (Panreac))
40 mM <i>buffer</i> Citrato-Fosfato pH 6,0
5 mM Ferrocianuro potásico (Sigma)
5 mM Ferricianuro potásico (Sigma)
150 mM NaCl
2 mM MgCl <sub>2</sub>

Para preparar el *buffer* Citrato-Fosfato pH 6,0 se mezclaron 17,9 mL de ácido cítrico 0,2 M (Panreac) con 36,6 mL de fosfato bisódico 0,4 M (Sigma).

Tras la tinción las muestras fueron lavadas con PBS y contrateñidas con eosina. Para ello, se preparó una solución *stock*: 1% eosina Y (Sigma) en etanol al 80% (Merck), y a partir de ésta una solución de trabajo: 25% solución *stock* de eosina; 0,5% ácido acético glacial (Panreac); 75% etanol al 80%, con la que se tiñeron las muestras durante 3 min. Se retiró el exceso de colorante con un lavado rápido en agua y se montó la preparación con glicerol al 60% (Sigma). Las muestras fueron examinadas con un microscopio de campo claro Leica DMR XA.

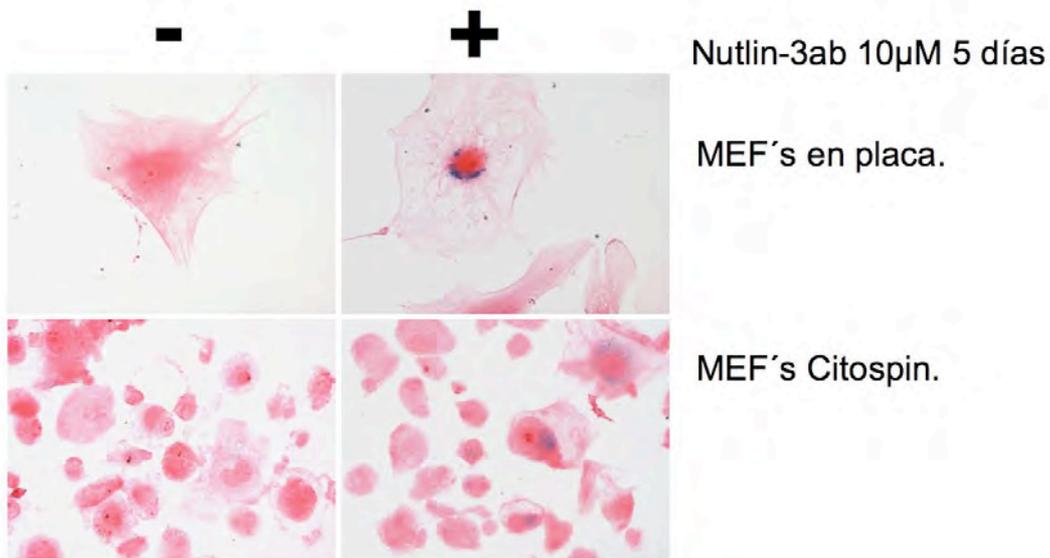
Como control positivo de senescencia se usaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) tratados con Nutlin-3ab (Sigma).

Se descongeló un vial de MEFs y se crecieron en medio de cultivo: DMEM (Lonza) + 10% FBS inactivado 20 min a 65°C + 1% L-Glutamina (Lonza) + 1% Penicilina–Estreptomycin (Lonza) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta tener un número suficiente de fibroblastos. Pasados 2 días, se plaquearon a diferentes concentraciones y se añadió Nutlin-3ab al medio de cultivo a una concentración final de 20 µM. Previamente se preparó un *stock* de 2 mM Nutlin-3ab en DMSO (Sigma) que se guardó a -20°C.

Tras 5 días con la droga se recogieron los MEFs tratándolos 5 min con tripsina (Lonza). Posteriormente se lavaron con PBS.

Una parte de ellos se colocó en distintas concentraciones en portas tratados con polilisina con un CitoSpin (Cyto-Tek® SAKURA) mediante 5 min de centrifugación a 500 rpm. Estos portas se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para usarlos posteriormente de control positivo en las futuras tinciones de senescencia según se iban realizando los cortes de los diferentes tejidos.

La otra parte se centrifugó tras lavarse con PBS, se resuspendió el *pellet* en OCT *Compound* y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Este bloque se cortó y se colocó una sección de MEFs en cada uno de los portas con secciones de tejidos.



**Figura 54. Control positivo de senescencia.** Tinción SA-β-Gal en MEFs tratados (+) o sin tratar (-) con Nutlin-3ab. En la parte superior podemos ver MEFs fotografiados sobre el soporte donde crecieron y en la parte inferior MEFs depositados sobre un porta utilizando un *citospin*.

### 3.3. Ensayo de formación de colonias hematopoyéticas

En la médula ósea de los ratones adultos, un pequeño número de células madre hematopoyéticas (HSCs) genera poblaciones heterogéneas de progenitores hematopoyéticos activos proliferativamente. Estos progenitores hematopoyéticos se dividen y se diferencian dando lugar diariamente a la generación de millones de células sanguíneas maduras. Se han desarrollado ensayos *in vitro* para cuantificar estos progenitores multipotenciales y progenitores más diferenciados de las líneas de eritrocitos, granulocitos, monocitos-macrófagos y megacariocitos, así como de las líneas preB linfoides. Cuando estas células se cultivan en una matriz semisólida, los progenitores individuales llamados células formadoras de colonias (CFCs) proliferan hasta formar pequeños grupos de células ó colonias.

Los ensayos de formación de colonias se llevan a cabo creciendo una suspensión celular en un medio semisólido como la metilcelulosa suplementado con nutrientes y citoquinas seguido de una incubación a 37°C de una duración entre varios días hasta varias semanas. Las colonias son clasificadas según el reconocimiento morfológico de uno o más tipos celulares en la misma colonia. Esto puede hacerse mediante observación *in situ* por microscopía de campo claro o por tinción de las células por métodos citoquímicos o inmunocitoquímicos.

Para realizar el ensayo de formación de colonias se utilizaron ratones de genotipo p53<sup>ER/ER</sup>; p210BCR-ABL diagnosticados como enfermos mediante HEMAVET y ratones sanos de genotipo p53<sup>+/+</sup>.

Los ratones se sacrificaron mediante inhalación de cloroformo y se recogieron los siguientes tejidos: la sangre (mediante punción cardiaca), el bazo y la médula ósea.

La sangre (~1 mL) se recogió sobre 60 µL de EDTA tripotásico 0,5 M y se lisaron los eritrocitos con 15 mL de RCLB durante 20 min en hielo. Tras la lisis, se lavó el *pellet* de células con PBS + 1% FBS y se resuspendió en 2 mL de Iscove's MDM con 2% FBS (IMDM) (Stem Cell Technologies).

El bazo y los huesos de las patas traseras fueron transferidos a placas con PBS + 1% FBS y se realizaron varios pases para lavar los tejidos. Finalmente, el bazo y la médula ósea extraída por *flushing* con una jeringuilla de 1 mL se pasaron por un *cell-strainer* de 70 µm para disgregarlos hasta células individuales. Las suspensiones celulares se llevaron a 50 mL con PBS + 1% FBS. Se centrifugaron a 500g y el *pellet* se resuspendió en otros 50 mL de PBS + 1% FBS.

En este paso se contaron las células de la sangre, el bazo y la médula ósea haciendo diluciones de las suspensiones con 3% ácido acético con azul de metileno. El conteo se realizó utilizando una cámara de Neubauer.

Se estimó el volumen de las diferentes suspensiones que contenía  $4 \times 10^6$  células y se llevó a 2 mL con IMDM. Tras centrifugar el *pellet* se resuspendió en 2 mL de IMDM. En el caso de la médula ósea se realizó una dilución 1:10 de esta suspensión. La concentración de las suspensiones celulares fue

finalmente de  $2 \times 10^6$  células/mL y en el caso de la médula ósea de  $2 \times 10^5$  células/mL.

De cada uno de los tres tejidos recogidos se sembraron 4 placas: a dos se las trató con 4-hidroxitamoxifén y a las otras 2 con etanol (excipiente). Para ello se preparó la siguiente mezcla:

3mL	MethoCult® Media #M3434 (Stem Cell Technologies)
30µL	Penicilina/Estreptomicina 100X (Lonza)
300µL	de la suspensión celular
3,3µL	Etanol (Merck) o 4-hidroxitamoxifén (Sigma) 0,1mM en Etanol (Merck)

La composición del MethoCult® Media #M3434 es:  
1% MC, 15% FBS, 1% BSA, 10 µg/mL insulina, 200 µg/mL transferrina, 50 ng/mL rm SCF, 10 ng/mL rm IL-3, 10 ng/mL rh IL-6, 3 U/mL rh EPO.

Las mezclas se agitaron por vortex para homogeneizar bien todos los componentes y tras esperar a que desaparecieran las burbujas se repartió 1,1 mL en placas petri de 35 mm de diámetro con la ayuda de una jeringuilla y agujas con la punta redondeada (Stem Cell Technologies).

Las células se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 2 semanas medidas en una placa de 15 cm de diámetro en cuyo interior se colocaron junto con las placas con los cultivos dos placas abiertas llenas de agua estéril para evitar la desecación del medio de cultivo. Cada 3 días se les añadió a los cultivos etanol o 4-hidroxitamoxifén a una concentración final de 0,1 nM disuelto en 50 µL de IMDM.



**Figura 55. Ensayo de formación de colonias.** Fotografía de las placas donde crecieron las colonias de uno de los experimentos realizados.

Se realizaron conteos de las colonias los días 4 y 7 del periodo de incubación. Se contaron las colonias de 2 cuartos de cada placa y se hizo la media de colonias por placa teniendo en cuenta los valores obtenidos en las 2 réplicas.

Las células se crecieron hasta conseguir el máximo número posible sin que empezaran a mostrar un aspecto no saludable. Las células y el medio de cultivo se recogieron en PBS, se centrifugaron (a 300g, 5 min, a temperatura ambiente) y los *pellets* celulares se lavaron con 15 mL de PBS para eliminar todo el medio posible. El PBS fue aspirado y los *pellets* celulares congelados sobre hielo seco 10 min y almacenados a -20°C hasta el momento de su procesamiento para su análisis proteico.

Las células recogidas también se utilizaron para ver muerte por apoptosis mediante citometría de flujo y tinción con anexina V-IP. En este caso, las células fueron sometidas a un segundo lavado con PBS y se continuó con el protocolo anteriormente descrito para la realización de esta tinción.

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

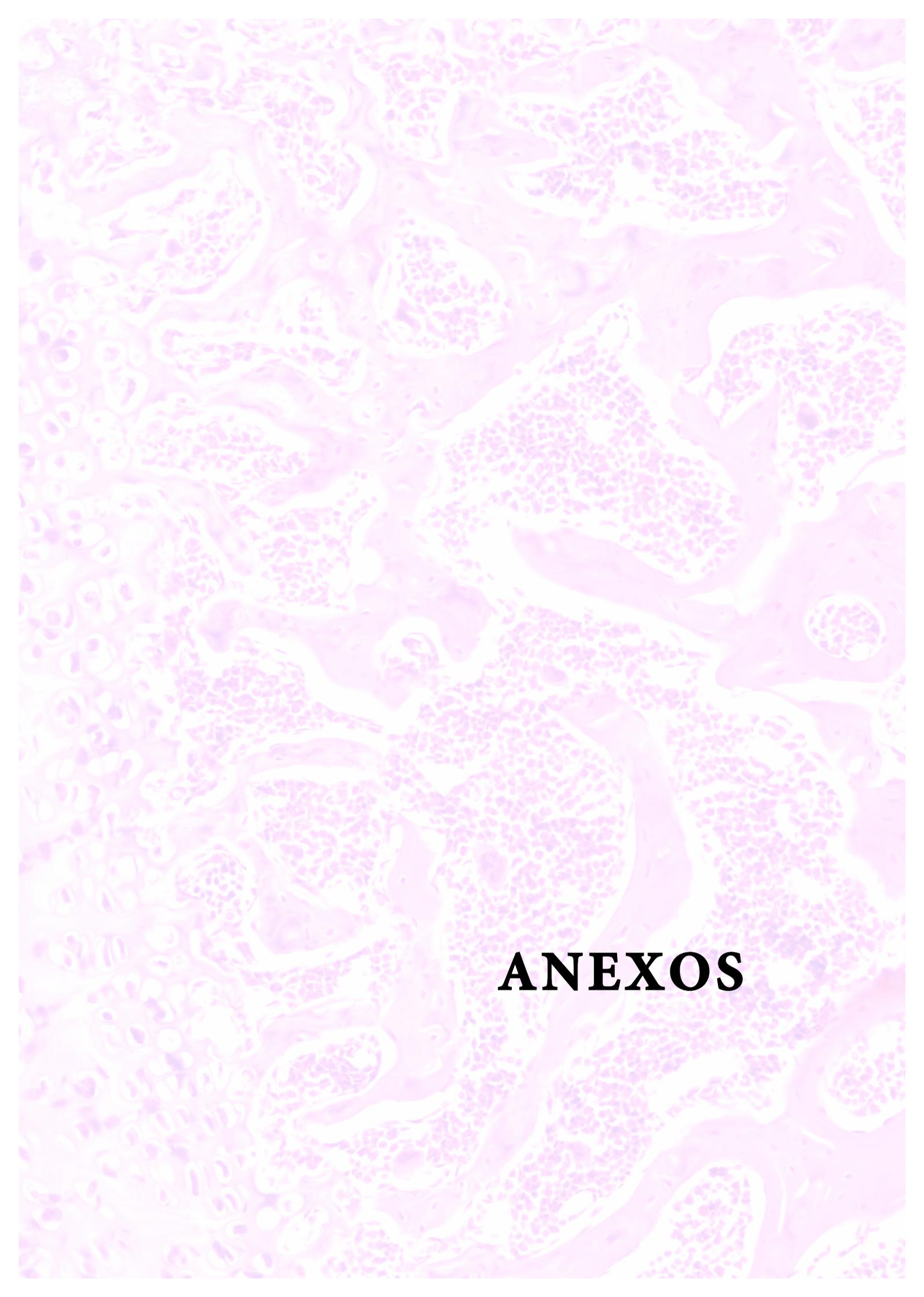
El análisis estadístico de los datos obtenidos en la realización de este trabajo ha sido realizado con el software GraphPad Prism5 (GraphPad Software).

-Para el estudio de las curvas de supervivencia se llevó a cabo un análisis de Kaplan-Meier y para determinar su significación estadística se aplicó el test Log-rank de Mantel-Cox.

-Para el estudio de los datos de apoptosis se realizó un ANOVA de una vía y para su significación estadística se aplicó el test de comparaciones múltiples de Dunn's (test no paramétrico).

-Para el estudio de la cuantificación de las poblaciones celulares mediante HEMAVET® se realizó un ANOVA de una vía (para analizar las diferencias antes-después del tratamiento) y de dos vías (considerando el tiempo como una segunda variable). Como post-test se aplicó el test de comparaciones múltiples de Dunn.

-Para el estudio de los datos obtenidos del ensayo de formación de colonias se aplicó el test de Wilcoxon para datos apareados (test no paramétrico).



**ANEXOS**

# ANEXOS

## Anexo 1. Ratones sacrificados en avanzado estado de la enfermedad usados para la caracterización del fenotipo de la colonia p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLP210.

ID	GENOTIPO	EDAD	DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO	
1	BA65	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	25	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA Y CARCINOMA RENAL
2	BA161	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	26	TUMOR MIELOIDE INDIFERENCIADO
3	BA133	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	33	LIGERO INFILTRADO
4	BA136	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	28	LINFOMA
5	BA419	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	17	TUMOR MIELOIDE INDIFERENCIADO (LMC) (AGRESIVO)
6	BA431	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	14	TUMOR MIELOIDE INDIFERENCIADO (LMC)
7	BA440	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	14	TUMOR MIELOIDE INDIFERENCIADO (LMC)
8	BA423	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	23	TUMOR MIELOIDE Y LINFOIDE INDIFERENCIADO (LMC)
9	BA513	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	7	LINFOMA EN TIMO
10	BA466	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	15	TUMOR HEMATOLÓGICO INDIFERENCIADO (LMC AVANZADA)
11	BA434	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	22	TUMOR MIELOIDE INDIFERENCIADO (LMC)
12	BA524	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	7	LINFOMA EN TIMO Y BAZO
13	BA487	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	20	TUMOR MIELOIDE INDIFERENCIADO (LMC)
14	BA270	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	40	TUMOR MIELOIDE INDIFERENCIADO (LMC)
15	BA55	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	42	LINFOMA ESPLÉNICO QUE HA DISEMINADO A HÍGADO
16	BA64	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	28	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
17	BA56	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	62	TUMOR MIELOIDE
18	BA26	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	31	LIGERO INFILTRADO
19	BA34	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	38	SARCOMA MIELOIDE CON DISEMINACIÓN A GANGLIOS
20	BA36	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	38	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
21	BA38	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	44	TUMOR MIELOIDE
22	BA159	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	50	TUMOR MIELOIDE QUE INFILTRA HÍGADO Y BAZO
23	BA121	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	33	LINFOMA
24	BA45	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	13	TUMOR MIELOIDE
25	BA249	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	36	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA-CRISIS BLÁSTICA
26	BA333	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	16	LEUCEMIA MIELOIDE
27	BA430	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	19	LEUCEMIA MIELOIDE
28	BA405	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	32	TUMOR MIELOIDE Y LINFOIDE
29	BA497	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	11	TUMOR MIELOIDE
30	BA240	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	73	TUMOR MIELOIDE
31	BA450	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	29	TUMOR MIELOIDE
32	BA443	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	38	TUMOR MIELOIDE Y LINFOPLASMOCÍTICO
33	BA182	p53 <sup>+/+</sup> ; BCR-ABL	29	LIGERO INFILTRADO
34	BA171	p53 <sup>+/+</sup> ; BCR-ABL	32	LIGERO INFILTRADO
35	BA122	p53 <sup>+/+</sup> ; BCR-ABL	53	TUMOR MIELOIDE
36	BA181	p53 <sup>+/+</sup> ; BCR-ABL	74	NEOPLASIA HEMATOLOGICA EN BAZO Y TIMO
37	BA501	p53 <sup>+/+</sup> ; BCR-ABL	7	TIMO CON INFILTRADOS MIELOIDES
38	BA558	p53 <sup>+/+</sup> ; BCR-ABL	19	TUMOR MIELOIDE Y LINFOIDE INDIFERENCIADO
39	BA505	p53 <sup>+/+</sup> ; BCR-ABL	38	TUMOR MIELOIDE INDIFERENCIADO

Edad: Edad en semanas a la que murieron estos ratones.

**Anexo 2. Ratones sacrificados en avanzado estado de la enfermedad tras haber sido tratados con tamoxifén utilizados para estudiar si el fenotipo variaba con el tratamiento.**

ID	GENOTIPO	EDAD	TRATAMIENTO	DIAGNÓSTICOS DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
1	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	40	Periodo 1	LEUCEMIA MIELOIDE DE CÉLULAS BLÁSTICAS Y MADURAS
2	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	36	Periodo 1	TUMOR MIELOIDE
3	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	43	Periodo 1	TUMOR MIELOIDE
4	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	17	Periodo 1	TUMOR MIELOIDE CON CIERTO GRADO DE DIFERENCIACIÓN
5	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	26	Periodo 1	TUMOR MIELOIDE MUY INDIFERENCIADO
6	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	40	Periodo 1	TUMOR MIELOIDE INDIFERENCIADO
7	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	28	Periodo 2	LEUCEMIA MIELOIDE
8	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	32	Periodo 2	LEUCEMIA MIELOIDE
9	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	23	Periodo 1	LEUCEMIA MIELOIDE
10	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	34	Periodo 1	TUMOR MIELOIDE
11	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	35	Periodo 2	NO VALORABLE
12	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	34	Periodo 1	PEQUEÑOS INFILTRADOS BLÁSTICOS
13	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	47	Periodo 1	TUMOR MIELOIDE
14	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	52	Periodo 1	TUMOR MIXTO: MIELOIDE Y LINFOIDE
15	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	48	Periodo 2	INFILTRADO LINFOIDE EN PULMÓN
16	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	45	Periodo 2	TUMOR MIELOIDE MUY INDIFERENCIADO
17	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	48	Periodo 2	TUMOR MIELOIDE
18	p53 <sup>ER/+</sup> ; p210BCR-ABL	35	Periodo 1	TUMOR MIELOIDE

Edad: Edad en semanas a la que murieron estos ratones.

