

77



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIA

"Marcaje fluorescente de fragmentos de DNA entrecruzados con proteínas para su uso como sondas".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A
WENDY ARGELIA GARCIA SUASTEGUI



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTORA: DRA. MA. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

MEXICO D.F.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Marcaje fluorescente de fragmentos de DNA entrecruzados con proteínas para su uso como sondas."

realizado por Wendy Argelia García Suastegui.

con número de cuenta 9504011-4, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. María Eugenia Gonsbatt Bonaparte

WESVA

Propietario

Dr. Victor M. Valdes López

Victor M. Valdes Lopez

Propietario

M. en IBB Clementina Castro Hernández

Clementina Castro Hernandez

Suplente

Dr. Guillermo Laguna Hernández

Guillermo Laguna Hernandez

Suplente

Dra. Patricia Ramírez Noguera

Patricia Ramirez Noguera

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

[Signature]
Dra. Patricia Ramos Morales.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Agradezco al programa de Becas de tesis de Licenciatura (Probetel) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM el apoyo que recibí durante la realización de esta tesis, misma que entrego con satisfacción.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, bajo la dirección de la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte. El trabajo fue parcialmente financiado por el CONACYT con el registro número 30950M.

***“La liberté consiste à pouvoir faire
tout ce qui ne nuit pas à autrui...”***

**Article IV de la Déclaration
des droits de l'homme.**

*Quien no conoce nada, no ama nada. Quien
no puede hacer nada, no comprende nada.
Quien nada comprende, nada vale, pero quien
comprende también ama, observa, ve ...*

*Cuando mayor es el conocimiento inherente
a una cosa, más grande es el amor ...*

*Quien cree que todas las frutas maduran
al mismo tiempo que las frutillas nada
sabe acerca de las uvas.*

PARACELSO.

*No debemos creer a los muchos que dicen
que sólo se ha de educar al pueblo libre,
sino más bien a los filósofos que dicen
que solo los cultos son libres.*

EPICTETO.

*Nada es demasiado maravilloso
para ser verdad.*

MICHEL FARADAY.

Dedicatorias.

*A Dios por haberme concedido el milagro de la vida a lado de tanta gente maravillosa..
Dedico esta tesis y mi vida entera a mi madre. No tenga palabras para agradecerle todo lo que
has hecho por mí, te amo, eres lo mejor que me ha sucedido.*

*A mi padre, gracias por confiar siempre en mí y haberme motivado para triunfar en la vida.
Te amo no solo por lo que eres, sino por lo que soy cuando estoy contigo.*

A mi hermana Minerva, por compartir conmigo cada momento de mi vida.

*A mis abuelitas Amparo y Margarita que me han puesto el ejemplo para superar todas las
adversidades.*

*A mis abuelitos, Samuel y Enrique y a mis tíos por todo el cariño que me han dado y por
todas las experiencias compartidas: Sara, Sandra M., Alejandra, Martín, Rosa, Tronue,
Daty A., Maru, Vera, Daty G., Luis, Juan, Sandra, Ernesto, Sergio, Lupe, Samuel,
Javier, Jaime, Grecia, Gloria, Lupe.*

*A mis primos, porque sin ustedes nada hubiera sido igual: Mauro, Mónica, Belén, Iván
Danesa, Mouse, Nancy, Oscar, Danny, David, Karina, Karen, Omar, Mesula, Katia,
Edna, René, Gina, Jessica, Karla, Brandon, Alan, Fabián, Yasmín, Gabriela, Miguel,
Elizabeth, Sunny, Cesar.*

A mis pequeñas sobrinas: Brenda, Britney, Andrea y Matzu.

*A mis amigos de la facultad de Ciencias, jamás olvidaré los momentos compartidos ni aquellas
increíbles prácticas de campo: Carmen, Mary Paz, Leo, Lilia, Julieta, Silvia, Tronue,
Leopoldo, Mariana, Hazel, Vera, Tetzuy, Daty M., Graín, Mónica, Carlos, Octavio,
Adriana, Héctor, Carmine, Lizardo, Mónica.*

*A mis amigos del museo Universitario: Kenia, Andrómeda, Vera Bunge, Edgar, Juanita,
Tronue, Rosa, Gonzalo, Rodrigo, David, Jorge y Vera Tinoco.*

*A mis compañeros del laboratorio por todo lo que hemos compartido, Gerardo, Jorge, Quítez,
Bernardo, Emilia, Daty Guzmán, Sra. Delfina y especialmente a Ivira, Luciana y Anita,
por su apoyo en la realización de los experimentos. Gracias Anita por tu gran disposición y
por la asesoría que me brindaste para la presentación de este trabajo.*

*A Abraham por demostrarme lo maravillosos que pueden ser todos y cada uno de los instantes
de la vida. A tu lado he sido profundamente feliz, gracias por tu comprensión y cariño.*

Agradecimientos.

A la UNAM, nuestra máxima casa de estudios porque me has dado las bases para desarrollarme como profesionista y como ser humano; por tu cálida hospitalidad, por el regalo de tus bastos espacios, por la oportunidad que me otorgaste de conocer a tanta gente maravillosa, por los idiomas, los deportes, los jardines, las salas de conciertos y cines; pero sobre todo por permitirme ser parte de tu espíritu.

A la Dra. Gonsebatt, por creer en mí, por haberme incluido en su maravilloso grupo de trabajo; por sus consejos y apoyo; su amabilidad; por transmitirme su pasión por la ciencia. Siempre será mi querida gran maestra.

A Clemen, a quien interrumpí y cuestioné varias veces a lo largo de esta investigación y de quien siempre recibí un trato amable y la solución a un gran número de dificultades.

A Paty Ramírez, por tus enseñanzas, por el apoyo y confianza incondicionales que siempre me has brindado, pero sobre todo por tu amistad y paciencia.

A el Dr. Victor Valdez, orgullo de la facultad de ciencias por sus extraordinarias clases de Biología Molecular, en las que nunca dejó de sorprenderme. Gracias por haber encendido en mí la chispa de la aventura científica.

A el Dr. Guillermo Laguna, por el apoyo que tan amablemente me brindó y por sus valiosos comentarios que mejoraron este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
Arsénico	10
Antecedentes Históricos	10
Características Químicas	10
Absorción	12
Biotransformación	12
Efectos genotóxicos del Arsénico en células humanas	14
Excreción	16
Hepatocitos	16
Línea celular WRL-68	17
Entrecruzamientos DNA-Proteínas (DPC)	18
Principios y aplicaciones de la hibridación <i>in situ</i>	22
La sonda	23
Marcado de la sonda	24
Detección de la sonda	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
OBJETIVOS	27
Objetivo general	28

Objetivos particulares	28
HIPÓTESIS	29
MÉTODOS	30
Cultivo de Células WRL-68	30
Tratamiento con Arsenito de sodio (NaAsO ₂)	31
Viabilidad celular	32
Aislamiento de complejos DNA-Proteínas	33
Determinación de DNA por fluorescencia	34
Precipitación del DNA	35
Concentración y pureza del DNA	35
Digestión del DNA con endonucleasa de restricción Mbo 1	36
Determinación del tamaño de los fragmentos de DNA	36
Marcaje de DNA por <i>nick translation</i>	37
Cultivo de sangre entera, aislamiento y fijación de linfocitos	38
Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	38
Análisis en el Microscopio confocal	40
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	54
APENDICES	64

RESUMEN.

Los entrecruzamientos DNA proteínas (DPC) representan lesiones potencialmente dañinas que son inducidas por una gran variedad de agentes tanto físicos como químicos. Estas lesiones no siempre son reparadas y se inducen a concentraciones no citotóxicas. Se ha postulado que su presencia sea utilizada como un indicador temprano de efecto de exposición a agentes genotóxicos, sin embargo a pesar de que se han identificado algunas de las proteínas involucradas en los entrecruzamientos, se desconocen su cinética y el tipo de secuencias de DNA involucradas. Con el objetivo de identificar algunas de las secuencias involucradas en estos complejos, decidimos marcar los segmentos de DNA presentes en DPC inducidos por NaAsO_2 en la línea celular hepática WRL-68. Se aislaron los DPC mediante precipitación con SDS/KCl y se digirieron las proteínas adheridas a ellos mediante un tratamiento con Proteinasa K, para posteriormente precipitar el DNA libre de proteínas, con etanol/acetato de K.

Los fragmentos se marcaron con bases biotinizadas por el método de *Nick Translation*. Las sondas así generadas se utilizaron para realizar un estudio funcional mediante hibridación *in situ*. Se lograron hibridaciones en núcleos interfásicos. Estas sondas se utilizarán posteriormente para realizar pruebas de hibridación con secuencias conocidas, y así identificar el tipo de secuencias involucradas en los entrecruzamientos.

INTRODUCCIÓN

Arsénico.

Antecedentes Históricos.

Los compuestos arsenicales tienen una larga historia como agentes medicinales y venenosos. Su uso medicinal fue descrito desde el año 400 A.C. por Hipócrates, quien recomendó la aplicación de una pasta a base de Arsénico, para tratar úlceras cutáneas. Durante la Edad Media, las propiedades tóxicas del Arsénico fueron muy utilizadas y el Arsénico blanco (Trióxido de Arsénico) fue el veneno de elección, por su alta toxicidad. Durante la primera Guerra Mundial, se desarrollaron y utilizaron como armas químicas los gases arsenicales, entre ellos el gas Lewisita (clorovinil-dicloroarsina), que es un potente irritante local y tóxico sistémico. A principios del siglo XX, los arsenicales orgánicos e inorgánicos se emplearon para combatir enfermedades como la tripanosomiasis la sífilis, enfermedades cutáneas crónicas, anemia, leucemia y enfermedades pulmonares. Su uso medicinal está actualmente limitado a casos avanzados de la enfermedad del sueño y como componente de drogas antiparasitarias de uso tópico (Albores, *et.al.*, 1997).

