

40
Rej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

UNION ADN-PROTEINAS COMO INDICADOR
DE EXPOSICION AGUDA A ARSENICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
LILIA GALVAN SALDAÑA



MEXICO, D. F.



1998

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

269554

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Ma. del Carmen Parra González _____

Vocal Marina Gavilanes Ruiz _____

Secretario Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte _____

1er. Suplente Elpidio García Ramírez _____

2o. Suplente José Pedraza Chaverri _____

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Toxicología ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

Bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte.



Asesora

Lilia Galván Saldaña



Sustentante

Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto PAPIIT IN 207196.

DEDICATORIA

'El dolor amplía en el corazón el espacio para el gozo.'

A Jesús...

A Don Atri.

A Ramo.

a GRACIAS

**"Dentro de tu opción, haz la mejor vida posible."
San Ignacio de Loyola**

*A mi Madre... porque... no hay palabras para expresar el "gracias" que te mereces.
Por el soporte moral y la ilusión y desilusión que esto significó para ti... en fin... ¡gracias!*

A mi Padre, porque para bien o para mal, si tú no fueras Q.F.B., yo tampoco.

*A mis hermanos, porque si no molestaran tanto no sería lo mismo llegar hasta aquí.
Ahora les he dado ejemplo.*

A Honey en una forma especial, por todo su apoyo, paciencia y amor en las noches de desvelo que compartimos con este trabajo... y en lo cotidiano ¿o no?

A la Dra. Gonsebatt por la oportunidad y la confianza que me dió desde el primer momento; por todos los momentos compartidos, por supuesto su amistad y muy importante también su paciencia. Gracias.

A Paty Ramírez por todo el apoyo técnico en la realización de este trabajo. Y por supuesto por tu amistad y consejos en todo ámbito.

A todos los compañeros de laboratorio, Sra. Delfina, Paty G. y Marta, porque al cumplir con su trabajo hicieron más fácil el mío.

A Ricardo A. Obávez porque tal vez sin quererlo me enseñaste el valor de estudiar y entender la naturaleza más allá de la fe.

Ahora me vienen todos los amigos con quienes estudié a lo largo de la carrera y quiero agradecer especialmente a Gaby Sánchez, Lupita Calderón, Adriana Campos, Ingrid Neyra e Ileana Rodríguez.

RESUMEN

La unión ADN-proteína está implicada en procesos de expresión génica, reparación, replicación y de manera menos específica, en la conformación estructural de la cromatina. La generación de entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas con las que interacciona puede producir interrupciones en la hebra de ADN, originando deleciones importantes durante su síntesis o reparación, lo que puede ocasionar la inactivación o pérdida de genes que pueden ser los involucrados en la supresión de tumores o en secuencias teloméricas cuya preservación resulta esencial en el mantenimiento de la integridad cromosómica.

Dentro del grupo de agentes entrecruzadores, el arsenito de sodio ha demostrado inducir enlaces entre las hebras de ADN y daño cromosómico dependiente de síntesis, por lo que en este trabajo se decidió estudiar su capacidad para inducir complejos ADN-proteínas.

El sistema biológico utilizado fueron ratones de la cepa Balb/c AnN, sometidos a un tratamiento agudo con arsénico. Las dosis utilizadas fueron 4.5, 9 y 12 mg/kg de arsenito de sodio. Una vez transcurridas 3 horas de exposición, se extrajeron los hígados, y enseguida fueron homogeneizados. Del homogenado se aislaron los núcleos y se precipitaron las proteínas unidas al ADN mediante una metodología basada en la propiedad del dodecil sulfato de sodio (SDS) para unirse fuertemente a proteínas y no así al ADN. Posteriormente, al agregar cloruro de potasio (KCl) el SDS se une a éste formando un precipitado insoluble que sedimenta al centrifugar a baja velocidad. Si el ADN está complejado a alguna proteína, al precipitar las proteínas el ADN precipita con ellas. Por digestión de las proteínas el ADN es liberado y luego cuantificado por fluorescencia.

Mediante este método se pudo demostrar que el arsenito de sodio indujo complejos ADN-proteínas de manera significativa en la dosis de 12 mg/kg así como en el control positivo utilizado. Se observó una relación dosis-efecto con una $r=0.56$ y $p=0.001$. Se identificaron a un grupo de citoqueratinas, mediante el uso de anticuerpos específicos en inmunorrépticas, como algunas de las proteínas presentes en los complejos.

Indice

1. Introducción	
1.1 Planteamiento del problema	
1.1.1 Arsénico y daño	2
1.1.2 Daño hepático	3
1.1.3 Exposición aguda a arsénico	3
1.2 Hipótesis	5
1.3 Objetivos	6
2. Antecedentes	7
Mecanismo de acción de los carcinógenos	11
Uniones ADN-proteínas. Generalidades.	
Replicación y reparación	13
2.1.1 El núcleo durante el ciclo celular	20
2.1.2 Interacciones ADN-proteína específicas	22
2.1.3 Interacciones ADN-proteína inespecíficas	24
2.2 Arsénico	
2.2.1 Generalidades	27
2.2.2 Toxicocinética	
2.2.2.1 Absorción	28
2.2.2.2 Distribución	28
2.2.2.2.1 Mecanismo de toxicidad	29
2.2.2.2.2 Metilación	29
2.2.2.2.3 Excreción	30
2.2.3 Toxicodinamia	31

2.3 El hígado	
2.3.1 Anatomía y fisiología	32
2.3.2 Daño inducido por arsénico	33
3. Materiales y métodos	35
3.1 Metodologías	
Tratamiento a ratones	38
Aislamiento de los núcleos	38
Precipitación de complejos	39
Determinación de ADN por fluorescencia	40
Electroforesis	41
Inmunorréplica	42
4. Resultados	43
5. Discusión	56
6. Conclusiones	61
7. Referencias	63

Abreviaturas

ADN	Acido Desoxirribonucleico
IARC	International Agency for Research in Cancer. Agencia Internacional de Investigación contra el cáncer.
CAP	Complejos ADN-proteína
DMA	Acido Dimetilarsinico
WHO	World Health Organization. Organización Mundial de la Salud.
MMC	Mitomicina C
UV	Ultravioleta
MAR	Matrix Attachment Region. Región de unión a la matriz.
SAR	Scaffold Attachment Region. Región de Unión a las proteínas del soporte (matriz).
ARN	Acido ribonucleico
SAMe	S-adenosilmetionina
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación
MMA	Acido Metilarsónico
OFM	Oxidasa de función mixta
ROS	Reactive oxygen species. Especies reactivas de oxígeno.

I. INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema

1.1.1 Arsénico y daño

El arsénico inorgánico ha sido clasificado por la IARC (1980) como un agente carcinogénico. Cuando por exposición ocupacional se entra en contacto con él por vía aérea, hay evidencia de cáncer de pulmón; por otro lado, en caso de exposición por vía oral se presenta un aumento de cáncer de piel, vejiga, riñón, hígado y pulmón (Chen y Lin, 1994). Es posible que los compuestos de arsénico inorgánico interfieran con los mecanismos de reparación del ADN. La frecuencia de aberraciones cromosómicas, dependiente de replicación, se encuentran incrementadas en individuos expuestos a arsénico inorgánico, así como en pacientes que toman medicamentos que lo contienen (Gonsebatt y cols., 1997). El mecanismo por el cual el arsénico induce daño al material genético aún no se conoce. Se han postulado los siguientes:

- a) la posible inhibición de una o más enzimas involucradas en la reparación y la replicación del ADN (Li y Rosman, 1989; Dong y Luo, 1994).
- b) O que al competir el arsénico por los grupos metilo podría generar una hipometilación de las bases de ADN (Mass, 1992).
- c) Inducir la amplificación de genes (Lee y cols., 1989).
- d) La formación de radicales libres capaces de inducir la ruptura en la cadena de ADN (Yamanaka y cols., 1993).

El arsénico inorgánico trivalente puede inhibir la actividad enzimática porque reacciona con los grupos sulfhidrilo de las proteínas; tanto el arsénico pentavalente como el trivalente pueden inhibir la respiración mitocondrial por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Esto sugiere que el arsénico podría remplazar al fósforo en la cadena de ADN.

1.1.2 Daño hepático

Los arsenicales inorgánicos y diversos arsenicales orgánicos hoy obsoletos son particularmente tóxicos al hígado.

En lo referente a los efectos hepáticos por exposición crónica al arsénico, se ve que este se acumula en el hígado (Morris y cols., 1974). Los trastornos asociados a este tipo de exposición al metaloide son: fibrosis, cirrosis, hipertensión portal, angiosarcoma y daño por oclusión de las venas. Aunque no ha sido muy documentado, es posible que el daño se presente a nivel de endotelio vascular más que por acción directa sobre el hepatocito (Del Razo, 1997).

Los hepatocitos se ocupan de diversas reacciones de transformación y conjugación de extraordinaria importancia para la detoxificación de algunos compuestos endógenos y exógenos nocivos para el organismo. Muchos de los fármacos liposolubles terapéuticos hasta plaguicidas y otras sustancias tóxicas al organismo son metabolizadas y detoxificadas por los hepatocitos (Comark, 1988).

1.1.2 Exposición aguda a arsénico

El daño agudo involucra a sangre, corazón, cerebro, riñón y tracto gastrointestinal. Una ingestión aguda puede causar tanto trastornos agudos como crónicos. En humanos, en caso de exposición aguda, las molestias son principalmente gastrointestinales y se presentan una hora después de haberlo ingerido; si previamente se habían ingerido alimentos, las molestias gastrointestinales se presentarán hasta 12 horas después de la ingestión. El individuo se queja de calambres intensos en músculo estriado y sed profunda. Al perderse líquido aparecen síntomas de choque. En fase terminal surgen a veces convulsiones hipóxicas con coma y muerte. Algunos casos reportan daño a cerebro (Hardman y cols., 1996).

En cuanto a la exposición aguda a arsénico en ratones sabemos que causa una disminución importante en la respiración tisular hepática.

En ratones expuestos a 50 ppm de arsénico trivalente en el agua de bebida se observaron cambios estructurales en los hepatocitos, mismos que consistían en una invaginación de la membrana nuclear, engrosamiento de la superficie mitocondrial y pérdida de glucógeno; en cuanto a cambios tardíos se encuentra la presencia de estructuras laminares densas en los peroxisomas (Mohelska y cols., 1980).

Debido a su ubicuidad en el ambiente estamos continuamente en contacto con arsénico ya sea en el agua de bebida, en alimentos de origen marino, en herbicidas, pesticidas y también por su uso en la industria.

1.2 Hipótesis

Al momento que entramos en contacto con el arsénico, el organismo se da a la tarea de eliminarlo; en el proceso de eliminación el arsénico pasa por el hígado con el propósito de hacerlo menos dañino por medio de una biometilación para su posterior eliminación por heces y orina.

Asimismo, se ha encontrado en ratones que un metabolito del DMA es capaz de reaccionar con oxígeno molecular y generar el radical peróxido ($H_2O_2^{\cdot}$), inductor de rupturas en la cadena de ADN.

Es posible que en el proceso de detoxificación del arsénico se generen radicales libres en las macromoléculas celulares generando uniones ADN-proteínas, que provoque interrupciones en la hebra de ADN, originando deleciones o problemas en los procesos de reparación y replicación del mismo.

De esto se desprende la siguiente hipótesis: “ si durante la exposición aguda a arsénico se inducen uniones ADN-proteínas en proporciones cuantificables, estas permanecen en la célula como un indicador de que se estuvo en contacto con el metaloide a una dosis importante. Con lo que los entrecruzamientos ADN-proteína serían una prueba útil para el diagnóstico temprano de exposición no sólo a arsénico sino incluso a otros elementos que actúan similarmente.”

1.3 Objetivos

Objetivo general

Determinar la presencia de uniones ADN-proteínas inducidos en hígado de ratones por arsenito de sodio.

Objetivos particulares

1. Determinar la relación dosis-efecto entre los diferentes tratamientos y la proporción de complejos aislados.
2. Comparar la inducción de complejos ADN-proteína (CAP) con arsenito de sodio contra la inducción de un control positivo.
3. Caracterizar las proteínas involucradas en la formación de estos complejos.

2. ANTECEDENTES

El desarrollo científico y tecnológico ha mejorado indudablemente las condiciones de vida de nuestra especie, pero al mismo tiempo ha producido severos cambios en el medio ambiente. Se estima que cada año se producen aproximadamente 260 millones de toneladas de desechos tóxicos solamente en los Estados Unidos (Simmons y cols., 1988). El origen de la mayoría de estas sustancias tóxicas se halla en los procesos industriales. La contaminación ambiental generada en el ambiente de trabajo, por el uso extensivo de fertilizantes y plaguicidas en la agricultura, y por los desechos tóxicos generados por la industria química, médica y los desechos radioactivos, representan un riesgo para la salud de las comunidades en contacto con ellos (Sullivan y Krieger, 1992). Es por ello que reconocer la presencia e identidad de los agentes peligrosos en el ambiente y el alcance o el nivel de la exposición a ellos, es extremadamente importante para poder estudiar los efectos que estos tengan en la salud humana (WHO, 1985).

Tomatis (1990) menciona que el 90% de los diferentes tipos de cáncer conocidos se originan por exposición ambiental u ocupacional. Los carcinógenos así originados, llamados carcinógenos químicos, son las sustancias tóxicas que producen cáncer en animales o en seres humanos. Estos agentes son absorbidos, activados y metabolizados como cualquier otra sustancia química o cualquier otra toxina, sin embargo actúan de manera específica. Los carcinógenos químicos tienen efectos acumulativos y tardíos, las exposiciones crónicas a pequeñas cantidades son efectivas y su acción a nivel de los ácidos nucleicos es también específica (IARC, 1987).

Existen procesos industriales que están asociados fuertemente con el desarrollo de cáncer, a pesar de que el agente causal no se haya identificado, ellos incluyen la manufactura de aminas (cáncer de vejiga), colorantes (cáncer de pulmón), cadmio (cáncer de próstata), arsénico (cáncer de pulmón), la minería de hematita (cáncer de pulmón), níquel (cáncer de cavidad nasal y de pulmón) y la industria hulera (cáncer de pulmón) (Piantadosi y Sullivan, 1992).

La Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) considera que los agentes y procesos enlistados en la Tabla 1 resultan carcinogénicos para el ser humano (IARC, 1987). Esta información ha sido obtenida a partir de los resultados de estudios epidemiológicos en poblaciones humanas expuestas y de estudios en animales de laboratorio.