**Anexo 3. Tamaño (en %) de las poblaciones celulares mieloides de sangre periférica de ratones de 4 meses de edad antes y después del tratamiento con tamoxifén.**

ID	GENOTIPO	TRATAMIENTO	SANGRE PERIFÉRICA					
			Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup> SSC <sup>high</sup>	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup> SSC <sup>int</sup>	Eosinófilos	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>-</sup>	Gr1 <sup>d</sup> Mac1 <sup>+</sup>	
1	59	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	13,5	5,13	28,13	0	0
2	57	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	8,55	3,03	1,67	4,06	0
3	134	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	8,88	3,93	3,5	0	0
4	319	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	55,76	6,24	0,19	2,85	0
5	319	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	16,4	6,3	2,3	10,4	4,2
6	322	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	12,8	3,87	0,67	5,6	10,14
7	322	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	12,8	6,25	1,47	8,4	6
8	323	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	14,56	2,91	1,58	9,57	9,98
9	323	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	15,5	6,02	1,87	3,5	5,1
10	326	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	24,6	5,7	0,74	15,8	15,18
11	326	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	31,6	9	1,27	26,3	6
12	329	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	17,63	4,6	4,99	13,23	9,1
13	329	p53 <sup>ER/ER</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	9,9	3,3	4,2	7,3	4
14	62	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	9,42	3,6	2,81	4,14	0
15	137	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	13,08	4,53	1,27	11,75	0
16	232	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	6	3,77	0	15,5	0
17	279	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	8,73	3,43	1,35	0	0
18	303	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	9,93	3,76	1,23	6,36	7,4
19	303	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	16,21	4,1	1	12,3	6,95
20	305	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	15	5,14	0,57	20,5	14,5
21	306	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	14	2	0,15	4,36	5,2
22	306	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	16,04	3,9	1,64	5,4	4,3
23	307	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	7,49	2,1	0,41	6,85	4,29
24	307	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	16,7	4,2	0,9	8,9	5,1
25	324	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	10,8	3,14	1,56	8,36	5,51
26	324	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	9,8	4,2	2,4	8,2	4,4
27	330	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	8,48	2,13	1,43	7,3	4,79
28	330	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	17,2	4,8	1,9	16	5,3
29	332	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	14,55	4,86	1,97	9,64	7,28
30	332	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	16,1	8,9	2,35	13,2	6,8
31	333	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	4,16	2,8	0,05	32,1	9,66
32	335	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	8,98	2,65	1,28	7,82	6,63
33	335	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	9,7	4	0,99	6,79	6,9
34	337	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	ANTES	7,62	4,33	1,38	12,56	9,9
35	337	p53 <sup>ER/+</sup> ;p210BCR-ABL	DESPUÉS	11	5,9	0,86	22	7,5

**Anexo 4. Tamaño (en %) de las poblaciones celulares hematológicas de sangre periférica, médula ósea y bazo de ratones enfermos p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL después del tratamiento con tamoxifén o con aceite.**

ID	TRATAMIENTO	EDAD EN EL TRATAMIENTO	SANGRE PERIFÉRICA					
			Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup> SSC <sup>high</sup>	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup> SSC <sup>int</sup>	Eosinófilos	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>-</sup>	Gr1 <sup>d</sup> Mac1 <sup>+</sup>	
1	653	ACEITE	5 MESES	67	0	0,7	0	19,3
2	678	ACEITE	4 MESES	57,38	6,24	3,4	6,3	0
3	719	ACEITE	4 MESES	19,17	2,03	6	3,5	4
4	841	ACEITE	4 MESES	56,39	3,93	0,1	12	13,5
5	845	ACEITE	5 MESES	36,65	0	0,6	44	0
6	860	ACEITE	4 MESES	51,98	0	1	20	1
7	869	ACEITE	4 MESES	33,86	4,91	1,85	4,45	3,5
8	890	ACEITE	4 MESES	32,07	9,26	1,25	6,1	5,01
9	1017	ACEITE	5 MESES	60,17	0	10	8	0,93
10	1067	ACEITE	5 MESES	42,51	9,82	1	5,52	5,58
11	643	TAMOXIFÉN	5 MESES	56	8,77	2,74	0,8	0
12	657	TAMOXIFÉN	5 MESES	48,61	7,09	0	1,84	0
13	679	TAMOXIFÉN	4 MESES	20,6	7,5	4	13,3	0
14	683	TAMOXIFÉN	4 MESES	22,7	4,58	4,59	6	0
15	697	TAMOXIFÉN	4 MESES	49,2	9,87	2,26	3,79	1,93
16	720	TAMOXIFÉN	4 MESES	32,3	7,27	2	9,53	5,33
17	751	TAMOXIFÉN	4 MESES	43,9	7,36	1,49	16,44	4
18	818	TAMOXIFÉN	5 MESES	13,5	2,9	0,1	0	0
19	822	TAMOXIFÉN	4 MESES	54,67	0	0,46	0	0
20	831	TAMOXIFÉN	5 MESES	23,11	3,99	0,16	3,5	2,68
21	847	TAMOXIFÉN	4 MESES	63,1	13	1,2	7,12	1,37
22	856	TAMOXIFÉN	4 MESES	66,13	11	3,5	1,5	1
23	863	TAMOXIFÉN	4 MESES	24,14	6	0	6,6	6,6
24	871	TAMOXIFÉN	5 MESES	62,4	17,8	0,5	3,5	3,7
25	881	TAMOXIFÉN	4 MESES	22,69	0	0	0	3,4
26	1006	TAMOXIFÉN	4 MESES	35,27	8,78	2,19	5,12	5,03
27	1048	TAMOXIFÉN	5 MESES	48,37	0	0,76	4	0,4
28	1054	TAMOXIFÉN	4 MESES	34,15	0	0,95	4,08	11,45

ID	TRATAMIENTO	EDAD EN EL TRATAMIENTO	MÉDULA ÓSEA	BAZO		
			Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup>	Gr1 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup>	LINF B	
1	653	ACEITE	5 MESES	81,8	31,6	24,57
2	678	ACEITE	4 MESES	78	13,58	26,18
3	719	ACEITE	4 MESES	71,7	5,24	66,28
4	841	ACEITE	4 MESES	74,12	52,71	16,8
5	845	ACEITE	5 MESES	67,56	14,68	10,2
6	860	ACEITE	4 MESES	76,6	50	28,3
7	869	ACEITE	4 MESES	60,74	5,4	62,8
8	890	ACEITE	4 MESES	75,84	12,36	58,25
9	1017	ACEITE	5 MESES	98,5	58,63	5,05
10	1067	ACEITE	5 MESES	79,79	17,46	22
11	643	TAMOXIFÉN	5 MESES	79,75	22,94	36,2
12	657	TAMOXIFÉN	5 MESES	71,4	12,5	29,7
13	679	TAMOXIFÉN	4 MESES	68	3,5	17
14	683	TAMOXIFÉN	4 MESES	67,45	6,1	54,87
15	697	TAMOXIFÉN	4 MESES	83,85	32,31	32,43
16	720	TAMOXIFÉN	4 MESES	79,66	15,35	34
17	751	TAMOXIFÉN	4 MESES	76,93	19,05	21,04
18	818	TAMOXIFÉN	5 MESES	74	70	15
19	822	TAMOXIFÉN	4 MESES	81,2	5,37	11,6
20	831	TAMOXIFÉN	5 MESES	62,63	3,29	49,18
21	847	TAMOXIFÉN	4 MESES	84,19	28,9	20,48
22	856	TAMOXIFÉN	4 MESES	73	12,58	32,86
23	863	TAMOXIFÉN	4 MESES	72,42	12,98	47
24	871	TAMOXIFÉN	5 MESES	79,3	38,1	39
25	881	TAMOXIFÉN	4 MESES	0	0	0
26	1006	TAMOXIFÉN	4 MESES	86,56	10,46	32
27	1048	TAMOXIFÉN	5 MESES	89	51,76	7,77
28	1054	TAMOXIFÉN	4 MESES	60,72	0	14,98

## Anexo 5. Valores de las poblaciones celulares hematológicas obtenidos por HEMAVET® en ratones sanos.

Para averiguar los parámetros hematológicos normales de nuestra cepa mixta p53ERTAM<sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210 se realizaron análisis con HEMAVET® a una serie de ratones sanos de genotipos p53<sup>ER/ER</sup>, p53<sup>ER/+</sup> y p53<sup>+/+</sup> de fondo genético mixto, de edades comprendidas entre las 15 y las 40 semanas de edad. Las medias de estos valores, omitiendo los valores extremos, se consideraron como los parámetros de un ratón sano en el fondo genético de nuestros individuos.

Valores celulares normales de la colonia p53ERTAM <sup>KI</sup> x Sca1-BCR-ABLp210		
	Valores absolutos (miles/ $\mu$ L sangre)	Valores porcentuales (%)
Leucocitos	9,16	
Neutrófilos	2,32	24,29
Linfocitos	6,02	67,06
Monocitos	0,39	4,22
Eosinófilos	0,32	3,22
Basófilos	0,12	1,22

	WBC#	NE#	LY#	MO#	EO#	BA#	NE%	LY%	MO%	EO%	BA%
855 (15)	10,78	2,84	6,83	0,36	0,57	0,19	26,31	63,34	3,31	5,31	1,74
857 (15)	7,36	0,99	6,15	0,12	0,08	0,03	13,42	83,5	1,57	1,12	0,38
862 (15)	4,16	0,85	3,12	0,12	0,05	0,02	20,32	75,03	2,93	1,22	0,5
864 (15)	5,72	1,28	4	0,2	0,17	0,07	22,33	69,94	3,57	2,93	1,23
865 (15)	8,02	1,87	5,23	0,27	0,46	0,18	23,32	65,26	3,37	5,79	2,26
866 (15)	7,8	1,83	5,26	0,26	0,33	0,12	23,49	67,41	3,36	4,2	1,54
868 (15)	4,8	0,97	3,47	0,17	0,12	0,06	20,29	72,35	3,59	2,43	1,34
870 (15)	4,1	0,74	3,11	0,18	0,04	0,03	18,13	75,94	4,3	1,01	0,62
872 (15)	7,94	1,88	5,49	0,32	0,2	0,05	23,7	69,09	4,02	2,56	0,64
874 (15)	15,9	5,54	8,5	0,64	0,9	0,33	34,82	53,47	4	5,67	2,05
877 (15)	6,32	2	3,98	0,27	0,04	0,02	31,68	63,03	4,29	0,61	0,39
880 (15)	10,04	1,39	7,93	0,31	0,28	0,12	13,87	78,99	3,08	2,81	1,24
887 (15)	3,84	1,28	2,33	0,16	0,06	0,01	33,25	60,62	4,15	1,61	0,37
889 (15)	5,78	1,78	3,49	0,25	0,17	0,09	30,79	60,38	4,34	2,91	1,58
891 (15)	6,74	1,59	4,19	0,26	0,46	0,24	23,55	62,13	3,84	6,87	3,62
895 (15)	13,78	4,53	6,77	0,64	1,28	0,56	32,9	49,12	4,64	9,27	4,06
900 (15)	7,24	1,55	5,26	0,21	0,13	0,1	21,37	72,62	2,88	1,79	1,34
901 (15)	11,08	2,67	7,45	0,63	0,28	0,05	24,14	67,21	5,67	2,53	0,45
902 (15)	9,84	2,14	6,9	0,21	0,38	0,22	21,73	70,09	2,13	3,85	2,2
903 (15)	11,7	2,88	7,49	0,44	0,63	0,27	24,59	64	3,72	5,42	2,28
905 (15)	7,6	1,44	5,75	0,32	0,08	0,02	18,9	75,6	4,25	1,01	0,23
908 (15)	12,04	4,28	6,61	0,49	0,49	0,17	35,51	54,9	4,11	4,03	1,45
909 (15)	6,32	1,28	4,65	0,32	0,1	0,03	20,22	73,61	4,17	1,6	0,41
911 (15)	8,26	1,87	5,95	0,32	0,1	0,03	22,67	71,99	3,62	1,16	0,36
912 (15)	15,66	4,48	9,54	0,72	0,7	0,23	28,58	60,91	4,59	4,47	1,45
913 (15)	10,8	3,09	7,32	0,38	0,01	0	28,58	67,77	3,55	0,08	0,02
918 (15)	7,14	0,94	5,9	0,28	0,01	0,01	13,13	82,65	3,95	0,11	0,17
924 (15)	6,04	1,13	4,69	0,17	0,03	0,01	18,76	77,7	2,87	0,46	0,22
BA1019 (15)	10,48	2,55	6,77	0,6	0,43	0,13	24,29	64,58	5,77	4,12	1,25
BA1020 (15)	4,1	0,63	3,23	0,14	0,07	0,04	15,28	78,79	3,37	1,69	0,86
BA1022 (15)	7,68	1,51	5,11	0,34	0,47	0,24	19,67	66,52	4,48	6,15	3,17
BA1024 (15)	16,18	3,91	10,44	0,87	0,72	0,23	24,19	64,53	5,37	4,47	1,44
BA1035 (15)	13,1	5,55	6,37	0,58	0,47	0,13	42,34	48,65	4,41	3,59	1
BA1036 (15)	4,6	0,93	3,45	0,17	0,04	0,02	20,11	74,9	3,67	0,8	0,52
BA1040 (15)	8,02	1,73	5,51	0,46	0,23	0,09	21,53	68,67	5,79	2,91	1,1
BA1041 (15)	6,76	1,63	4,65	0,31	0,14	0,03	24,1	68,74	4,58	2,06	0,51
BA1044 (15)	5,96	1,7	3,29	0,27	0,44	0,27	28,56	55,15	4,5	7,34	4,46
BA1045 (15)	6,68	1,37	4,5	0,29	0,33	0,2	20,44	67,31	4,37	4,87	3,01
855 (17)	17,64	5,37	9,97	0,91	0,98	0,4	30,47	56,53	5,17	5,53	2,28
857 (17)	9,8	2,19	6,66	0,49	0,29	0,17	22,34	67,92	5,04	3	1,71
862 (17)	4,64	0,98	3,41	0,21	0,03	0,02	21,13	73,41	4,52	0,6	0,33
864 (17)	11,86	3,03	7,78	0,77	0,21	0,07	25,53	65,63	6,51	1,74	0,59
865 (17)	8,08	1,76	5,78	0,36	0,14	0,03	21,82	71,58	4,49	1,7	0,41
867 (17)	9	2,25	5,51	0,34	0,62	0,28	24,95	61,26	3,79	6,91	3,1
870 (17)	10,2	3,01	5,1	0,49	1,08	0,52	29,54	49,99	4,82	10,56	5,08
872 (17)	17,04	4,75	10,87	0,69	0,58	0,14	27,9	63,82	4,04	3,41	0,83
874 (17)	13,08	5,4	6,39	0,45	0,54	0,29	41,29	48,89	3,43	4,16	2,23
889 (17)	4,96	1,1	3,64	0,21	0,01	0	22,15	73,29	4,28	0,18	0,1
891 (17)	10,68	2,74	6,8	0,57	0,45	0,12	25,7	63,68	5,3	4,18	1,14
895 (18)	6,14	1,42	4,16	0,22	0,23	0,1	23,17	67,78	3,6	3,79	1,67
900 (18)	9,4	2,46	5,62	0,42	0,63	0,27	26,17	59,83	4,44	6,65	2,92
901 (18)	9,4	1,72	7,1	0,4	0,14	0,05	18,33	75,53	4,22	1,44	0,49
902 (18)	11,64	1,8	9,22	0,52	0,08	0,02	15,46	79,17	4,48	0,68	0,21
903 (18)	13,88	3,95	7,91	0,51	1,03	0,48	28,48	57,02	3,64	7,4	3,46
905 (18)	8	1,99	4,85	0,3	0,62	0,24	24,85	60,67	3,81	7,72	2,95
908 (18)	12,74	2,45	9,4	0,6	0,24	0,05	19,24	73,79	4,71	1,85	0,41
909 (18)	6,38	1,07	5,13	0,14	0,03	0,01	16,72	80,43	2,17	0,45	0,22
911 (18)	9,62	1,82	7,22	0,35	0,17	0,06	18,89	75,01	3,64	1,81	0,65
912 (18)	9	1,75	6,57	0,27	0,28	0,13	19,46	72,98	3,01	3,09	1,46
913 (18)	15,06	3,59	9,61	0,53	0,91	0,42	23,84	63,8	3,52	6,04	2,8
918 (18)	5,4	0,74	4,4	0,18	0,05	0,03	13,74	81,4	3,42	0,94	0,49
MEDIA	9,08	2,26	5,96	0,38	0,34	0,14	23,80	67,38	4,04	3,36	1,43
DESV EST	3,54	1,32	2,02	0,19	0,31	0,14	6,19	8,67	0,89	2,45	1,20