Características Químicas.

El arsénico, pertenece al grupo VA de la tabla periódica; su número atómico es 33 y su masa atómica 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 $+5$.

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 .

El Arsénico puede ser liberado al ambiente por actividad volcánica y erosión de depósitos minerales. 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 y herbicida; en la manufactura de vidrio, pigmentos, pinturas y aleaciones. El mortal gas Arsina (AsH_3) es usado en la manufactura de microchips en la industria de semiconductores.

Las concentraciones de Arsénico en el aire en sitios alejados de actividades antropogénicas son de 1 a 3 ng/m^3 mientras que, en áreas industriales emisoras de Arsénico, los niveles de este elemento pueden ser de 100 hasta 300 ng/m^3 . Las concentraciones de As en el agua son usualmente menores a 10 $\mu g/L$, mientras que, en sitios cercanos a minas o contaminados con minerales arsenicales, fluctúan entre 200 y 1000 $\mu g/L$. Las concentraciones de Arsénico en el suelo varían de 1 a 40 mg/Kg y, en áreas agrícolas, pueden ser aun más altas por la presencia de residuos de plaguicidas arsenicales.

La ingestión de Arsénico en el agua de bebida (principalmente Arsénico inorgánico) es una fuente de exposición muy importante para algunas poblaciones, por lo que puede ser un problema grave de salud pública. Este problema ha sido descrito en Taiwán, Chile, Argentina, México e India; en todas las regiones afectadas por la presencia de As en el agua de bebida se rebasa varias veces el límite máximo permisible para el agua de bebida (50 $\mu g As/L$).

Absorción.

Los compuestos de Arsénico se absorben después de ingerirse o inhalarse. La absorción por la piel es limitada. El Arsénico es transportado a través de la sangre a los diferentes órganos y tejidos. Los compuestos Arsenicales tienden a acumularse en grandes cantidades en hígado, riñones, pulmones, músculos, huesos, piel y pelo.

El Arsénico trivalente (+3) se une con fuerza a los grupos sulfhidrilos de las proteínas, puede acumularse en tejidos con alto contenido de queratinas esto explica su persistencia en cabello y uñas como consecuencia de su unión a los grupos sulfhidrido de la queratina (Squibbo y Fowler 1983) este metaloide también interfiere con numerosos sistemas enzimáticos, incluso en los relacionados con la respiración celular, el metabolismo del glutatión y la restitución del DNA (Albores *et al.*, 1997).

Biotransformación del Arsénico

La biotransformación es la vía metabólica más común para arsenicales inorgánicos, tanto en humanos como en otras especies animales. El hígado es el principal sitio de metilación del Arsénico, también se ha demostrado que este órgano puede acumularlo.

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 *et al.*, (1984), Thompson (1993) y Styblo *et al.*, (1999) 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 (figura 1).

Esto es, una vez reducido el arsénico se adiciona el primer grupo metilo para formar el ácido monometilarsínico (MMA) y sigue otra metilación para formar el ácido dimetilarsínico (DMA) considerado como el compuesto final en el metabolismo del arsénico en mamíferos. El DMA es la forma más abundante de excreción del Arsénico en el hepatocito, lo que sugiere que la dimetilación del Arsénico puede facilitar su interacción con las membranas para su eliminación (Stybło *et al.*, 1999). La metilación del arsénico inorgánico es un paso importante en la eliminación del arsénico ya que los arsenicales pentavalentes metilados son excretados fácilmente (Hughes *et al.*, 1994).

Debido a que los arsenicales monometilados y dimetilados son considerados menos tóxicos que los arsenicales inorgánicos, se ha propuesto la metilación como mecanismo de detoxificación (Yamauchi y Fowler, 1994). Recientemente ha sido detectada y parcialmente caracterizada una enzima que cataliza la mono y dimetilación del Arsénico en muestras de hígado de diversas especies (Aposhian, 1997).

La Metilación del arsénico se realiza principalmente en la fracción citosólica del hepatocito, la S-adenosilmetionina (SAMe) es 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. El metabolismo del arsénico es afectado por la dosis, altas dosis pueden saturar o inhibir la Metilación del Arsénico (Stybło *et al.*, 1999) incrementando la presencia de Arsénico trivalente en el tejido.

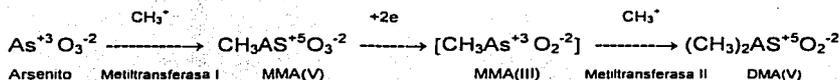


Figura 1. Hipótesis de biotransformación del Arsénico: Thompson (1993).

Efectos tóxicos del Arsénico en células humanas.

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 sulfhídrico de las proteínas. Las enzimas son particularmente afectadas si el grupo sulfhídrico (-SH) está ubicado en un sitio crítico para su actividad (Jha *et al.*, 1992).

Estudios tempranos han demostrado que los arsenicales inhiben la proliferación celular de linfocitos humanos en cultivo (Petres *et al.*, 1977; Wen *et al.*, 1981; McCabe *et al.*, 1983). El efecto inhibitorio de los arsenicales en la progresión del ciclo celular se debe posiblemente a su afinidad por las proteínas que contienen grupos sulfhídrico (Léonard y Lauwerys, 1980; Ramírez *et al.*, 1997). De igual modo en México la cinética de proliferación en linfocitos de personas expuestas crónicamente al Arsénico se vio disminuida, lo que provoca una disminución en la respuesta inmune celular que puede eventualmente conducir a malignidad (Ostrosky-Wegman *et al.*, 1991).

En diversos estudios se ha demostrado que compuestos inorgánicos de Arsénico son capaces de inducir efectos dependientes de la síntesis de DNA, como aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas por intervenir en procesos de ligación, en linfocitos humanos y en células embrionarias de hámster de manera dosis dependiente. Adicionalmente se ha reportado que los arsenicales son menos eficientes en la inducción de intercambio de cromátidas hermanas en cultivos de sangre entera que en cultivos de linfocitos aislados (Larramendy *et al.*, 1991). Los arsenicales son capaces de inducir entrecruzamientos DNA-Proteínas y rupturas en el DNA de células de mamífero (Wedrychowski *et al.*, 1986; Dong y Luo, 1993, Ramírez *et al.*, 2000). Sin embargo no se ha reportado que el Arsénico induzca mutaciones en loci específicos ni en bacterias ni en células de mamífero (Lee *et al.*, 1986). Los mecanismos genéticos de carcinogénesis del arsénico aún no están bien entendidos.

Se ha reportado que las células tratadas con Arsenito de Sodio y expuestas a radiación tardan más tiempo en reparar su DNA alterado que las células no tratadas, presumiblemente porque los compuestos de arsénico tienen un efecto inhibitorio en los procesos de ligamiento (Huang *et al.*,1991). Se ha encontrado que los inhibidores de los procesos de reparación de DNA incrementan la producción de aberraciones cromosómicas inducidas por varios clastógenos (Natarajan *et al.*,1982; Preston, 1982). El último paso en los mecanismos de reparación de lesiones en el DNA involucra ligación, si este paso es inhibido, el resultado es un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Natarajan y Obe, 1984). También se ha demostrado que el Arsenito de sodio inhibe la escisión de dímeros de pirimidina y la síntesis no programada de DNA en fibroblastos humanos normales (Okui y Fujiwara, 1980) el arsénico inhibe la unión de hebras rotas, pero no interfiere en la actividad de polimerización de los nucleótidos (Lee-Chen *et al.*,1992).

A pesar de la cantidad de trabajos que reportan que el arsénico inhibe los mecanismos de reparación del DNA, Li y Rossman en 1989 observaron que células V-78 tratadas con N-metil-N-nitrosourea e incubadas con Arsenito presentaron reparación del DNA por escisión. Es posible que el arsénico en el rango de concentraciones utilizado por ellos, no inhiba los procesos de reparación del DNA. Sin embargo diversos reportes afirman que los mecanismos de reparación en lesiones inducidas por arsénico (incluidos los DPC) se ven disminuidos. La reparación por escisión es el mecanismo más común de reparación del DNA en células de mamífero. En esta vía, una DNasa elimina el segmento dañado, subsecuentemente se lleva a cabo la polimerización y finalmente la unión de la hebra por la DNA ligasa (Lindahl, 1987).

El Arsénico es reducido y metilado principalmente en células hepáticas mediante una serie de reacciones que requieren glutatión intracelular reducido (GSH) generando formas reactivas intermediarias (Styblo y Thomas, 1995;

Clewell *et al.*, 1999) que pueden conducir a la formación de DPC. Los DPC hacen al DNA más sensible a ser dañado por otros agentes como la N- Metil-N-nitrosourea (Dong y Luo, 1994).

Se ha demostrado que el Arsénico trivalente induce la síntesis de proteínas de estrés y factores de crecimiento (Germolec *et al.*, 1996). El arsénico es capaz de inducir cáncer de piel, pulmón, vejiga e hígado (Chen *et al.*, 1992).

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 vía bilis no contribuye significativamente a su excreción total (Menzel *et al.*, 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.

Hepatocitos.

Los hepatocitos constituyen el 80% de la población celular del hígado. La mayoría de las funciones que desempeña el hígado recaen en los hepatocitos. El núcleo del hepatocito es, en general esférico y central. Muchos hepatocitos (más del 50%) son poliploides, es decir que contienen dos (o más) veces la cantidad normal de DNA. Los núcleos de los hepatocitos presentan uno o más nucleolos y grumos cromatínicos dispersos (cariosomas), así como también un reborde de cromatina perinuclear (Ross, 1992).

Línea celular WRL-68.