Tabla 1. AGENTES QUIMICOS Y PROCESOS CARCINOGENICOS PARA EL HOMBRE (fuente: IARC)

Aceites minerales, sin tratar y levemente tratados
Aflatoxinas
Alcohol isopropílico, manufactura de, proceso fuertemente ácido
Aluminio, la producción de
4-Aminobifenil
Anticonceptivos orales, combinación ¹
Anticonceptivos orales, secuenciales ¹
Arsénico y productos arsenicales*
Asbestos
Auramina, la manufactura de
Azatioprina
Benceno
Benzidina
Betel, nuez de, con tabaco
N,N-Bis(2-cloroetil)-2-naftilamina(Clornafcina)
Bis(clorometil)eter y clorometil metil eter (grado técnico)
Botas y zapatos, manufactura y reparación de
1,4-Butanodiol dimetanosulfonato (Mileran)
Carbón mineral, alquitrán de hulla
Carbón mineral, gasificación de
Carbón mineral, minería de
Clorambucil
1-(2-Cloroetil)-3-(4-metilciclohexyl)-1-nitrosourea (metil-CCNU)

Ciclosporina
Cocaína, producción de
Ciclofosfamida
Cromo hexavalente, compuestos de*
Dietilestilbestrol
Erionita
Estrógeno, terapia de reemplazo
Estrógeno, no esteroideo*
Estrógeno, esteroideo*
Esquistos, aceites de
Hematita, minería subterránea de, con exposición a radón
Hierro y acero, fundición de
Hollín
Magenta, manufactura de
Melfalán
8-Metoxipsoralen e irradiación ultravioleta A
MOPP (terapia combinada con mostaza de nitrógeno, vincristina, procarbazona y prednisona) y otras quimioterapias combinadas que incluyan agentes alquilantes
Mostaza, gas de
Muebles y gabinetes de madera, trabajo con
2-Naftilamina
Níquel, compuestos de*
Pintura, exposición ocupacional a
Radón
Hule, industria del
Tabaco, productos de, tabaco sin humo
Tabaco, humo del
Talco, que contenga fibras asbestiformes
Tiotepa, tris(1-aziridinil)sulfito de fosfina
Trosulfan
Vinilo, cloruro de

*Se refiere a un grupo de sustancias químicas o procesos y no necesariamente a todos los compuestos.

¹ Estos agentes tienen un efecto protector contra cánceres de ovario y de endometrio.

Mecanismos de acción de los Carcinógenos

Según Legator y Au (1994), un carcinógeno típico, puede inducir los siguientes eventos: a) el cambio genético inicial que conduce a una célula iniciada, b) puede generar especies reactivas de oxígeno que pueden causar más daño genético, c) produce alteraciones genéticas posteriores a las iniciales, incluyendo la activación de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores, d) estimula la expansión clonal de la célula iniciada (promoción) y/o acelera la proliferación celular y, e) puede modificar la respuesta inmune.

Se ha podido comprobar que el sitio primario de acción de muchos carcinógenos químicos es el ADN, por lo que la investigación mecanística trata de reconocer los nucleótidos a los que los carcinógenos se unen, el tipo de unión o de aductos que se forman. Muchos detalles han sido elucidados en el caso de la metilnitrosourea, conociéndose que produce iones carbonium, así como su sitio de unión a la guanina. En los seres humanos no existe evidencia que demuestre que los aductos del ADN que no estén unidos covalentemente, puedan causar cáncer. Sin embargo en bacterias, aún las sustancias intercalantes son mutagénicas, lo que hace sospechar que la unión covalente no sea necesaria en otras especies (Piantadosi y Sullivan, 1992).

Las evidencias que apoyan al ADN como un blanco crítico en el proceso carcinogénico se basan en:

1. La mayoría de los cánceres presentan anomalías cromosómicas.
2. La mayoría de los cánceres presentan expresión génica anormal.
3. Muchos cánceres presentan activación de oncogenes.
4. Las neoplasias se autopropagan, es decir el cáncer se hereda al nivel celular.

5. Algunas alteraciones genéticas predisponen al cáncer.
6. Los carcinógenos reaccionan covalentemente con el ADN.
7. Los defectos en la reparación del ADN predisponen al cáncer.

Las sustancias mutagénicas inducen cambios específicos en el ADN a nivel de: a) secuencia nucleotídica, b) estructura cromosómica o c) número cromosómico. Los cambios nucleotídicos son identificados como mutaciones génicas, mientras que las alteraciones cromosómicas son identificadas como daño citogenético clastogénico (b) o aneuploideogénico (c).

Se ha podido demostrar que 19 de los 27 carcinógenos estudiados (un 70%) inducen daño citogenético (Sorsa y cols., 1992). Muchos carcinógenos son agentes químicos o físicos que inducen entrecruzamientos entre las macromoléculas celulares como el ADN y las proteínas. Tal es el caso de las radiaciones ionizantes, la radiación ultravioleta (UV), carcinógenos como la mitomicina C (MMC), el cis-Platino (cis-Pt), el arsénico, el cromo, etc., que también inducen aberraciones cromosómicas dependientes de replicación, es decir que para que la fragmentación cromosómica ocurra el material genético tiene primero que replicarse.

Es por ello que los entrecruzamientos ADN-proteínas podrían estar involucrados en este tipo de daño.

Uniones ADN-proteínas

Generalidades. Replicación y reparación

El núcleo es el centro de control de toda la célula ya que contiene al ADN. Está separado del resto de la célula por una doble membrana conocida como envoltura nuclear. Los ribosomas, ARNm, proteínas cromosómicas y enzimas necesarias para la actividad nuclear se transportan a través de ella debido a la presencia de los poros nucleares, que son los canales de paso. En el crecimiento o diferenciación celular el núcleo es el sitio metabólicamente más activo (Becker, 1986).

Casi todo el ADN de células diferenciadas está presente como cromatina. La cromatina es el complejo formado entre el ADN, histonas y proteínas no histónicas. Es decir, que la cromatina es el material de que están compuestos los cromosomas (DeRobertis, 1996). Ocupa todo el núcleo de las células que no están en mitosis y llega a estar altamente condensada en los cromosomas, tan pronto como el proceso de replicación es terminado. Las histonas desempeñan un papel fundamental en el enrollamiento de la cromatina, (Figura 1). Son proteínas con una alta porción de aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina) lo que facilita su unión con el ADN, molécula que tiene predominancia de cargas negativas (DeRobertis, 1996).

La cromatina a menudo parece estar unida a una matriz nuclear proteica y, al parecer, esta unión es necesaria para la transcripción o replicación del ADN. Los sitios de ADN unidos a estructuras proteicas en el núcleo interfásico son llamadas MAR (del inglés matrix attachment regions), algunas veces se les refiere como SAR (del inglés scaffold attachment regions), ambos casos se refieren a la matriz nuclear (Lewin, 1997). Las estructuras de la matriz son llamadas componentes del “esqueleto” o del “soporte” (scaffold).

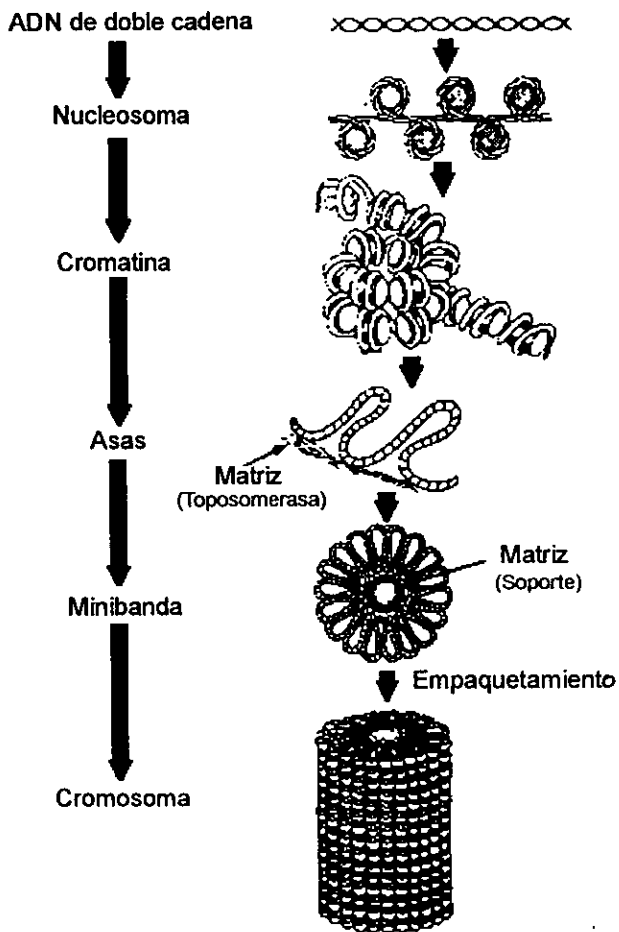


Figura 1. Esquema de los niveles de organización en la cromatida de un cromosoma. Aproximadamente 160 pares de bases de la hélice de ADN que da casi dos vueltas alrededor del octámero de histonas para formar los nucleosomas (Pienta y cols., 1989).

Algunas de las proteínas que constituyen la matriz nuclear muestran una unión en una secuencia específica al ADN, conocida como MAR; estas secuencias han sido postuladas con base en las asas cromosomales (Alberts y cols., 1994) (Figura 2).

La matriz nuclear está definida como un subcomponente estructural dinámico del núcleo que dirige la organización tridimensional del ADN en asas y provee sitios para el anclaje intranuclear específico de los ácidos nucleicos y el transporte de partículas. Tiene un papel importante en la replicación, ya que contiene sitios de arreglo para la síntesis del ADN localizados en las asas. Las horquillas de replicación, la ADNpolimerasa α , y el ADN sintetizado *de novo* están estrechamente asociados a la matriz nuclear durante la síntesis. El ADN sintetizado *de novo* se une covalentemente a la topoisomerasa II en el núcleo interfásico (Pienta y cols., 1989). El ADN recién sintetizado está estrechamente unido a la matriz por un complejo multienzimático llamado replicasa, en el que aparecen involucradas al menos seis enzimas.

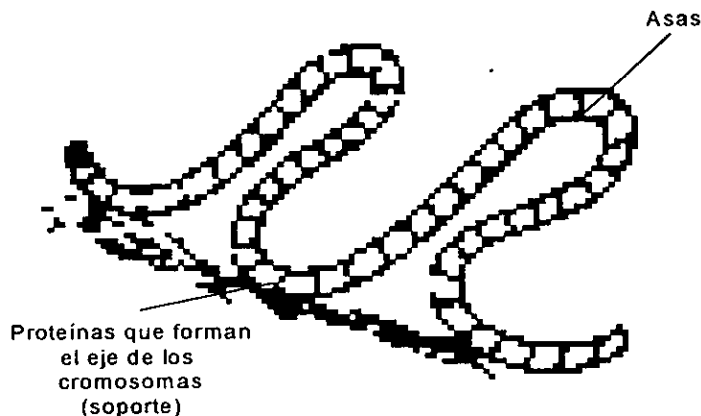


FIGURA 2: Un modelo de la estructura cromosómica. Una sección de un cromosoma se dobla formando una serie de asas. En los sitios de unión con la cromatina, la matriz ayuda a organizar los cromosomas, localizar los genes y regula la transcripción del ADN y replicación en el núcleo (Alberts y cols., 1994).

De entre las proteínas que se unen frecuentemente a la cromatina están las enzimas directamente involucradas en la replicación del ADN y son: 1) ADN girasa, 2) helicasas, encargadas de separar la cadena de ADN para formar la horquilla de replicación; 3) proteínas que previenen el realineamiento de las cadenas antes de la replicación; 4) enzimas que sintetizan los oligonucleótidos de ARN, 5) la ADN polimerasa; 6) la ARNasa para remover los primers de ARN, y 7) ligasa, una enzima que une covalentemente a los fragmentos de Okazaki en la hebra de síntesis discontinua (Figura 3).

En mamíferos el proceso de replicación se agiliza, pues un gran número de horquillas progresan simultáneamente; esto sirve para agilizar el proceso. En eucariotes, a diferencia de las bacterias, se trata de un proceso más complejo debido a la organización del ADN en cromosomas y a la gran cantidad del mismo (Devlin, 1996).

Al iniciar la duplicación del ADN, las proteínas son reclutadas para originar el ensamblaje multiproteico de la maquinaria de replicación (Fig.5 izquierda) y este ensamblaje acciona el inicio de las horquillas de replicación (Fig.5 derecha). Los componentes de la replicación acompañan el seguimiento de las horquillas, dejando detrás un origen "gastado", es decir, un origen que no inició la replicación en ese sitio del ADN. Consecuentemente, la reiniciación requerirá el ensamblaje de nuevos componentes en el origen de la replicación. Si este ensamblaje es restringido a una parte del ciclo celular y la iniciación de las horquillas de replicación a otra, entonces el disparo del origen ocurrirá una sola vez por ciclo (Su y cols., 1995).

Otras proteínas que interactúan constantemente con el ADN son las enzimas encargadas de la reparación. Su función es vital, ya que si bien la supervivencia de una especie puede deberse a cambios genéticos que permiten la evolución, la supervivencia del individuo demanda una estabilidad genética.

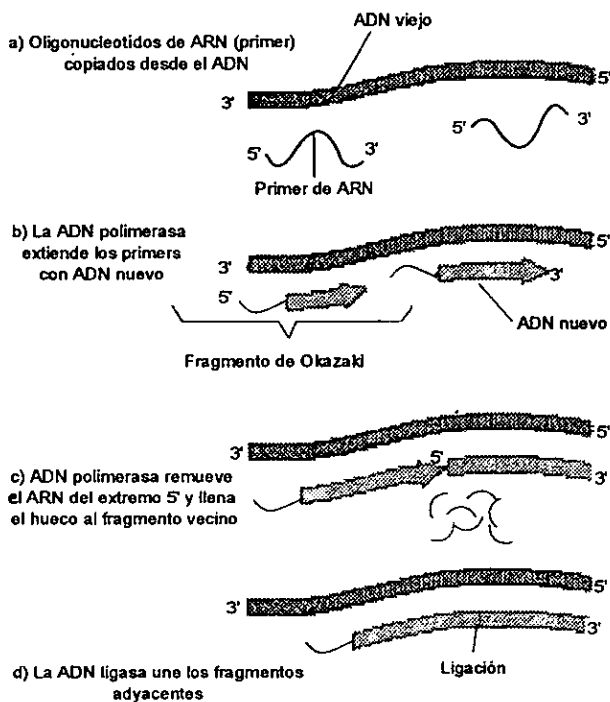
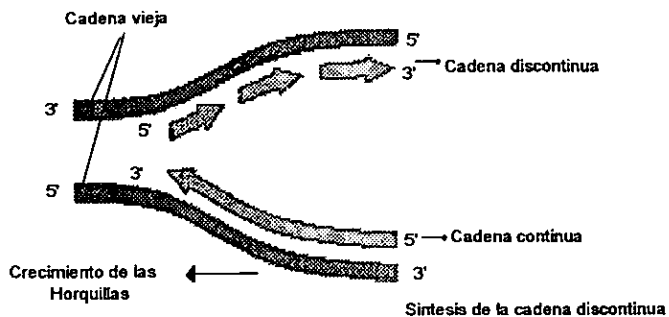


Figura 3. Esquema de replicación de ADN. La síntesis de la cadena continua es catalizada por la ADNpolimerasa III. La parte complicada es la replicación de la cadena fragmentada que involucra varios pasos (Lodish y cols. 1995).