# Anexos

	WBC#	NE#	LY#	MO#	EO#	BA#	NE%	LY%	MO%	EO%	BA%
1019 (20)	8,36	2,64	4,56	0,24	0,66	0,26	31,62	54,55	2,84	7,84	3,15
1020 (20)	8,82	2,58	4,81	0,43	0,65	0,35	29,2	54,59	4,93	7,32	3,97
1024 (20)	15,18	4,08	9,42	0,72	0,77	0,2	26,88	62,05	4,73	5,04	1,3
1035 (20)	9,72	3,32	5,94	0,41	0,03	0,01	34,16	61,15	4,26	0,33	0,11
1036 (20)	9,72	3,11	5,19	0,48	0,72	0,21	32,03	53,44	4,93	7,41	2,21
1040 (20)	5,66	1,3	3,72	0,25	0,27	0,13	22,91	65,78	4,38	4,72	2,22
1041 (20)	8,66	2,84	4,45	0,42	0,65	0,3	32,76	51,37	4,88	7,52	3,48
1044 (20)	8,44	2,55	5	0,25	0,45	0,18	30,24	59,24	3,02	5,39	2,11
1045 (20)	6,14	0,98	4,78	0,27	0,09	0,03	15,89	77,81	4,39	1,49	0,43
855 (22)	8,54	1,69	6,21	0,23	0,27	0,14	19,79	72,7	2,68	3,14	1,68
857 (22)	8,96	1,62	6,96	0,31	0,04	0,04	18,03	77,67	3,43	0,41	0,46
862 (22)	9,1	2,52	5,19	0,39	0,73	0,27	27,67	57,04	4,24	8,05	3
864 (22)	11,78	3,4	7,15	0,62	0,47	0,13	28,85	60,72	5,29	4,01	1,13
865 (22)	9,24	1,98	6,18	0,3	0,54	0,24	21,45	66,84	3,21	5,88	2,62
867 (22)	6,1	1,56	3,79	0,32	0,36	0,07	25,51	62,17	5,22	5,9	1,18
870 (22)	2,62	0,39	2,11	0,11	0,01	0	14,94	80,55	4,15	0,28	0,08
874 (22)	12,34	3,61	8,07	0,5	0,14	0,03	29,22	65,37	4,04	1,14	0,24
891 (22)	5,34	1,38	3,55	0,1	0,22	0,1	25,78	66,5	1,91	4,03	1,78
895 (22)	12,78	4,04	7,77	0,55	0,29	0,12	31,64	60,76	4,34	2,29	0,97
900 (22)	16,14	4,47	10,22	0,78	0,53	0,14	27,71	63,31	4,85	3,29	0,85
901 (22)	6,8	1,3	5,25	0,21	0,03	0,01	19,07	77,26	3,08	0,41	0,17
902 (22)	5,98	1,04	4,79	0,13	0,01	0,01	17,35	80,13	2,11	0,23	0,19
903 (22)	11,34	2,09	8,6	0,56	0,06	0,03	18,42	75,81	4,97	0,52	0,28
905 (22)	10,66	3,12	5,68	0,61	0,83	0,42	29,23	53,31	5,69	7,8	3,98
908 (22)	6	1,09	4,64	0,22	0,04	0,02	18,09	77,28	3,65	0,66	0,31
909 (22)	9,74	2,55	6,34	0,46	0,3	0,08	26,2	65,06	4,77	3,11	0,86
911 (22)	13,2	3,75	7,41	0,68	1	0,36	28,42	56,12	5,12	7,59	2,75
912 (22)	12,84	2,43	9,6	0,6	0,17	0,06	18,89	74,73	4,65	1,29	0,45
913 (22)	19,86	4,79	13,47	0,92	0,56	0,13	24,1	67,82	4,61	2,84	0,63
918 (22)	6,16	0,66	5,29	0,18	0,02	0,01	10,74	85,86	2,89	0,4	0,11
MEDIA	9,54	2,43	6,20	0,41	0,36	0,14	24,56	66,23	4,11	3,68	1,42
DESV EST	3,66	1,18	2,36	0,21	0,29	0,12	6,18	9,63	0,99	2,83	1,24
857 (27)	9,28	1,67	7,07	0,51	0,02	0,01	18	76,14	5,54	0,24	0,07
862 (27)	6,02	1,8	3,91	0,26	0,02	0,02	29,94	65,03	4,37	0,3	0,35
864 (27)	4,84	0,73	3,91	0,17	0,02	0	15,13	80,78	3,56	0,44	0,09
865 (27)	6,02	1,56	4,06	0,23	0,11	0,06	25,85	67,47	3,82	1,87	0,99
867 (27)	7,22	1,35	5,48	0,24	0,12	0,03	18,64	75,88	3,28	1,73	0,47
870 (27)	6,48	1,84	4,31	0,3	0,03	0,01	28,32	66,5	4,58	0,45	0,15
874 (27)	15,26	5,55	7,36	0,66	1,24	0,46	36,34	48,2	4,33	8,11	3,02
891 (27)	7,46	1,89	5,07	0,4	0,09	0,01	25,28	67,99	5,39	1,21	0,12
895 (27)	17	5,75	8,48	1,06	1,29	0,41	33,82	49,91	6,23	7,59	2,44
900 (27)	12,1	3,47	6,73	0,59	0,96	0,35	28,71	55,59	4,87	7,93	2,89
901 (27)	10,56	2,26	7,37	0,56	0,31	0,06	21,43	69,76	5,29	2,91	0,61
902 (27)	10,76	2,3	8,04	0,31	0,09	0,02	21,42	74,75	2,84	0,79	0,2
903 (27)	9,64	2,25	6,76	0,18	0,3	0,16	23,3	70,08	1,86	3,15	1,62
905 (27)	7	1,3	5,22	0,3	0,14	0,05	18,56	74,61	4,23	1,93	0,67
908 (27)	4,8	1,01	3,52	0,21	0,05	0,02	21,06	73,28	4,33	0,95	0,37
909 (27)	11,34	2,56	7,74	0,64	0,3	0,1	22,57	68,22	5,64	2,64	0,92
911 (27)	10,8	2,58	7,61	0,35	0,22	0,05	23,9	70,44	3,2	2	0,46
912 (27)	11,74	1,95	9,19	0,44	0,13	0,03	16,63	78,29	3,71	1,14	0,22
913 (27)	13,28	2,79	9,94	0,4	0,12	0,04	21,01	74,82	2,99	0,88	0,3
918 (27)	4,52	1,05	3,24	0,22	0	0,02	23,17	71,62	4,8	0	0,41
857 (30)	10,26	1,93	7,85	0,4	0,06	0,02	18,83	76,47	3,89	0,61	0,21
862 (30)	7,54	2,03	4,47	0,32	0,48	0,24	26,86	59,32	4,29	6,31	3,23
864 (30)	9,44	2,26	6,48	0,4	0,24	0,05	23,99	68,6	4,28	2,56	0,58
865 (30)	10,62	2,05	8,08	0,37	0,09	0,03	19,3	76,05	3,49	0,83	0,31
867 (30)	10,2	2,4	6,92	0,47	0,32	0,09	23,56	67,86	4,61	3,11	0,85
874 (30)	15,98	7,29	7,05	0,78	0,73	0,13	45,63	44,11	4,9	4,56	0,8
891 (30)	5,64	1,21	4,22	0,19	0,01	0	21,54	74,86	3,35	0,26	0
895 (30)	11,5	3,35	7,19	0,51	0,35	0,09	29,16	62,54	4,46	3,02	0,82
900 (30)	14,5	4,63	7,91	0,6	1,04	0,32	31,95	54,55	4,11	7,18	2,21
901 (30)	7,54	1,64	5,36	0,32	0,16	0,06	21,71	71,08	4,25	2,16	0,8
902 (30)	9,02	1,86	6,64	0,4	0,08	0,04	20,64	73,56	4,48	0,88	0,45
903 (30)	15,1	3,99	9,3	0,45	0,96	0,4	26,42	61,56	2,99	6,37	2,65
905 (30)	4,9	0,98	3,49	0,18	0,19	0,06	20,02	71,17	3,73	3,91	1,17
908 (30)	5,64	1,27	4	0,3	0,05	0,02	22,54	70,96	5,26	0,91	0,33
909 (30)	6,78	1,81	3,68	0,34	0,68	0,28	26,65	54,28	4,95	10,03	4,09
911 (30)	8,92	1,35	7,12	0,35	0,07	0,03	15,12	79,79	3,94	0,84	0,31
912 (30)	11,42	2,58	8,01	0,51	0,25	0,08	22,56	70,14	4,45	2,17	0,68
913 (30)	12,8	2,58	9,44	0,46	0,28	0,04	20,17	73,73	3,6	2,2	0,31
918 (30)	11,78	3,29	7,08	0,62	0,62	0,17	27,95	60,08	5,26	5,3	1,42
MEDIA	9,63	2,41	6,39	0,41	0,31	0,10	24,04	67,95	4,23	2,81	0,96
DESV EST	3,37	1,40	1,91	0,18	0,36	0,13	6,01	8,95	0,89	2,64	1,03
857 (35)	8,86	1,08	7,26	0,48	0,03	0	12,18	81,96	5,47	0,37	0,02
862 (35)	5,84	1,37	3,95	0,18	0,23	0,11	23,45	67,67	3,16	3,86	1,85
864 (35)	8,5	1,91	6,15	0,25	0,17	0,02	22,43	72,38	2,99	1,97	0,23
865 (35)	9,84	2,52	6,74	0,48	0,06	0,04	25,6	68,54	4,85	0,64	0,37
867 (35)	7,62	1,8	4,94	0,37	0,36	0,16	23,57	64,82	4,81	4,76	2,04
874 (35)	7,96	2,31	4,39	0,66	0,45	0,15	29,04	55,11	8,29	5,7	1,85
891 (35)	5,34	1,36	3,33	0,28	0,27	0,1	25,44	62,41	5,32	5,03	1,8
765 (40)	5,06	0,91	3,66	0,25	0,16	0,08	17,96	72,3	4,96	3,25	1,53
767 (40)	10,16	2,4	7,25	0,34	0,14	0,03	23,59	71,36	3,35	1,38	0,33
770 (40)	8,28	2,37	5,12	0,38	0,32	0,09	28,68	61,79	4,63	3,82	1,09
783 (40)	9,76	2,35	7,17	0,21	0,02	0,01	24,08	73,49	2,17	0,19	0,07
786 (40)	12,56	3,71	7,33	0,54	0,75	0,22	29,56	58,35	4,33	5,97	1,79
789 (40)	6,6	1,95	4,01	0,3	0,22	0,12	29,48	60,8	4,54	3,34	1,84
791 (40)	7,64	1,68	5,14	0,28	0,39	0,14	21,94	67,28	3,73	5,16	1,89
793 (40)	3,76	0,49	2,97	0,21	0,07	0,03	12,93	78,95	5,64	1,75	0,73
801 (40)	14,34	4,66	8,14	0,75	0,64	0,15	32,5	56,76	5,24	4,46	1,04
803 (40)	12,62	4,5	6,29	0,6	0,88	0,35	35,67	49,81	4,77	6,98	2,76
805 (40)	8,04	2,26	5,2	0,39	0,16	0,03	28,08	64,7	4,9	1,96	0,35
809 (40)	10,1	2,51	6,95	0,47	0,12	0,05	24,84	68,83	4,65	1,19	0,49
810 (40)	7,66	2,04	5,3	0,24	0,06	0,01	26,69	69,2	3,18	0,83	0,1
811 (40)	5,92	1,29	4,35	0,21	0,06	0,01	21,83	73,51	3,52	0,97	0,16
MEDIA	8,40	2,17	5,51	0,37	0,26	0,09	24,74	66,67	4,50	3,03	1,06
DESV EST	2,65	1,06	1,52	0,16	0,24	0,09	5,68	7,90	1,28	2,08	0,84
MEDIA TOTAL	9,16	2,32	6,02	0,39	0,32	0,12	24,29	67,06	4,22	3,22	1,22
DESV EST TOTAL	3,40	1,27	2,00	0,19	0,31	0,13	6,02	8,78	0,98	2,53	1,13

Entre paréntesis se indica la edad de los ratones. El color de la casilla de la identificación del animal hace referencia al genotipo: p53<sup>ER/ER</sup> (rojo), p53<sup>ER/+</sup> (naranja) y p53<sup>+/+</sup> (amarillo).

## Anexo 6. Valores de las poblaciones hematológicas de ratones sanos obtenidas con HEMAVET® en dos recuentos separados por un intervalo de 15 días.

	WBC#		NE#		LY#		MO#		EO#		BA#	
	ANTES	DESPUÉS										
855 (15)	10,78	17,64	2,84	5,37	6,83	9,97	0,36	0,91	0,57	0,98	0,19	0,4
857 (15)	7,36	9,8	0,99	2,19	6,15	6,66	0,12	0,49	0,08	0,29	0,03	0,17
862 (15)	4,16	4,64	0,85	0,98	3,12	3,41	0,12	0,21	0,05	0,03	0,02	0,02
864 (15)	5,72	11,86	1,28	3,03	4	7,78	0,2	0,77	0,17	0,21	0,07	0,07
865 (15)	8,02	8,08	1,87	1,76	5,23	5,78	0,27	0,36	0,46	0,14	0,18	0,03
867 (15)	7,5	9	1,83	2,25	5,26	5,51	0,26	0,34	0,33	0,62	0,12	0,28
870 (15)	4,1	10,2	0,74	3,01	3,11	5,1	0,18	0,49	0,04	1,08	0,03	0,52
872 (15)	7,94	17,04	1,88	4,75	5,49	10,87	0,32	0,69	0,2	0,58	0,05	0,14
874 (15)	15,9	13,08	5,54	5,4	8,5	6,39	0,64	0,45	0,9	0,54	0,33	0,29
889 (15)	5,78	4,96	1,78	1,1	3,49	3,64	0,25	0,21	0,17	0,01	0,09	0
891 (15)	6,74	10,68	1,59	2,74	4,19	6,8	0,26	0,57	0,46	0,45	0,24	0,12
895 (15)	13,78	6,14	4,53	1,42	6,77	4,16	0,64	0,22	1,28	0,23	0,56	0,1
900 (15)	7,24	9,4	1,55	2,46	5,26	5,62	0,21	0,42	0,13	0,63	0,1	0,27
901 (15)	11,08	9,4	2,67	1,72	7,45	7,1	0,63	0,4	0,28	0,14	0,05	0,05
902 (15)	9,84	11,64	2,14	1,8	6,9	9,22	0,21	0,52	0,38	0,08	0,22	0,02
903 (15)	11,7	13,88	2,88	3,95	7,49	7,91	0,44	0,51	0,63	1,03	0,27	0,48
905 (15)	7,6	8	1,44	1,99	5,75	4,85	0,32	0,3	0,08	0,62	0,02	0,24
908 (15)	12,04	12,74	4,28	2,45	6,61	9,4	0,49	0,6	0,49	0,24	0,17	0,05
909 (15)	6,32	6,38	1,28	1,07	4,65	5,13	0,26	0,14	0,1	0,03	0,03	0,01
911 (15)	8,26	9,62	1,87	1,82	5,95	7,22	0,32	0,35	0,1	0,17	0,03	0,06
912 (15)	15,66	9	4,48	1,75	9,54	6,57	0,72	0,27	0,7	0,28	0,23	0,13
913 (15)	10,8	15,06	3,09	3,59	7,32	9,61	0,38	0,53	0,01	0,91	0	0,42
918 (15)	7,14	5,4	0,94	0,74	5,9	4,4	0,28	0,18	0,01	0,05	0,01	0,03

	BA#		NE%		LY%		MO%		EO%		BA%	
	ANTES	DESPUÉS										
855 (15)	0,19	0,4	26,31	30,47	63,34	56,53	3,31	5,17	5,31	5,53	1,74	2,28
857 (15)	0,03	0,17	13,42	22,34	83,5	67,92	1,57	5,04	1,12	3	0,38	1,71
862 (15)	0,02	0,02	20,32	21,13	75,03	73,41	2,93	4,52	1,22	0,6	0,5	0,33
864 (15)	0,07	0,07	22,33	25,53	69,94	65,63	3,57	6,51	2,93	1,74	1,23	0,59
865 (15)	0,18	0,03	23,32	21,82	65,26	71,58	3,37	4,49	5,79	1,7	2,26	0,41
867 (15)	0,12	0,28	23,49	24,95	67,41	61,26	3,36	3,79	4,2	6,91	1,54	3,1
870 (15)	0,03	0,52	18,13	29,54	75,94	49,99	4,3	4,82	1,01	10,56	0,62	5,08
872 (15)	0,05	0,14	23,7	27,9	69,09	63,82	4,02	4,04	2,56	3,41	0,64	0,83
874 (15)	0,33	0,29	34,82	41,29	53,47	48,89	4	3,43	5,67	4,16	2,05	2,23
889 (15)	0,09	0	30,79	22,15	60,38	73,29	4,34	4,28	2,91	0,18	1,58	0,1
891 (15)	0,24	0,12	23,55	25,7	62,13	63,68	3,84	5,3	6,87	4,18	3,62	1,14
895 (15)	0,56	0,1	32,9	23,17	49,12	67,78	4,64	3,6	9,27	3,79	4,06	1,67
900 (15)	0,1	0,27	21,37	26,17	72,62	59,83	2,88	4,44	1,79	6,65	1,34	2,92
901 (15)	0,05	0,05	24,14	18,33	67,21	75,53	5,67	4,22	2,53	1,44	0,45	0,49
902 (15)	0,22	0,02	21,73	15,46	70,09	79,17	2,13	4,48	3,85	0,68	2,2	0,21
903 (15)	0,27	0,48	24,59	28,48	64	57,02	3,72	3,64	5,42	7,4	2,28	3,46
905 (15)	0,02	0,24	18,9	24,85	75,6	60,67	4,25	3,81	1,01	7,72	0,23	2,95
908 (15)	0,17	0,05	35,51	19,24	54,9	73,79	4,11	4,71	4,03	1,85	1,45	0,41
909 (15)	0,03	0,01	20,22	16,72	73,61	80,43	4,17	2,17	1,6	0,45	0,41	0,22
911 (15)	0,03	0,06	22,67	18,89	71,99	75,01	3,82	3,64	1,16	1,81	0,36	0,65
912 (15)	0,23	0,13	28,58	19,46	60,91	72,98	4,59	3,01	4,47	3,09	1,45	1,46
913 (15)	0	0,42	28,58	23,84	67,77	63,8	3,55	3,52	0,08	6,04	0,02	2,8
918 (15)	0,01	0,03	13,13	13,74	82,65	81,4	3,95	3,42	0,11	0,94	0,17	0,49

Entre paréntesis se indica la edad de los ratones. El color de la casilla de la identificación del animal hace referencia al genotipo: p53<sup>ER/ER</sup> (rojo), p53<sup>ER/+</sup> (naranja) y p53<sup>+/+</sup> (amarillo).

**Anexo 7. Valores de las poblaciones hematológicas de ratones enfermos p53<sup>ER/ER</sup>;p210BCR-ABL tratados con tamoxifén o aceite obtenidas con HEMAVET® antes y después del tratamiento (15 días de separación).**

	WBC#		NE#		LY#		MO#		EO#		BA#	
	ANTES	DESPUÉS										
BA679	9,22	6,92	4,69	2,48	3,49	3,33	0,67	0,86	0,24	0,17	0,13	0,08
BA683	12,54	2,4	3,43	0,71	7,18	1,43	0,58	0,12	1,01	0,1	0,35	0,04
BA643	5,1	4,82	2,67	2,15	2,09	1,92	0,28	0,6	0,04	0,11	0,02	0,03
BA697	7,96	5,12	2,56	2,21	4,66	2,65	0,46	0,21	0,22	0,03	0,06	0,01
BA657	6,7	2,28	3,09	0,74	2,84	1,43	0,49	0,09	0,2	0,02	0,08	0,01
BA720	9,92	8,92	4,55	3,99	4,31	4,02	0,48	1,33	0,38	0,13	0,2	0,04
BA751	16,5	5,04	5,78	2,31	6,19	1,36	3,24	0,9	0,92	0,33	0,37	0,14
BA822	20,8	1,96	11,33	0,44	3,37	0,99	5,32	0,5	0,76	0,02	0,03	0,01
BA847	7,96	5,94	3,61	3,68	2,35	1,36	1,1	0,61	0,6	0,24	0,29	0,05
BA818	9,88	5,9	6,79	2,99	1,77	1,59	0,39	1,13	0,76	0,17	0,17	0,02
BA856	25,86	3,24	9,88	1,66	10,78	1,12	1,63	0,33	2,62	0,11	0,95	0,02
BA881	16,78	6,16	5,78	2,33	8,16	3,26	2,37	0,5	0,41	0,06	0,06	0,01
BA863	10,44	3,22	4,14	1,2	4,12	1,49	0,61	0,26	1,13	0,18	0,44	0,08
BA831	19,14	5,14	5,61	1,38	10,51	3,02	1,31	0,38	1,3	0,29	0,42	0,06
BA871	12,08	1,96	5,48	1,57	4,19	0,25	0,87	0,05	1,09	0,07	0,45	0,02
BA1006	9,96	4,02	5,09	1,59	3,65	1,95	0,55	0,27	0,48	0,15	0,19	0,05
BA1048	8,78	5,74	5,33	2,81	2,03	2,01	0,85	0,7	0,37	0,18	0,21	0,05
BA1054	13,04	2,32	4,25	0,76	6,48	1,34	0,64	0,1	1,17	0,08	0,49	0,03
BA1057	4,94	5,24	2,98	2,94	1,47	1,49	0,29	0,09	0,16	0,49	0,04	0,22
BA1128	11,34	8,62	5,09	3,21	5,1	4,86	0,94	0,44	0,19	0,08	0,02	0,02
BA1127	46,92	64,64	22,86	38,85	5,68	2,09	14,75	12,91	3,33	9,72	0,3	1,08
BA1113	4,1	3,76	2,71	2,08	1,21	1,19	0,17	0,2	0,01	0,22	0	0,07
BA1166	16,86	17,98	10,8	9,24	2,17	3,77	3,27	3,77	0,56	1,1	0,05	0,1
BA1136	8,96	5,12	5,09	2,74	3,12	1,91	0,45	0,26	0,22	0,16	0,09	0,06
BA1402	9,3	5,14	3,01	1,67	4,79	2,88	0,55	0,23	0,67	0,28	0,27	0,08
BA1404	15,1	4,68	4,06	1,53	9,32	2,78	0,79	0,22	0,71	0,11	0,21	0,04
BA1419	11,1	2,24	3,43	0,78	5,67	1,14	0,54	0,15	1,07	0,11	0,38	0,06
BA678	6,6	9,4	3,53	3,48	2,19	4,5	0,31	1,35	0,41	0,07	0,16	0,01
BA653	8,3	6,4	3,36	3,17	3,59	2,34	0,9	0,51	0,28	0,28	0,17	0,1
BA719	15,72	2,76	2,9	0,72	10,74	1,82	0,72	0,14	0,97	0,05	0,4	0,03
BA841	8,32	4,9	4,15	2,69	3,33	1,36	0,8	0,56	0,04	0,2	0	0,09
BA845	10,16	12,22	5,89	6,3	1,76	4,16	2,47	1,21	0,03	0,5	0,01	0,05
BA860	18,08	4,32	5,97	2,37	9,68	1,42	1,55	0,31	0,62	0,15	0,26	0,08
BA869	11,04	3,92	3,85	1,5	5,26	1,84	0,54	0,26	1,01	0,23	0,38	0,08
BA890	17,14	4,48	5,49	1,81	8,7	2,23	0,87	0,3	1,5	0,1	0,58	0,04
BA1017	5,06	4,68	3,16	1,96	1,09	1,43	0,66	1,04	0,1	0,19	0,05	0,05
BA1067	12,58	2,5	3,99	0,92	6,81	1,24	0,77	0,11	0,73	0,16	0,27	0,07
BA1117	9,36	9,44	3,18	4,02	5	3,57	1,08	1,63	0,09	0,19	0,01	0,04
BA1153	4,66	4,3	1,75	1,63	2,37	2,01	0,32	0,36	0,21	0,22	0,01	0,08
BA1133	10,22	7,06	4,43	4,13	4,7	2,16	1,05	0,66	0,02	0,09	0,01	0,03
BA1186	8,6	8,7	3,49	3,34	4,19	4,59	0,78	0,43	0,1	0,27	0,04	0,08
BA1146	9,9	15,3	3,42	5,87	3,68	3,98	2,05	5	0,61	0,39	0,14	0,06
BA1352	11,66	7,5	3,79	3,65	6,07	2,98	0,45	0,34	0,96	0,38	0,38	0,16
BA1385	14,84	14,86	7,19	8,88	4,02	2,08	3,29	3,38	0,28	0,47	0,06	0,05
BA1391	13,3	2,74	4,36	1,56	6,85	0,97	0,58	0,17	1,1	0,03	0,4	0,02

En morado se indican los animales tratados con tamoxifén y en verde los animales tratados con aceite.