El uso de modelos celulares como complemento y como parte alternativa para la experimentación animal en estudios de fisiología celular, se incrementó en la década de los 80as. (Jover et al., 1992).

La línea celular WRL-68 fue aislada de un epitelio de hígado fetal poliploide humano, aparentemente normal y fue patentada en 1976 por Apostolov con el registro: USA patente No. 3935066. Esta línea celular, fue depositada en la colección americana de cultivos Rockville, MD (ATCC con acceso en el número CL48). La patente establece que: a) Cuando las células son cultivadas en medios de crecimiento, forman grupos discretos; b) Estas células presentan una morfología similar a los hepatocitos de hígado humano; c) Su tiempo de generación no es mayor a 24 horas; d) Muestran incremento en su producción de glucógeno, en presencia de 1% de glucosa en el medio; d) Estas células son capaces de soportar virus, para la preparación de vacunas virales.

Los hepatocitos de la línea celular WRL-68 mantienen su morfología y funciones específicas, lo cual sugiere que estas células pueden utilizarse como un buen modelo para el estudio de las funciones hepáticas *in vitro* (Gutiérrez et al., 1994).

Las células WRL-68 observadas bajo el microscopio fotónico, presentan la típica forma poligonal de células epiteliales (figura 2). Sus características morfológicas son compatibles con las células parenquimáticas de hígado, estas células presentan un patrón de citoqueratinas similar a células hepáticas en hígado (Gutiérrez et al., 1994).

Estas células secretan alpha-feto proteína (AFP) y albúmina lo que indica que las células desempeñan funciones específicas de hígado (Marceau et al.,1989). Las células WRL-68 preservan la actividad de muchas enzimas específicas o características de hígado utilizadas en química clínica para el diagnóstico de desordenes hepáticos como por ejemplo Alanina amino transferasa ALAT enzima que se encuentra únicamente en citoplasma de células hepáticas (Schmidt y Schmidt, 1979), Aspartato amino transferasa ASAT, gamma- glutamyl transpeptidasa GGt enzimas especialmente abundantes en hígado y fosfatasa alcalina.



Figura 2. Hepatocitos humanos de la línea celular WRL-68, se observa que presentan una forma poligonal, típica de células epiteliales.

Entrecruzamientos DNA-Proteínas (DPC).

Los **DPC** son resultado de enlaces covalentes entre dos macromoléculas el DNA y las proteínas (Singh, 2000). Existen dos tipos de **DPC**, los fisiológicos y los patológicos. Los fisiológicos pueden ser por ejemplo los que ocurren para que se realice el empaquetamiento de DNA en espermias. Los entrecruzamientos patológicos entre dos macromoléculas en sitios al azar, pueden ser ocasionados por agentes genotóxicos tales como: rayos X, luz UV, metales, formaldehído, entre otros (Singh, 2000).

Entre los metales que se han reportado como agentes entrecruzadores, se encuentran el Cromo VI, III y II; Níquel II; Cadmio II; Arsénico IV y III. Estos agentes son capaces de entrecruzar proteínas de matriz nuclear, algunas proteínas cromosomales y citoqueratinas con el DNA. La capacidad que tienen los metales de formar entrecruzamientos, depende de la concentración en la que se encuentren y la reactividad que presenten con las macromoléculas involucradas (Wedrychowski *et al.*, 1986).

La participación de los metales como mediadores para la formación de DPC no es muy clara, sin embargo se han propuesto varias alternativas. El oxígeno derivado del H_2O_2 y $O_2^{\cdot -}$ (radical superóxido) en presencia de iones metálicos de transición tales como el cobre o hierro, desencadenan la producción de especies reactivas llamadas radicales libres; la especie reactiva más importante es el radical OH^{\cdot} . La ionización y la radiación UV incrementan la producción del radical súper oxido $O_2^{\cdot -}$ que en presencia de iones metálicos produce radicales OH, los cuales provocan entrecruzamientos del DNA con proteínas (Singh N., 2000).

Se ha establecido firmemente la formación de aductos con DNA producidos por moléculas endógenas reactivas (Marnett y Burchman, 1993). Tanto radicales libres como productos de la peroxidación lipídica generados *in vivo*, se han propuesto como responsables del daño producido al DNA cuando las células no han sido expuestas a agentes físicos o químicos exógenos (Voitkun y Zhitkovich, 1999). La formación de Malondialdehído (MDA), Formaldehído, acetaldehído y otros aldehídos como resultado del proceso de peroxidación lipídica está bien documentado (Esterbauer, 1982). Estos aldehídos son considerados químicos formadores de DPC.

No se conoce con certeza el proceso de formación de DPC pero se ha propuesto que el ataque de radicales libres y otras especies reactivas a proteínas libres provoca modificaciones químicas que conducen a subsecuentes reacciones con el segundo componente no modificado DNA produciendo un crosslink intermolecular (Voitkum y Zhitkovich 1999). Empleando las técnicas de Cromatografía de gases y espectroscopia de masas Dizdaroglu et al. (1989); Gajewsky y Dizdarglu (1990) han encontrado que la forma química más abundante en los DPC inducidos por exposición a radicales libres son los entrecruzamientos entre Timina y Tirosina como resultado de una adición del radical allyl de la timina al carbono 3 de la tirosina seguido de una oxidación del aducto resultante (figura 3).

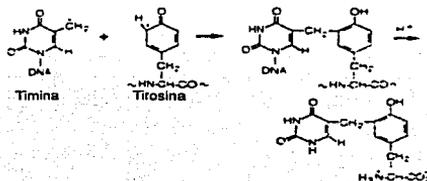


Figura 3. Radicales hidroxilo inducen entrecruzamientos DNA- Proteína involucrando una Timina y una Tirosina. La formación de este aducto ocurre como resultado de la extracción de un átomo de H por un radical OH \cdot del grupo metilo de la Timina; seguido por la adición del radical Timina resultante al carbono 3 de la Tirosina y finalmente la oxidación del aducto resultante (Dizdaroglu et al., 1989)

Las proteínas que se han encontrado en DPC inducidos por metales pesados, usualmente tienen pesos moleculares altos, de entre 94 000 y 200 000 Da (Wedrychowski et al., 1986).

Los DPC son lesiones biológicamente relevantes que estimulan un crecimiento celular acelerado y como consecuencia cáncer (Connaway *et al.*, 1996). Estas lesiones tardan mucho tiempo en repararse (Gant, 1987) y sus mecanismos de reparación son muy poco conocidos. Se ha propuesto que los DPC son reparados por la nucleasa UvrABC, mediante reparación por escisión de nucleótidos. Esta enzima corta la hebra de DNA al final del entrecruzamiento, posteriormente se reemplaza la secuencia de nucleótidos que fue eliminada tomando como templado a la hebra complementaria (Minko *et al.*, 2002).

En ocasiones, los DPC no son reparados correctamente. Cuando esto ocurre se provoca un desequilibrio fisiológico en la célula que la puede conducir a la muerte. Pero si la célula no muere, al dividirse transmite mutaciones a las células hijas que podrían con el tiempo transformarse (Singh, 2000).

Se ha sugerido a los DPC como biomarcadores de exposición a agentes genotóxicos. Se conocen diversas técnicas para la detección de los DPC. La técnica más utilizada es empleando filtros de elusión (Bradley y Disart, 1985). Los entrecruzamientos pueden ser detectados con microscopía electrónica (Bohr y Nielsen, 1984). Otra técnica consiste en la precipitación selectiva del DNA asociado con proteínas utilizando K-SDS (Toniolo *et al.*, 1993). Recientemente se demostró que también se pueden identificar DPC utilizando electroforesis con microgeles, dado que el DNA entrecruzado con proteínas, disminuye significativamente su migración en electroforesis alcalina (Singh, 2000). Otro método para detectar entrecruzamientos consiste en evaluar las alteraciones en los patrones de digestión del DNA por endonucleasas de restricción, ya que la asociación de una proteína al DNA impide que la endonucleasa reconozca su sitio de corte (Yong Chen *et al.*, 1991).

Principios y aplicaciones de la hibridación "in situ".

La hibridación "in situ", fue descrita en 1969 por Joseph Gall y Mary Lou Pardue (Gall y Pardue, 1969). Pocos meses después, dos grupos más de investigadores publican resultados similares (John *et al.*, 1969; Buongiorno-Nardelli y Amaldi, 1970) es una de las herramientas más utilizadas actualmente en Biología Celular y Molecular, para la detección de secuencias particulares de ácidos nucleicos en compartimientos celulares definidos (figura 4).

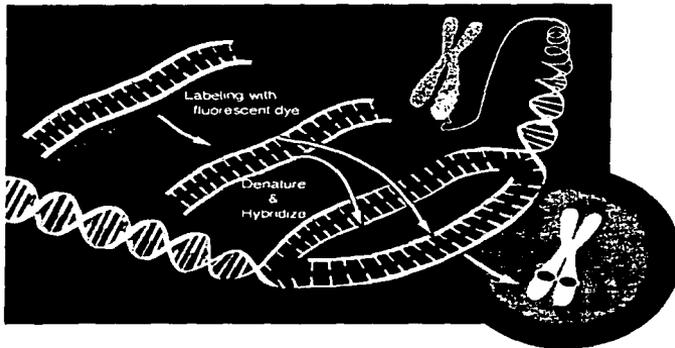


Figura 4. Hibridación *in situ* fluorescente. La secuencia de ácidos nucleicos que será introducida a las células para detectar la secuencia complementaria específica (la sonda), se marca *in vitro*, posteriormente ésta se desnaturaliza para que se realicen reasociaciones de cadenas complementarias y así formar estructuras duplex en compartimientos celulares.