El ADN no es una sustancia inerte y a pesar de estar protegido por las proteínas que forman parte de la cromatina, es sensible a la presencia de una variedad de sustancias tóxicas como mutágenos, la descomposición térmica de nucleótidos, la radiación UV, la radiación ionizante, los carcinógenos, etc., existentes en el medio, así como en el interior de la célula, que tienen la capacidad de modificar las bases o de alterar los grupos fosfato-azúcar. Como se mencionó antes, existen además errores de copia ocasionales introducidos por las ADNpolimerasas durante la replicación.

Los mecanismos de reparación pueden ser divididos en dos categorías: una, el daño al ADN es directamente reparado; otra, la más común, la región dañada es removida por un sistema de nucleasa especializado y entonces el hueco es llenado correctamente. El proceso de reparación por escisión involucra los siguientes pasos: a) el segmento dañado de ADN debe ser reconocido como distinto al ADN no dañado; b) la cadena dañada es abierta por una endonucleasa; c) una exonucleasa remueve una porción de la cadena dañada, dejando un hueco de una sola cadena; d) una ADNpolimerasa y una ligasa colaboran en la reparación del hueco usando la cadena no dañada como templado (Figura 4).

La bacteria *E.coli* utiliza el mecanismo llamado UvrABC para reparar por escisión la formación de aductos; este mecanismo es capaz también de reparar los dímeros de timina que son inducidos por exposición a luz UV, además de otro tipo de lesiones causadas al ADN por carcinógenos. De ahí que cuando hay mutaciones a nivel de los genes que codifican para estas proteínas reparadoras queda el organismo expuesto a toda suerte de daño en el ADN.

Existe una gran similitud en el mecanismo molecular de reparación por escisión entre *E. coli*, levaduras, hámsters y humanos. Las proteínas reparadoras de las levaduras tienen gran similitud secuencial con las de humanos y éstas a su vez con la proteína UvrC de *E. coli* (Lodish y cols., 1995).

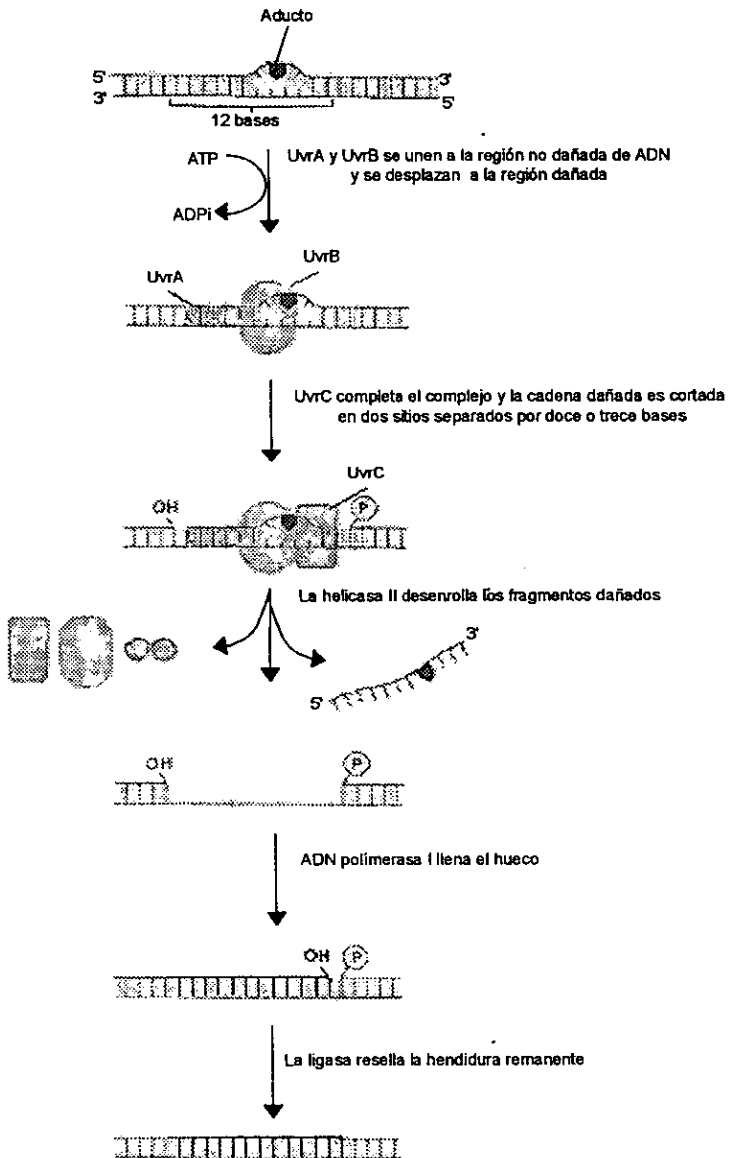


Figura 4. Reparación por escisión. Este mecanismo se utiliza para la reparación de aductos, dímeros de timina y otras formas de daño que modifican la estructura normal del ADN (Lodish y cols., 1995).

2.1.1. El núcleo durante el ciclo celular

Durante la mitosis la célula se divide en dos células hijas. Este paso es seguido por un periodo de pausa designado fase G_1 durante el cual no hay síntesis de ADN. A la fase G_1 lo sigue la fase S donde hay síntesis de ADN; y después viene una pequeña pausa que es conocida como fase G_2 , para finalmente entrar en mitosis otra vez. En los eucariontes superiores pocas células del organismo se dividen activamente, la mayoría están en descanso en una corta fase, llamada G_0 , después de la mitosis. Pero algunas células diferenciadas tales como las musculares y las neuronas nunca se dividen después de su diferenciación, y asumen un estado de quietud de la fase G_0 (Adams, 1992).

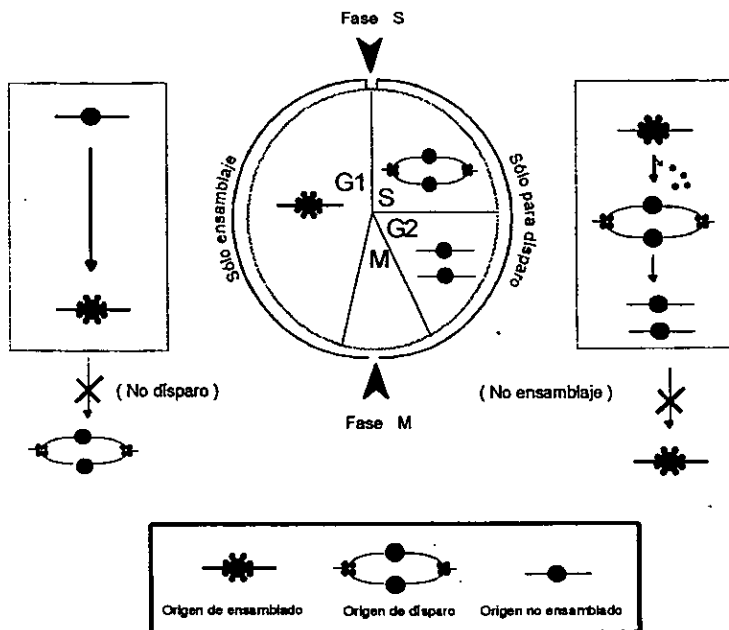


Figura 5. Modelo para limitar la replicación del ADN a una por ciclo celular. La formación de un origen de replicación involucra el ensamblaje de factores esenciales para la replicación en un sitio marcado del ADN (ORC, origin recognition complex). (Su y cols.,1995).

La célula toma la decisión irreversible de proliferar durante la fase G₁. Esto se inhibe si le faltan nutrientes o si está en contacto con otras células (inhibición por contacto). Por el contrario, la síntesis de ADN se ve inducida por varios agentes como carcinógenos o virus tumorales, los cuales disparan sin control la proliferación celular (cáncer); también las intervenciones quirúrgicas que inducen regeneración de tejidos; o bien moléculas conocidas como mitógenos, las cuales se unen a receptores de la superficie celular iniciando una serie de eventos que llevan a la división celular (Voët, 1997).

Es durante la fase S que se duplica el ADN y las moléculas nucleares que lo acompañan. En el control de la división celular intervienen dos tipos de moléculas: las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas. En las células de animales superiores se han encontrado dos cinasas: la cdk2 y la cdc2, esta última al ser activada por una ciclina, fosforila a diversas proteínas que cumplen funciones esenciales en la consumación de la mitosis, por ejemplo: algunas proteínas asociadas a los filamentos de actina y a los microtúbulos del citoesqueleto; también las láminas de la lámina nuclear, la histona H1, etc. Es decir, cuando actúa sucede lo siguiente:

1. Se desintegra el armazón de filamentos de actina, así la célula pierde contacto con sus células vecinas.
2. Se desarman los microtúbulos interfásicos pero otros se agrupan para dar lugar a las fibras del uso mitótico.
3. Se disgrega la lámina nuclear y con ella la envoltura del núcleo.
4. Se modifica la forma como la histona H1 se asocia al ADN lo que lleva al enrollamiento y compactación de los cromosomas (De Robertis, 1996).

Como ya se mencionó la replicación del ADN está asociada con la matriz nuclear y algunas de las enzimas involucradas en la síntesis del ADN son sintetizadas o activadas al inicio de la fase S (Adams y cols., 1992).

2.1.2 Interacciones ADN-proteína específicas

Como ya hemos descrito con detalle en los párrafos anteriores, la organización estructural del ADN en células eucariotas y la regulación de las funciones del ADN son estrictamente dependientes de una multitud de interacciones ADN-proteínas. El reconocimiento de secuencias específicas de los pares de bases del ADN a proteínas involucradas en la regulación de la transcripción es solo una faceta de las interacciones ADN-proteínas (Revzin, 1990).

Antes de que un gen pueda ser transcrito al ARN debe haber un sitio de unión específico en el ADN el cual es reconocido por proteínas. La posición específica de una proteína o complejo de proteínas en una secuencia particular del ADN requiere de la interacción favorablemente estérica entre la proteína y su sitio de unión.

En el caso particular de interacciones ADN-proteínas, el modelo original para reconocimiento selectivo involucra principalmente puentes de hidrógeno entre las proteínas y las bases, el resto de la molécula de ADN, los fosfatos y los azúcares, se considera carente de suficiente información para la selectividad. La unión de una proteína a una secuencia específica de ADN es dependiente de dos tipos de interacciones. La base principal para la selectividad de la secuencia es el contacto directo entre la cadena polipeptídica y el borde expuesto de los pares de bases; estos contactos involucran puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals (Travers, 1993).

Como la doble hélice de ADN es rígida, el doblado necesario para su empaquetamiento está normalmente mediado por proteínas que por ellas mismas promueven el ensamblaje dentro de un alto orden de estructuras nucleoproteicas. Sin embargo, además de su papel en la estructura primaria, el doblado de ADN es también un componente esencial en la formación de los complejos nucleoproteicos requeridos para los sitios específicos en la recombinación y en la iniciación de la transcripción y la replicación.

Algunas proteínas, de las cuales las nucleasas son el mejor ejemplo, interaccionan con una región relativamente corta de ADN con baja selectividad.

En dos casos hay evidencia sustancial de que la conformación local particular del ADN es necesaria para producir interacción. Uno de los mejores estudios ejemplificantes de este tipo de interacción involucra deoxirribonucleasa bovina pancreática I (ADNasa I). Esta enzima bajo condiciones estándar, introduce una sola escisión en la cadena doble (Figura 6). Sin embargo la velocidad de ruptura de esta enzima varía a lo largo de la secuencia de ADN, indicando con esto que la enzima es sensible a cambios estructurales en la doble cadena de ADN (Travers, 1993).

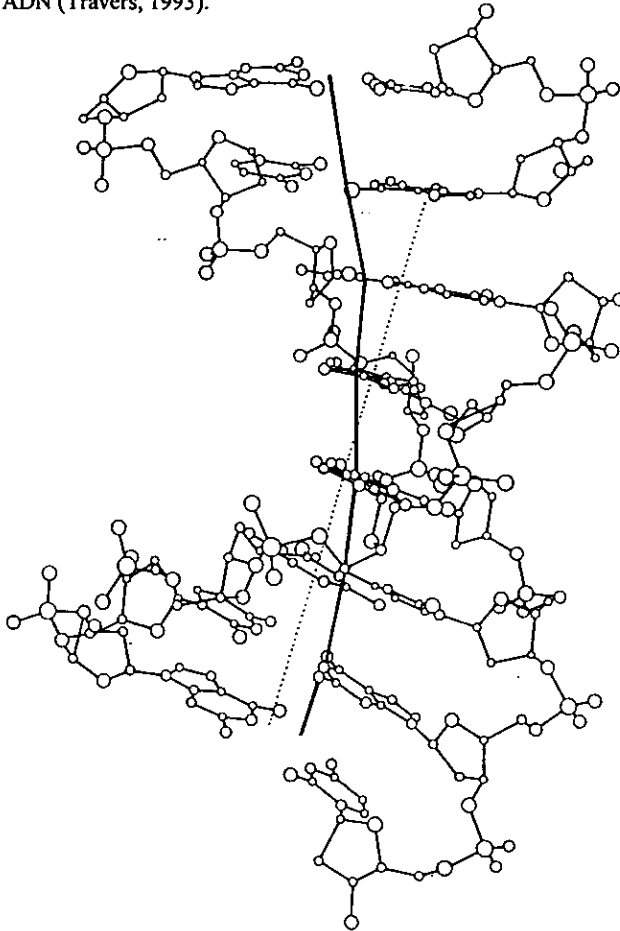


Figura 6. La interacción de ADNasa I con ADN. La ADNasa I induce un doblez en el eje de la hélice de ADN (Travers, 1993).

2.1.3 Interacciones ADN-proteínas inespecíficas

Muchos otros tipos de proteínas están involucradas en la regulación y manipulación del genoma en las diferentes fases del ciclo celular, y sus interacciones específicas están basadas en diferentes aspectos de la estructura del ADN. Por ejemplo, varios procesos celulares involucran la exposición transitoria de secuencias de una sola cadena en la célula como parte de la transferencia de información de ADN a ADN (y de ADN a ARN). Estos procesos incluyen replicación, recombinación y reparación y un participante central en todos ellos son las proteínas que se unen fuerte y cooperativamente a tales intermediarios de una sola cadena (Revzin, 1990).