	NE%		LY%		MO%		EO%		BA%	
	ANTES	DESPUÉS								
BA679	50,91	35,84	37,84	48,13	7,28	12,41	2,55	2,49	1,43	1,13
BA683	27,33	29,71	57,28	59,62	4,6	4,8	8,03	4,07	2,76	1,81
BA643	52,44	44,68	40,96	39,89	5,4	12,53	0,88	2,33	0,33	0,57
BA697	32,17	43,16	58,53	51,83	5,82	4,19	2,73	0,66	0,75	0,16
BA657	46,11	32,29	42,39	62,59	7,35	4,09	2,95	0,77	1,2	0,26
BA720	45,91	38,01	43,47	45,07	4,81	14,93	3,82	1,47	2	0,5
BA751	35,03	45,92	37,53	26,92	19,65	17,92	5,55	6,51	2,24	2,73
BA822	54,46	22,34	16,2	50,59	25,57	25,58	3,63	1,06	0,14	0,43
BA847	45,39	61,92	29,47	22,83	13,84	10,32	7,6	4,12	3,7	0,81
BA818	68,71	50,61	17,9	27	3,96	19,18	7,69	2,89	1,76	0,32
BA856	38,22	51,33	41,7	34,47	6,29	10,19	10,12	3,3	3,67	0,72
BA881	34,46	37,76	48,6	52,95	14,12	8,18	2,47	0,96	0,35	0,14
BA863	39,61	37,39	39,45	46,18	5,86	8,19	10,87	5,72	4,21	2,52
BA831	29,3	26,92	54,9	58,8	6,83	7,45	6,8	5,62	2,17	1,21
BA871	45,37	80,17	34,67	12,66	7,18	2,73	9,05	3,43	3,73	1,01
BA1006	51,15	39,62	36,62	48,53	5,52	6,71	4,82	3,81	1,89	1,32
BA1048	60,68	48,88	23,09	34,97	9,63	12,17	4,23	3,16	2,36	0,81
BA1054	32,56	32,69	49,73	57,88	4,92	4,42	9,01	3,54	3,79	1,47
BA1057	60,37	56,18	29,74	28,34	5,82	1,79	3,25	9,39	0,81	4,29
BA1128	44,9	37,21	44,94	56,41	8,29	5,12	1,69	0,98	0,19	0,28
BA1127	48,72	60,1	12,11	3,23	31,43	19,97	7,09	15,04	0,65	1,67
BA1113	66,09	55,19	29,42	31,76	4,22	5,39	0,18	5,81	0,08	1,86
BA1166	64,07	51,38	12,89	20,98	19,37	20,95	3,35	6,11	0,32	0,58
BA1136	56,81	53,43	34,79	37,21	4,97	5,03	2,44	3,1	0,97	1,23
BA1402	32,41	32,57	51,54	56,05	5,88	4,39	7,23	5,51	2,95	1,49
BA1404	26,92	32,78	61,71	59,36	5,25	4,72	4,71	2,26	1,4	0,89
BA1419	30,93	34,79	51,07	51,06	4,9	6,49	9,67	5,12	3,44	2,54
BA678	53,45	37	33,2	47,88	4,76	14,31	6,21	0,72	2,38	0,09
BA653	40,53	49,53	43,2	36,52	10,79	7,9	3,42	4,44	2,06	1,61
BA719	18,42	25,98	68,32	65,88	4,55	5,19	6,18	1,75	2,53	1,2
BA841	49,9	54,8	40,02	27,74	9,64	11,5	0,43	4,18	0,02	1,77
BA845	57,97	51,54	17,32	34,06	24,33	9,9	0,33	4,11	0,05	0,39
BA860	33,04	54,78	53,56	32,88	8,57	7,23	3,41	3,36	1,42	1,74
BA869	34,84	38,2	47,68	46,96	4,91	6,75	9,14	5,99	3,44	2,09
BA890	32,03	40,38	50,75	49,84	5,05	6,7	8,77	2,2	3,41	0,87
BA1017	62,43	41,85	21,57	30,64	13,04	22,32	1,89	4,11	1,08	1,07
BA1067	31,74	36,68	54,16	49,49	6,14	4,47	5,83	6,44	2,12	2,91
BA1117	34,02	42,57	53,43	37,83	11,5	17,23	0,96	1,96	0,08	0,41
BA1153	37,56	37,99	50,77	46,69	6,81	8,38	4,6	5,09	0,25	1,85
BA1133	43,36	58,44	46,03	30,54	10,31	9,35	0,22	1,25	0,08	0,43
BA1186	40,56	38,37	48,68	52,74	9,07	4,93	1,22	3,08	0,47	0,88
BA1146	34,55	38,37	37,16	26,02	20,69	32,66	6,14	2,57	1,46	0,38
BA1352	32,53	48,7	52,08	39,72	3,82	4,5	8,26	5,01	3,3	2,07
BA1385	48,42	59,78	27,12	13,98	22,14	22,76	1,89	3,15	0,43	0,32
BA1391	32,79	56,92	51,54	35,29	4,38	6,04	8,29	0,99	3	0,76

En morado se indican los animales tratados con tamoxifén y en verde los animales tratados con aceite.

## Anexo 8. Ratones utilizados para la determinación del mecanismo de actuación de p53 en la ralentización del progreso de la LMC.

ID	TRATAMIENTO	EDAD (SEMANAS)	TIEMPO ENTRE TRATAMIENTO Y SACRIFICIO (DÍAS)	DIAGNÓSTICO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA	
1	BA643	TAMOXIFEN	23	1	TUMOR LINFOIDE Y EN MENOR MEDIDA MIELOIDE
2	BA697	TAMOXIFEN	18	1	TUMOR MIELOIDE
3	BA657	TAMOXIFEN	23	1	TUMOR MIELOIDE
4	BA720	TAMOXIFEN	18	1	TUMOR MIELOIDE
5	BA751	TAMOXIFEN	16	1	INFILTRADOS LINFOIDES
6	BA822	TAMOXIFEN	16	1	TUMOR LINFOIDE MUY AGRESIVO
7	BA847	TAMOXIFEN	19	1	TUMOR HEMATOLOGICO AGRESIVO DE CELULAS BLASTICAS
8	BA818	TAMOXIFEN	19	1	TUMOR DE APARIENCIA LINFOIDE
9	BA856	TAMOXIFEN	15	1	TUMOR DE APARIENCIA LINFOIDE
10	BA881	TAMOXIFEN	15	1	TUMOR HEMATOLÓGICO MUY INDIFERENCIADO
11	BA653	ACEITE	23	1	TUMOR MIELOIDE CON INFILTRADOS LINFOIDES
12	BA719	ACEITE	19	1	PEQUEÑO AGREGADO MIELOIDE
13	BA841	ACEITE	16	1	TUMOR QUE PARECE LINFOIDE
14	BA845	ACEITE	19	1	TUMOR MIELOIDE MUY DISEMINADO
15	BA860	ACEITE	15	1	TUMOR INDIFERENCIADO
16	BA679	TAMOXIFEN	16	3	TUMOR MIELOIDE O COEXISTE CON ALGUN PROCESO LINFOIDE
17	BA683	TAMOXIFEN	17	3	PEQUEÑOS INFILTRADOS INDETERMINADOS
18	BA1006	TAMOXIFEN	16	3	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
19	BA1048	TAMOXIFEN	20	3	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
20	BA1054	TAMOXIFEN	19	3	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
21	BA678	ACEITE	17	3	TUMOR LINFOIDE Y EN MENOR MEDIDA MIELOIDE
22	BA1017	ACEITE	20	3	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
23	BA1067	ACEITE	20	3	BAZO HIPERPLÁSICO
24	BA863	TAMOXIFEN	17	5	TUMOR MIELOIDE
25	BA831	TAMOXIFEN	21	5	TUMOR MIELOIDE
26	BA871	TAMOXIFEN	20	5	TUMOR MIELOIDE POCO CLARO
27	BA869	ACEITE	17	5	BAZO REACTIVO
28	BA890	ACEITE	18	5	NORMAL

## Anexo 9. Resultados obtenidos por citometría de flujo tras el marcaje de suspensiones celulares de sangre, timo, bazo y médula ósea con anexina V, IP, anti-Sca1 y anticuerpos anti-linaje.

En rojo se indican los datos correspondientes a ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  enfermos tratados con tamoxifén.

En amarillo se indican los datos correspondientes a ratones  $p53^{ER/ER};p210BCR-ABL$  enfermos tratados con aceite.

En azul se indican los datos correspondientes a ratones  $p53^{ER/ER}$  tratados con tamoxifén.

INDIVIDUO	SANGRE PERIFÉRICA									
	Sca1+LIN+					Sca1+LIN-				
	Sca1+LIN+	Sca1+LIN-	AN+IP+	AN+IP-	AN+	AN-IP+	AN+IP+	AN+IP-	AN+	AN-IP+
856	20,3	5,64	1,49	1,34	2,83	20,1	0,94	1,07	2,01	12,1
881	50,8	1,52	4,87	10,9	15,77	4,41	7,75	6,69	14,44	7,75
818	77,1	1,08	4,89	3,73	8,62	3,42	19,4	8,42	27,82	22,3
847	11,4	1,84	10,7	10,2	20,9	1,59	15,9	15,8	31,7	30,8
822	41,2	24,4	6,1	5,72	11,82	27,6	6,55	5,5	12,05	34,3
1006	46,1	4,66	0,14	1,38	1,52	1,03	2,74	11,9	14,64	11,1
1048	38,3	25,2	6,82	7,85	14,67	4,24	2,26	4,31	6,57	2,49
1054	27,8	1,37	8,45	5,99	14,44	6,46	11,9	11,9	23,8	28,6
871	47,4	17,9	2,31	10,5	12,81	7,3	0,49	3,85	4,34	4,74
831	23,1	1,38	0,33	0,66	0,99	12,2	3,45	1,38	4,83	37,2
860	50,5	1,56	1,77	1,74	3,51	3,59	2,79	4,38	7,17	14,7
845	80,7	3,19	3,71	2,88	6,59	7,35	0,17	1,34	1,51	15,7
841	65,9	22,5	3,1	4,92	8,02	3,23	3,4	2,49	5,89	5,64
1017	29,9	2,79	1,13	7,58	8,71	1,8	0,13	9,04	9,17	1,86
1067	2,65	11,7	4,2	1,91	6,11	27,9	1,99	1,73	3,72	18,7
890	13,1	1,94	0,17	0,17	0,34	11,7	0	0	0	12,2
1012	30,4	0,184	0,095	0,493	0,588	5,61	0	2,35	2,35	0
1052	40,6	1,79	0,507	1,52	2,027	3,04	0,719	2,16	2,879	15,1
1056	30,4	1,74	0,166	0,256	0,422	10,4	0,789	0	0,789	12,9
1078	24,1	1,97	1,43	1,43	2,86	5,93	10	5	15	52,5
1079	32,4	0,273	0,689	1,07	1,759	3,98	0	0	0	18,2

INDIVIDUO	TIMO									
	Sca1+LIN+					Sca1+LIN-				
	Sca1+LIN+	Sca1+LIN-	AN+IP+	AN+IP-	AN+	AN-IP+	AN+IP+	AN+IP-	AN+	AN-IP+
856	47,4	34	1,46	1,85	3,31	2,92	6,55	7,19	13,74	0,86
881	98,9	0,7	0,18	0,66	0,84	2,1	3,98	1,7	5,68	15,9
818	20,6	3,43	12,3	4,1	16,4	7,34	1,81	1,44	3,25	9,59
847	31,9	9,85	7,49	1,94	9,43	32,2	3,91	1,29	5,2	29,3
822	93,7	2,03	1,65	2,6	4,25	6,52	3,36	2,3	5,66	7,08
1006	28,3	52,9	2,33	18,3	20,63	1,74	5,21	14,8	20,01	1,53
1048	51,9	45	1,91	2,37	4,28	6,4	0,99	3,07	4,06	3,63
1054	77,6	2,23	1,03	3,27	4,3	2,08	2,92	7,08	10	3,54
871	68,7	13,9	1,9	0,7	2,6	19,7	0,41	0,58	0,99	7,74
831	45,7	24,6	0,66	0,53	1,19	3,33	0,22	0,96	1,18	1,77
860	57,4	28,4	0,34	0,45	0,79	1,8	0,091	0,52	0,611	1,11
845	32,6	7,76	2,23	0,89	3,12	12,6	0,2	0,4	0,6	8,68
841	90,7	0,68	0,57	0,65	1,22	3,23	0,86	1,29	2,15	9,91
1017	56,4	37,6	0,42	0,55	0,97	3,47	0,019	0,13	0,149	0,26
1067	51,8	0,9	0,38	0,76	1,14	3,47	0,75	0	0,75	18,8
890	15,6	3,75	1,23	2,1	3,33	18,2	1,81	0	1,81	3,01
1012	20,6	1,37	0,704	3,8	4,504	3,8	0,847	0,847	1,694	5,51
1052	4,68	1,25	0,357	1,79	2,147	7,68	0,334	1,34	1,674	6,02
1056	3,48	0,85	0,953	2	2,953	6,96	0,391	1,17	1,561	3,52
1078	8,24	1,12	0,408	1,94	2,348	4,18	0	2,26	2,26	3,01
1079	36,6	1,44	0,265	2,47	2,735	2,42	0,355	1,42	1,775	4,61

INDIVIDUO	BAZO						Sca1+LIN-				
	Sca1+LIN+	Sca1+LIN-	AN+IP+	AN+IP-	AN+	AN-IP+	AN+IP+	AN+IP-	AN+	AN-IP+	
856	61,7	3,03	0,21	1,45	1,66	2,45	0,24	0,73	0,97	22,3	
881	90,4	0,63	0,23	0,57	0,8	2,06	0	0	0	23,1	
818	83,8	1,81	0,95	0,93	1,88	16	0,66	1,32	1,98	35,9	
847	48,9	3,11	0,56	1,57	2,13	4,51	1,67	2,38	4,05	36,4	
822	60,4	4,56	1,82	2,75	4,57	16,9	2,28	3,2	5,48	39	
1006	46,1	10,8	0,75	2,31	3,06	3,77	2,54	1,94	4,48	31,4	
1048	15,3	8,6	2,03	6,77	8,8	14,9	0,65	2,21	2,86	12,6	
1054	31,9	12,8	1,43	5,03	6,46	6,36	1,56	4,68	6,24	24,4	
871	68,8	3,57	1,31	6,48	7,79	5,56	1,17	3,89	5,06	19,5	
831	16,8	0,6	1,94	4,58	6,52	5,47	1,09	2,17	3,26	54,3	
860	48,4	0,53	0,46	0,62	1,08	4,49	1,01	1,01	2,02	55,6	
845	23,5	4,26	1,69	1,9	3,59	7,79	1,23	1,66	2,89	37	
841	70,6	1,44	0,53	0,83	1,36	11	1,13	1,45	2,58	29,5	
1017	17,1	6,32	1,07	6	7,07	13,4	0,44	2,14	2,58	10,7	
1067	19,7	1,88	1,7	5,14	6,84	11,2	5,44	2,41	7,85	68,5	
890	19,2	0,87	0,88	2,09	2,97	5,28	1,1	0	1,1	43,1	
1012	22,2	0,898	0,515	2,97	3,485	10,6	1,39	0,554	1,944	70,4	
1052	21,5	2,07	0,742	0,758	1,5	30,9	1,67	0,167	1,837	82,8	
1056	20,9	1,75	0,438	2,84	3,278	11,5	1,7	0,992	2,692	63,7	
1078	21,9	0,404	0,349	2,34	2,689	15,4	1,83	0	1,83	53	
1079	20,6	0,969	0,447	2,71	3,157	13,1	0,256	1,03	1,286	61,8	

INDIVIDUO	MÉDULA ÓSEA						Sca1+LIN-				
	Sca1+LIN+	Sca1+LIN-	AN+IP+	AN+IP-	AN+	AN-IP+	AN+IP+	AN+IP-	AN+	AN-IP+	
856	6,8	0,99	1,57	1,39	2,96	12,5	0,4	0	0,4	28,7	
881	97,4	0,39	0,055	0,23	0,285	1	0	0	0	1,15	
818	9,35	2,1	4,74	0,84	5,58	26,9	1,85	0	1,85	66,6	
847	9,44	2,84	4,52	1,7	6,22	21,4	2,96	1,76	4,72	37,1	
822	8,99	2,42	4,16	4,73	8,89	18,7	2,96	3,24	6,2	27,2	
1006	2,47	2,94	1,06	0,79	1,85	1,98	15,8	2,78	18,58	28,6	
1048	3,11	20,4	3,36	3,1	6,46	3,5	3,16	4,82	7,98	6,83	
1054	1,7	3,76	1,5	6,8	8,3	2,14	3,1	4,07	7,17	36,4	
871	8,64	2,54	0,75	1,88	2,63	9,67	1,28	1,28	2,56	24,8	
831	5,57	0,92	0,67	1,01	1,68	9,08	0	0,79	0,79	55,3	
860	9,02	1,08	1,97	1,08	3,05	9,13	0,65	0	0,65	26,8	
845	11,2	2,63	0,54	0,9	1,44	7,34	1,54	0,19	1,73	55,5	
841	17,3	2,4	0,66	1,87	2,53	6,7	1,79	1,14	2,93	39,1	
1017	1,41	11,6	3,64	0,52	4,16	43,9	1,13	0,79	1,92	9,27	
1067	1,68	1,96	0,34	2,57	2,91	3,09	4,63	4,03	8,66	38,1	
890	4,95	0,65	1,8	1,52	3,32	12,9	0,53	0	0,53	41,6	
1012	4,88	0,47	1,3	4,91	6,21	15,3	1,92	0	1,92	52,9	
1052	7,2	1,53	1,1	5,6	6,7	11,6	1,48	0,741	2,221	61,1	
1056	3,17	1,05	2,61	7,15	9,76	15,4	2,07	0,415	2,485	59,3	
1078	3,77	0,345	2,23	4,24	6,47	12,9	0	0	0	67,1	
1079	2,65	0,327	1,61	7,38	8,99	18,5	0	0	0	71,1	

**Anexo 10. Ratones utilizados para la purificación de las poblaciones celulares Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup> y Sca1<sup>-</sup>Lin<sup>+</sup> para su análisis mediante PCR cuantitativa.**

ID	GENOTIPO	TRATAMIENTO	EDAD (SEMANAS)	DIAGNÓSTICO	
1	BA1057	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	TAMOXIFEN	22	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
2	BA1128	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	TAMOXIFEN	16	LINFOMA SIMILAR A BURKITT
3	BA1127	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	TAMOXIFEN	18	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
4	BA1113	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	TAMOXIFEN	21	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
5	BA1166	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	TAMOXIFEN	17	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
6	BA1136	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	TAMOXIFEN	21	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA Y TUMOR LINFOIDE
7	BA1117	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	ACEITE	18	TUMOR MIELOIDE
8	BA1153	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	ACEITE	17	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
9	BA1133	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	ACEITE	21	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
10	BA1186	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	ACEITE	16	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA
11	BA1147	p53 <sup>ER/ER</sup> ; p210BCR-ABL	CALIBRADOR	21	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA TEMPRANA

### Anexo 11. Resultados del ensayo de PCR cuantitativa.

En morado se indican los animales tratados con tamoxifén y en verde los tratados con aceite.