La hibridación de ácidos nucleicos, se basa en la formación de dobles cadenas entre dos secuencias nucleotídicas complementarias (Alberts *et al.*, 1986). La hibridación de ácidos nucleicos es un método poderoso para detectar y cuantificar secuencias de DNA y RNA específicas. Las reasociaciones de cadenas

complementarias para formar estructuras duplex pueden ser llevadas a cabo en una variedad de formas: ya sea con RNA o DNA en solución y DNA de una sola cadena inmovilizado en agar o filtros de nitrocelulosa, o bien químicamente unidos a una matriz insoluble.

El proceso que involucra todos los métodos basados en la hibridación molecular fue descrito por primera vez por Marmur y Doty en 1961 (en Southern, 1985). A partir de este descubrimiento se establecen dos hechos importantes: a) las dos secuencias involucradas en la formación de la doble hélice pueden tener solo un grado de complementariedad y b) la estabilidad del doblete formado, depende de la extensión de la complementariedad (Southern, 1985).

La reasociación de ácidos nucleicos involucra la incubación de moléculas de una sola cadena bajo condiciones de fuerza iónica y temperatura, las cuales favorecen la formación de dobletes de cadenas base-apareadas (Young y Anderson, 1985).

La sonda.

Todas las metodologías que emplean el proceso de hibridación de ácidos nucleicos comprenden básicamente el uso de un fragmento de DNA de una sola cadena marcado específicamente *in vitro*, conocido como "sonda". Esta reacciona y se une con su cadena de DNA complementaria. Los híbridos son visualizados utilizando métodos de detección que reconocen específicamente la marca de la "sonda" de DNA (Volkers *et al.*, 1989).

La sonda es la secuencia de ácidos nucleicos que será introducida a las células para detectar la secuencia complementaria específica. Las sondas pueden ser fragmentos de DNA, oligonucleótidos, fragmentos de DNA generados por PCR, RNA antisense ó RNA sense producidos por transcripción *in vitro*.

Marcado de la sonda

La sonda puede ser marcada por *nick translation*. Rigby y cols. (1977) demostraron que este método es eficiente y reproducible. No altera las características originales del DNA sin marcar. El método se basa en la actividad de las enzimas DNasa y DNA polimerasa. La primera hace cortes puntuales en la molécula de DNA (pellizcos "nicks") y la segunda repara estos cortes, pero no solo introduce un nucleótido en el punto donde hubo el daño, sino que continúa recorriendo el corte a lo largo de la molécula e introduciendo nucleótidos hasta que encuentra una señal de término, que puede ser el final de la molécula, en el caso de las sondas (figura 5).

La reacción de *nick translation* involucra la acción de dos enzimas: 1) la DNasa I (dosoxirribonucleasa pancreática de bovino), que es una endonucleasa que hidroliza DNA de una o de dos cadenas, hasta una mezcla compleja de mono u oligonucleótidos con terminación fosfato 5'. 2) la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*. La DNasa I ataca de manera independiente cada cadena de DNA, resultando en fragmentos de una sola cadena. Los sitios de corte están distribuidos al azar y el grado de hidrólisis (o *nicking*) puede ser controlado por la concentración de la DNasa I y el tiempo de la reacción. La holoenzima DNA polimerasa I cataliza la reacción de acoplamiento y la adición de secuencias de residuos de nucleótidos a la cadena 3' hidroxil-terminal de un fragmento, con la eliminación de unidades de nucleótidos de 5' fosfato terminal. Con desoxinucleótidos trifosfato (marcados isotópicamente o no isotópicamente) como sustratos, los nucleótidos preexistentes no marcados en el molde de DNA son reemplazados por los marcados por la acción de la DNA polimerasa (Chan y McGee, 1990).

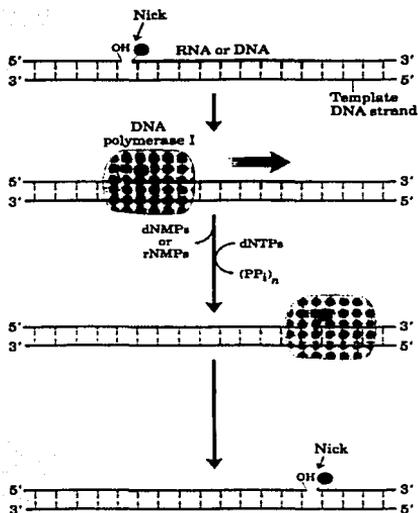


Figura 5. Marcaje de DNA por *nick translation*. La DNasa realiza un *nick* (Ruptura de un enlace fosfodiéster dejando libres un OH 3' y un fosfato 5'), posteriormente la DNA polimerasa 1 reconoce el *Nick*, esta enzima funciona como exonucleasa en dirección 5'→3' degradando la cadena de DNA apareada con aquella que le sirve de templado. Simultáneamente va reemplazando la hebra degradada introduciendo así los nucleótidos marcados.

Actualmente, el marcado de las sondas para hibridación *in situ* se realiza utilizando generalmente precursores no isotópicos, como nucleótidos análogos modificados con la vitamina **Biotina** (figura 6) o con el esteroide **Digoxigenina** este tipo de marcado tiene la ventaja adicional de que la detección se puede llevar a cabo de diferentes maneras.

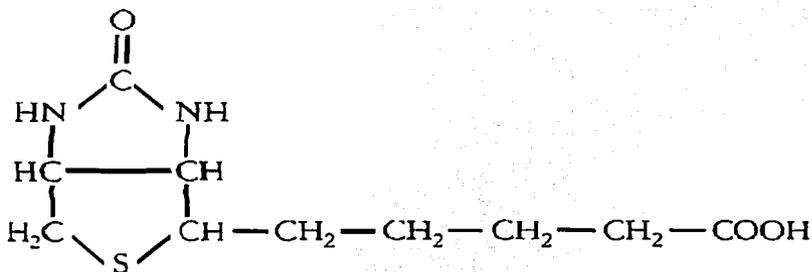


Figura 6. Estructura química de la Biotina.

Detección de la sonda.

Cuando se utiliza a la vitamina Biotina (PM 244.3) como marcador, la detección se basa en la alta afinidad que la proteína Avidina presenta por esta vitamina. Esta afinidad es extremadamente alta ($K_d \approx 10^{-15}$ M), que es casi equivalente a una unión covalente. La Avidina puede ser acoplada a una enzima cromógena (peróxidasa, fosfatasa alcalina) para su detección con el microscopio de campo claro, a un fluorocromo (fluoresceína o rojo Texas) para su detección con el microscopio de epifluorescencia y a partículas de oro coloidal de un diámetro determinado, para su detección con el microscopio electrónico de transmisión. La detección puede también llevarse a cabo con anticuerpos anti-biotina acoplados a enzimas, fluorocromos o partículas de oro coloidal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los entrecruzamientos DNA-Proteínas (DPC) representan lesiones potencialmente importantes inducidas por una gran variedad de agentes de conocida actividad carcinogénica, entre los que se encuentra el Arsénico. Si estas lesiones no son reparadas rápidamente y se inducen a concentraciones no citotóxicas podrían alterar la estructura de la cromatina, inhibir la transcripción de genes o generar rompimientos de DNA en el momento de la replicación al impedir que se dupliquen las regiones en contacto con las proteínas.

Existe la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para conocer el proceso por el cual se generan y se procesan este tipo de lesiones, para poder asociarlos a marcadores de riesgo carcinogénico como son las aberraciones cromosómicas y los micronúcleos.

En el presente trabajo se generaron sondas a partir de los segmentos de DNA entrecruzados con proteínas mediante su marcaje con nucleótidos biotinilados por el método de *nick translation*. Las sondas así generadas se utilizaron en la localización nuclear y cromosómica de las secuencias de DNA involucradas en DPC inducidos por arsenito de sodio en la línea celular WRL-68.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Marcar mediante *nick translation* los fragmentos de DNA entrecruzados con proteínas para su utilización como sondas.

Objetivos particulares.

Inducir la formación de complejos DNA-Proteína (DPC) en hepatocitos de la línea celular WRL-68 mediante tratamientos con NaAsO_2 .

Aislar los complejos DNA -Proteína (DPC) por precipitación selectiva utilizando KCl-SDS.

Determinar la integridad del DNA extraído de los DPC mediante una prueba de digestión con la endonucleasa Mbo 1.

Marcar con bases biotiniladas por el método de *nick translation* el DNA extraído de los DPC.

Realizar un estudio funcional de las sondas generadas, mediante una prueba de hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) en linfocitos de sangre periférica.

HIPOTESIS.

Si el DNA extraído de los complejos DNA-Proteína se encuentra íntegro, entonces puede ser marcado por el método de *nick translation*, para utilizarse como sonda en la localización nuclear y cromosómica de las secuencias.

METODOS.

Cultivo de células.

Se descongelaron células de la línea celular WRL-68 y se sembraron en cajas de plástico estériles, adicionando a la caja lentamente 15 mililitros de Medio Dulbecco Eagle Modificado (DMEM) de Sigma suplementado con 8% de suero fetal bovino (Gibco BRL 16000-044), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL 11140-050) 100 U/ml de Penicilina y 100µg/ml de estreptomycin (Gibco BRL 15070-089). Las cajas se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂ hasta confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado cada dos días.

Al transcurrir 7 días, las células alcanzaron la fase de confluencia y fueron tripsinizadas para ser transferidas a cajas de cultivo más grandes. Para tripsinizar, se retiró el medio de cultivo de las células y se enjuagaron con PBS estéril. Posteriormente se agregó 1.5 ml de tripsina (Apéndice 3) de Sigma y se incubó momentáneamente la caja con tripsina a 37 °C , hasta observar a contraluz la separación de las células. Una vez separadas las células, se agregaron 4ml de medio DMEM suplementado para inactivar a la tripsina y este material se trasladó a una caja de mayor tamaño, donde se agregaron 26ml más de medio DMEM para cubrir bien la cara de la botella donde crecerían las células (figura 7).