El complejo de histonas también muestra especificidad por el ADN enrollado más que por una secuencia; sin embargo, los sitios de unión a la doble cadena son más comunes que las uniones a una sola cadena de ADN.

Porque el ADN y el ARN son polielectrolitos, sus interacciones con proteínas generalmente tienen un componente electrostático sustancial. Es claro que las interacciones ADN-proteínas inespecíficas están involucradas en varios procesos fundamentales *in vivo*. Quizá el mejor ejemplo de esto son los nucleosomas.

La formación del nucleosoma no es particularmente una secuencia específica de ADN. Las uniones a proteínas no específicas pueden servir para salvaguardar a los ácidos nucleicos de una degradación (Revzin, 1990).

2.1.4 Uniones ADN-proteínas inducidas: entrecruzamientos

Un número de observaciones avalan la importancia biológica de los entrecruzamientos ADN-proteína. Por ejemplo, la sensibilidad demostrada por las curvas de crecimiento de una bacteria tratada con luz UV, se asocia al grado de entrecruzamientos ADN-proteínas, lo que sugiere que éstos son biológicamente importantes (Friedberg, 1985).

El ADN de las células de mamífero está ampliamente relacionado con proteínas involucradas en la regulación de expresión génica y estructura de la cromatina, como se describió anteriormente. La mayoría de los químicos que reaccionan con ADN también

reaccionan con proteínas, por lo que es lógico esperar que proteínas y aminoácidos se acomplejen al ADN.

Esto se apoya en el hecho de que muchos químicos incrementan la formación de radicales oxígeno en las células causando la oxidación de aminoácidos, proteínas y ADN. En algunos casos el reactivo químico por sí mismo participa directamente en la unión de una proteína o aminoácido hacia el ADN (Costa y cols., 1996).

Las uniones ADN-proteínas son importantes lesiones genotóxicas inducidas por agentes ambientales y carcinógenos como luz UV, radiación γ , agentes alquilantes, formaldehído, benzo[a]-pireno, nickel, cromato y cis- o trans- platino (II) (Lei y cols., 1995). Es decir, son ocasionadas por agentes ambientales físicos y químicos e incluso de uso clínico. Debido a la pobre capacidad de reparación de la célula para disociar los entrecruzamientos ADN-proteínas, éstos pueden estar presentes durante la replicación del ADN y posiblemente causen la pérdida importante de material genético que podría ser vital, como por ejemplo, inactivar genes supresores de tumores (Miller y Costa, 1989).

Los entrecruzamientos no son una clase homogénea de aductos de ADN porque se forman por diferentes clases de mecanismos químicos e involucran diferentes grupos de unión y diferentes proteínas. Por ejemplo, los entrecruzamientos producidos por aldehídos y metales se forman involucrándose el agente químico, el cual sirve como puente para el entrecruzamiento del ADN a alguna proteína (Costa y cols., 1997). Los agentes físicos como la radiación ionizante y la luz ultravioleta entrecruzan directamente el ADN a las proteínas por activación de los grupos químicos que los constituyen.

Algunos fármacos antineoplásicos pueden producir entrecruzamientos ADN-proteínas por la estabilización de intermediarios covalentes entre las topoisomerasas y el ADN. Del origen de formación de los entrecruzamientos en la célula depende que las lesiones persistan en la célula: el cromo VI ha demostrado ser uno de los agentes responsable de lesiones que persisten más en la célula expuesta; mientras que la radiación ionizante forma complejos ADN-proteína menos estables (Costa y cols., 1997).

Las uniones ADN-proteínas son uno de los mayores tipos de daño que afectan al ADN, son producidos en cromatina aislada y en células de mamíferos por ionización y radiación UV. La evidencia indica que las uniones químicas involucradas en este tipo de uniones son de naturaleza covalente (Nackerdien y cols., 1992).

Poco se sabe sobre las consecuencias biológicas de los entrecruzamientos, ya que su estudio no es fácil. Datos obtenidos sobre agentes inductores de entrecruzamientos en cultivos celulares sugieren que la formación de los mismos interfiere con la replicación del ADN, lo cual puede llevar a la pérdida de material genético dando como resultado eventos mutagénicos.

Hay algunos casos de exposición aérea a formaldehído en donde el tejido nasal presentó entrecruzamientos ADN-proteína como para ser un útil indicador de exposición. Se encontró también que la exposición a cromo VI por vía aérea producía altas cantidades de entrecruzamientos ADN-proteínas en linfocitos, sugiriendo su uso potencial como indicador de exposición (Costa y cols., 1997).

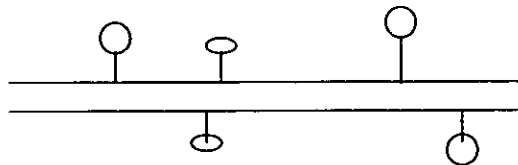
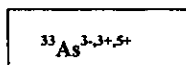


Figura 7. Modelo de un complejo ADN-proteína. Distribución al azar.

2.2 Arsénico

2.2.1 Generalidades

El arsénico es un elemento abundante en la naturaleza. Perteneció al grupo VA de la tabla periódica; su número atómico es 33 y su masa atómica de 74.9; está clasificado como elemento de transición o metaloide, esto es que comparte algunas propiedades tanto físicas como químicas con los metales. Sus números de oxidación más comunes son 3-, 3+ y 5+.



No es un elemento simple, pues su comportamiento químico es muy complejo, lo que da lugar a múltiples compuestos arsenicales presentes en forma inorgánica y orgánica. Los compuestos arsenicales pentavalentes son los más estables en la naturaleza; en cuanto a los trivalentes, los más comunes son el arsenito de sodio NaAsO_2 , trióxido de arsénico As_2O_3 y cloruro arsenioso AsCl_3 .

Además de su ocurrencia natural, existen actividades humanas que emiten arsénico al medio ambiente, tal es el caso de combustibles fósiles (carbón, madera), estaciones generadoras de energía eléctrica, procesos de fundición y refinación de metales no ferrosos (plomo, zinc, cobre), el uso de preservadores para la madera, la manufactura de semiconductores para la industria electrónica elaborados a base de arseniuro de galio (GaAs) e indio (InAs) y los depósitos de desechos químicos con grandes cantidades de arsénico almacenadas inadecuadamente. Se ha utilizado de una forma u otra como pesticida, herbicida y rodenticida; en la manufactura del vidrio, pigmentos, pinturas y aleaciones. El mortal gas arsina (AsH_3) es usado en la manufactura de microchips en la industria de semiconductores.

2.2.2 Toxicocinética

2.2.2.1 Absorción

Las principales vías de entrada del arsénico al organismo son gastrointestinal y tracto respiratorio, aunque también se ha reportado absorción a través de la piel.

La absorción gastrointestinal de compuestos arsenicales depende de su solubilidad en agua principalmente. En seres humanos y en la mayoría de las especies animales, la absorción llega a ser mayor al 90% cuando es administrado en forma acuosa (Tam y col., 1979).

La absorción por el tracto respiratorio depende del tamaño de partícula inhalada, así como la solubilidad del compuesto arsenical (ATSDR, 1993).

2.2.2.2 Distribución

Una vez absorbido, el arsénico es transportado a través de la sangre a diferentes órganos y tejidos. Los compuestos arsenicales (orgánicos e inorgánicos) tienden a acumularse en grandes cantidades principalmente en pulmón, hígado, piel y riñón. El arsénico trivalente se une fuertemente a grupos sulfhidrilo de la queratina, depositándose en grandes cantidades en pelo y uñas.

Previamente a la metilación del arsénico inorgánico, se realiza una importante unión de arsénico inorgánico con algunas proteínas hepáticas, lo que sugiere que este evento representa el primer paso de detoxificación de arsénico inorgánico ya que lo hace menos disponible (Bodgan y cols., 1994).

La metilación del arsénico se realiza principalmente en la fracción citosólica del hígado, siendo la S-adenosilmetionina (SAME) el principal donador de grupos metilo y se cree que el glutatión reducido (GSH) es el donador de electrones para la reducción de los compuestos arsenicales.

2.2.2.2.1 Mecanismo de toxicidad

El mecanismo más importante que se postula para explicar la toxicidad de los compuestos arsenicales trivalentes es a través de su afinidad por los grupos sulfhidrido de las proteínas. Las enzimas son particularmente afectadas si el grupo sulfhidrido ($-SH$) está ubicado en un sitio crítico para su actividad (Jha y cols., 1992).

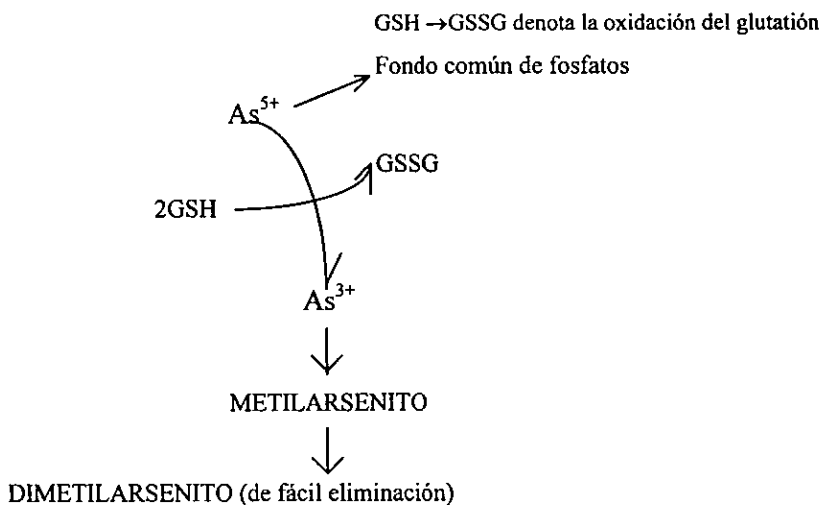


Figura 8. Biotransformación del arsénico en el ser humano (Goodman y Gilman, 1996).

2.2.2.2.2 Metilación

En la actualidad aún no se conoce con exactitud el proceso de biotransformación del arsénico, sin embargo, se han aceptado hipótesis como la propuesta por Cullen y cols. (1984) y Thompson (1993) esquematizadas en la Figura 9 en donde se sugiere que el metabolismo del arsénico involucra dos procesos: A) las reacciones de reducción que interconvierten el arsénico V a arsénico III ; y B) las reacciones de metilación oxidativa que convierten el arsénico III en especies metiladas. Esto es, una vez reducido el arsénico se adiciona el primer grupo metilo para formar el ácido monometilarsónico (MMA) y sigue

otra metilación para formar el ácido dimetilarsínico (DMA) considerado como el compuesto final en el metabolismo del arsénico en mamíferos. Los compuestos metilados no se desmetilan para liberar al arsénico (Buchet y cols., 1981a).

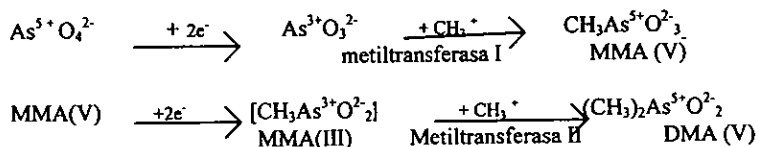


Figura 9. Hipótesis de biotransformación de arsénico: Thompson (1993).

La capacidad de metilación del arsénico puede ser modificada por factores como:

1. La dosis y el tiempo de exposición, esto es por la posible saturación del proceso de metilación del arsénico, a mayor exposición al arsénico hay una disminución en la eficiencia de metilación debido a una saturación de la capacidad metilante del organismo (Buchet y cols., 1981b).
2. Tipo de dieta, pues ciertos alimentos podrían alterar la metilación de arsénico, estos serían los relacionados con la obtención de los grupos metilo, de tal manera que nutrientes como la metionina, la colina, la vitamina B₁₂ y/o el ácido fólico que interviene en la síntesis y utilización de SAmE (donador de metilos) podrían modificar la metilación (Vather y Marafante, 1987).
3. Probablemente por el polimorfismo genético de las enzimas metilantes. Varias enzimas que catalizan la metilación de diferentes xenobióticos se encuentran bajo control genético. Aún no se ha determinado el papel del genotipo en la variación individual de la capacidad metilante de arsénico (Weinshilboum, 1988).

2.2.2.3 Excreción

Debido a la alta absorción de los compuestos arsenicales, su excreción por heces es muy baja, alrededor del 4% de la dosis administrada. La bilis es una vía de importancia considerable para la excreción relativa del arsénico, no obstante, debido a su reabsorción en el intestino, el arsénico queda disponible otra vez para su excreción por el riñón, como

consecuencia, la excreción de arsénico la vía biliar no contribuye significativamente a su excreción total (Menzel y cols., 1994).

Se ha considerado que las especies de arsénico trivalente presentan mayor fijación tisular, por lo que comparativamente, las especies pentavalentes (inorgánicas y metiladas) se excretan más rápidamente por el riñón.

La acumulación de arsénico en pelo y uñas ha sido considerada una forma de eliminación. La principal vía de excreción es a través del riñón donde una parte (2 al 20%) del arsénico inorgánico absorbido es excretado en la orina sin metilar y el resto se excreta en forma metilada, siendo la dimetilada la forma predominante.

2.2.3 Toxicodinamia

La toxicidad del arsénico es compleja ya que depende de la vía de exposición, del número de oxidación y de la forma química del compuesto arsenical.

El hecho que la mayoría de los carcinógenos son también mutágenos han llevado a estudiar a los compuestos arsenicales, los cuales no ha demostrado una actividad mutagénica directa en bacterias o en hámster, sin embargo cuando se administra junto con otros mutágenos como los rayos UV, los rayos X o los agentes alquilantes, aumenta la capacidad mutagénica de estos agentes, lo que es descrito como una actividad co-mutagénica de los compuestos arsenicales. Hay reportes donde el arsénico inorgánico inhibe la remoción de los dímeros de timina inducidos con luz UV del ADN de células humanas SF34 (Wang y cols., 1997). Los compuestos de arsénico trivalente pueden inhibir la actividad de las enzimas que contienen el grupo tiol, específicamente aquellas que contienen dos grupos sulfhidrilo vecinos. Las ligasas de ADN que contienen grupos sulfhidrilo esenciales son consideradas blanco sospechoso de la acción del arsenito de sodio. Esto indica un posible mecanismo de efectos co-mutagénicos.