#### Sangre periférica.

Tejido	Individuo	Población	Detector	Task	Ct	Ct Std Err	Avg Ct	Avg dCt	dCt Std Err	ddCt	RQ
SP	1113	S+L	BAX	Target	22.303	0.056	22.404	-3.250	0.076	-0.393	1.313
SP	1117	S+L	BAX	Target	17.368	0.027	21.997	-3.084	0.057	-0.227	1.170
SP	1128	S+L	BAX	Target	25.525	0.068	25.623	-5.847	0.237	-2.990	7.946
SP	1133	S+L	BAX	Target	22.920	0.013	22.942	-1.925	0.067	0.932	0.524
SP	1136	S+L	BAX	Target	22.319	0.010	22.319	-2.646	0.135	0.211	0.864
SP	1147	S+L	BAX	Target	19.100	0.027	19.086	-2.857	0.054	0.000	1.000
SP	1166	S+L	BAX	Target	15.459	0.031	20.329	-2.594	0.042	0.263	0.833
SP	1186	S+L	BAX	Target	27.705	0.070	27.565	-0.914	0.124	1.943	0.26
SP	1113	S+L	Fas	Target	30.185	0.051	30.286	4.632	0.072	1.870	0.274
SP	1117	S+L	Fas	Target	23.091	0.086	27.816	2.736	0.081	-0.026	1.018
SP	1128	S+L	Fas	Target	29.148	0.019	29.128	-2.342	0.228	-5.103	34.378
SP	1133	S+L	Fas	Target	29.026	0.103	29.222	4.354	0.122	1.593	0.332
SP	1136	S+L	Fas	Target	28.546	0.114	28.616	3.651	0.176	0.889	0.54
SP	1147	S+L	Fas	Target	24.738	0.057	24.705	2.762	0.074	0.000	1.000
SP	1166	S+L	Fas	Target	23.139	0.053	28.569	5.646	0.084	2.884	0.135
SP	1186	S+L	Fas	Target	32.357	0.136	32.085	3.605	0.171	0.844	0.557
SP	1113	S+L	P21	Target	25.262	0.089	25.432	-0.222	0.103	0.102	0.932
SP	1117	S+L	P21	Target	18.494	0.046	23.215	-1.866	0.059	-1.542	2.913
SP	1128	S+L	P21	Target	30.721	0.086	30.829	-0.641	0.243	-0.317	1.246
SP	1133	S+L	P21	Target	26.670	0.038	26.594	1.726	0.076	2.049	0.242
SP	1136	S+L	P21	Target	24.331	0.024	24.286	-0.679	0.137	-0.356	1.280
SP	1147	S+L	P21	Target	21.616	0.034	21.620	-0.323	0.058	0.000	1.000
SP	1166	S+L	P21	Target	19.151	0.052	24.474	1.551	0.067	1.875	0.273
SP	1186	S+L	P21	Target	29.063	0.043	29.141	0.661	0.111	0.985	0.505
SP	1113	S+L	P53	Target	25.430	0.078	25.523	-0.131	0.093	-0.469	1.385
SP	1117	S+L	P53	Target	21.964	0.043	26.730	1.650	0.066	1.311	0.403
SP	1128	S+L	P53	Target	30.835	0.089	30.770	-0.700	0.243	-1.039	2.054
SP	1133	S+L	P53	Target	26.018	0.052	26.033	1.165	0.084	0.827	0.564
SP	1136	S+L	P53	Target	24.913	0.015	24.940	-0.025	0.135	-0.363	1.286
SP	1147	S+L	P53	Target	22.070	0.182	22.282	0.339	0.188	0.000	1.000
SP	1166	S+L	P53	Target	17.072	0.044	22.244	-0.679	0.054	-1.018	2.025
SP	1186	S+L	P53	Target	29.712	0.112	29.847	1.367	0.152	1.028	0.49
SP	1113	S+L	PUMA	Target	24.145	0.055	24.249	-1.405	0.075	0.656	0.635
SP	1117	S+L	PUMA	Target	18.047	0.054	22.755	-2.326	0.063	-0.266	1.202
SP	1128	S+L	PUMA	Target	25.319	0.021	25.288	-6.182	0.228	-4.122	17.408
SP	1133	S+L	PUMA	Target	24.043	0.042	23.964	-0.904	0.078	1.156	0.449
SP	1136	S+L	PUMA	Target	23.856	0.036	23.845	-1.120	0.139	0.940	0.521
SP	1147	S+L	PUMA	Target	19.869	0.015	19.883	-2.060	0.049	0.000	1.000
SP	1166	S+L	PUMA	Target	17.845	0.082	23.105	0.181	0.059	2.242	0.211
SP	1113	S+L	GUSB	ENDO	25.552	0.051	25.654				
SP	1117	S+L	GUSB	ENDO	20.164	0.015	25.080				
SP	1128	S+L	GUSB	ENDO	31.056	0.227	31.470				
SP	1133	S+L	GUSB	ENDO	24.829	0.066	24.868				
SP	1136	S+L	GUSB	ENDO	24.849	0.134	24.965				
SP	1147	S+L	GUSB	ENDO	22.021	0.047	21.943				
SP	1166	S+L	GUSB	ENDO	17.744	0.033	22.923				
SP	1186	S+L	GUSB	ENDO	28.622	0.103	28.480				

SP	1057	S+L+	BAX	Target	18.655	0.035	18.592	-1.700	0.064	1.157	0.448
SP	1113	S+L+	BAX	Target	29.062	0.064	29.167	-1.615	0.084	1.242	0.423
SP	1117	S+L+	BAX	Target	24.599	0.056	24.679	-3.342	0.074	-0.485	1.399
SP	1127	S+L+	BAX	Target	23.835	0.036	23.906	-1.398	0.075	1.459	0.364
SP	1128	S+L+	BAX	Target	24.798	0.027	24.846	-3.834	0.039	-0.977	1.968
SP	1133	S+L+	BAX	Target	27.312	0.010	27.330	-2.130	0.060	0.727	0.604
SP	1136	S+L+	BAX	Target	29.253	0.035	29.316	-1.891	0.074	0.966	0.512
SP	1147	S+L+	BAX	Target	29.441	0.045	29.429	-2.277	0.078	0.580	0.669
SP	1153	S+L+	BAX	Target	32.603	0.315	32.515	1.225	0.373	4.082	0.059
SP	1166	S+L+	BAX	Target	25.199	0.068	25.326	-3.062	0.084	-0.205	1.153
SP	1186	S+L+	BAX	Target	31.296	0.048	31.220	-1.180	0.084	1.677	0.313
SP	1057	S+L+	Fas	Target	23.194	0.034	23.130	2.839	0.064	0.077	0.948
SP	1117	S+L+	Fas	Target	29.504	0.088	29.591	1.570	0.100	-1.192	2.284
SP	1128	S+L+	Fas	Target	27.452	0.056	27.564	-1.116	0.063	-3.878	14.699
SP	1186	S+L+	Fas	Target	35.557	0.264	35.097	2.697	0.273	-0.065	1.046
SP	1057	S+L+	P21	Target	23.772	0.047	23.722	3.431	0.072	3.754	0.074
SP	1113	S+L+	P21	Target	35.009	0.002	35.007	4.225	0.054	4.548	0.043
SP	1117	S+L+	P21	Target	29.198	0.088	29.341	1.320	0.100	1.643	0.32
SP	1127	S+L+	P21	Target	26.582	0.006	26.571	1.267	0.066	1.590	0.332
SP	1128	S+L+	P21	Target	30.806	0.031	30.831	2.151	0.042	2.474	0.18
SP	1133	S+L+	P21	Target	33.408	0.083	33.473	4.013	0.102	4.336	0.05
SP	1136	S+L+	P21	Target	35.670	0.269	36.131	4.924	0.277	5.247	0.026
SP	1147	S+L+	P21	Target	35.545	0.416	35.835	4.129	0.421	4.452	0.046
SP	1166	S+L+	P21	Target	27.335	0.039	27.396	-0.992	0.063	-0.669	1.590
SP	1186	S+L+	P21	Target	34.352	0.408	35.159	2.759	0.414	3.082	0.118
SP	1057	S+L+	P53	Target	21.168	0.006	21.156	0.865	0.054	0.526	0.694
SP	1113	S+L+	P53	Target	30.643	0.006	30.639	-0.142	0.054	-0.481	1.396
SP	1117	S+L+	P53	Target	30.689	0.157	30.376	2.355	0.164	2.017	0.247
SP	1127	S+L+	P53	Target	25.426	0.019	25.434	0.130	0.069	-0.209	1.156
SP	1128	S+L+	P53	Target	29.293	0.069	29.388	0.708	0.075	0.369	0.774
SP	1133	S+L+	P53	Target	29.691	0.124	29.794	0.334	0.137	-0.005	1.003
SP	1136	S+L+	P53	Target	31.098	0.095	31.285	0.078	0.115	-0.261	1.198
SP	1147	S+L+	P53	Target	31.694	0.048	31.681	-0.026	0.080	-0.364	1.287
SP	1166	S+L+	P53	Target	28.634	0.017	28.658	0.270	0.052	-0.068	1.049
SP	1186	S+L+	P53	Target	35.123	0.167	35.060	2.660	0.181	2.321	0.2
SP	1057	S+L+	PUMA	Target	19.990	0.030	19.949	-0.342	0.062	1.718	0.304
SP	1113	S+L+	PUMA	Target	30.710	0.127	30.948	0.167	0.138	2.227	0.214
SP	1117	S+L+	PUMA	Target	25.058	0.039	25.124	-2.897	0.061	-0.837	1.786
SP	1127	S+L+	PUMA	Target	26.363	0.008	26.347	1.043	0.066	3.103	0.116
SP	1128	S+L+	PUMA	Target	24.998	0.015	24.974	-3.707	0.032	-1.646	3.130
SP	1133	S+L+	PUMA	Target	29.100	0.003	29.106	-0.354	0.059	1.706	0.306
SP	1136	S+L+	PUMA	Target	31.234	0.075	31.292	0.085	0.100	2.145	0.226
SP	1147	S+L+	PUMA	Target	28.792	0.040	28.725	-2.982	0.075	-0.922	1.894
SP	1166	S+L+	PUMA	Target	26.715	0.084	26.874	-1.514	0.097	0.547	0.685
SP	1186	S+L+	PUMA	Target	32.254	0.033	32.295	-0.106	0.076	1.954	0.258
SP	1057	S+L+	GUSB	ENDO	20.392	0.054	20.292				
SP	1113	S+L+	GUSB	ENDO	30.752	0.054	30.782				
SP	1117	S+L+	GUSB	ENDO	27.931	0.048	28.021				
SP	1127	S+L+	GUSB	ENDO	25.310	0.066	25.304				
SP	1128	S+L+	GUSB	ENDO	28.671	0.028	28.680				
SP	1133	S+L+	GUSB	ENDO	29.371	0.059	29.460				
SP	1136	S+L+	GUSB	ENDO	31.264	0.065	31.207				
SP	1147	S+L+	GUSB	ENDO	31.591	0.064	31.707				
SP	1153	S+L+	GUSB	ENDO	31.389	0.200	31.290				
SP	1166	S+L+	GUSB	ENDO	28.295	0.049	28.388				
SP	1186	S+L+	GUSB	ENDO	32.271	0.069	32.400				

SP	1057	S-L+	BAX	Target	17.659	0.008	17.651	-0.232	0.073	2.625	0.162
SP	1113	S-L+	BAX	Target	19.520	0.027	19.500	0.051	0.060	2.908	0.133
SP	1117	S-L+	BAX	Target	31.769	0.031	31.769	-2.125	0.199	0.732	0.602
SP	1128	S-L+	BAX	Target	31.936	0.032	31.995	-1.020	0.091	1.837	0.28
SP	1133	S-L+	BAX	Target	28.300	0.031	28.239	-0.140	0.094	2.717	0.152
SP	1136	S-L+	BAX	Target	28.157	0.008	28.172	-1.251	0.071	1.606	0.328
SP	1147	S-L+	BAX	Target	26.063	0.009	26.074	-0.711	0.076	2.146	0.226
SP	1166	S-L+	BAX	Target	28.604	0.064	28.706	-1.368	0.084	1.489	0.356
SP	1186	S-L+	BAX	Target	27.674	0.030	27.720	-0.966	0.109	1.891	0.27
SP	1057	S-L+	Fas	Target	18.560	0.173	18.788	0.905	0.188	-1.857	3.622
SP	1113	S-L+	Fas	Target	21.379	0.038	21.340	1.891	0.065	-0.871	1.829
SP	1136	S-L+	Fas	Target	32.716	0.073	32.643	3.221	0.101	0.459	0.728
SP	1186	S-L+	Fas	Target	29.219	0.051	29.292	0.606	0.116	-2.155	4.454
SP	1057	S-L+	P21	Target	21.296	0.016	21.266	3.384	0.074	3.707	0.077
SP	1113	S-L+	P21	Target	22.047	0.075	21.994	2.545	0.091	2.868	0.137
SP	1117	S-L+	P21	Target	30.762	0.019	30.789	-3.104	0.198	-2.781	6.874
SP	1128	S-L+	P21	Target	34.433	0.063	34.550	1.535	0.106	1.858	0.276
SP	1133	S-L+	P21	Target	30.988	0.032	31.033	2.654	0.095	2.977	0.127
SP	1136	S-L+	P21	Target	32.179	0.006	31.626	2.203	0.071	2.527	0.174
SP	1147	S-L+	P21	Target	28.466	0.097	28.538	1.752	0.123	2.076	0.237
SP	1166	S-L+	P21	Target	30.335	0.078	30.490	0.416	0.095	0.739	0.599
SP	1186	S-L+	P21	Target	30.644	0.206	31.018	2.332	0.231	2.656	0.159
SP	1057	S-L+	P53	Target	19.692	0.084	19.534	1.652	0.111	1.313	0.402
SP	1113	S-L+	P53	Target	21.491	0.067	21.524	2.075	0.085	1.737	0.300
SP	1117	S-L+	P53	Target	36.525	0.498	37.357	3.463	0.535	3.125	0.115
SP	1128	S-L+	P53	Target	33.446	0.125	33.696	0.681	0.152	0.343	0.789
SP	1133	S-L+	P53	Target	29.901	0.058	30.003	1.624	0.107	1.286	0.41
SP	1136	S-L+	P53	Target	32.000	0.061	31.878	2.455	0.093	2.117	0.231
SP	1147	S-L+	P53	Target	28.067	0.052	28.092	1.307	0.092	0.968	0.511
SP	1166	S-L+	P53	Target	31.718	0.105	31.780	1.706	0.119	1.367	0.388
SP	1186	S-L+	P53	Target	29.958	0.066	30.079	1.394	0.124	1.055	0.481
SP	1057	S-L+	PUMA	Target	19.735	0.010	19.737	1.854	0.073	3.915	0.066
SP	1113	S-L+	PUMA	Target	21.375	0.074	21.301	1.852	0.091	3.912	0.066
SP	1117	S-L+	PUMA	Target	31.551	0.050	31.471	-2.423	0.203	-0.363	1.286
SP	1128	S-L+	PUMA	Target	30.707	0.162	31.004	-2.011	0.183	0.049	0.966
SP	1133	S-L+	PUMA	Target	30.854	0.152	30.792	2.413	0.177	4.473	0.045
SP	1136	S-L+	PUMA	Target	29.711	0.080	29.576	0.153	0.107	2.213	0.216
SP	1147	S-L+	PUMA	Target	26.957	0.059	27.074	0.289	0.096	2.349	0.196
SP	1166	S-L+	PUMA	Target	30.581	0.202	30.770	0.696	0.209	2.756	0.148
SP	1186	S-L+	PUMA	Target	29.335	0.053	29.298	0.613	0.117	2.673	0.157
SP	1057	S-L+	GUSB	ENDO	17.781	0.072	17.883				
SP	1113	S-L+	GUSB	ENDO	19.489	0.053	19.449				
SP	1117	S-L+	GUSB	ENDO	33.505	0.197	33.894				
SP	1128	S-L+	GUSB	ENDO	32.847	0.085	33.015				
SP	1133	S-L+	GUSB	ENDO	28.230	0.089	28.379				
SP	1136	S-L+	GUSB	ENDO	29.459	0.071	29.423				
SP	1147	S-L+	GUSB	ENDO	26.802	0.076	26.786				
SP	1166	S-L+	GUSB	ENDO	30.072	0.054	30.074				
SP	1186	S-L+	GUSB	ENDO	28.582	0.105	28.686				

## Timo.

Tejido	Individuo	Población	Detector	Task	Ct	Ct Std Err	Avg Ct	Avg dCt	dCt Std Err	ddCt	RO
TIMO	1057	S+L	BAX	Target	24.754	0.077	24.664	-2.489	0.084	0.375	0.771
TIMO	1113	S+L	BAX	Target	28.489	0.077	28.402	-3.391	0.282	-0.527	1.441
TIMO	1117	S+L	BAX	Target	22.887	0.021	22.911	-2.277	0.040	0.587	0.666
TIMO	1127	S+L	BAX	Target	21.574	0.062	21.622	0.332	0.105	3.196	0.109
TIMO	1133	S+L	BAX	Target	22.984	0.018	26.745	-3.788	0.158	-0.924	1.898
TIMO	1136	S+L	BAX	Target	18.307	0.083	18.386	-2.384	0.087	0.480	0.717
TIMO	1147	S+L	BAX	Target	19.477	0.249	19.191	-2.864	0.250	0.000	1.000
TIMO	1153	S+L	BAX	Target	29.198	0.028	29.227	-1.314	0.082	1.550	0.342
TIMO	1166	S+L	BAX	Target	24.469	0.107	24.347	-2.082	0.127	0.782	0.582
TIMO	1057	S+L	Fas	Target	31.587	0.236	31.657	4.504	0.239	0.502	0.706
TIMO	1113	S+L	Fas	Target	36.487	0.210	36.719	4.927	0.343	0.926	0.526
TIMO	1117	S+L	Fas	Target	29.024	0.121	29.105	3.917	0.125	-0.084	1.060
TIMO	1127	S+L	Fas	Target	28.870	0.137	29.021	7.731	0.161	3.730	0.075
TIMO	1133	S+L	Fas	Target	29.084	0.190	32.635	2.921	0.197	-1.081	2.115
TIMO	1136	S+L	Fas	Target	25.258	0.128	25.368	4.598	0.131	0.597	0.661
TIMO	1147	S+L	Fas	Target	25.939	0.106	26.057	4.002	0.110	0.000	1.000
TIMO	1166	S+L	Fas	Target	32.570	0.146	32.593	6.164	0.161	2.162	0.223
TIMO	1057	S+L	P21	Target	28.611	0.159	28.759	1.605	0.162	-0.906	1.873
TIMO	1113	S+L	P21	Target	30.655	0.223	30.398	-1.394	0.351	-3.905	14.984
TIMO	1117	S+L	P21	Target	24.089	0.088	24.104	-1.084	0.094	-3.595	12.083
TIMO	1127	S+L	P21	Target	24.437	0.306	24.731	3.442	0.317	0.931	0.525
TIMO	1133	S+L	P21	Target	27.301	0.159	31.693	1.160	0.493	-1.351	2.551
TIMO	1136	S+L	P21	Target	20.447	0.054	20.412	-0.358	0.061	-2.869	7.304
TIMO	1147	S+L	P21	Target	24.436	0.157	24.566	2.511	0.160	0.000	1.000
TIMO	1153	S+L	P21	Target	31.696	0.218	31.947	1.407	0.231	-1.104	2.150
TIMO	1166	S+L	P21	Target	27.785	0.166	27.714	1.285	0.180	-1.226	2.339
TIMO	1057	S+L	P53	Target	30.155	0.059	30.118	2.965	0.067	3.540	0.086
TIMO	1113	S+L	P53	Target	31.167	0.131	31.026	-0.766	0.301	-0.190	1.141
TIMO	1117	S+L	P53	Target	28.023	0.057	27.981	2.793	0.066	3.369	0.097
TIMO	1127	S+L	P53	Target	23.481	0.179	23.682	2.392	0.198	2.968	0.128
TIMO	1133	S+L	P53	Target	27.077	0.038	30.500	-0.033	0.242	0.543	0.686
TIMO	1136	S+L	P53	Target	20.306	0.020	20.304	-0.465	0.034	0.110	0.926
TIMO	1147	S+L	P53	Target	21.375	0.128	21.479	-0.576	0.131	0.000	1.000
TIMO	1153	S+L	P53	Target	31.087	0.163	30.940	0.400	0.180	0.976	0.509
TIMO	1166	S+L	P53	Target	25.335	0.005	25.336	-1.093	0.069	-0.518	1.432
TIMO	1057	S+L	PUMA	Target	26.060	0.057	26.071	-1.082	0.065	0.064	0.957
TIMO	1113	S+L	PUMA	Target	31.141	0.157	31.322	-0.470	0.313	0.675	0.626
TIMO	1117	S+L	PUMA	Target	25.085	0.041	25.037	-0.151	0.053	0.995	0.502
TIMO	1127	S+L	PUMA	Target	24.050	0.162	24.235	2.946	0.183	4.091	0.059
TIMO	1133	S+L	PUMA	Target	26.306	0.091	30.271	-0.263	0.196	0.882	0.542
TIMO	1136	S+L	PUMA	Target	20.961	0.042	21.009	0.239	0.050	1.384	0.383
TIMO	1147	S+L	PUMA	Target	20.729	0.156	20.910	-1.145	0.159	0.000	1.000
TIMO	1153	S+L	PUMA	Target	32.448	0.287	32.539	1.998	0.298	3.143	0.113
TIMO	1166	S+L	PUMA	Target	26.812	0.061	26.750	0.321	0.092	1.467	0.362
TIMO	1057	S+L	GUSB	ENDO	27.120	0.032	27.153				
TIMO	1113	S+L	GUSB	ENDO	31.642	0.271	31.792				
TIMO	1117	S+L	GUSB	ENDO	25.180	0.034	25.188				
TIMO	1127	S+L	GUSB	ENDO	21.237	0.085	21.289				
TIMO	1133	S+L	GUSB	ENDO	26.461	0.066	30.534				
TIMO	1136	S+L	GUSB	ENDO	20.738	0.027	20.770				
TIMO	1147	S+L	GUSB	ENDO	22.052	0.026	22.055				
TIMO	1153	S+L	GUSB	ENDO	30.571	0.077	30.541				
TIMO	1166	S+L	GUSB	ENDO	26.373	0.069	26.429				