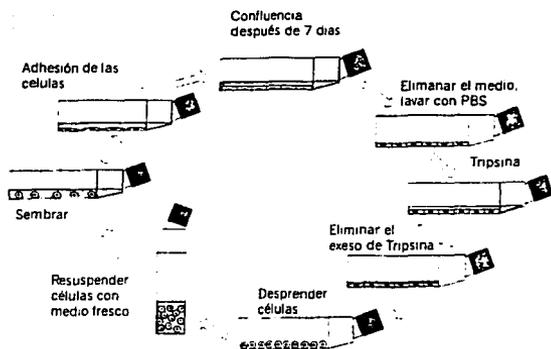


Figura 7. Cultivo de células en monocapa. Distintas etapas en el ciclo de cultivo y crecimiento de células en monocapa seguidas de Tripsinización (Fresheny, 2000).

Tratamiento a las células WRL-68 con NaAsO₂.

Cuando las células alcanzaron la fase de confluencia, fueron enjuagadas dos veces con PBS estéril, para posteriormente adicionarles el medio de cultivo DMEM suplementado con NaAsO₂ 1×10^{-5} M en el que permanecieron durante 18 horas para inducir la formación de DPC, las células fueron tratadas en fase de confluencia para evitar la formación de DPC en fase S, ya que los DPC interfieren en la replicación del DNA. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo y las células fueron enjuagadas dos veces con PBS. Finalmente se lavaron con 10 ml de PBS en las cajas de cultivo y se desprendieron de la pared de la caja con la ayuda de un cepillo.

Viabilidad celular.

Se determinó la viabilidad de las células después del tratamiento con NaAsO_2 utilizando el colorante azul trypan (Sigma) que da información sobre el estado fisiológico de la membrana celular. Se tomó una alícuota de 10 microlitros de la suspensión celular adicionando $80\mu\text{l}$ de colorante y $910\mu\text{l}$ de PBS 1x. Las células se observaron en una cámara de Neubauer bajo el microscopio fotónico, para determinar el porcentaje de viabilidad se contaron las células claras y oscuras como se describe en la figura 8.

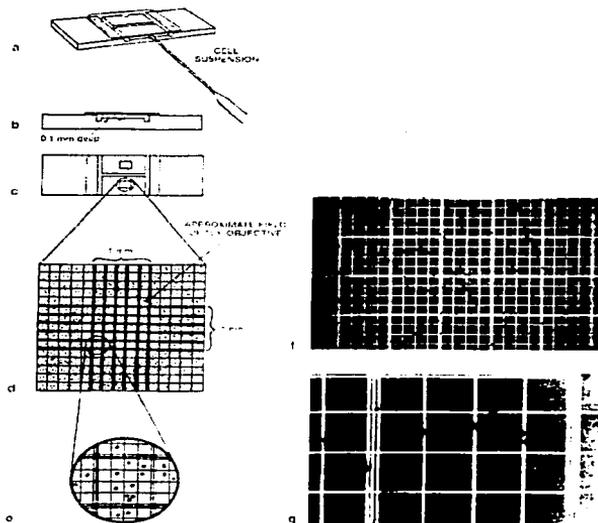


Figura 8. Colocando una pequeña alícuota de la suspensión celular con azul trypan al 2% en una cámara de Neubauer, es posible cuantificar las células que se encuentran vivas (células claras) así como las células muertas (células oscuras), ya que el colorante nos permite conocer el estado físico de las membranas, cuando la membrana de la célula se encuentra dañada, entra el colorante por lo que la célula se tiñe más intensamente.

Aislamiento de los complejos DNA-Proteínas (DPC).

La precipitación de los DPC se llevó a cabo empleando el método descrito por Costa, M. y colaboradores (1992). En breve, después de la determinación de viabilidad, las células fueron lisadas utilizando 0.5 ml de solución A (SDS 2%, PMSF 1mM, Tris-HCl 20mM) y se congelaron a -70°C. Las células se descongelaron en un baño de agua a 37°C y el DNA se fragmentó pasando la solución por una aguja de acero calibre 21 en cuatro ocasiones, lo cual garantiza una fragmentación relativamente uniforme de segmentos de 20 Kb aproximadamente (Zhitkovich *et al.*, 1992). Los lisados se vaciaron a un tubo Eppendorf ejerciendo cierta presión y evitando al máximo la formación de burbujas. Se adicionaron 0.5ml de solución B (KCl 100mM, Tris-HCl 20mM, pH 7.5) y se mezcló en el vortex. Las muestras se incubaron a 65°C por 10 min., luego cada tubo se invirtió 3 veces y se colocó en hielo durante 5 min., para permitir la formación del precipitado KCl-SDS-Proteínas-DNA. Los precipitados se colectaron por centrifugación a 6000g por 5min a 4°C. Los sobrenadantes se descartaron y las pastillas se resuspendieron en 1ml de solución C (100mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.5). Las muestras se calentaron y se lavaron 3 veces como se describió anteriormente. Después del último lavado se resuspendió la pastilla en 250µl de solución D (100mM KCl, 10mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 7.5).

Con el fin de caracterizar los fragmentos de DNA presentes en los DPC, se degradaron las proteínas entrecruzadas al DNA con una solución de proteinasa K. Se agregaron 25µl de Proteinasa K (Sigma, USA) a razón de 0.2 mg/ml y se incubó a 50°C durante 3h para degradar la mayor cantidad de proteínas entrecruzadas con el DNA. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 50µl de BSA (Sigma, USA) a razón de 4mg/ml, las muestras se colocaron 5 min. en hielo. Se obtuvo el DNA entrecruzado con proteínas mediante centrifugación a 12 000g durante 10min a 4° C. Se recuperó el sobrenadante y se congeló a -70° C (figura 9).

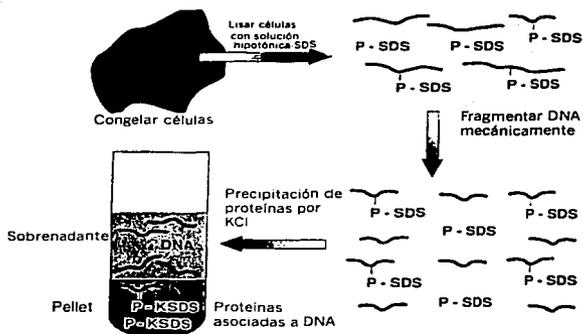


Figura 9. Descripción del principio de Precipitación de los DPC. Después de lisadas las células con una solución hipotónica, se agrega una solución con SDS. El detergente SDS se une fuertemente a proteínas formando complejos P-SDS. Posteriormente se cortan fragmentos de DNA mecánicamente, haciéndolos pasar a través de una aguja de calibre 21, así, se pueden separar los fragmentos de DNA que no se encuentran unidos a proteínas, mediante centrifugación. Una vez que se tienen los complejos DNA-P-KSDS, se adiciona Proteínasa K, para degradar a las proteínas que por un lado se encuentran asociadas a DNA y por otro al SDS, de esta manera se puede recuperar íntegramente el DNA que formó parte de los DPC (Costa *et al.*, 1993).

Determinación de DNA por fluorescencia.

Para estimar el porcentaje de DNA entrecruzado con proteínas, se determinó la cantidad de DNA total y DNA de los DPC, utilizando el tinte fluorescente Hoechst (bis-benzimida) que se intercala en las regiones A-T del DNA y cuya fluorescencia indica la cantidad de DNA presente en cada muestra de una manera indirecta. Para tomar las lecturas en el fluorómetro, se tomó una alícuota de 10 μ l de cada muestra, se agregaron 978 μ l de solución C (apéndice 4) y 12.5 μ l de tinte Hoechst (0.002mg/ml). Se elaboró una curva con concentraciones conocidas de DNA para interpolar los valores de fluorescencia obtenidos en cada lectura.

Precipitación del DNA con Etanol.

Para eliminar los restos de SDS y concentrar el DNA, este fue precipitado con dos volúmenes de etanol absoluto (frío) y 0.1 volúmenes de Acetato de Sodio 0.3M. Esta mezcla se colocó a -20°C . Durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 RPM a 4°C , se decantó el sobrenadante, los pelets fueron enjuagados con etanol al 70% y se colocaron los tubos con el DNA en un baño a 50°C para evaporar el alcohol restante, una vez que el DNA se encontró totalmente seco (se observó transparente), se resuspendió con 100 microlitros de buffer 10mM Tris, 0.1mM EDTA con ayuda de una micropipeta a 50°C .

Concentración y pureza del DNA.

Se colocó una alícuota de 5 microlitros del DNA resuspendido en buffer Tris-EDTA, en 1ml del buffer TBE 1X, para calcular la concentración y pureza del DNA por absorbancia a 260 y 280nm en el espectro de luz UV, empleando un espectrofotómetro controlado por un microprocesador (modelo Ultrospec 2000 de Pharmacia Biotech).

La concentración del DNA se midió utilizando la absorbancia a 260nm, ya que se sabe que una solución de DNA con una densidad óptica de 1.0 (1.0 Unidad de Absorbancia) tiene una concentración de $50\mu\text{g/ml}$, en una cubeta de paso de luz de 10mm.

El índice de pureza se estimó dividiendo la lectura de absorbancia en el espectro a 260 entre la lectura de absorbancia a 280nm. Considerando que un índice de 1.8 equivale a 100% de pureza en el DNA.

Digestión del DNA con la endonucleasa Mbo 1.

Se fragmentó el DNA presente en los DPC con la enzima de restricción Mbo 1 (Gibco BRL 15248-016) que reconoce como sitio de corte la secuencia de bases 5' GATC 3' en una cadena y 3'CTAG 5' en la otra cadena.