El arsenito puede incrementar el nivel de peróxido intracelular. Al involucrarse la catalasa y la glutatión peroxidasa en la defensa contra la genotoxicidad del arsenito se soporta la hipótesis de que daña al ADN a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (Kato y cols., 1994).

El arsénico ha demostrado que incrementa la persistencia de daño a ADN, citotoxicidad, mutagenicidad y clastogenicidad en combinación con los ya mencionados agentes capaces de inducir uniones ADN-proteínas (Lee-Chen, 1993).

Los grupos sulfidrilo se encuentran también copiosamente distribuidos en las histonas y se tiene ya conocimiento de la acción del arsénico sobre ellas, además inhibe la reparación del ADN y se puede incorporar a éste en sustitución del fosfato y mediar las interacciones ADN-proteínas (Dong y Luo, 1994).

2.3 El hígado

2.3.1 Anatomía y fisiología

Los seres humanos en su vida y ambiente de trabajo ingieren, inhalan y absorben una gran cantidad de sustancias que pueden afectar al organismo y desencadenar daño a los tejidos a través de numerosos mecanismos. El hígado que es el sitio primario para la biotransformación de componentes propios y extraños, es particularmente vulnerable. Muchos compuestos ingeridos son detoxificados y eliminados por el hígado principalmente como conjugados, algunos actúan directamente, mientras otros son bioactivados a compuestos intermedios que pueden ser tóxicos y producir daño hepático y otros padecimientos y en el largo plazo, cáncer (Hodgson y cols., 1994). En otras palabras el hígado, como órgano responsable del metabolismo de xenobióticos, es particularmente susceptible a daño por drogas y toxinas.

El hígado está estratégicamente localizado entre el tracto gastrointestinal y la circulación general. El tejido hepático está formado por numerosos lobulillos, a su vez constituidos por células hepáticas. Entre ellos hay nervios, conductos biliares, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. El hígado recibe sangre de dos fuentes, el sistema portal de sangre venosa desde el intestino y recibe sangre arterial desde la arteria hepática. La vena porta entra al hígado y se ramifica entre los lobulillos, penetrando hasta el centro de ellos en forma de vasos capilares que tienen paredes incompletas, lo que permite que la sangre se

ponga en contacto con el tejido hepático. La arteria hepática también penetra al hígado y se ramifica en vasos capilares entre los lobulillos. Los hepatocitos tienen microvellosidades que incrementan el área superficial para absorber materiales desde el plasma.

El hígado mantiene la concentración normal de azúcar en la sangre por almacenamiento de glucógeno y/o la liberación de glucosa. Además sintetiza numerosas proteínas y otros compuestos vitales del plasma. De esta manera el daño hepático o la interferencia con sus funciones vitales puede ser perjudicial, incluso letal para el organismo.

2.3.2 Daño inducido por arsénico

El hígado posee diferentes formas de eliminar xenobióticos del organismo. Estas reacciones se dividen en dos grupos denominadas de Fase I y de Fase II. Las reacciones de Fase I consisten en reacciones que hacen más polar a la molécula para su eliminación del organismo tales como la oxidación, reducción o hidrólisis. Las reacciones de Fase II, por su parte, modifican a las moléculas generalmente por reacciones de conjugación que hace a los compuestos más excretables y en ocasiones menos tóxicos. Muchas de las reacciones de la Fase I involucran a las isoenzimas P-450 y a la oxidasa de función mixta.

El sistema P-450 es un multicomponente enzimático que requiere NADPH y oxígeno atmosférico (Figura 10).

La exposición a arsénico causa alteraciones histológicas y bioquímicas en el hígado de roedores y humanos. El arsénico disminuye el contenido de citocromo P-450 hepático que tiene que ver con la destoxificación del arsénico (Albores y cols., 1992).

El arsenito de sodio tiene efecto sobre el contenido de citocromo P-450 y la actividad de la oxidasa de función mixta (OFM), disminuyendo ambos sistemas de manera dosis dependiente (Albores y cols., 1992). Esto podría explicar el hecho de que el hígado es un órgano que acumula arsénico durante la exposición a él.

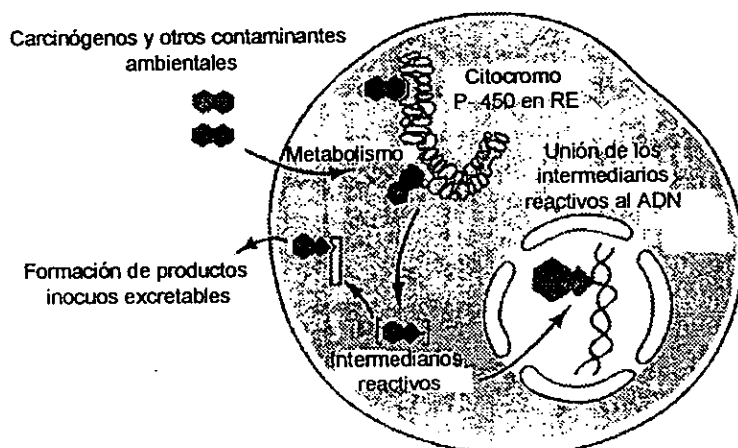


Figura 10. Esquema que muestra la activación metabólica de químicos policíclicos no polares por el sistema citocromo P-450 en una célula de mamífero típica para formar reactivos intermedios que se unen a los centros nucleofílicos en el ADN. (Friedberg, 1985).

3. Materiales y métodos

Equipo y material

Balanza analítica
Cámara electroforesis Miniprotean II de BioRad
Centrífuga
Espectrofotómetro
Fluorómetro
Homogenizador
Material de vidrio de uso rutinario en laboratorios de análisis
Microcentrífuga
Micropipetas
Parrilla
Potenciómetro

Material biológico

- 30 ratones de la cepa Balb/cAnN de sexo masculino y de peso entre los 25 y 30 gramos.
- Citoqueratina de Sigma
- Anticuerpos anticitoqueratinas Anti-Pancitoqueratina comprada en Sigma. un cóctel de anticuerpos dirigidos a las siguientes citoqueratinas (CK): citoqueratina 1(68kd), citoqueratina 4 (59kd), citoqueratina 5 (58kd), citoqueratina 6 (56kd), citoqueratina 8 (52kd), citoqueratina 10 (56kd), citoqueratina 13 (54kd), citoqueratina 18 (45kd) y citoqueratina 19 (40kd).
- Marcador de pesos moleculares Rainbow de Amersham Life Science con los siguientes pesos moleculares: miosina 220kd, fosforilasa b 97.4kd, BSA 66 kd, ovalbumina 46kd, anhidrasa carbónica 30kd, inhibidor de la tripsina 21.5kd, lisozima 14.3kd.

Reactivos

Arsenito de sodio
Dicromato de potasio
Bis-benzimida (Hoescht 33285) de Sigma
Azida
PMSF
Ortovanadato
Albúmina (BSA)
Proteinasa K (PK)
Dodecil sulfato de sodio (SDS)
Cloruro de potasio
Tris-HCl
Fosfato monobásico de potasio
Fosfato dibásico de sodio
Sacarosa
Tritón X-100
Cloruro de magnesio

Trizma base
Cloruro de sodio
Metanol
Glicina
Leche en polvo
Acrilamida Bio Rad
Bis-acrilamida Bio Rad
Persulfato de amonio Bio Rad
Azul de brillante de coomasie R-250 Bio Rad
Azul de bromofenol
2- mercaptoetanol
Glicerol
Kit ECL Western blotting detection reagents

Soluciones

- Buffer de fosfatos pH 8
- Buffer de sacarosa pH 7.4: sacarosa 0.32M, Tritón X-100 1% (v/v), MgCl 5mM, Tris-HCl 10mM. Ajustar el pH a 7.4
Para la técnica de precipitación de complejos:
- Solución A: SDS 2%, PMSF 1 mM, Tris-HCl 20mM.
- Solución B: KCl 200mM, Tris-HCl 20mM
- Solución C: KCl 100mM, Tris-HCl 20mM
- Solución D: KCl 100mM, Tris-HCl 100mM, EDTA 10mM
Estas 4 soluciones se ajustan a pH 7.5

- TBS: trizma base, cloruro de sodio a pH 7.6
- Buffer de transferencia: trizma base, glicina y metanol

3.1 Metodologías

Tratamiento a ratones

Se trataron 6 ratones por dosis. Se preparó una solución 1mg/ml de arsenito de sodio y una solución de igual concentración de dicromato de potasio justo antes de inyectar a los animales. Se utilizó como diluyente solución salina estéril.

A ratones entre 25.0 y 30.0g se les inyectó por vía intraperitoneal:

- Ratones tratados con arsénico: una dosis de 4.5mg de arsenito de sodio/kg de peso; 9 mg/kg y 12 mg/kg.
- Ratones tratados con cromo: se inyectó una dosis de 40mg de dicromato de potasio/kg de peso.
- Ratones control: se les inyectó 0.5 ml de solución salina estéril.

Se dejaron transcurrir 3 horas; terminado el tiempo se sacrificó a los ratones por dislocación cervical. Rápidamente fue extirpado el hígado y se colocó sobre una caja petri estéril inmersa en hielo con buffer de fosfatos pH 8/PMSF 1mM frío.

Aislamiento de los núcleos

1. Los hígados extraídos se homogenizaron en 3 ml de buffer de fosfatos pH 8/PMSF 1mM. Luego se les adicionó azida 0.5M, PMSF 10µg/ml y ortovanadato 100mM se mezclaron perfectamente. Los tubos se mantuvieron siempre en hielo.
 2. Para lograr la extracción de los núcleos se diluyó el homogenado 1:10 en buffer de sacarosa manteniéndose en hielo.
 3. Transcurridos cinco minutos se centrifugó a 15,000g por 20 minutos a 4°C.
 4. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en la solución A.
 5. Se alicuotaron en tubos eppendorffs perfectamente rotulados 500µl de resuspensión.
- Se mantuvieron en congelación a -70°C para proceder a la precipitación de los complejos. El congelamiento ayuda a eliminar el fondo durante la precipitación de los complejos.

Precipitación de complejos ADN-proteína

(Zhitkovich y Costa, 1992).

1. Se descongeló un tubo eppendorff con 0.5ml de resuspensión a 37°C, por cada ratón tratado. Los núcleos fueron lisados en la sol. A (ver Soluciones pág. 33).
2. Con una jeringa con aguja del 21 se hizo pasar cuatro veces el lisado; generando algo de espuma pero evitando efectuar derrames. Todo el proceso se realizó en hielo.
3. Cuando la espuma se incorporó a la fase líquida, se tomó una alícuota de 3.5µl por ratón tratado que se aforó a 1ml con solución D (ver Soluciones pág. 33) y se utilizaron para determinar ADN total, se congelaron a -20°C para su posterior determinación.
4. Al resto se adicionó 0.5 ml de la solución B (ver Soluciones pág. 33) y se mezcló en el vortex durante 5 segundos a toda velocidad.
5. Se dejó en baño a 65°C por 10 minutos.
6. Una vez transcurridos se invirtieron los tubos eppendorff dos veces y se pusieron en hielo durante cinco minutos, lo cual precipita el complejo formado entre el SDS y el potasio.
7. Se centrifugaron a 6000g durante 5 minutos a 4°C.
8. Se quitó el sobrenadante con la micropipeta con mucho cuidado de no tocar el precipitado. El botón se resuspendió en 1ml de la solución C utilizando un vortex y se realizó un lavado con solución C (ver Soluciones pág. 33).
9. Se dejó en baño de 65°C por 10 minutos.
10. Una vez transcurridos se invirtieron un par de veces los tubos y se pusieron en hielo durante cinco minutos.
11. Se centrifugaron a 6000g durante 5 minutos a 4°C.
12. Se llevaron a cabo dos lavados más como se indicó arriba (paso 8 al 10), es decir que en total, se realizaron 3 lavados. Los lavados son con el objeto de eliminar cualquier resto de proteína o de ADN que no estuvieran unidos formando los complejos.
13. Después del último lavado se resuspendió el botón en 0.25ml de solución D. Se guardaron 50µl para realizar una electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) para identificar algunas de las proteína(s) involucrada(s) en la formación de los complejos,

mediante su inmunorreactividad a anticuerpos monoclonales, después de su transferencia a membranas de nitrocelulosa (Inmunorréplica).

14. A los 0.20ml restantes en cada tubo se les adicionó proteinasa K considerando una concentración de 0.2mg/ml.
15. Se dejó en baño a 50-55°C durante tres horas para lograr liberar al ADN de los complejos aislados para cuantificarlo.
16. Una vez transcurridas se adicionó 0.50ml de BSA 4mg/ml, se mezcló e incubó 3 minutos en hielo.
17. Se centrifugó a 12,000g durante 10 minutos a 4°C.
18. Se recuperó el sobrenadante y se determinó ADN por fluorescencia.

Determinación de ADN por fluorescencia

Labarca y Paigen, 1980.

1. Se preparó una solución 1mg/ml de bis-benzimida (Hoechst 33258, SIGMA); de esta solución se tomó 1ml y se llevó a 50ml con agua destilada. Se descongelaron las muestras para ADN total.
2. De los sobrenadantes obtenidos en la precipitación de los complejos, descrita anteriormente, se tomaron 0.15ml y se aforaron a 1ml con solución **D**.
3. Se preparó un blanco con 1ml de solución **D** al que se adicionó 12.5µl de solución bis-benzimida (250ng). Se incubó por 10 minutos en la oscuridad y se calibró el cero del fluorómetro para la determinación de ADN total y ADN de los precipitados.
4. Para las determinaciones de ADN a cada muestra se le añadieron 12.5µl de solución bis-benzimida (250ng), se incubaron por 10 minutos en la oscuridad y se determinó su fluorescencia.
5. Los datos se interpolaron en una curva patrón de ADN y se calculó el porcentaje de complejos ADN-proteína (CAP). La curva de ADN se llevó a cabo adicionando albúmina a los tubos considerando la existencia de impurezas de proteínas que pudieran

interferir con la determinación de ADN. Con un ensayo posterior se vió que no había interferencia por la presencia de albúmina, por lo que para la determinación de ADN en las muestras, no se adicionó al blanco.

Electroforesis

1. Se utilizó un gel de acrilamida al 10% para la separación de las proteínas. De la alícuota tomada antes de la adición de la proteinasa K (ver técnica de precipitación de complejos, paso 13), se determinó la cantidad de proteína en cada muestra. Esta determinación se realizó midiendo la absorbancia relativa a 280 nm en el espectrofotómetro, tomando una alícuota de 2 μ l de cada muestra. Debido a que el SDS interfiere con el reactivo de Bradford éste método no se puede ser utilizado para la determinación de proteínas.
2. Una vez determinada la cantidad de proteína por muestra se tomaron aproximadamente 40 μ g de proteína, se puso en un eppendorf y después se le adicionó DNAsa; se incubó a 37°C por una hora.
3. Una vez transcurrida la digestión del ADN, se mantuvieron las muestra en hielo y se adicionó el buffer muestra con β -mercaptoetanol; se calentaron por cinco minutos en agua hirviendo y fueron mantenidas en hielo hasta proceder con la electroforesis (SDS-PAGE), según la técnica de Laemmli (Coligen, 1992).
4. Se cargaron los carriles considerando uno para un marcador de pesos moleculares. Se corrió a 100 volts, durante aproximadamente 40 minutos.