TIMO	1057	S+L+	BAX	Target	28.244	0.052	28.296	-1.406	0.091	1.457	0.364
TIMO	1113	S+L+	BAX	Target	19.430	0.074	19.347	-3.403	0.094	-0.539	1.453
TIMO	1117	S+L+	BAX	Target	19.669	0.025	19.690	-2.498	0.058	0.366	0.776
TIMO	1127	S+L+	BAX	Target	23.950	0.098	23.908	-1.677	0.099	1.186	0.439
TIMO	1133	S+L+	BAX	Target	25.167	0.027	25.198	-2.588	0.044	0.276	0.826
TIMO	1136	S+L+	BAX	Target	26.632	0.053	26.694	-1.623	0.064	1.241	0.423
TIMO	1147	S+L+	BAX	Target	27.994	0.013	28.002	-2.102	0.177	0.762	0.59
TIMO	1153	S+L+	BAX	Target	25.229	0.109	25.332	-1.301	0.147	1.563	0.339
TIMO	1166	S+L+	BAX	Target	24.051	0.042	24.038	-1.929	0.075	0.934	0.523
TIMO	1186	S+L+	BAX	Target	25.704	0.171	25.868	-2.397	0.174	0.466	0.724
TIMO	1113	S+L+	Fas	Target	26.167	0.033	26.178	3.429	0.067	-0.573	1.487
TIMO	1117	S+L+	Fas	Target	25.267	0.154	25.427	3.239	0.162	-0.763	1.697
TIMO	1133	S+L+	Fas	Target	29.905	0.063	29.972	2.186	0.072	-1.816	3.521
TIMO	1186	S+L+	Fas	Target	34.355	0.347	33.972	5.707	0.348	1.705	0.307
TIMO	1057	S+L+	P21	Target	32.017	0.149	31.861	2.158	0.166	-0.353	1.277
TIMO	1113	S+L+	P21	Target	22.012	0.043	21.991	-0.758	0.072	-3.269	9.639
TIMO	1117	S+L+	P21	Target	25.869	0.044	25.833	3.645	0.068	1.134	0.456
TIMO	1127	S+L+	P21	Target	28.510	0.116	28.389	2.804	0.117	0.293	0.816
TIMO	1133	S+L+	P21	Target	30.792	0.094	30.815	3.029	0.101	0.518	0.698
TIMO	1136	S+L+	P21	Target	31.142	0.208	30.997	2.680	0.211	0.169	0.889
TIMO	1147	S+L+	P21	Target	32.401	0.083	32.488	2.384	0.195	-0.127	1.092
TIMO	1153	S+L+	P21	Target	27.987	0.116	27.953	1.321	0.152	-1.190	2.282
TIMO	1166	S+L+	P21	Target	27.117	0.045	27.110	1.142	0.076	-1.369	2.582
TIMO	1186	S+L+	P21	Target	30.488	0.091	30.493	2.228	0.096	-0.284	1.217
TIMO	1057	S+L+	P53	Target	29.983	0.005	29.983	0.280	0.074	0.856	0.552
TIMO	1113	S+L+	P53	Target	22.546	0.069	22.471	-0.279	0.091	0.297	0.814
TIMO	1117	S+L+	P53	Target	24.609	0.030	24.574	2.386	0.060	2.962	0.128
TIMO	1127	S+L+	P53	Target	25.308	0.065	25.237	-0.348	0.067	0.228	0.854
TIMO	1133	S+L+	P53	Target	27.374	0.078	27.445	-0.341	0.085	0.235	0.85
TIMO	1136	S+L+	P53	Target	28.337	0.191	28.507	0.191	0.194	0.766	0.588
TIMO	1147	S+L+	P53	Target	30.711	0.086	30.613	0.509	0.196	1.085	0.471
TIMO	1153	S+L+	P53	Target	27.012	0.107	27.090	0.457	0.146	1.033	0.489
TIMO	1166	S+L+	P53	Target	25.383	0.102	25.500	-0.468	0.119	0.108	0.928
TIMO	1186	S+L+	P53	Target	28.055	0.028	28.037	-0.228	0.040	0.348	0.786
TIMO	1057	S+L+	PUMA	Target	30.458	0.044	30.425	0.722	0.086	1.867	0.274
TIMO	1113	S+L+	PUMA	Target	23.535	0.042	23.486	0.737	0.072	1.882	0.271
TIMO	1117	S+L+	PUMA	Target	20.744	0.043	20.725	-1.463	0.068	-0.317	1.246
TIMO	1127	S+L+	PUMA	Target	26.871	0.041	26.892	1.307	0.043	2.452	0.183
TIMO	1133	S+L+	PUMA	Target	29.356	0.031	29.321	1.534	0.046	2.680	0.156
TIMO	1136	S+L+	PUMA	Target	29.282	0.048	29.236	0.920	0.059	2.065	0.239
TIMO	1147	S+L+	PUMA	Target	29.115	0.079	29.194	-0.910	0.193	0.235	0.85
TIMO	1153	S+L+	PUMA	Target	28.246	0.039	28.287	1.654	0.106	2.799	0.144
TIMO	1166	S+L+	PUMA	Target	26.216	0.074	26.258	0.290	0.096	1.436	0.37
TIMO	1186	S+L+	PUMA	Target	28.373	0.067	28.341	0.075	0.073	1.221	0.429
TIMO	1057	S+L+	GUSB	ENDO	29.631	0.074	29.703				
TIMO	1113	S+L+	GUSB	ENDO	22.808	0.059	22.749				
TIMO	1117	S+L+	GUSB	ENDO	22.225	0.052	22.188				
TIMO	1127	S+L+	GUSB	ENDO	25.601	0.014	25.585				
TIMO	1133	S+L+	GUSB	ENDO	27.814	0.035	27.786				
TIMO	1136	S+L+	GUSB	ENDO	28.347	0.035	28.317				
TIMO	1147	S+L+	GUSB	ENDO	29.928	0.176	30.104				
TIMO	1153	S+L+	GUSB	ENDO	26.537	0.099	26.633				
TIMO	1166	S+L+	GUSB	ENDO	25.970	0.061	25.968				
TIMO	1186	S+L+	GUSB	ENDO	28.295	0.029	28.265				

TIMO	1057	S-L+	BAX	Target	29.631	0.119	29.754	-1.259	0.124	1.605	0.329
TIMO	1127	S-L+	BAX	Target	28.700	0.062	28.733	-1.649	0.085	1.215	0.431
TIMO	1133	S-L+	BAX	Target	29.215	0.068	29.138	-1.359	0.146	1.505	0.352
TIMO	1136	S-L+	BAX	Target	25.112	0.027	25.125	-1.866	0.050	0.998	0.501
TIMO	1147	S-L+	BAX	Target	31.138	0.104	31.258	-1.362	0.391	1.501	0.353
TIMO	1153	S-L+	BAX	Target	27.732	0.239	27.641	-1.505	0.266	1.359	0.39
TIMO	1166	S-L+	BAX	Target	25.263	0.062	25.316	-1.643	0.082	1.220	0.429
TIMO	1186	S-L+	BAX	Target	33.165	0.140	33.021	-0.795	0.240	2.069	0.238
TIMO	1153	S-L+	Fas	Target	32.343	0.235	32.290	3.145	0.263	-0.857	1.811
TIMO	1057	S-L+	P21	Target	34.075	0.202	34.287	3.275	0.205	0.764	0.589
TIMO	1127	S-L+	P21	Target	32.743	0.213	32.986	2.605	0.221	0.094	0.937
TIMO	1133	S-L+	P21	Target	34.108	0.183	33.909	3.412	0.224	0.901	0.536
TIMO	1136	S-L+	P21	Target	30.871	0.166	30.680	3.689	0.171	1.178	0.442
TIMO	1147	S-L+	P21	Target	35.249	0.146	35.249	2.629	0.404	0.118	0.921
TIMO	1153	S-L+	P21	Target	31.415	0.316	31.160	2.015	0.337	-0.496	1.411
TIMO	1166	S-L+	P21	Target	30.922	0.236	30.685	3.726	0.242	1.215	0.431
TIMO	1186	S-L+	P21	Target	36.148	1.594	36.961	3.145	1.606	0.634	0.644
TIMO	1057	S-L+	P53	Target	31.390	0.083	31.395	0.383	0.091	0.958	0.515
TIMO	1127	S-L+	P53	Target	30.788	0.106	30.680	0.299	0.121	0.874	0.546
TIMO	1133	S-L+	P53	Target	30.942	0.081	30.888	0.391	0.152	0.967	0.512
TIMO	1136	S-L+	P53	Target	26.429	0.053	26.488	-0.504	0.068	0.072	0.951
TIMO	1147	S-L+	P53	Target	33.315	0.182	33.233	0.613	0.419	1.188	0.439
TIMO	1153	S-L+	P53	Target	29.260	0.104	29.177	0.031	0.157	0.607	0.657
TIMO	1166	S-L+	P53	Target	26.857	0.052	26.916	-0.043	0.075	0.532	0.691
TIMO	1186	S-L+	P53	Target	35.039	0.131	35.186	1.369	0.235	1.945	0.26
TIMO	1057	S-L+	PUMA	Target	32.082	0.252	31.977	0.965	0.255	2.110	0.232
TIMO	1127	S-L+	PUMA	Target	30.695	0.119	30.775	0.394	0.133	1.539	0.344
TIMO	1133	S-L+	PUMA	Target	31.677	0.130	31.825	1.328	0.183	2.473	0.18
TIMO	1136	S-L+	PUMA	Target	28.107	0.026	28.090	1.099	0.050	2.244	0.211
TIMO	1147	S-L+	PUMA	Target	31.376	0.371	31.770	-0.850	0.529	0.295	0.815
TIMO	1153	S-L+	PUMA	Target	30.869	0.156	30.689	1.543	0.195	2.689	0.155
TIMO	1166	S-L+	PUMA	Target	28.619	0.169	28.707	1.748	0.177	2.893	0.135
TIMO	1186	S-L+	PUMA	Target	34.820	0.582	35.286	1.470	0.614	2.615	0.163
TIMO	1057	S-L+	GUSB	ENDO	30.975	0.036	31.013				
TIMO	1127	S-L+	GUSB	ENDO	30.376	0.059	30.382				
TIMO	1133	S-L+	GUSB	ENDO	30.406	0.129	30.497				
TIMO	1136	S-L+	GUSB	ENDO	26.954	0.042	26.991				
TIMO	1147	S-L+	GUSB	ENDO	32.773	0.377	32.620				
TIMO	1153	S-L+	GUSB	ENDO	29.270	0.117	29.146				
TIMO	1166	S-L+	GUSB	ENDO	26.901	0.054	26.959				
TIMO	1186	S-L+	GUSB	ENDO	33.603	0.195	33.816				

Bazo.

Tejido	Individuo	Población	Detector	Task	Ct	Ct Std Err	Avg Ct	Avg dCt	dCt Std Err	ddCt	RQ
BAZO	1113	S+L-	BAX	Target	31.355	0.090	31.261	-2.352	0.205	-0.443	1.360
BAZO	1117	S+L-	BAX	Target	24.110	0.038	24.185	-2.647	0.068	-0.738	1.668
BAZO	1133	S+L-	BAX	Target	24.839	0.065	24.736	-0.856	0.090	1.053	0.482
BAZO	1136	S+L-	BAX	Target	20.690	0.049	20.605	-1.134	0.085	0.775	0.584
BAZO	1147	S+L-	BAX	Target	24.204	0.042	24.285	-1.909	0.045	0.000	1.000
BAZO	1113	S+L-	Fas	Target	37.905	0.530	38.235	4.621	0.561	1.377	0.385
BAZO	1117	S+L-	Fas	Target	30.229	0.112	30.382	3.550	0.125	0.306	0.809
BAZO	1133	S+L-	Fas	Target	30.085	0.030	30.032	4.440	0.069	1.196	0.437
BAZO	1136	S+L-	Fas	Target	26.379	0.035	26.370	4.631	0.078	1.386	0.383
BAZO	1147	S+L-	Fas	Target	29.366	0.039	29.438	3.244	0.042	0.000	1.000
BAZO	1113	S+L-	P21	Target	34.602	0.127	34.671	1.058	0.224	-2.801	6.968
BAZO	1117	S+L-	P21	Target	25.628	0.018	25.656	-1.176	0.059	-5.034	32.771
BAZO	1133	S+L-	P21	Target	29.461	0.091	29.531	3.939	0.110	0.081	0.946
BAZO	1136	S+L-	P21	Target	23.200	0.028	23.174	1.434	0.075	-2.424	5.367
BAZO	1147	S+L-	P21	Target	30.032	0.015	30.052	3.858	0.021	0.000	1.000
BAZO	1113	S+L-	P53	Target	33.888	0.100	33.980	0.367	0.210	0.499	0.708
BAZO	1117	S+L-	P53	Target	29.006	0.070	28.933	2.101	0.090	2.233	0.213
BAZO	1133	S+L-	P53	Target	27.422	0.044	27.394	1.802	0.077	1.933	0.262
BAZO	1136	S+L-	P53	Target	22.549	0.029	22.554	0.815	0.075	0.946	0.519
BAZO	1147	S+L-	P53	Target	26.006	0.040	26.062	-0.131	0.043	0.000	1.000
BAZO	1113	S+L-	PUMA	Target	35.269	0.319	34.676	1.062	0.368	1.464	0.362
BAZO	1117	S+L-	PUMA	Target	26.234	0.023	26.258	-0.574	0.061	-0.172	1.127
BAZO	1133	S+L-	PUMA	Target	27.802	0.068	27.783	2.191	0.092	2.593	0.166
BAZO	1136	S+L-	PUMA	Target	23.220	0.074	23.177	1.438	0.101	1.840	0.279
BAZO	1147	S+L-	PUMA	Target	25.612	0.093	25.792	-0.402	0.094	0.000	1.000
BAZO	1113	S+L-	GUSB	ENDO	33.881	0.184	33.613				
BAZO	1117	S+L-	GUSB	ENDO	26.735	0.057	26.832				
BAZO	1133	S+L-	GUSB	ENDO	25.717	0.062	25.592				
BAZO	1136	S+L-	GUSB	ENDO	21.872	0.069	21.740				
BAZO	1147	S+L-	GUSB	ENDO	26.174	0.015	26.194				
BAZO	1113	S+L+	BAX	Target	25.142	0.058	25.253	-1.119	0.062	0.790	0.578
BAZO	1117	S+L+	BAX	Target	22.604	0.068	22.719	-1.877	0.097	0.032	0.978
BAZO	1127	S+L+	BAX	Target	27.915	0.040	27.924	-2.053	0.097	-0.143	1.105
BAZO	1128	S+L+	BAX	Target	29.587	0.016	29.562	-0.404	0.065	1.505	0.352
BAZO	1133	S+L+	BAX	Target	24.879	0.047	24.799	-1.297	0.054	0.612	0.654
BAZO	1136	S+L+	BAX	Target	24.835	0.052	24.905	-1.244	0.057	0.665	0.631
BAZO	1147	S+L+	BAX	Target	28.553	0.056	28.543	-1.680	0.056	0.229	0.853
BAZO	1166	S+L+	BAX	Target	27.297	0.039	27.375	-2.635	0.082	-0.726	1.654
BAZO	1186	S+L+	BAX	Target	24.678	0.015	24.689	-1.069	0.031	0.840	0.559
BAZO	1113	S+L+	P21	Target	32.021	0.139	31.944	5.572	0.140	1.713	0.305
BAZO	1117	S+L+	P21	Target	27.436	0.101	27.634	3.038	0.123	-0.820	1.766
BAZO	1127	S+L+	P21	Target	31.213	0.050	31.237	1.260	0.101	-2.598	6.056
BAZO	1128	S+L+	P21	Target	32.471	0.058	32.356	2.390	0.086	-1.468	2.767
BAZO	1133	S+L+	P21	Target	31.303	0.062	31.277	5.181	0.068	1.322	0.4
BAZO	1136	S+L+	P21	Target	30.442	0.071	30.579	4.430	0.074	0.571	0.673
BAZO	1147	S+L+	P21	Target	33.830	0.208	34.210	3.987	0.208	0.128	0.915
BAZO	1166	S+L+	P21	Target	29.117	0.044	29.206	-0.805	0.085	-4.663	25.336
BAZO	1186	S+L+	P21	Target	29.929	0.045	29.987	4.230	0.053	0.371	0.773
BAZO	1113	S+L+	P53	Target	26.970	0.584	26.385	0.013	0.585	0.144	0.905
BAZO	1117	S+L+	P53	Target	27.065	0.107	27.231	2.635	0.128	2.767	0.147
BAZO	1127	S+L+	P53	Target	30.250	0.067	30.362	0.385	0.111	0.517	0.699
BAZO	1128	S+L+	P53	Target	33.516	0.192	33.135	3.170	0.202	3.301	0.101
BAZO	1133	S+L+	P53	Target	26.110	0.048	26.014	-0.082	0.055	0.049	0.966
BAZO	1136	S+L+	P53	Target	26.152	0.028	26.154	-0.005	0.035	0.137	0.91
BAZO	1147	S+L+	P53	Target	31.355	0.101	31.155	0.932	0.101	1.063	0.479
BAZO	1166	S+L+	P53	Target	30.766	0.065	30.883	0.872	0.097	1.004	0.499
BAZO	1186	S+L+	P53	Target	26.252	0.062	26.371	0.613	0.068	0.745	0.597
BAZO	1113	S+L+	PUMA	Target	28.876	0.184	28.876	2.504	0.185	2.906	0.133
BAZO	1117	S+L+	PUMA	Target	23.121	0.061	23.233	-1.363	0.092	-0.961	1.947
BAZO	1127	S+L+	PUMA	Target	30.867	0.126	30.734	0.757	0.154	1.159	0.448
BAZO	1128	S+L+	PUMA	Target	30.172	0.034	30.132	0.166	0.072	0.568	0.674
BAZO	1133	S+L+	PUMA	Target	27.494	0.018	27.527	1.431	0.033	1.832	0.281
BAZO	1136	S+L+	PUMA	Target	27.955	0.042	27.987	1.838	0.047	2.240	0.212
BAZO	1147	S+L+	PUMA	Target	30.838	0.055	30.888	0.664	0.055	1.066	0.478
BAZO	1166	S+L+	PUMA	Target	28.761	0.081	28.862	-1.148	0.108	-0.747	1.678
BAZO	1186	S+L+	PUMA	Target	27.322	0.031	27.370	1.612	0.041	2.014	0.248
BAZO	1113	S+L+	GUSB	ENDO	26.336	0.022	26.373				
BAZO	1117	S+L+	GUSB	ENDO	24.458	0.069	24.596				
BAZO	1127	S+L+	GUSB	ENDO	30.013	0.088	29.977				
BAZO	1128	S+L+	GUSB	ENDO	30.006	0.063	29.965				
BAZO	1133	S+L+	GUSB	ENDO	26.137	0.027	26.096				
BAZO	1136	S+L+	GUSB	ENDO	26.122	0.021	26.149				
BAZO	1147	S+L+	GUSB	ENDO	30.213	0.007	30.223				
BAZO	1166	S+L+	GUSB	ENDO	29.875	0.072	30.010				
BAZO	1186	S+L+	GUSB	ENDO	25.812	0.027	25.758				