Se colocaron 10 microgramos del DNA que se obtuvo de los DPC en un tubo Eppendorf, a este se agregaron 5µl del buffer React 2 a una concentración 10X (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 500 µg/ml BSA, 50% v/v glicerol y 0.1% w/v Triton x-100), 39µl de H₂O estéril y una unidad de la enzima

Mbo 1. Esta mezcla se incubó a 37°C. En un baño de agua y se tomaron muestras de 10µl a los tiempos 10',15',20' y 30'.

Determinación del tamaño de los fragmentos de DNA.

Las muestras de DNA obtenidas en los distintos tiempos de digestión 0', 10', 15', 20' y 30' se corrieron en un gel de agarosa al 1% w/v mediante electroforesis horizontal.

Se colocaron 6 microlitros de muestra en cada carril adicionando 2 microlitros de mezcla de aplicación (50mM glicerol, 10mM Tris pH 7.5, 0.1% Azul de Bromofenol y 0.1% Xilen-Cianol). En uno de los carriles se corrieron 2 microlitros de marcador de peso molecular de 1Kb plus de Gibco como referencia. Las muestras se corrieron durante 45 minutos a 80V en la cámara de electroforesis horizontal. Los carriles de DNA se observaron por fluorescencia de Bromuro de Etidio a 254nm de luz UV.

Marcaje de DNA por Nick Translation.

Existen varias técnicas que se utilizan para marcar ácidos nucleicos. En este trabajo utilizamos el método propuesto por Rigby et al., en 1977 denominado *nick translation*, por ser un método eficiente y sencillo que no altera las características originales del DNA sin marcar. El método se basa en la actividad de las enzimas DNasa I (desoxirribonucleasa pancreática de bovino) y DNAPolimerasa 1 de *Escherichia coli*. La primera hace cortes puntuales en la molécula de DNA (pellizcos=nicks) y la segunda repara esos cortes, pero no solo introduce un nucleótido en el punto donde hubo daño, sino que continua recorriendo el corte a lo largo de la molécula e introduciendo nucleótidos hasta que encuentra una señal de término (que puede ser el final de la molécula, en el caso de las sondas).

El marcaje de la sonda se realizó utilizando nucleótidos análogos modificados con la vitamina Biotina. Antes de llevar a cabo la reacción de *nick translation*, el DNA fue precipitado con etanol-acetato de K como se describió previamente. Posteriormente se colocaron los siguientes reactivos en un tubo Eppendorf de 1.5ml que se encontraba inmerso en hielo: 2.5 μ l de mezcla 0.2mM de deoxinucleotidos trifosfatados dNTP (excepto dCTP), 2.5 μ l de mezcla de dNTP (excepto dGTP) con una concentración de 0.2mM de cada nucleótido, 1 μ g de DNA, 2.5 μ l de la solución 0.4mM de biotin-14-dCTP y 41.9 μ l de H₂O estéril. Finalmente se agregaron 5 μ l de la mezcla DNasa /DNAPolimerasa. Dicha mezcla se homogenizó con una microcentrífuga y se incubó durante 60 minutos a 15°C. Transcurrido ese tiempo se detuvo la reacción de marcaje con un buffer 0.5M EDTA pH 8. Las sondas generadas se precipitaron con etanol-Acetato de Potasio y se resuspendieron con formamida desionizada.

Cultivo de sangre entera, aislamiento y fijación de linfocitos.

Primeramente se heparinizó una jeringa y se tomaron 10ml de sangre de un donador adulto sano del sexo masculino. Se colocaron 15 gotas de sangre en tubos de 15 ml estériles que contenían 5ml de medio RPMI-1640 (Sigma R-4130) suplementado con l-glutamina y aminoácidos no esenciales, agregando 200µl de Fitohemaglutinina en cada tubo y se incubaron a 37°C durante 72 horas. Una hora antes de la cosecha se colocaron 250µl de Colcemid para arrestar en metafase a las células que se estuvieran dividiendo.

Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron los tubos a 1000 RPM durante 10 minutos para recuperar las células y se resuspendieron con una solución hipotónica de KCl 0.075 M manteniéndolas en esta solución durante 40 minutos a 37° C para estallar a los eritrocitos. Las células se centrifugaron nuevamente a 1000 RPM y se desechó el sobrenadante con las membranas de los eritrocitos. Las células se lavaron dos veces más con fijador frío (metanol-ácido acético 3:1), centrifugando durante 10 minutos para eliminar completamente los residuos de eritrocitos. Después del último lavado las células fueron resuspendidas en 500µl de fijador. Finalmente se tomó una gota de esta suspensión y se colocó sobre una laminilla limpia previamente cubierta con sigmacote (de sigma) para adherir las células a la laminilla.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Para evaluar la funcionalidad de las sondas de DNA generadas por *nick translation*, se realizaron ensayos de hibridación *in situ* en linfocitos de sangre periférica. La prueba de FISH se realizó de acuerdo a la metodología descrita en *Current Protocols in molecular biology (2000)* con algunas modificaciones.

Las laminillas se trataron con Proteinasa K 0.5µg/ml en 20mM Tris/2mM CaCl₂ durante 10 minutos a 37° C, enseguida se enjuagaron dos veces en PBS. Las laminillas se deshidrataron empleando una serie de alcoholes graduados 70°, 85°, 96° y 100°, se desnaturizó el DNA nuclear de los linfocitos colocando las laminillas en una solución 70% formamida en 2 X SSC durante 2 minutos a 70°C. Nuevamente se deshidrataron las laminillas en alcoholes graduados 70°, 85°, 96° y 100° (dos minutos en cada uno a 4° C).

La sonda que se generó por *nick translation* fue resuspendida en 10µl de formamida desionizada y 0.5µl de DNA de esperma de salmón y se desnaturizó por calentamiento a 70° C durante 10 minutos e inmediatamente después se enfrió en hielo.

Se colocaron 100 ng de sonda con hibridisol VI de Oncor (50% formamida en 2xSSC) sobre las laminillas, se cubrió con un cuadro de parafilm de 22 X 22mm. y la hibridación se realizó a 37°C en una cámara húmeda durante toda la noche.

Al día siguiente, se removió el parafilm y las laminillas se lavaron durante 15 min. en 50% formamida/2 x SSC a 37° C y posteriormente se mantuvieron 15 minutos en 2 x SSC a 37° C seguido de 15 minutos en 1 x SSC a temperatura ambiente. Las laminillas se incubaron en una solución Preblock (4 xSSC con 5% de leche en polvo sin grasa y 0.02% de acida de Sodio) durante 5 minutos, seguidos de una incubación de 45 minutos en oscuridad con solución detectora de Biotina (4 x SSC con 1% de BSA y 5µg/ml de Avidina acoplada a Fluoresceína). Las laminillas se lavaron secuencialmente durante 10 minutos en 4 x SSC, 4 x SSC con 0.1% de Triton X-100, y 4 x SSC respectivamente. Para contrastar el DNA las laminillas se mantuvieron durante 5 minutos en 1µg/ml de yoduro de propidio en PBS. Se lavaron las laminillas brevemente en 1 x SSC, y finalmente se colocó sobre ellas 10µl de medio de montaje para fluorescencia *antifade* (Apéndice 4) , se cubrieron un cubreobjetos y se sellaron con esmalte para uñas transparente.

Las laminillas se examinaron en un microscopio de fluorescencia con un filtro de triple banda y posteriormente en un microscopio confocal.

Análisis en el microscopio confocal.

En principio, las laminillas se observaron con el objetivo 10X (Con un filtro de triple banda que permite detectar tanto la fluorescencia del Yoduro de Propidio como la de fluoresceína), para localizar las células con hibridación *in situ*.

Una vez identificada la célula de interés, se cambió al objetivo de inmersión 40X y se transfirió la imagen a una computadora para ser analizada con el programa Confocal Assistant Sharp. Exe. Para hacer una reconstrucción de la célula en tercera dimensión, se hicieron cortes ópticos seriales a intervalos de 1µm.

RESULTADOS.

Después del tratamiento con NaAsO₂ las células WRL-68 mostraron una viabilidad igual a 78%. El Arsenito de sodio en una concentración de 1×10^{-5} M indujo una proporción significativa de DPC *in vitro*. Los valores basales de DPC obtenidos en este trabajo fueron de 4.94% de DNA entrecruzado con proteínas. En las células tratadas con Arsenito de sodio la cantidad de entrecruzamientos se incrementó considerablemente hasta alcanzar un valor de 14.59% de DNA entrecruzado (tabla 1).

Muestra	Fluorescencia del DNA total	DNA total µg/ml	Fluorescencia del DNA entrecruzado	DNA entrecruzado µg/ml	Porcentaje de DNA entrecruzado
Control	1 602	541.250	159	26.777	4.94%
Tratamiento con NaAsO ₂	1 628	550.0	475.6	80.240	14.59%

Tabla 1. Se estimaron las cantidades de DNA mediante fluorescencia empleando el tinte Hoechst 33258 (que se intercala en las regiones A-T del DNA). Los valores de DNA se interpolaron en una recta establecida con valores de fluorescencia del tinte Hoechst en función de la concentración de DNA.

La precipitación de los DPC con KCl-SDS se basa en la fuerte afinidad que presenta el detergente SDS por las proteínas, no así por el DNA (Alberts *et al.*, 1996).

Los valores de absorbancia obtenidos para esta prueba son $A_{\lambda 260} 189 / A_{\lambda 280} 117 = 1.61$ lo que indica la presencia de restos de algunos otros materiales (péptidos o aminoácidos) asociados al DNA.