Inmunorréplica

1. Después de realizar la electroforesis según la técnica anterior, se colocó sobre la membrana de nitrocelulosa (hay que tener cuidado de no tocarla), previamente humedecida en buffer de transferencia teniendo en todo momento cuidado de no dañarla, para llevar a cabo la electrotransferencia de las proteínas. La transferencia se llevó a cabo a 100volts durante 1h.
2. Al terminar se tomó la membrana y se bloqueó con TBS leche al 2%, BSA al 0.5%, toda la noche en agitación moderada y en frío.
3. Los lavados después del bloqueo fueron realizados con TBS-tween al 0.1% cuidando de no lastimar la membrana, como sigue: un primer lavado en agitación durante 15 minutos, el segundo durante 10 minutos y finalmente 3 lavados de 5 minutos cada uno.
4. Se adicionó el anticuerpo anti-citoqueratinas diluido 1:100 en TBS leche al 1% BSA al 1%, durante una hora en agitación moderada.(En el caso del anticuerpo anti-citoqueratinas se trata de un cóctel que consiste en las siguientes: CK 1(68kd), CK 4 (59kd), CK 5 (58kd), CK 6 (56kd), CK 8 (52kd), CK 10 (56kd), CK 13 (54kd), CK 18 (45kd) y CK 19 (40kd). Anti-Pancitoqueratina comprada en Sigma).
5. Se lavó igual que el paso 3. Enseguida se adicionó el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:2000 en TBS leche al 1% BSA al 1%, durante una hora en agitación moderada.
6. Se lavó igual que en el paso 3. Para la detección de los anticuerpos que reaccionaron se trabajó según el método ECL (Luminol).
7. El revelado se efectuó en la oscuridad. Se utilizó una mezcla 1:1 de la sustancia 1 y 2 (reactivos ECL) para detectar la fluorescencia.
8. Se dejó durante 5 min en exposición sobre una placa fotográfica.
9. Para finalizar se utilizó solución reveladora y solución fijadora.

Método estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis el nivel de significancia se estableció para una $p < 0.05$ y se empleó el programa SigmaStat (Sigma Co.). La relación dosis-efecto se exploró mediante un análisis de correlación simple.

4. Resultados

Se ocuparon 6 ratones por cada tratamiento y se procesaron los hígados de cada ratón por separado para un total de 30 ratones y 30 muestras. Los grupos de ratones no fueron tratados todos el mismo día, se hizo en grupos de tres (tres ratones por cada tratamiento fueron tratados el mismo día).

En la tabla 1 se pueden observar los porcentajes de uniones ADN-proteínas aisladas de los hígados de los animales controles, mientras que las tablas 2, 3, 4 y 5 presentan los datos obtenidos con los tratamientos de 4.5, 9 y 12 mg/kg de arsenito de sodio y dicromato de potasio 40 mg/kg de peso respectivamente.

Los porcentajes observados en los controles estuvieron en el rango de 0.3-0.6% del ADN total, mientras que en los ratones tratados los rangos fueron entre el 0.4 y el 1.4%. En la gráficas 1 y 3 se ilustran los valores promedios para cada grupo experimental. Los tratamientos indujeron un incremento en la proporción de complejos, sin embargo la respuesta no fue uniforme en todos los ratones como se puede observar en las tablas 2, 3, 4 y 5 y en la gráfica 2.

RATON	mg ADN total	mg CAP	% CAP
1	2085.71	8.87	0.425
2	1885.71	6.27	0.332
3	1897.14	6.80	0.358
4	1225.71	4.27	0.348
5	1262.85	7.20	0.567
6	945.71	6.13	0.648

Tabla 1. Porcentaje de uniones DNA-proteínas en ratones controles tratados con 0.5ml de solución salina estéril..

RATON	mg ADN total	mg CAP	% CAP
1	1865.71	19.13	1.02
2	1731.43	7.20	0.416
3	1974.28	13.07	0.692
4	1094.28	6.40	0.585
5	1237.14	12.73	1.03
6	1411.43	13.84	0.98

Tabla 2. Porcentajes obtenidos con tratamiento: 4.5 mg Arsenito de sodio/kg de peso.

RATON	mg ADN total	mg CAP	% CAP
1	1708.57	9.67	0.566
2	1368.57	9.60	0.701
3	2219.99	13.13	0.592
4	1405.71	13.88	0.987
5	1134.28	6.47	0.570
6	1254.28	11.6	0.925

Tabla 3. Porcentajes obtenidos con tratamiento: 9mg Arsenito de sodio/kg de peso.

RATON	mg ADN total	mg CAP	% CAP
1	1971.43	13.60	0.690
2	2548.57	14.80	0.581
3	1862.85	13.67	0.734
4	-----	-----	-----
5	1368.57	17.8	1.3
6	1311.43	11.8	0.899

Tabla 4. Porcentajes obtenidos con tratamiento: 12mg Arsenito de sodio/kg de peso.

Nota: la muestra del ratón 4 se perdió mientras era procesada.

RATON	mg ADN total	mg CAP	% CAP
1	1865.71	9.47	0.507
2	1434.28	8.27	0.576
3	1877.14	12.20	0.650
4	1351.43	19.40	1.43
5	1371.43	16.67	1.21
6	1222.85	15.27	1.25

Tabla 5. Porcentaje obtenido con tratamiento: 40mg dicromato de potasio/kg de peso.

Para investigar si existe una relación dosis-efecto, se realizó una correlación simple entre las dosis empleadas y los porcentajes de los CAPs. Esta prueba nos permite conocer si la asociación entre los tratamientos y los CAPs inducidos puede ser descrito por una función de tipo lineal. Para ello, los valores de las dosis fueron transformadas logarítmicamente, ya que no se trata de una progresión continua de datos (Zar, 1984). El análisis se realizó con el programa Sigma Stat (SIGMA) obteniéndose una correlación de $r=0.56$, con una $p=0.0049$ (Gráfica 4).

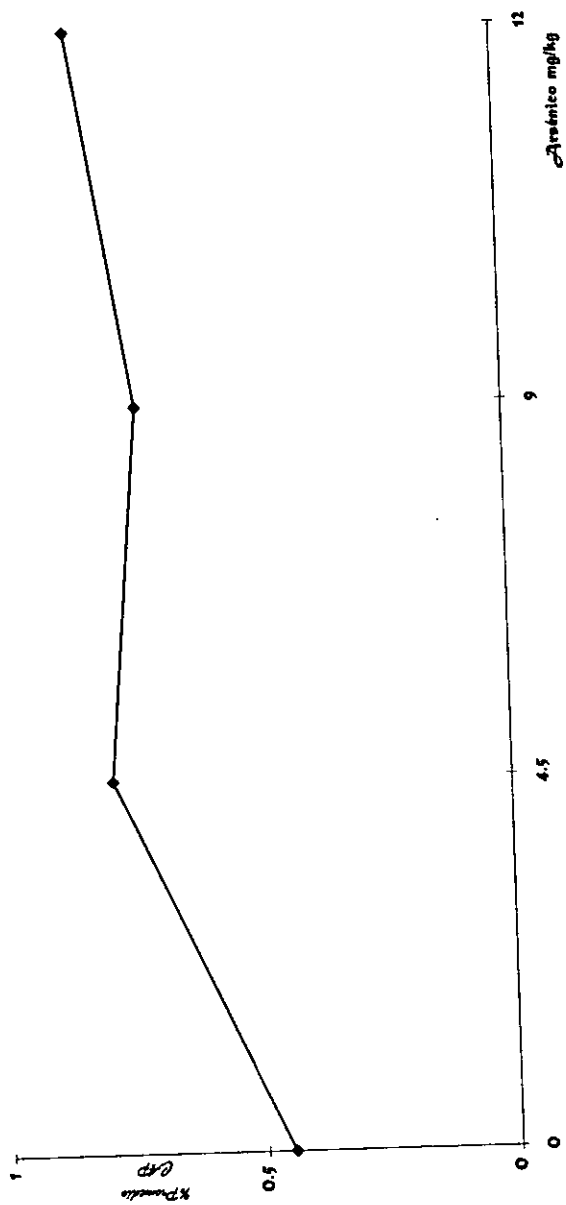
Los porcentajes de CAPs para cada animal y tratamiento fueron analizados mediante un análisis de varianza no paramétrico de una sola vía (prueba de Kruskal-Wallis); este demostró que existían diferencias significativas entre los grupos de tratamientos ($p=0.046$). Para contrastar los datos obtenidos entre los diferentes tratamientos y los controles se utilizó el análisis de Dunn (Zar, 1989) y se existía una inducción significativa de complejos entre el grupo control y el de ratones tratados con 12 mg/kg de arsenito de sodio, así como entre los controles y el grupo tratado con cromo. La inducción con 4.5 y 9 mg/kg de arsenito no fueron significativos.

TRATAMIENTO	PROMEDIO DE %CAP \pm D.E.
Controles	0.446 \pm 0.1313
Arsénico 4.5mg/kg	0.787 \pm 0.26
Arsénico 9.0 mg/kg	0.7235 \pm 0.171
Arsénico 12.0 mg/kg	0.841 \pm 0.281
Cromo 40 mg/kg	0.937 \pm 0.403

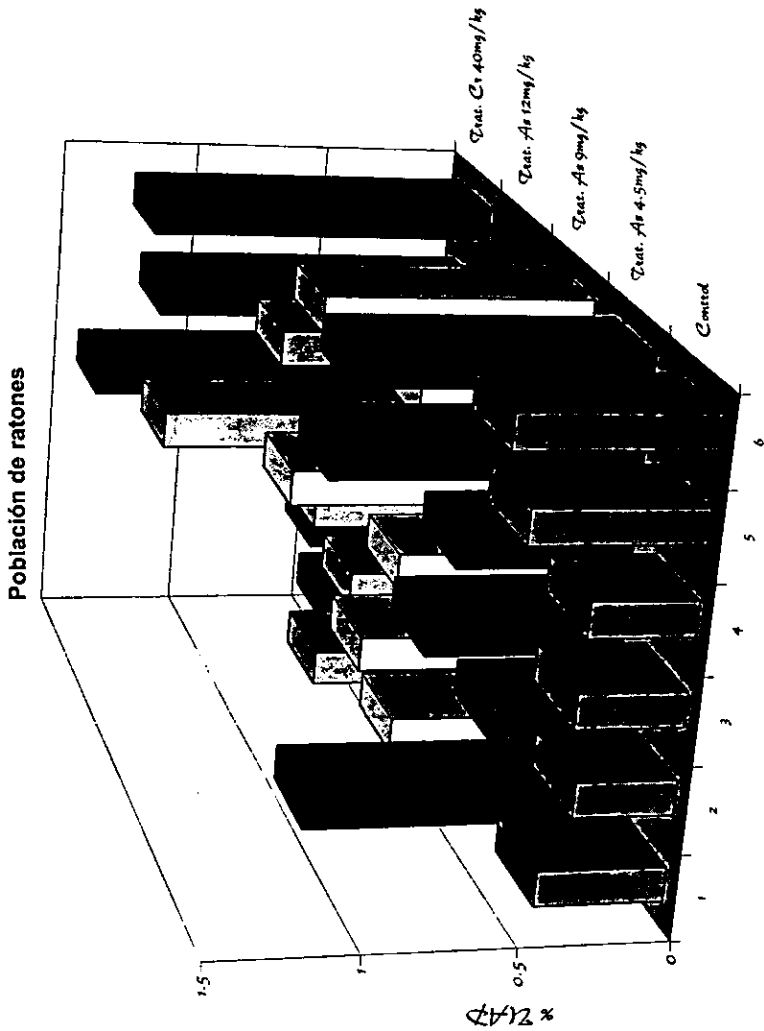
D.E.: desviación estándar.

Tabla 6. Promedios y desviaciones estándar de los complejos inducidos por arsénico y cromo.

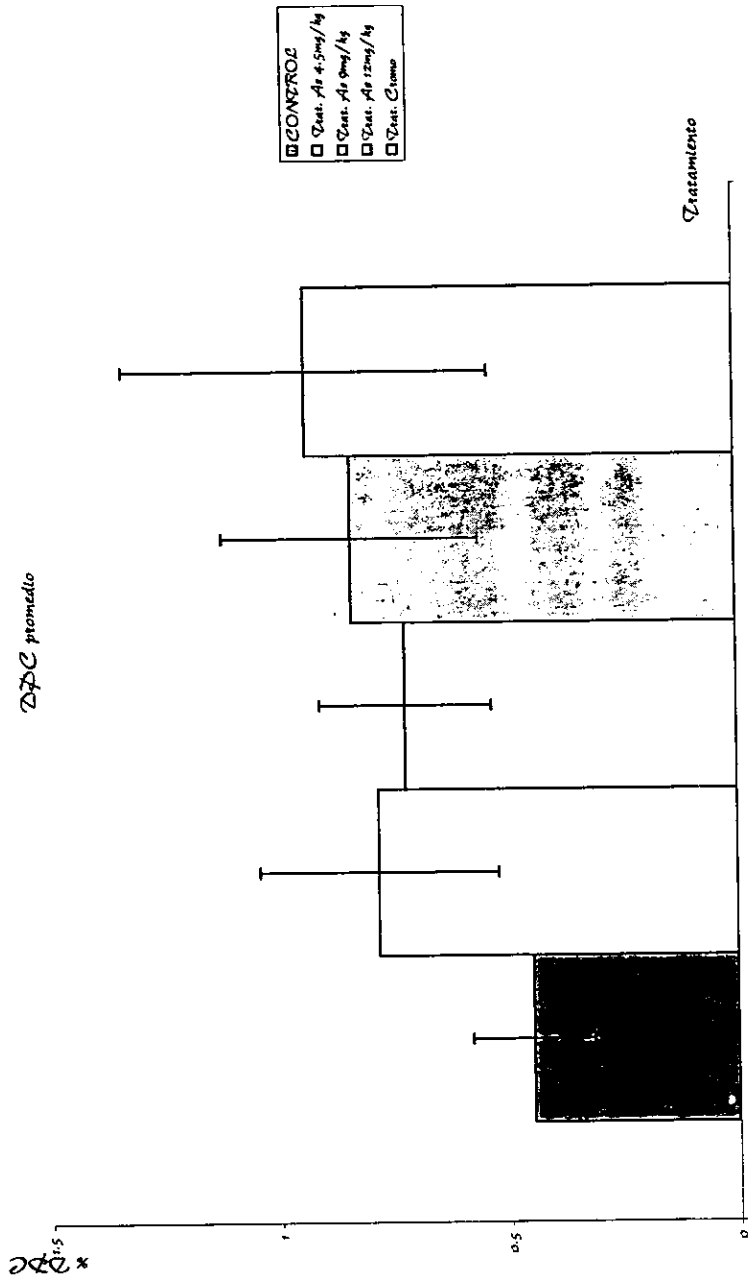
Curva de promedios de porcentajes CAP por tratamiento