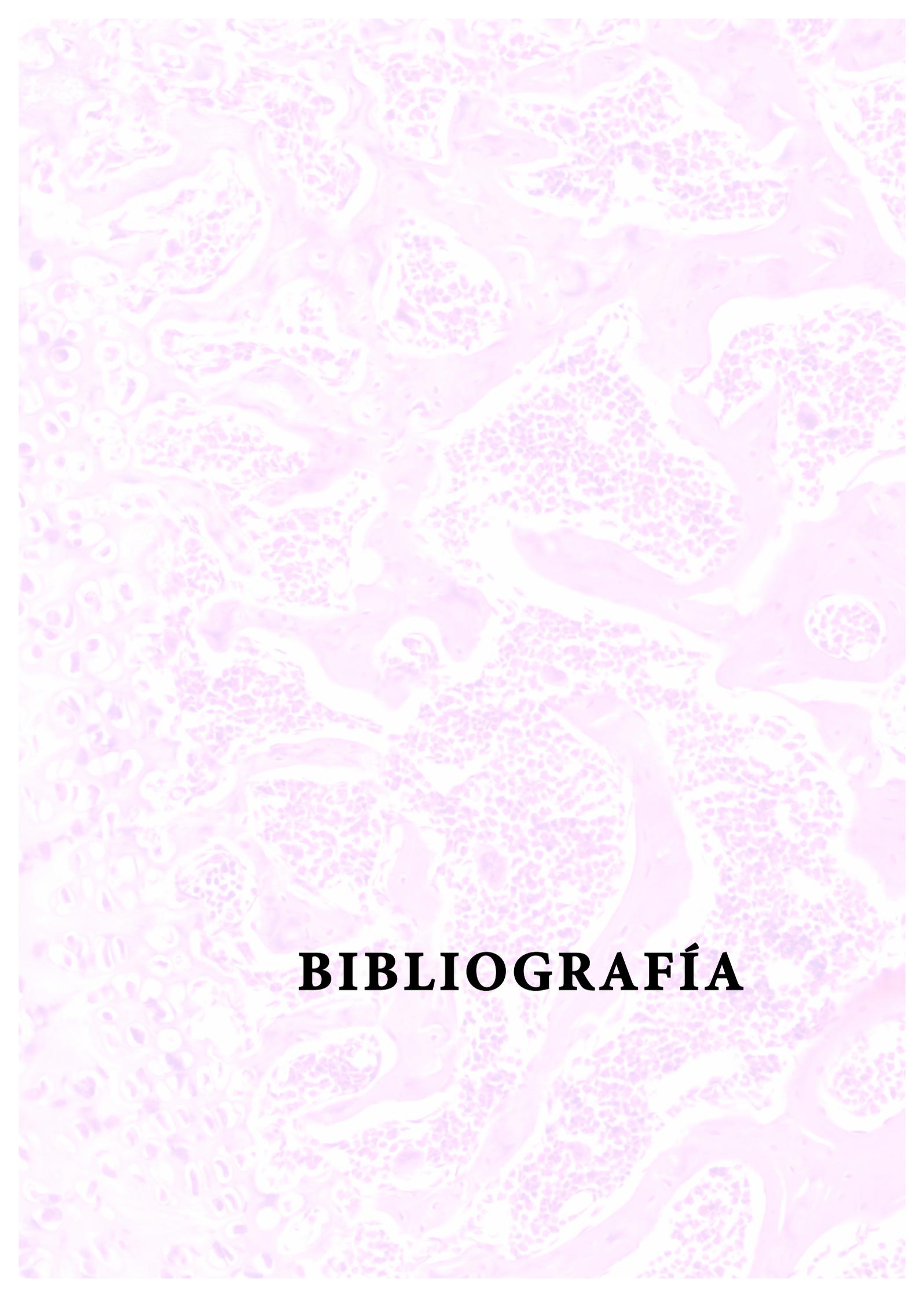
BAZO	1057	S-L+	BAX	Target	21.709	0.081	21.782	-0.384	0.119	1.525	0.347
BAZO	1113	S-L+	BAX	Target	25.957	0.082	26.114	0.148	0.088	2.057	0.24
BAZO	1117	S-L+	BAX	Target	27.375	5,61E-01	27.376	0.293	0.017	2.203	0.217
BAZO	1133	S-L+	BAX	Target	26.316	0.011	26.335	0.216	0.032	2.126	0.229
BAZO	1136	S-L+	BAX	Target	26.472	0.057	26.551	0.154	0.058	2.063	0.239
BAZO	1147	S-L+	BAX	Target	21.763	0.008	21.749	-1.876	0.053	0.033	0.978
BAZO	1153	S-L+	BAX	Target	25.723	0.023	25.738	-1.084	0.062	0.825	0.564
BAZO	1166	S-L+	BAX	Target	21.897	0.041	21.842	-1.739	0.051	0.170	0.889
BAZO	1186	S-L+	BAX	Target	24.833	0.060	24.949	-0.014	0.064	1.895	0.269
BAZO	1057	S-L+	Fas	Target	24.129	0.030	24.123	1.956	0.092	-1.288	2.442
BAZO	1057	S-L+	P21	Target	25.774	0.187	25.988	3.822	0.206	-0.037	1.026
BAZO	1113	S-L+	P21	Target	29.225	0.090	29.365	3.398	0.095	-0.461	1.376
BAZO	1117	S-L+	P21	Target	29.312	0.047	29.335	2.253	0.050	-1.605	3.043
BAZO	1133	S-L+	P21	Target	29.481	0.118	29.631	3.512	0.122	-0.347	1.272
BAZO	1136	S-L+	P21	Target	29.858	0.047	29.794	3.397	0.047	-0.461	1.377
BAZO	1147	S-L+	P21	Target	27.425	0.081	27.398	3.773	0.097	-0.086	1.061
BAZO	1153	S-L+	P21	Target	31.679	0.086	31.550	4.728	0.103	0.869	0.547
BAZO	1166	S-L+	P21	Target	23.333	0.033	23.268	-0.313	0.045	-4.172	18.022
BAZO	1186	S-L+	P21	Target	28.155	0.059	28.043	3.079	0.062	-0.779	1.716
BAZO	1057	S-L+	P53	Target	24.204	0.213	24.406	2.240	0.230	2.371	0.193
BAZO	1113	S-L+	P53	Target	27.829	0.080	27.980	2.013	0.086	2.145	0.226
BAZO	1117	S-L+	P53	Target	32.754	0.082	32.593	5.510	0.084	5.642	0.02
BAZO	1133	S-L+	P53	Target	27.735	0.114	27.859	1.740	0.118	1.872	0.273
BAZO	1136	S-L+	P53	Target	28.136	0.008	28.127	1.730	0.010	1.861	0.275
BAZO	1147	S-L+	P53	Target	23.503	0.093	23.558	-0.068	0.107	0.064	0.957
BAZO	1153	S-L+	P53	Target	27.105	0.042	27.186	0.364	0.071	0.495	0.71
BAZO	1166	S-L+	P53	Target	23.631	0.188	23.791	0.210	0.190	0.341	0.789
BAZO	1186	S-L+	P53	Target	26.138	0.071	26.270	1.306	0.074	1.437	0.369
BAZO	1057	S-L+	PUMA	Target	24.402	0.084	24.498	2.332	0.121	2.734	0.150
BAZO	1113	S-L+	PUMA	Target	28.986	0.048	29.074	3.107	0.057	3.509	0.088
BAZO	1117	S-L+	PUMA	Target	30.136	0.019	30.141	3.059	0.025	3.460	0.091
BAZO	1133	S-L+	PUMA	Target	28.697	0.045	28.664	2.546	0.054	2.947	0.13
BAZO	1136	S-L+	PUMA	Target	29.276	0.048	29.179	2.783	0.048	3.184	0.11
BAZO	1147	S-L+	PUMA	Target	23.392	0.009	23.403	-0.222	0.054	0.179	0.883
BAZO	1153	S-L+	PUMA	Target	28.160	0.085	28.315	1.493	0.103	1.895	0.269
BAZO	1166	S-L+	PUMA	Target	24.178	0.034	24.245	0.664	0.046	1.066	0.478
BAZO	1186	S-L+	PUMA	Target	27.435	0.091	27.609	2.646	0.093	3.048	0.121
BAZO	1057	S-L+	GUSB	ENDO	22.125	0.087	22.166				
BAZO	1113	S-L+	GUSB	ENDO	25.928	0.032	25.967				
BAZO	1117	S-L+	GUSB	ENDO	27.115	0.017	27.082				
BAZO	1133	S-L+	GUSB	ENDO	26.164	0.030	26.119				
BAZO	1136	S-L+	GUSB	ENDO	26.400	0.006	26.397				
BAZO	1147	S-L+	GUSB	ENDO	23.520	0.053	23.625				
BAZO	1153	S-L+	GUSB	ENDO	26.708	0.058	26.822				
BAZO	1166	S-L+	GUSB	ENDO	23.630	0.031	23.581				
BAZO	1186	S-L+	GUSB	ENDO	24.955	0.021	24.964				

Médula ósea.

Tejido	Individuo	Población	Detector	Task	Ct	Ct Std Err	Avg Ct	Avg dCt	dCt Std Err	ddCt	RO
MO	1057	S+L-	BAX	Target	22.462	0.043	22.416	-0.941	0.045	1.268	0.415
MO	1127	S+L-	BAX	Target	19.746	0.023	19.707	0.293	0.028	2.502	0.177
MO	1133	S+L-	BAX	Target	18.569	0.012	18.586	-2.335	0.062	-0.127	1.092
MO	1136	S+L-	BAX	Target	22.206	0.028	22.242	-2.475	0.063	-0.267	1.203
MO	1147	S+L-	BAX	Target	18.302	0.030	18.242	-2.209	0.039	0.000	1.000
MO	1166	S+L-	BAX	Target	29.924	0.075	29.884	-1.781	0.322	0.428	0.743
MO	1057	S+L-	Fas	Target	29.046	0.007	29.042	5.685	0.016	0.880	0.543
MO	1127	S+L-	Fas	Target	25.933	0.073	25.901	6.488	0.074	1.683	0.311
MO	1133	S+L-	Fas	Target	26.820	0.043	26.880	5.959	0.074	1.154	0.449
MO	1136	S+L-	Fas	Target	29.831	0.059	29.891	5.173	0.082	0.369	0.774
MO	1147	S+L-	Fas	Target	25.253	0.023	25.256	4.805	0.034	0.000	1.000
MO	1057	S+L-	P21	Target	26.138	0.028	26.090	2.734	0.031	2.124	0.229
MO	1127	S+L-	P21	Target	23.013	0.067	22.901	3.488	0.069	2.878	0.136
MO	1133	S+L-	P21	Target	22.677	0.091	22.663	1.741	0.109	1.131	0.456
MO	1136	S+L-	P21	Target	25.168	0.020	25.127	0.410	0.060	-0.200	1.149
MO	1147	S+L-	P21	Target	21.093	0.024	21.061	0.610	0.034	0.000	1.000
MO	1166	S+L-	P21	Target	33.334	0.131	33.413	1.748	0.339	1.138	0.454
MO	1057	S+L-	P53	Target	24.449	0.034	24.421	1.065	0.037	1.555	0.34
MO	1127	S+L-	P53	Target	21.262	0.024	21.243	1.830	0.029	2.320	0.2
MO	1133	S+L-	P53	Target	21.254	0.017	21.272	0.351	0.063	0.841	0.558
MO	1136	S+L-	P53	Target	24.440	0.085	24.578	-0.139	0.102	0.351	0.784
MO	1147	S+L-	P53	Target	19.976	0.009	19.961	-0.490	0.026	0.000	1.000
MO	1166	S+L-	P53	Target	31.356	0.139	31.200	-0.465	0.342	0.025	0.983
MO	1057	S+L-	PUMA	Target	24.602	0.052	24.549	1.193	0.054	1.937	0.261
MO	1127	S+L-	PUMA	Target	21.779	0.015	21.779	2.365	0.022	3.110	0.116
MO	1133	S+L-	PUMA	Target	20.094	0.020	20.058	-0.863	0.064	-0.119	1.086
MO	1136	S+L-	PUMA	Target	24.454	0.028	24.493	-0.224	0.063	0.520	0.697
MO	1147	S+L-	PUMA	Target	19.836	0.076	19.707	-0.744	0.079	0.000	1.000
MO	1166	S+L-	PUMA	Target	32.165	0.267	32.436	0.771	0.411	1.516	0.350
MO	1057	S+L-	GUSB	ENDO	23.363	0.014	23.357				
MO	1127	S+L-	GUSB	ENDO	19.405	0.016	19.413				
MO	1133	S+L-	GUSB	ENDO	20.866	0.060	20.921				
MO	1136	S+L-	GUSB	ENDO	24.694	0.056	24.718				
MO	1147	S+L-	GUSB	ENDO	20.491	0.025	20.451				
MO	1166	S+L-	GUSB	ENDO	31.406	0.313	31.665				

MO	1057	S+L+	BAX	Target	31.643	0.044	31.682	-1.832	0.568	0.377	0.770
MO	1113	S+L+	BAX	Target	29.371	0.089	29.475	-0.598	0.105	1.610	0.327
MO	1117	S+L+	BAX	Target	25.414	0.021	25.446	-0.292	0.081	1.916	0.265
MO	1128	S+L+	BAX	Target	24.496	0.017	24.528	-2.531	0.035	-0.323	1.251
MO	1133	S+L+	BAX	Target	19.614	0.101	19.685	-1.582	0.114	0.626	0.648
MO	1136	S+L+	BAX	Target	30.569	0.089	30.734	-0.628	0.133	1.580	0.334
MO	1147	S+L+	BAX	Target	25.454	0.055	25.564	-2.035	0.064	0.173	0.887
MO	1153	S+L+	BAX	Target	21.901	0.031	21.961	-0.892	0.048	1.317	0.401
MO	1166	S+L+	BAX	Target	29.582	0.034	29.623	-2.621	0.200	-0.412	1.331
MO	1186	S+L+	BAX	Target	18.603	0.037	18.568	-1.348	0.109	0.860	0.551
MO	1128	S+L+	Fas	Target	28.045	0.048	28.098	1.039	0.057	-3.765	13.599
MO	1133	S+L+	Fas	Target	25.251	0.052	25.235	3.968	0.074	-0.837	1.787
MO	1153	S+L+	Fas	Target	28.253	0.042	28.246	5.394	0.056	0.589	0.665
MO	1186	S+L+	Fas	Target	25.494	0.037	25.535	5.618	0.109	0.814	0.569
MO	1057	S+L+	P21	Target	38.059	0.641	37.340	3.826	0.855	3.217	0.108
MO	1113	S+L+	P21	Target	33.721	0.208	33.908	3.835	0.215	3.225	0.107
MO	1117	S+L+	P21	Target	27.707	0.045	27.759	2.020	0.090	1.411	0.376
MO	1128	S+L+	P21	Target	28.560	0.106	28.705	1.646	0.110	1.036	0.488
MO	1133	S+L+	P21	Target	24.303	0.052	24.359	3.092	0.074	2.482	0.179
MO	1136	S+L+	P21	Target	35.718	6.05E-01	35.718	4.356	0.099	3.747	0.074
MO	1147	S+L+	P21	Target	32.147	0.051	32.157	4.558	0.060	3.948	0.065
MO	1153	S+L+	P21	Target	26.965	0.044	27.052	4.199	0.057	3.589	0.083
MO	1166	S+L+	P21	Target	31.278	0.031	31.305	-0.939	0.199	-1.549	2.926
MO	1186	S+L+	P21	Target	19.487	0.118	19.356	-0.561	0.156	-1.170	2.251
MO	1057	S+L+	P53	Target	35.031	0.026	35.042	1.528	0.567	2.018	0.247
MO	1113	S+L+	P53	Target	32.525	0.113	32.639	2.565	0.126	3.055	0.12
MO	1117	S+L+	P53	Target	30.219	0.062	30.271	4.532	0.100	5.023	0.031
MO	1128	S+L+	P53	Target	28.051	0.079	28.175	1.116	0.085	1.606	0.329
MO	1133	S+L+	P53	Target	22.056	0.045	22.088	0.820	0.070	1.310	0.403
MO	1136	S+L+	P53	Target	32.194	0.071	32.249	0.887	0.122	1.377	0.385
MO	1147	S+L+	P53	Target	27.929	0.024	27.903	0.304	0.040	0.794	0.577
MO	1153	S+L+	P53	Target	24.072	0.025	24.098	1.246	0.045	1.736	0.3
MO	1166	S+L+	P53	Target	32.693	0.168	33.028	0.784	0.259	1.274	0.413
MO	1186	S+L+	P53	Target	20.775	0.099	20.661	0.745	0.143	1.235	0.425
MO	1057	S+L+	PUMA	Target	34.488	0.582	34.665	1.151	0.812	1.896	0.269
MO	1113	S+L+	PUMA	Target	31.751	0.132	31.862	1.788	0.143	2.533	0.173
MO	1117	S+L+	PUMA	Target	26.533	0.042	26.596	0.857	0.089	1.601	0.33
MO	1128	S+L+	PUMA	Target	24.415	0.071	24.552	-2.507	0.078	-1.763	3.394
MO	1133	S+L+	PUMA	Target	22.520	0.024	22.513	1.245	0.058	1.990	0.252
MO	1136	S+L+	PUMA	Target	32.918	0.016	32.950	1.588	0.101	2.332	0.199
MO	1147	S+L+	PUMA	Target	26.591	0.064	26.684	-0.915	0.072	-0.170	1.125
MO	1153	S+L+	PUMA	Target	25.011	0.032	25.072	2.220	0.049	2.964	0.128
MO	1166	S+L+	PUMA	Target	31.298	0.058	31.189	-1.055	0.205	-0.311	1.240
MO	1186	S+L+	PUMA	Target	22.735	0.170	22.841	2.924	0.199	3.669	0.079
MO	1057	S+L+	GUSB	ENDO	34.087	0.567	33.514				
MO	1113	S+L+	GUSB	ENDO	30.017	0.056	30.073				
MO	1117	S+L+	GUSB	ENDO	25.787	0.078	25.739				
MO	1128	S+L+	GUSB	ENDO	27.023	0.031	27.059				
MO	1133	S+L+	GUSB	ENDO	21.244	0.053	21.267				
MO	1136	S+L+	GUSB	ENDO	31.163	0.099	31.362				
MO	1147	S+L+	GUSB	ENDO	27.660	0.032	27.599				
MO	1153	S+L+	GUSB	ENDO	22.779	0.037	22.852				
MO	1166	S+L+	GUSB	ENDO	32.017	0.197	32.244				
MO	1186	S+L+	GUSB	ENDO	19.994	0.103	19.916				