La lectura de Absorbancia a 260nm fue de 0.189; se sabe que una solución de DNA con una Unidad de Absorbancia tiene una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, por lo tanto la lectura de Absorbancia indica una concentración de 9.45 $\mu\text{g/ml}$, este dato multiplicado por 200 (dilución de trabajo) nos da el valor de concentración final de la solución de DNA = 1.89 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

En la figura 10 se observan los tamaños del DNA en los distintos tiempos de digestión. Antes de la digestión con la endonucleasa Mbo 1 la mayoría de los fragmentos se encontraron en un rango mayor a 12 000 pb. (carril 2) Se puede apreciar que la digestión total ocurre a los 15 minutos después de iniciada la reacción (carril 4). La digestión total da como resultado fragmentos menores a 3000pb.

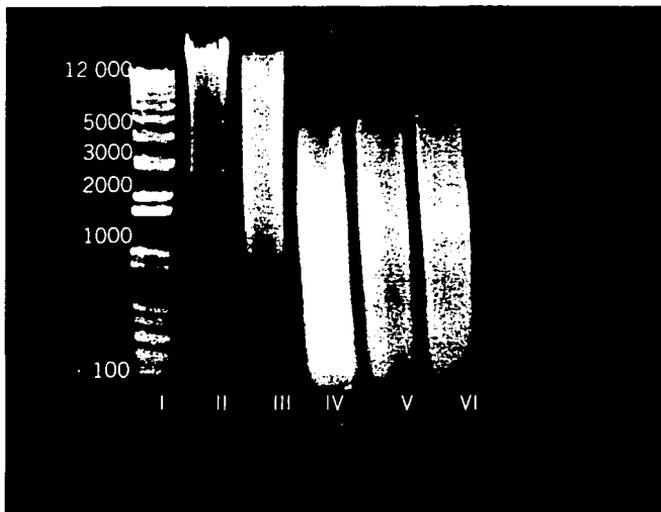


Figura 10. Electroforesis en geles de Agarosa al 1%, seguidos de fluorescencia con Bromuro de Etidio de los segmentos de DNA (extraídos de los DPC) en los distintos tiempos de digestión con la endonucleasa de restricción Mbo I. Los carriles corresponden a I) Marcador de peso molecular de 1Kb plus de Gibco BRL. II) DNA sin digerir, tiempo 0 de la reacción. III) DNA digerido durante 10' se observa que la digestión no ha sido completada. IV) DNA digerido durante 15' se aprecia que la digestión se ha completado. V) DNA digerido 20'. VI) DNA digerido 30'. Los carriles IV, V y VI mostraron un patrón de corrimiento similar.

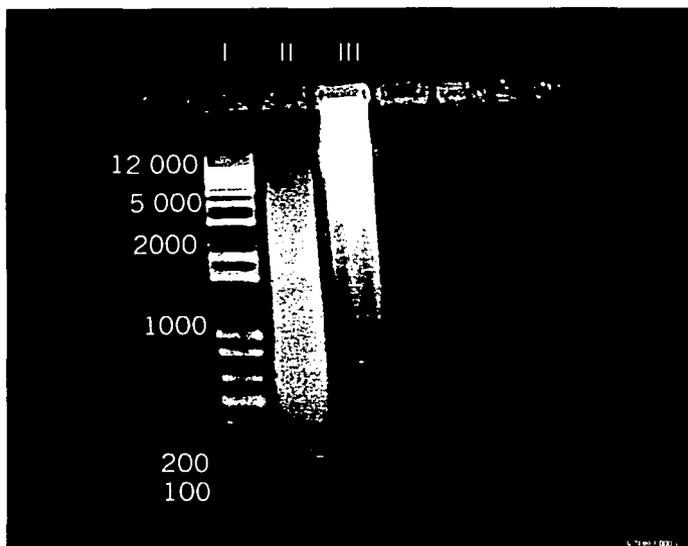


Figura 11. Electroforesis en geles de Agarosa al 1%, seguidos de fluorescencia con Bromuro de Etidio de los segmentos de DNA (extraídos de los DPC) marcados con Biotina por el método de *nick translation*. Los carriles corresponden a I) Marcador de peso molecular de 1Kb plus de Gibco BRL. II) DNA marcado. III)DNA sin marcar. Se observa que después de la reacción de marcaje, el tamaño de los fragmentos se encuentra en un rango de 200 a 5000pb. Mientras que antes del marcaje el tamaño de los segmentos tiene un rango de 5000 a más de 12 000pb.

Una vez marcado el DNA extraído de los DPC, se corrió en un gel de Agarosa al 1% para verificar el tamaño de los fragmentos resultantes de la reacción de Nick Translation. Los fragmentos se encontraron en un rango de 200 a 5000pb como se observa en la figura 11.

En la prueba de FISH, se observaron señales de hibridación en núcleos interfásicos y en metafases, como se muestra en la figura 12. El análisis de las células se realizó con ayuda de un microscopio confocal haciendo una reconstrucción de la célula mediante cortes ópticos seriales. La detección de fragmentos específicos de DNA en células y tejidos por medio de hibridación molecular *in situ* es una técnica de alta especificidad. Con ella es posible detectar secuencias de ácidos nucleicos en el interior de las células y/o en extendidos de cromosomas metafásicos, agregando una secuencia de ácidos nucleicos marcada (sonda), sobre una preparación de células o tejidos y haciendo disponible la secuencia complementaria en ese material, es posible conocer la posición que ocupa ésta secuencia en el núcleo e incluso en los cromosomas (Segura *et al.*, 1997)

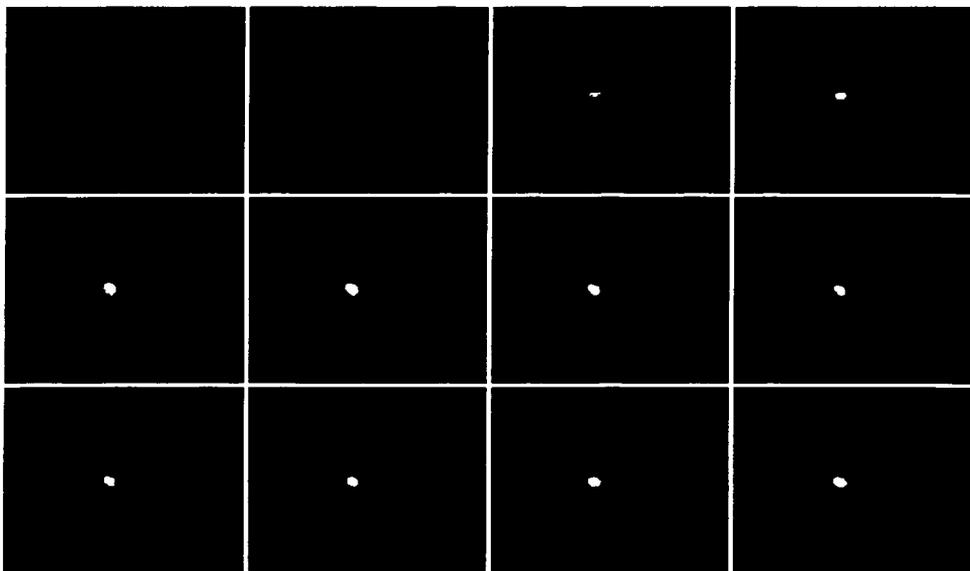


figura 12. Análisis confocal de núcleos de linfocitos humanos en interfase con hibridación *in situ* fluorescente (FISH) empleando sondas generadas por *nick translation* de los fragmentos de DNA extraídos de DPC. Los núcleos fueron teñidos con Yoduro de Propidio y la detección de Biotina se llevó a cabo utilizando Avidina acoplada a Fluoresceína.

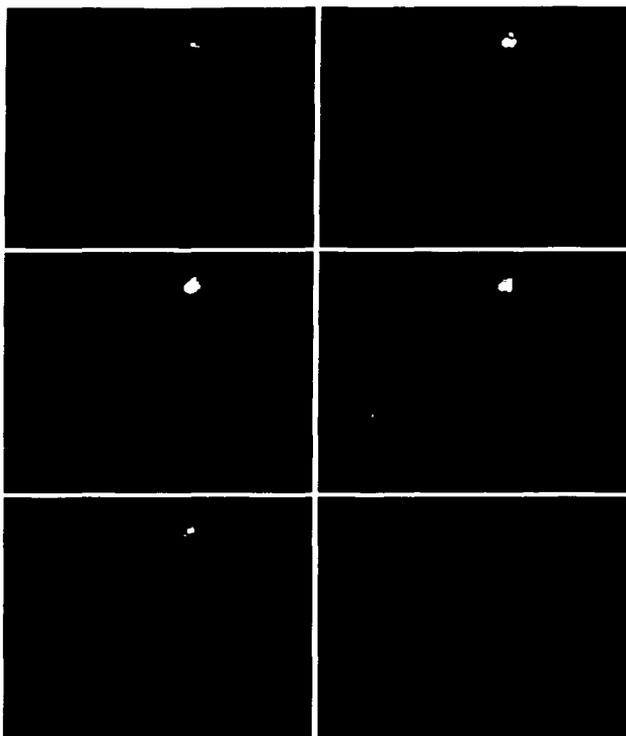


figura 13. Análisis confocal de núcleos de linfocitos humanos en interfase con hibridación *in situ* fluorescente (FISH) empleando sondas generadas por *nick translation* de los fragmentos de DNA extraídos de DPC. Los núcleos fueron teñidos con Yoduro de Propidio y la detección de Biotina se llevó a cabo utilizando Avidina acoplada a Fluoresceína.