Gráfica 1. Dosis de arsenito de sodio vs. %CAP promedio

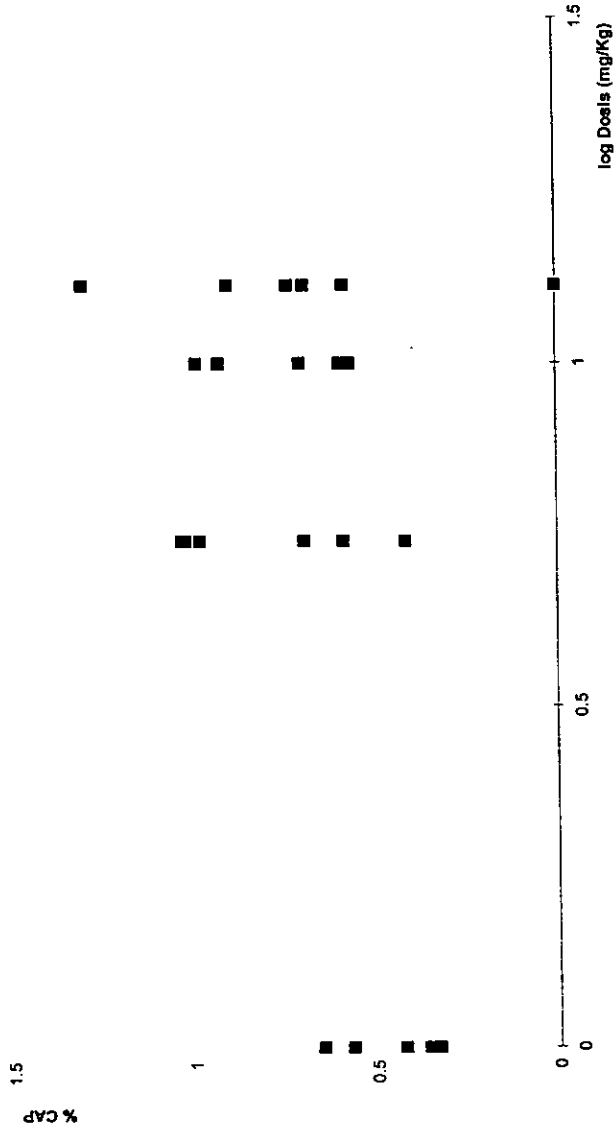


Gráfica 2. Inducción de complejos por tratamiento. n= 6 ratones.



Gráfica 3. Promedios de inducción de CAP por tratamiento y su desviación estándar.

Complejos ADN-proteínas inducidos por arsenito de sodio en hígado de ratón



Gráfica 4

Las proteínas aisladas en los complejos fueron caracterizadas mediante geles de poli-acrilamida (Figura 11 y 12). La Figura 11 es un gel que se realizó con el fin de ver un patrón de proteína total en las muestras de los núcleos aislados. Una vez procesadas las muestras según la técnica de Costa y cols. (1992) se corrió un gel con las proteínas aisladas de los complejos Figura 12. La banda que se observa al mismo nivel en todos los tratamientos se encuentra en el rango de los 30 y 46 kD, mismo que se cae dentro del rango de pesos moleculares de algunas citoqueratinas, concretamente la CK 19.

Sabemos que el arsénico es afín a los grupos sulfhidrilo de las proteínas de ahí que también tienda a acumularse en tejidos ricos en queratinas, las proteínas de los geles se transfirieron a membranas de celulosa y se utilizó un cóctel de anticuerpos anticitoqueratinas que reconoce a algunas de las citoqueratinas más comunes para realizar la inmunoréplica. Existen reportes que citan a la CK 18 como típica en el hígado y esta está incluida en el cóctel utilizado para la inmunoréplica.

Se realizó una detección por inmunorreactividad en membranas de celulosa (immunoblot) de las proteínas totales en una alícuota de la suspensión de núcleos aislados de los hígados de los ratones con el objeto de verificar la presencia de citoqueratinas en los núcleos, antes de la extracción de complejos. Se observó la presencia de tres bandas de citoqueratinas (Figura 14), apreciándose una tinción más intensa en las preparaciones de los organismos tratados con arsenito de sodio y con cromo con referencia a los núcleos de los ratones control.

En las Figuras 13 y 14 se muestran las inmunoréplicas descritas arriba, donde se ven bandas correspondientes a citoqueratinas aunque no podamos saber con exactitud a que citoqueratina corresponden es evidente que a las correspondientes a los pesos moleculares entre 30 y 46 kD que para este caso son las CK 18 y 19.

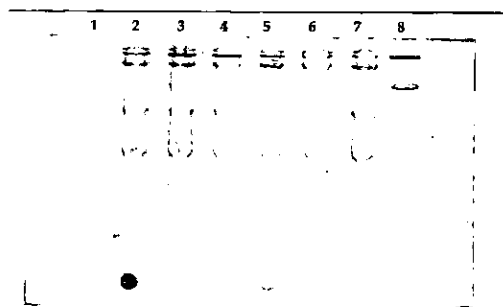


Figura 11. Gel donde se aprecia el patrón de proteínas existentes en una muestra de núcleos aislados de hígado de ratón. Dado que los núcleos son ricos en proteína vemos toda una gama de proteínas donde están incluidas las citoqueratinas (ver Figura 13).
De izquierda a derecha: Carril 1: citoqueratina de epidermis de humano.
Carriles 2 y 3: As 12.0 mg/kg
Carriles 4 y 5: As 9.0 mg/kg
Carriles 6 y 7: As 4.5 mg/kg
Carril 8: pesos moleculares.

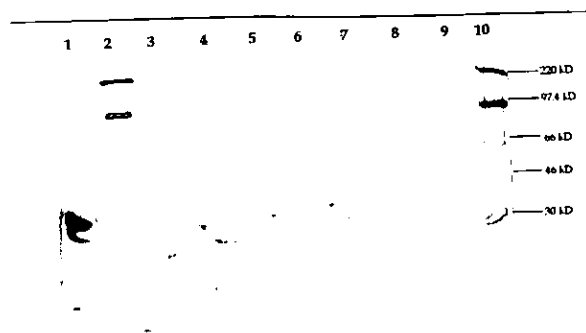


Figura 12. Gel con 40 μ g de proteína total obtenida de aislar los complejos ADN-proteína inducidos por arsénico a hígados de ratones. Hay una banda entre los 30 y 46 kD por lo que podría tratarse de la CK 19 (40kD).
De izquierda a derecha: Carril 1, Cromo 40 mg/kg. Carriles 2 y 10, pesos moleculares. Carril 3, control. Carriles 4 y 5, As 4.5 mg/kg. Carriles 6 y 7, As 9.0 mg/kg. Carriles 8 y 9, As 12.0 mg/kg.

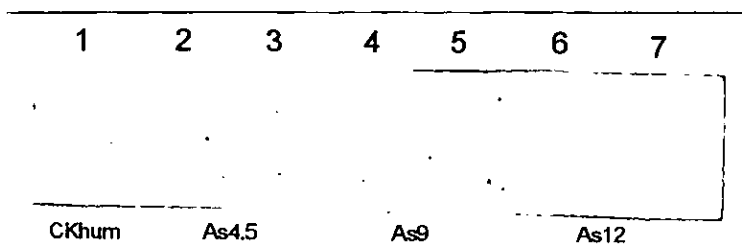
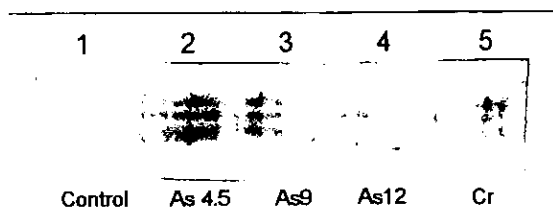


Figura 13 (arriba) y Figura 14 (abajo). Inmunorréplicas donde se utilizó el anticuerpo anti-pancitoqueratinas. Arriba se trata de una muestra de núcleos totales; mientras que abajo se trata de proteínas aisladas de los complejos inducidos en cada tratamiento.

5. Discusión

Se ha demostrado principalmente en sistemas *in vitro*, que existen sustancias capaces de inducir uniones ADN-proteínas que persisten en la célula y que además son resistentes al calor y a agentes reductores como el 2-mercaptoetanol. La mayoría de estas sustancias son además agentes carcinogénicos. Miller y cols. (1989) ha postulado que la presencia de estos complejos puede utilizarse como evidencia de la exposición a carcinógenos, por lo que resulta relevante investigar si los mismos efectos pueden ser observados *in vivo*.

Nuestros resultados en ratones, muestran que el arsenito de sodio fue capaz de inducir el mismo tipo de uniones que observamos en una línea celular hepática humana (Ramírez y cols., 1998). El efecto observado en los tratamientos agudos de arsénico, fue similar al obtenido con dicromato de potasio, un conocido inductor de CAP.

La curva dosis-efecto se ajusta significativamente en un 60 % a una correlación simple, lo cual resulta adecuado para un ensayo *in vivo*. De acuerdo a la gráfica 4, más que una correlación lineal, el porcentaje de CAP parece estar relacionado sublinealmente con la dosis, de manera similar a lo observado para el formaldehído en tejido nasal de ratón (Conaway cols., 1996). Aunque probablemente un ensayo que comprendiese un mayor número de animales permitiría resolver este punto de una manera más clara.

Dado que el hígado es el sitio en donde se concentran y biotransforman las sustancias que ingresan al organismo, la generación de este tipo de efectos implica que el ADN nuclear esta siendo atacado por los tóxicos de una manera indirecta, a través de generar radicales libres que son capaces de reaccionar con la molécula, formando complejos muy estables que resisten la temperatura de lavado que es de 65°C, de manera similar a lo observado con el cromato, formaldehído y cis-platino en líneas celulares (Costa y cols., 1997).

No hay que perder de vista que el mecanismo de acción de cromo y arsénico podría no ser el mismo y por ello las proteínas involucradas son diferentes. Esto demuestra que los requerimientos químicos para la interacción del ADN con las proteínas inducidas por el arsenito tengan una naturaleza diferente a la encontrada con cromo.

El arsénico (III) se une fuertemente a los grupos sulfhídrido de la queratina, depositándose en grandes cantidades en pelo y uñas. Con este estudio de exposición aguda hemos visto que se induce la formación de complejos ADN-citoqueratinas, y que además parece inducirse la síntesis de estas proteínas del citoesqueleto. Una de las citoqueratinas que se ha caracterizado como típica de hígado es la citoqueratina 18 (Green y cols., 1990); ésta tiene un peso molecular de 45kD. Como se puede apreciar en la figura 11, en los complejos aislados se encuentra evidencia de una proteína con un peso molecular a la altura de la banda de 46kD. Mientras que las figuras 13 y 14 representan la fluorescencia encontrada al utilizar un coctel de anticuerpos anticitoqueratinas que incluyen a la citoqueratina 18. No se realizó una inmunorréplica directamente para evidenciar la presencia de esta citoqueratina en particular, pero queda claro que se trata de varias citoqueratinas.

La organización de los filamentos de citoqueratina en hepatocitos de hígados normales de roedores y humanos se extiende a través del citoplasma, pero también se encuentran en el núcleo; se tiene evidencia de que en casos donde el hígado padece de alguna patología el entramado de citoqueratina sufre cambios dramáticos (Franke y cols., 1981). Además los cuerpos de Mallory, estructuras asociadas a efectos hepatóxicos están compuestos por citoqueratinas (Schirmagher y cols., 1998).

Para el caso del cromo, nuestro control positivo, se ha observado que los complejos ADN-proteínas persisten, después del tratamiento durante 36 horas en el hígado. Es posible que esta persistencia resulte del entrecruzamiento entre el ADN y las enzimas de reparación que fueron activadas para reparar las lesiones del ADN inducidas por el Cromo VI (Tsapakos y cols., 1983). Se caracterizaron inmunológicamente algunas otras proteínas complejadas con el ADN después de un tratamiento con cromato y se encontraron lamininas, proteínas de la matriz nuclear y citoqueratinas; no hubo unión a actina o a histonas.

Estos resultados indican que al menos en el caso del cromo, habría requerimientos químicos específicos para la interacción y formación de los complejos (Miller y cols., 1989).

A dosis citotóxicas también se lleva a cabo la formación de entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas. Se ha demostrado que la formación de las uniones ADN-proteínas se producen a concentraciones muy citotóxicas, tan tóxicas como para producir muerte celular (Costa y cols., 1997). En estos casos el valor de este tipo de uniones como indicador de exposición y efecto resulta poco relevante. En nuestro diseño experimental sólo evaluamos el daño que indujo el arsenito de sodio durante tres horas (tratamiento agudo). En virtud de que los compuestos arsenicales (inorgánicos y metilados) tienden a acumularse en grandes cantidades principalmente en pulmón, hígado, piel y riñón, sería interesante investigar la presencia de este mismo tipo de daño en tratamientos crónicos y subcrónicos que constituyan modelos más apegados a las condiciones de exposición de las poblaciones humanas, es decir, la exposición más común que ocurre en humanos es a través del agua de bebida, el consumo de alimentos y/o de medicamentos, etc.

El mecanismo por el cual el arsénico induce cáncer pudiera estar relacionado con las especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species). Pero este mecanismo por el cual el arsenito incrementa los niveles intracelulares de ROS en la célula no está claro aún; es posible que involucre a las pozas de glutatión y al sistema glutatión peroxidasa, glutatión reductasa (Del Razo, 1997). Estas especies reactivas de oxígeno pueden producir la genotoxicidad asociada al arsenito, parece razonable sugerir que al incrementar los niveles de antioxidantes intracelulares se tendrían efectos terapéuticos o preventivos en el envenenamiento con arsénico.

Otros de los efectos reportados para el arsenito es que unido a los efectos de la luz UV, incrementa la citotoxicidad, mutagenicidad y clastogenicidad de ésta en células de mamíferos; es decir, tiene un efecto co-genotóxico debido a que el arsenito inhibe la reparación de los dímeros de timina que la luz UV genera en el ADN (Lee-Chen y cols.