MO	1057	S-L+	BAX	Target	26.211	0.016	26.221	0.232	0.037	2.440	0.184
MO	1113	S-L+	BAX	Target	32.210	0.045	32.167	-0.918	0.129	1.291	0.409
MO	1117	S-L+	BAX	Target	29.844	0.064	29.728	-0.147	0.091	2.062	0.239
MO	1128	S-L+	BAX	Target	30.240	0.017	30.241	0.451	0.058	2.660	0.158
MO	1133	S-L+	BAX	Target	26.408	0.044	26.470	-0.173	0.071	2.035	0.244
MO	1147	S-L+	BAX	Target	27.761	0.050	27.856	0.569	0.056	2.777	0.146
MO	1153	S-L+	BAX	Target	31.223	0.055	31.262	-2.018	0.217	0.190	0.876
MO	1166	S-L+	BAX	Target	27.840	0.046	27.908	-1.222	0.086	0.986	0.505
MO	1186	S-L+	BAX	Target	34.439	0.119	34.639	0.410	0.180	2.618	0.163
MO	1057	S-L+	P21	Target	29.178	0.110	29.358	3.368	0.115	2.758	0.148
MO	1113	S-L+	P21	Target	35.971	0.687	37.077	3.992	0.697	3.383	0.096
MO	1117	S-L+	P21	Target	32.453	0.150	32.153	2.278	0.164	1.669	0.315
MO	1128	S-L+	P21	Target	33.287	0.063	33.331	3.541	0.084	2.932	0.131
MO	1133	S-L+	P21	Target	29.641	0.103	29.733	3.089	0.117	2.480	0.179
MO	1147	S-L+	P21	Target	30.394	0.042	30.472	3.184	0.048	2.574	0.168
MO	1153	S-L+	P21	Target	35.557	0.400	36.258	2.977	0.451	2.368	0.194
MO	1166	S-L+	P21	Target	31.414	0.012	31.437	2.306	0.074	1.697	0.308
MO	1057	S-L+	P53	Target	27.853	0.073	27.999	2.009	0.080	2.499	0.177
MO	1113	S-L+	P53	Target	36.916	0.101	37.074	3.989	0.158	4.479	0.045
MO	1117	S-L+	P53	Target	35.319	0.426	35.206	5.331	0.431	5.821	0.018
MO	1128	S-L+	P53	Target	32.710	0.035	32.748	2.958	0.065	3.448	0.092
MO	1133	S-L+	P53	Target	28.610	0.014	28.638	1.995	0.058	2.485	0.179
MO	1147	S-L+	P53	Target	29.763	0.063	29.781	2.494	0.067	2.984	0.126
MO	1153	S-L+	P53	Target	35.742	0.003	35.745	2.465	0.210	2.955	0.129
MO	1166	S-L+	P53	Target	30.629	0.060	30.725	1.595	0.094	2.085	0.236
MO	1186	S-L+	P53	Target	39.567	0.588	38.413	4.184	0.604	4.674	0.039
MO	1057	S-L+	PUMA	Target	28.832	0.067	28.965	2.975	0.074	3.720	0.076
MO	1113	S-L+	PUMA	Target	35.116	0.004	35.112	2.028	0.121	2.772	0.146
MO	1117	S-L+	PUMA	Target	31.230	0.058	31.213	1.338	0.087	2.082	0.236
MO	1128	S-L+	PUMA	Target	32.103	0.158	31.847	2.058	0.167	2.802	0.143
MO	1133	S-L+	PUMA	Target	29.519	0.026	29.470	2.827	0.062	3.571	0.084
MO	1147	S-L+	PUMA	Target	30.518	7.44E-01	31.155	3.867	0.024	4.612	0.041
MO	1153	S-L+	PUMA	Target	35.403	0.096	35.426	2.145	0.231	2.890	0.135
MO	1166	S-L+	PUMA	Target	30.395	0.134	30.545	1.415	0.153	2.159	0.224
MO	1186	S-L+	PUMA	Target	37.454	0.619	36.834	2.605	0.634	3.350	0.098
MO	1057	S-L+	GUSB	ENDO	25.971	0.033	25.990				
MO	1113	S-L+	GUSB	ENDO	32.855	0.121	33.085				
MO	1117	S-L+	GUSB	ENDO	29.989	0.065	29.875				
MO	1128	S-L+	GUSB	ENDO	29.687	0.055	29.789				
MO	1133	S-L+	GUSB	ENDO	26.537	0.056	26.643				
MO	1147	S-L+	GUSB	ENDO	27.239	0.024	27.288				
MO	1153	S-L+	GUSB	ENDO	32.964	0.210	33.280				
MO	1166	S-L+	GUSB	ENDO	29.023	0.073	29.130				
MO	1186	S-L+	GUSB	ENDO	34.495	0.135	34.229				

The background of the page is a microscopic image of biological tissue, likely a histological section. It features a complex, repeating pattern of cells and structures, rendered in a color palette of various shades of purple, magenta, and pink. The overall appearance is that of a dense, textured fabric or a complex cellular network.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Afonina, I. et al. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* **25**, 2657-60 (1997).
- Ahuja, H., Bar-Eli, M., Advani, S.H., Benchimol, S. & Cline, M.J. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6783-7 (1989).
- Ahuja, H. et al. The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *J Clin Invest* **87**, 2042-7 (1991).
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. & Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-8 (2003).
- Armstrong, J.F., Kaufman, M.H., Harrison, D.J. & Clarke, A.R. High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol* **5**, 931-6 (1995).
- Baker, S.J. et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**, 217-21 (1989).
- Bao, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-60 (2006).
- Bao, S. et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* **66**, 7843-8 (2006).
- Bar, J., Moskovits, N. & Oren, M. Involvement of stromal p53 in tumor-stroma interactions. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 47-54 (2009).
- Ben David, Y., Prideaux, V.R., Chow, V., Benchimol, S. & Bernstein, A. Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. *Oncogene* **3**, 179-85 (1988).
- Bennett, M. et al. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **282**, 290-3 (1998).
- Bienz, B., Zakut-Houri, R., Givol, D. & Oren, M. Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen p53. *Embo J* **3**, 2179-83 (1984).

- Bonnet, D. & Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**, 730-7 (1997).
- Brady, C.A. & Attardi, L.D. p53 at a glance. *J Cell Sci* **123**, 2527-32 (2010).
- Brooks, C.L. & Gu, W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* **21**, 307-15 (2006).
- Brosh, R. & Rotter, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* **9**, 701-13 (2009).
- Calabretta, B. & Perrotti, D. The biology of CML blast crisis. *Blood* **103**, 4010-22 (2004).
- Castellanos, A. et al. A BCR-ABL(p190) fusion gene made by homologous recombination causes B-cell acute lymphoblastic leukemias in chimeric mice with independence of the endogenous bcr product. *Blood* **90**, 2168-74 (1997).
- Chabner, B.A. & Roberts, T.G., Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* **5**, 65-72 (2005).
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9 (1987).
- Christophorou, M.A. et al. Temporal dissection of p53 function in vitro and in vivo. *Nat Genet* **37**, 718-26 (2005).
- Christophorou, M.A., Ringshausen, I., Finch, A.J., Swigart, L.B. & Evan, G.I. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* **443**, 214-7 (2006).
- Church, G.M. & Gilbert, W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-5 (1984).
- Clevers, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **17**, 313-9 (2011).
- Cobaleda, C. et al. A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **95**, 1007-13 (2000).
- Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* **10**, 51-7 (2010).

- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J. & Maitland, N.J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* **65**, 10946-51 (2005).
- Cox, C.V. et al. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* **104**, 2919-25 (2004).
- Cox, C.V. et al. Characterization of a progenitor cell population in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **109**, 674-82 (2007).
- Dalerba, P., Cho, R.W. & Clarke, M.F. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* **58**, 267-84 (2007).
- Dalerba, P. et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10158-63 (2007).
- DeLeo, A.B. et al. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 2420-4 (1979).
- Diekmann, D. et al. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* **351**, 400-2 (1991).
- Dimri, G.P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-7 (1995).
- Donehower, L.A. et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-21 (1992).
- Donehower, L.A. & Lozano, G. 20 years studying p53 functions in genetically engineered mice. *Nat Rev Cancer* **9**, 831-41 (2009).
- Druker, B.J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* **112**, 4808-17 (2008).
- Druker, B.J., O'Brien, S.G., Cortes, J. & Radich, J. Chronic myelogenous leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 111-35 (2002).
- Efeyan, A., Garcia-Cao, I., Herranz, D., Velasco-Miguel, S. & Serrano, M. Policing of oncogene activity by p53. *Nature* **443**, 159 (2006).
- el-Deiry, W.S. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-25 (1993).
- Eliyahu, D. et al. Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogene* **3**, 313-21 (1988).

- Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D. & Oren, M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312**, 646-9 (1984).
- Etzioni, R. et al. The case for early detection. *Nat Rev Cancer* **3**, 243-52 (2003).
- Feinstein, E. et al. p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6293-7 (1991).
- Feldser, D.M. et al. Stage-specific sensitivity to p53 restoration during lung cancer progression. *Nature* **468**, 572-5 (2010).
- Finlay, C.A. et al. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* **8**, 531-9 (1988).
- Fridman, J.S. & Lowe, S.W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030-40 (2003).
- Garcia-Cao, I. et al. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *Embo J* **21**, 6225-35 (2002).
- George, A.A. et al. Detection of leukemic cells in the CD34(+)CD38(-) bone marrow progenitor population in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **97**, 3925-30 (2001).
- Gorospe, M., Wang, X. & Holbrook, N.J. p53-dependent elevation of p21Waf1 expression by UV light is mediated through mRNA stabilization and involves a vanadate-sensitive regulatory system. *Mol Cell Biol* **18**, 1400-7 (1998).
- Graham, S.M. et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* **99**, 319-25 (2002).
- Guttman, M. et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**, 223-7 (2009).
- Harris, S.L. & Levine, A.J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**, 2899-908 (2005).
- He, L., He, X., Lowe, S.W. & Hannon, G.J. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* **7**, 819-22 (2007).

- Heisterkamp, N. et al. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* **344**, 251-3 (1990).
- Hernandez-Boluda, J.C. et al. Genomic p16 abnormalities in the progression of chronic myeloid leukemia into blast crisis: a sequential study in 42 patients. *Exp Hematol* **31**, 204-10 (2003).
- Honda, H. et al. Expression of p210bcr/abl by metallothionein promoter induced T-cell leukemia in transgenic mice. *Blood* **85**, 2853-61 (1995).
- Honda, H. et al. Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human Ph1-positive leukemias. *Blood* **91**, 2067-75 (1998).
- Honda, H. et al. Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210(bcr/abl)-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. *Blood* **95**, 1144-50 (2000).
- Hope, K.J., Jin, L. & Dick, J.E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* **5**, 738-43 (2004).
- Hu, Y. et al. Targeting multiple kinase pathways in leukemic progenitors and stem cells is essential for improved treatment of Ph+ leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16870-5 (2006).
- Huettner, C.S. et al. Inducible expression of BCR/ABL using human CD34 regulatory elements results in a megakaryocytic myeloproliferative syndrome. *Blood* **102**, 3363-70 (2003).
- Huettner, C.S., Zhang, P., Van Etten, R.A. & Tenen, D.G. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat Genet* **24**, 57-60 (2000).
- Huff, C.A., Matsui, W., Smith, B.D. & Jones, R.J. The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood* **107**, 431-4 (2006).
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H. & Vardiman, J.W. WHO classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. *IARC Press* **3**, 142-145 (2001).
- Jaiswal, S. et al. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10002-7 (2003).
- Jamieson, C.H. et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* **351**, 657-67 (2004).

- Jenkins, J.R., Rudge, K. & Currie, G.A. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* **312**, 651-4 (1984).
- Jiang, X. et al. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* **21**, 926-35 (2007).
- Joerger, A.C., Ang, H.C. & Fersht, A.R. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15056-61 (2006).
- Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A. & Bradley, A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**, 206-8 (1995).
- Junttila, M.R. et al. Selective activation of p53-mediated tumour suppression in high-grade tumours. *Nature* **468**, 567-71 (2010).
- Kelman, Z. et al. Rearrangements in the p53 gene in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* **74**, 2318-24 (1989).
- Kim, C.F. et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* **121**, 823-35 (2005).
- Kim, W.Y. & Sharpless, N.E. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* **127**, 265-75 (2006).
- Koleske, A.J. et al. Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron* **21**, 1259-72 (1998).
- Kress, M., May, E., Cassingena, R. & May, P. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* **31**, 472-83 (1979).
- Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., Golub, T.R. & Armstrong, S.A. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* **442**, 818-22 (2006).
- Kruse, J.P. & Gu, W. Modes of p53 regulation. *Cell* **137**, 609-22 (2009).
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. & Vousden, K.H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303 (1997).
- Kutyavin, I.V., Lukhtanov, E.A., Gamper, H.B. & Meyer, R.B. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res* **25**, 3718-23 (1997).

- Lane, D.P. & Crawford, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-3 (1979).
- Lavigueur, A. et al. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* **9**, 3982-91 (1989).
- Levine, A.J. & Oren, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* **9**, 749-58 (2009).
- Li, C. et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* **67**, 1030-7 (2007).
- Linke, K. et al. Structure of the MDM2/MDMX RING domain heterodimer reveals dimerization is required for their ubiquitylation in trans. *Cell Death Differ* **15**, 841-8 (2008).
- Linzer, D.I. & Levine, A.J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43-52 (1979).
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G. & Evan, G.I. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* **23**, 1686-90 (1995).
- Liu, B., Chen, Y. & St Clair, D.K. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med* **44**, 1529-35 (2008).
- Liu, G. et al. High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4174-9 (2000).
- Liu, X. et al. Interaction between c-Abl and Arg tyrosine kinases and proteasome subunit PSMA7 regulates proteasome degradation. *Mol Cell* **22**, 317-27 (2006).
- Lowe, S.W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307-15 (2004).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75 (1951).
- Maier, B. et al. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* **18**, 306-19 (2004).
- Malkin, D. et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233-8 (1990).

- Marchenko, N.D., Zaika, A. & Moll, U.M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* **275**, 16202-12 (2000).
- Marine, J.C. et al. Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ* **13**, 927-34 (2006).
- Marino, S., Vooijs, M., van Der Gulden, H., Jonkers, J. & Berns, A. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev* **14**, 994-1004 (2000).
- Martín-Zanca, D. Studies of p53 tumor suppression activity in mouse models. *Current Genomics* **3**, 265-283 (2002).
- Martins, C.P., Brown-Swigart, L. & Evan, G.I. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* **127**, 1323-34 (2006).
- Maru, Y. & Witte, O.N. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* **67**, 459-68 (1991).
- Mashal, R. et al. Rearrangement and expression of p53 in the chronic phase and blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* **75**, 180-9 (1990).
- Matheu, A. et al. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* **448**, 375-9 (2007).
- Mauro, M.J. & Druker, B.J. Chronic myelogenous leukemia. *Curr Opin Oncol* **13**, 3-7 (2001).
- Melero, J.A., Stitt, D.T., Mangel, W.F. & Carroll, R.B. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* **93**, 466-80 (1979).
- Melo, J.V. & Barnes, D.J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 441-53 (2007).
- Melo, J.V. & Deininger, M.W. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am* **18**, 545-68, vii-viii (2004).
- Miles, C., Sanchez, M.J., Sinclair, A. & Dzierzak, E. Expression of the Ly-6E.1 (Sca-1) transgene in adult hematopoietic stem cells and the developing mouse embryo. *Development* **124**, 537-47 (1997).

- Miller, S.J., Suthiphongchai, T., Zambetti, G.P. & Ewen, M.E. p53 binds selectively to the 5' untranslated region of cdk4, an RNA element necessary and sufficient for transforming growth factor beta- and p53-mediated translational inhibition of cdk4. *Mol Cell Biol* **20**, 8420-31 (2000).
- Miyamoto, T., Weissman, I.L. & Akashi, K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7521-6 (2000).
- Modi, H. et al. Role of BCR/ABL gene-expression levels in determining the phenotype and imatinib sensitivity of transformed human hematopoietic cells. *Blood* **109**, 5411-21 (2007).
- Moll, U.M. & Petrenko, O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* **1**, 1001-8 (2003).
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S. & Lozano, G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378**, 203-6 (1995).
- Mowat, M., Cheng, A., Kimura, N., Bernstein, A. & Benchimol, S. Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature* **314**, 633-6 (1985).
- Na Nakorn, T., Traver, D., Weissman, I.L. & Akashi, K. Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *J Clin Invest* **109**, 1579-85 (2002).
- Nagy, E. et al. Frequent methylation of p16INK4A and p14ARF genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase. *Eur J Cancer* **39**, 2298-305 (2003).
- Nakai, H. & Misawa, S. Chromosome 17 abnormalities and inactivation of the p53 gene in chronic myeloid leukemia and their prognostic significance. *Leuk Lymphoma* **19**, 213-21 (1995).
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106-10 (2007).
- Olive, K.P. et al. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**, 847-60 (2004).
- Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001008 (2010).

- Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D. & Rotter, V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* **312**, 649-51 (1984).
- Pardal, R., Clarke, M.F. & Morrison, S.J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 895-902 (2003).
- Passegue, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E. & Weissman, I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11842-9 (2003).
- Pear, W.S. et al. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* **92**, 3780-92 (1998).
- Perez-Caro, M. et al. Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment. *Embo J* **28**, 8-20 (2009).
- Perez-Caro, M. & Sanchez-Garcia, I. Killing time for cancer stem cells (CSC): discovery and development of selective CSC inhibitors. *Curr Med Chem* **13**, 1719-25 (2006).
- Primo, D. et al. Impact of BCR/ABL gene expression on the proliferative rate of different subpopulations of haematopoietic cells in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **135**, 43-51 (2006).
- Prince, M.E. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 973-8 (2007).
- Prives, C. & Hall, P.A. The p53 pathway. *J Pathol* **187**, 112-26 (1999).
- Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* **5**, 172-83 (2005).
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-11 (2001).
- Ricci-Vitiani, L. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-5 (2007).
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 402-12 (2008).
- Ryan, K.M., Phillips, A.C. & Vousden, K.H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 332-7 (2001).
- Sablina, A.A. et al. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* **11**, 1306-13 (2005).

- Saintigny, Y., Rouillard, D., Chaput, B., Soussi, T. & Lopez, B.S. Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint. *Oncogene* **18**, 3553-63 (1999).
- Sanchez-Garcia, I., Vicente-Duenas, C. & Cobaleda, C. The theoretical basis of cancer-stem-cell-based therapeutics of cancer: can it be put into practice? *Bioessays* **29**, 1269-80 (2007).
- Sawyers, C.L. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **340**, 1330-40 (1999).
- Shaw, P. et al. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4495-9 (1992).
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P., Roe, B.A. & Canaani, E. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell* **47**, 277-84 (1986).
- Sill, H., Goldman, J.M. & Cross, N.C. Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood* **85**, 2013-6 (1995).
- Singh, S.K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401 (2004).
- Smith, A.E., Smith, R. & Paucha, E. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell* **18**, 335-46 (1979).
- Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17 (1975).
- Srivastava, S., Zou, Z.Q., Pirolo, K., Blattner, W. & Chang, E.H. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* **348**, 747-9 (1990).
- Tasdemir, E. et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* **10**, 676-87 (2008).
- Toledo, F. & Wahl, G.M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* **6**, 909-23 (2006).
- Tomas-Loba, A. et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* **135**, 609-22 (2008).
- Trotta, R. et al. BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer Cell* **3**, 145-60 (2003).

- Tybulewicz, V.L., Crawford, C.E., Jackson, P.K., Bronson, R.T. & Mulligan, R.C. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* **65**, 1153-63 (1991).
- Tyner, S.D. et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415**, 45-53 (2002).
- Vaseva, A.V. & Moll, U.M. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 414-20 (2009).
- Ventura, A. et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445**, 661-5 (2007).
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-10 (2000).
- Voncken, J.W. et al. Restricted oncogenicity of BCR/ABL p190 in transgenic mice. *Cancer Res* **52**, 4534-9 (1992).
- Voncken, J.W. et al. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* **80**, 719-28 (1995).
- Vousden, K.H. & Ryan, K.M. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* **9**, 691-700 (2009).
- Wade, M., Wang, Y.V. & Wahl, G.M. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol* **20**, 299-309 (2010).
- Weinberg, R.A. The biology of cancer. *Garland Science* (2007).
- Wendel, H.G. et al. Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7444-9 (2006).
- Wolf, D. & Rotter, V. Inactivation of p53 gene expression by an insertion of Moloney murine leukemia virus-like DNA sequences. *Mol Cell Biol* **4**, 1402-10 (1984).
- Xin, L., Lawson, D.A. & Witte, O.N. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6942-7 (2005).
- Xue, W. et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656-60 (2007).
- Yonish-Rouach, E. et al. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**, 345-7 (1991).
- Zhang, Y. & Lu, H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* **16**, 369-77 (2009).