1992). Poco se sabe sobre las consecuencias biológicas de los entrecruzamientos ADN-proteína, ya que son difíciles de estudiar. Pero podría tratarse de interrupciones en la hebra de ADN impidiendo el paso de la ARN polimerasa a lo largo del ADN, perjudicando la disociación normal de la doble cadena y por tanto inhibir la replicación resultando en la pérdida de material genético (Revzin, 1990). Quedaría por investigar si los entrecruzamientos son los responsables del daño cromosómico observado en las poblaciones expuestas a As (Gonsebatt y cols., 1997).

La presencia de este tipo de daño en hepatocitos de ratón sugiere que este tipo de efectos puede estar participando en el daño hepático inducido por arsénico en individuos con exposición crónica, por lo que sería importante diseñar estudios crónicos en estos animales.

6. Conclusiones

En el presente estudio se logró la inducción de entrecruzamientos ADN-proteínas en un sistema *in vivo* expuesto a diferentes dosis de arsenito de sodio. Se evidenció la formación de entrecruzamientos ADN-proteína a nivel de hígado debido a la exposición a Arsénico, lo cual es evidente ya que es un órgano clave en la eliminación de xenobióticos del organismo.

Los entrecruzamientos nos pueden servir como indicadores de exposición y de efecto, aunque no quede claro el mecanismo por el cual el Arsénico induce daño celular, la hipótesis más aceptada es que el arsenito favorece la formación de radicales libres.

Si esto es cierto, indicaría que estos radicales libres no sólo dañan al ADN, sino que también genera cambios a nivel de la expresión normal de las citoqueratinas. En el caso del hígado esto resulta importante, ya que se han reportado enfermedades degenerativas como la cirrosis y la fibrosis, asociadas a alteraciones de las citoqueratinas; más aún, existen reportes de que los cuerpos de Mallory en los hepatocitos están constituidos por citoqueratinas.

Dada la importancia que tendría desde el punto de vista de la salud humana, una alteración en la fisiología de las citoqueratinas hepáticas, los resultados encontrados en este estudio plantean la necesidad de utilizar el mismo modelo en una exposición crónica.

7. Referencias

Adams, R.L.P., Knowler, J.T., Leader, D.P. The Biochemistry of the nucleic acids. 11th edition. London, 1992. Chapman & Hall. Pp. 41, 121, 153.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. Molecular Biology of the Cell. 3rd. edition. Garland Publishing, Inc. U.S.A., 1994.

Albores, A., Cebrián, M.E., Connelly, J.C., Bach, P.H., Bridges, J.W. (1992). Effects of arsenite on hepatic mixed-function oxidase activity in rats. *Xenobiotica* 22:5, 591-597.

ATDSR (1993). U.S. Agency for toxic substances and disease registry toxicological profile for arsenic. Public Health Service. Atlanta G.A.

Bodgan, G.M., Sampayo-Reyes, A., Aposhian, H.V. (1994). Arsenic binding proteins of mammalian system: I. Isolation of three arsenite-binding proteins of rabbit liver. *Toxicology* 93, 175-194.

Buchet, J.P., Lauwerys, R., Roels, H. (1981a). Comparison of the urinary excretion metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate or dimethylarsinate in man. *Int. Arch. Occup. Env. Health.* 48, 71-79.

Buchet, J.P., Lauwerys, R., Roels, H. (1981b). Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers. *Int. Arch. Occup. Env. Health.* 48, 111-118.

Chen, C.J., Lin, L.J. (1994). Human carcinogenicity and atherogenicity induced by chronic exposure to inorganic arsenic. In: Nriagu, J.O. Eds. *Arsenic in the Environment. Part II.* John Wiley & Sons, New York, pp. 109-131.

Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W., (1992). Current Protocols in immunology. National Institutes of Health. Library of Congress. U.S.A. 8.4.4-8.4.7

Conaway, C.C., Whysner, J., Verna, L.K., Williams, G.M.(1996). Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: Endogenous protection from DNA adduct formation. Pharmacol. and Therapeutics. 71, 29-55.

Cormark, D.H. Histología de HAM. 9ª edición. México, 1988. Harla. Pp. 654-656.

Costa ,M., Zhitkovich, A., Harris, M., Paustenbach, D., Gargas, M. (1997). DNA-protein cross-links produces by various chemicals in cultured human lymphoma cells. J.of Toxicol. and Env. Health 50, 433-449.

Costa, M., Zhitkovich, A., Toniolo, P., Taioli, E., Popov, T., Lukanova, A. (1996). Monitoring human Lymphocytic DNA-protein cross-links as biomarkers of biologically active doses of chromate. Environ. Health Persp. 104, 917-919.

Costa ,M., Zhitkovich, A., Toniolo, P. (1993). DNA-protein cross-links in welders: molecular implications. Cancer Res. 53, 460-463.

Cullen, W.R., McBride, B.C., Reglinski, J. (1984). The reaction of methylarsenicals with ditiols. Some biological implications. J. Inorg. Biochem. 21: 179-194.

Del Razo, M.L. (1997). Tesis doctoral: Biotransformación del arsénico y su relación con las lesiones de piel en individuos expuestos crónicamente al metaloide. CINVESTAV.

DeRobertis E:D:P. Biología Celular y Molecular. 12a. edición. Edit. El Ateneo. México. 1996. Pp 293-300.

- Devlin, T.M. Textbook of Biochemistry with clinical correlations. 3rd. edition. Wiley-Liss. U.S.A. 1992.
- Dong, J.T., Luo, X.M. (1994). Effects of arsenic on DNA damage and repair in human fetal lung fibroblast. *Mutation Res.* 315: 11-15.
- Franke, W.W., Denk, H., Kalt, R., Schmid, E. (1981). Biochemical and immunological identification of cytokeratin proteins present in hepatocytes of mammalian liver tissue. *Exp. Cell Res.* 131, 299-318.
- Ferraro, A., Cervoni, L., Eufemi, M., Altieri, F., Turano, C. (1996). Comparasion of DNA-protein interactions in intact nuclei from avian liver and erythrocytes: a cross-linking study. *J. of Cel. Biochem.* 62, 495-505.
- Friedberg, E.C. DNA repair. New York, 1985. WH Freeman & Company. Pp. 15-16.
- Green, J.A., Carthew, P., Heuillet, E., Simpson, J.L., Manson, M.M. (1990). Cytokeratin expression during AFB₁-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11, 1175-1182.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Salazar, A.M., Montero, R., Guzmán, P., Blass, J., Del Razo, L.M., García-Vargas, G., Albores, A., Cebrián, M.E., Kelsh, M., Ostrosky-Wegman, P. (1997). Cytogenetics effects in human exposure to arsenic. *Mutation Res.* 386, 219-228.
- Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W.; Gilman, A.G. Goodman y Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª Edición. México, 1996. Pp. 1766-1770.
- Hartwing, A., Gröblichhoff, U.D., Beyersmann, D., Natarajan, A.T., Filon, R., Mullenders, L.H.F. (1997). Interactions of arsenic (III) with nucleotide excision repair in UV-irradiates human fibroblasts. *Carcinogenesis* 18, 399-405.

Hodgson, E., Levi, E.P. Introduction to Biochemical toxicology. 2nd. Edition. Norwalk, Connecticut, 1994. Appleton& Lange. Pp 459-489.

IARC (1980). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some metal and metallic compounds, Vol. 23, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

IARC (1987). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Suppl. 7, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Jha, A.N., Noditi, M., Nilsson, R. Natarajan, A.T. (1992). Genotoxic effects of sodium arsenite on human cell. Mutation Res. 284, 215-221.

Kato, K., Hayashi, H., Hasegawa, A., Yamanaka, K., Okada, S. (1994). DNA damage induced in cultured human alveolar (L-132) cells by exposure to dimethylarsinic acid. Env. Healt Persp. 102, 285-288.

Labarca, C., Paigen, K. (1980). A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. Anal. Biochem. 102, 344-352.

Lee, T.C., Tanaka, N., Lamb, P.W., Gilmer, T.M., Barret, T.C. (1989). Induction of gene amplification by arsenic. Science 241: 79-81.

Lee-Chen, S.F., Gurr, J.R., Lin, I.B., Jan, K.Y. (1993). Arsenite enhances DNA double-strand breaks and cell killing of methyl methanesulfonate-treated cells by inhibiting the excision of alkali-labile sites. Mutation Res. 294, 21-28.

Lee-Chen, S.F., Yu, C.T., Jan, K.Y. (1992). Effect of arsenite on the DNA repair of UV-irradiated Chinese hamster ovary cells. Mutagenesis 7:1, 51-55.

Legator, M.S., Au, W.W. (1994). Application of integrated genetic monitoring: The optimal approach for detecting environmental carcinogens. *Env. Health Persp.* 102:9, 125-132.

Lei, Y. Zhang, Q., Zhuang, Z. (1995). Study on DNA-protein crosslinks induced by chromate and nickel compounds in vivo with ^{125}I -postlabelling assay. *Mutation Res.* 329, 197-203.

Lewin, B. *Genes VI*. Oxford, 1997. Oxford University Press. Pp 750-753.

Li, J.H., Rossman, T.G. (1989). Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: A possible mechanism of its comutagenesis. *Mol. Toxicol.* 2, 1-9.

Mass, M.J. (1992). Human carcinogenesis by arsenic. *Env. Geochem. Health* 14, 49-54.

Menzel, D.B., Ross, M., Oddo, S.V., Bergstrom, P., Greene, H., Roth, R.N. (1994). A physiologically based pharmacokinetic model for ingested arsenic. In: Chapell WR Abernathy C.O. and Cothorn C.R. Eds. *Arsenic. Exposure and Health*, Science Reviews Ltd. 40. Norwood, England, pp 209-218.

Miller, C.A., Costa, M. (1989). Immunological detection of DNA-protein complexes induced by chromate. *Carcinogenesis* 10, 667-672.

Miller, C.A., Cohen, M.D., Costa, M. (1991). Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and chromium compounds. *Carcinogenesis* 12, 269-276.

Mohelska, H., Benko, V., Smetana, K., Hyncica, V. (1980). Ultrastructural changes in hepatocytes of mice exposed to arsenic in drinking water. *Exp. Pathol.* 18:275-281.

Morris, J.S., Schmid, M., Newman, S. (1974). Arsenic and noncirrhotic portal hypertension. *Gastroenterology* 64:86-94.

Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuttolo, M.A., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. (1991). Chemical Nature of DNA-protein cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry* 30, 4873-4879.

Nickerson, J.A., Krockmalnic, G., Wan, K.M., Penman, S. (1997). The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 4446-4450.

Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., Montero, R. Vega, L., Barba, H., Espinosa, J. Palao, A. Cortinas, C., García-Vargas, G., Del Razo, L.M., Cebrián, M.E. (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Res.* 250, 477-482.

Piantadosi, S., Sullivan, J.B. (1992). Chemical and environmental carcinogenesis in: *Hazardous materials toxicology* Sullivan & Krieger Eds., Williams and Wilkins, Baltimore. Pp 77-90.

Pienta, K.J., Partin, A.W., Coffey, D.S. (1989). Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. *Cancer Res.* 49,2525-2532.

Ramírez, P. (1998). Estudio de los entrecruzamientos ADN-proteínas inducidos por arsénico. Manuscrito en preparación.

Revzin, A. *The Biology of nonspecific DNA-protein interactions.* Boca, Florida, 1990. CRC Press. Pp 1-2.

Simmons, J.E., DeMarini, D.M., Berman, B. (1988). Lethality and hepatotoxicity of complex waste mixtures. *Environ. Res.*, 46:74-85.

Sorsa, M., Wilbourn y Vainio, H. (1992). Mechanisms of carcinogenesis in risk identifications. Human cytogenetic damage as a predictor of cancer risk. De. H Vainio, P.N.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Magee, D.B. McGregory AJ McMichael Lyon, International Agency for Research on Cancer, Pp:-543-554.

Schirmagher, P. Dienes, H.P., Moll, R. (1998). De novo expression of nonhepatocellular cytokeratin in Mallory body formation. *Virchows. Arch.* 432, 143-152.

Su, T.T., Follete, P.J., O'Farrell, P.H.. (1995). Qualifying for the license to replicate. *Cell* 81, 825-828.

Sullivan, J.B., Krieger, G.R. (1992). Introduction to hazardous materials toxicology in: *Hazardous materials toxicology Sullivan & Krieger Eds., Williams and Wilkins, Baltimore.* pp 2-8.

Tam, G.K.H., Charbonneau, S.M., Bryce, F., Pomroy, C., Sandi, E. (1979). Metabolism of inorganic arsenic (^{74}As) in humans following oral ingestion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50: 319-322.

Thompson, D.J. (1993). A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem. Biol. Interact.* 88: 89-114.

Tomatis, L. (1990). *Cancer: causes, occurrence and control (IARC Sci Pub N°100)* International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Travers, A. *DNA-protein interactions.* London, 1993. Chapman & Hall. Chapter 1-2.

Tsapakos, M.J., Hampton, T.H., Wetterhahn, K.E. (1983). Chromium (VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver and lung. *Cancer Res.* 43, 5662-5667.

Tsapakos, M.J., Hampton, T.H., Wetterhahn, K. (1981). The carcinogen chromate induce DNA cross-links in rat liver and kidney. *J. Biol. Chem.* 256, 3623-3626.

Vather, m., Marafante, E. (1987). Effects of low dietary intake of methionine, choline or proteins on the biotransformation on arsenite in the rabbit . *Toxicol. Lett.* 37: 41-46.

Wagner, R.R., Maguire, M.P., Raymond, L.S. *Chromosomes. A synthesis.* USA, 1993. Wiley-Liss. Pp. 325-326.

Wang, T.S., Shu, Y.F., Liu, Y.C., Jan, K.Y., Huang, H. (1997). Glutation peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. *Toxicology* 121, 229-237.

Weinshilbom, R.M. (1988). Pharmacogenetics of methylation: relationship to drug metabolism. *Clin. Biochem.* 21: 201-210.

WHO (1985). Guidelines for the study of genetics effects in human populations. *Environ. Health Criteria* 46, Ginebra.

Yamanaka, K., Tezuka, M., Kato, K., Hasegawa, A., Okada, S. (1993). Crosslink formation between DNA and nuclear proteins by *in vivo* and *in vitro* exposures of cells to dimethylarsinic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 1184-1191.

Zar, J.H. *Biostatistical analysis.* Second edition. Prentice Hall. New Jersey, 1984. Pp 176-179.

Zhitkovich, A., Costa, M. (1992). A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and *in vivo*. *Carcinogenesis* 13, 1485-1489.