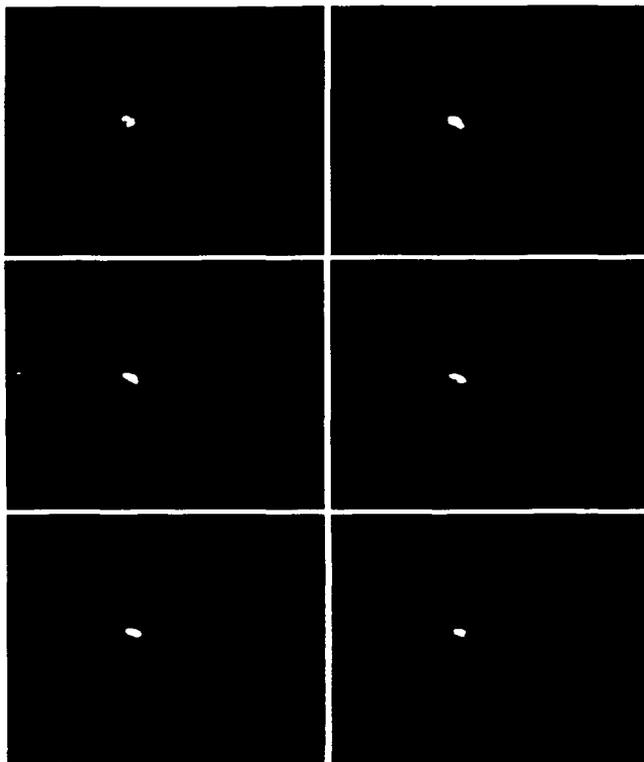


figura 14. Análisis confocal de núcleos de linfocitos humanos en interfase con hibridación *in situ* fluorescente (FISH) empleando sondas generadas por *nick translation* de los fragmentos de DNA extraídos de DPC. Los núcleos fueron teñidos con Yoduro de Propidio y la detección de Biotina se llevó a cabo utilizando Avidina acoplada a Fluoresceína.

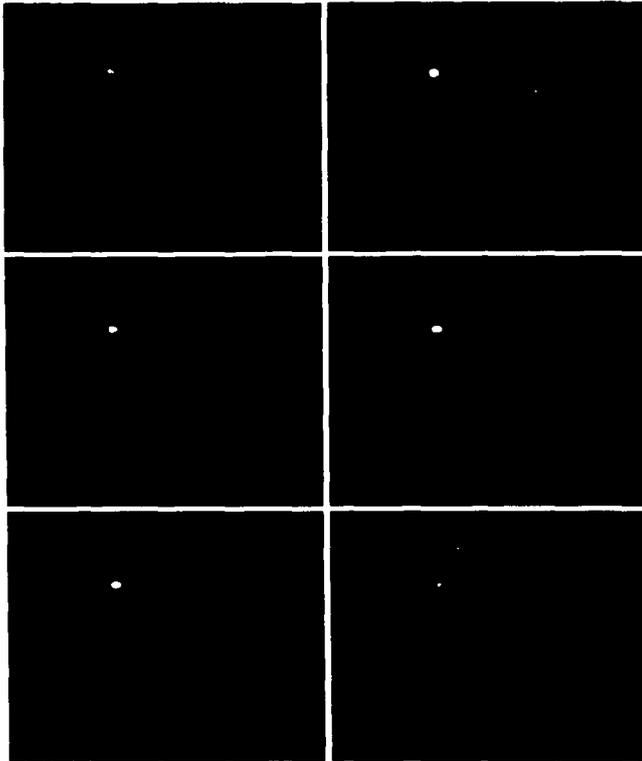


figura 15. Análisis confocal de núcleos de linfocitos humanos en interfase con hibridación *in situ* fluorescente (FISH) empleando sondas generadas por *nick translation* de los fragmentos de DNA extraídos de DPC. Los núcleos fueron teñidos con Yoduro de Propidio y la detección de Biotina se llevó a cabo utilizando Avidina acoplada a Fluoresceína

DISCUSIÓN.

Los DPC representan un tipo de daño genético cuyo significado biológico es escaso y que han sido propuestos como biomarcadores en la estimación de riesgo por exposición a agentes carcinógenos como formaldehído y para algunos metales como el Arsénico (Ramirez *et al.*, 2000).

A pesar de los estudios enfocados en este tipo de daño, aun no se conoce la naturaleza química de los DPC. Es necesario conocer la naturaleza química de estos entrecruzamientos para entender las consecuencias biológicas que tienen en las células. Se sabe que la capacidad entrecruzadora de algunos metales, se debe a su reactividad con las macromoléculas involucradas así como a la distancia a la que se encuentran de estas (Wedrychowsky *et al.*, 1986). También se ha reportado que el Oxígeno derivado del H_2O_2 y el radical superóxido O_2^- en presencia de iones metálicos de transición desencadenan la producción de radicales libres los cuales provocan entrecruzamientos entre DNA y proteínas (Singh, 2000).

A pesar de que se desconoce el significado biológico de los entrecruzamientos, se han postulado diversos eventos que resultan de la formación de DPC. La formación de entrecruzamientos covalentes entre el DNA y las proteínas, puede alterar la estructura de la cromatina, inhibir la expresión de algunos genes e impedir la replicación del DNA incrementándose así la cantidad de deleciones, que pueden dar origen a aberraciones cromosómicas y así generar células aneuploides mediante disrupciones en proteínas del citoesqueleto (Sugiyama *et al.*, 1989 y Vega *et al.*, 1995), debido a que tanto la replicación como la regulación de la expresión del DNA, depende de interacciones específicas transitorias entre el DNA y algunas proteínas, cuando existen proteínas unidas al DNA de manera permanente, obstruyen los sitios de unión de aquellas que participan en los

procesos de transferencia de información genética. Si estas lesiones no son reparadas, la presencia de proteínas unidas covalentemente al DNA puede actuar como una barrera para la maquinaria de replicación y transcripción del DNA y provocar deleciones (Costa M. 1993)

Es difícil establecer la relación entre una lesión genética y un tumor. Sin embargo, se ha observado que pérdidas en el DNA pueden conducir a la formación de tumores. Deleciones en secuencias de DNA al igual que otros mecanismos como las mutaciones puntuales conducen a la inactivación de genes supresores de tumores como Rb y p53 (Weinberg, 1991) y otros genes que mantienen adecuadamente el ciclo celular.

Los DPC son un tipo de daño al DNA que puede ser usado no solamente como biomarcador de posible exposición a agentes entrecruzadores como el Arsénico, la presencia de este tipo de lesiones también puede ser un indicador temprano de riesgo para desarrollar cancer (Costa M. 1993).

En el presente trabajo, se observó que el NaAsO_2 induce la formación de entrecruzamientos DNA-Proteínas (DPC) *in vitro* en las células WRL-68. Con estos resultados se puede afirmar que el Arsenito de Sodio induce DPC en células derivadas de hepatocitos humanos y la vinculación del DNA con proteínas que normalmente no se encuentran asociadas a él, se propician en presencia del NaAsO_2 .

El estudio de la capacidad inductora de DPC por agentes tóxicos como el Arsénico, provee de evidencias en la disección del significado biológico de este tipo de daño genético y ofrece una opción para el entendimiento de los efectos celulares del metal (Ramírez *et al.*, 2000).

El porcentaje de DPC básicas 4.9% observado en el presente estudio, puede explicarse, si consideramos que en el interior de las células se generan constantemente especies reactivas ya sea como producto del metabolismo celular o de la peroxidación lipídica. Se ha propuesto que las moléculas endógenas reactivas, son responsables de la formación de aductos DNA- Proteínas cuando las células no han sido expuestas a agentes genotóxicos externos.

Tanto especies reactivas de oxígeno como aldehídos pueden inducir entrecruzamientos entre DNA y proteínas. A la luz de la continua formación intracelular de radicales de oxígeno y aldehídos así como de su capacidad para producir entrecruzamientos es posible que los DPC sean formas relativamente abundantes de daño endógeno al DNA (Esterbauer, 1999).

El valor de pureza del DNA extraído de los DPC fue de 1.61 lo que indica la presencia de restos de algunos otros materiales (péptidos o aminoácidos) asociados al DNA. La razón de absorbancias $A_{\lambda 260}/A_{\lambda 280}$ se conoce para el nucleótido puro, tiene un valor de 1.8 para DNA puro.

Entre las proteínas que se han encontrado presentes en los DPC se encuentran proteínas de matriz nuclear, lámina nuclear (A, B y C), algunas proteínas cromosomales y citoqueratinas (Wedrychowsky *et al.*, 1986).

No hay reportes de las secuencias de DNA involucradas en los DPC ni del estado en que se encuentran dichas secuencias. En el presente trabajo observamos que el DNA se encuentra en buen estado y es funcional dado que puede ser digerido por enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas (en el caso de la endonucleasa Mbo 1, corta la hélice del DNA cuando encuentra la secuencia 5'- G A T C- 3'; 3'- C T A G -5').

Además, este DNA puede marcarse con bases biotiniladas por el método de *nick translation* y las sondas así generadas, ser utilizadas para la identificación de las secuencias involucradas en los DPC, mediante hibridación de ácidos nucleicos.

La detección de fragmentos específicos de DNA en células y tejidos por medio de hibridación molecular *in situ* es una técnica de alta especificidad. Con ella es posible detectar secuencias de ácidos nucleicos en el interior de las células y/o en extendidos de cromosomas metafásicos. Agregando una secuencia de ácidos nucleicos marcada (sonda), sobre una preparación de células o tejidos y haciendo disponible la secuencia complementaria en ese material, es posible conocer la posición que ocupa ésta secuencia en el núcleo e incluso en los cromosomas (Segura M. 1997).

La identificación mediante hibridación de ácidos nucleicos de las secuencias involucradas en los DPC, puede contribuir a mejorar el entendimiento de las implicaciones biológicas a las que conduce este tipo de daño. Si las secuencias de DNA entrecruzadas pertenecen a genes, se pensaría que los DPC interfieren en su expresión. Si las secuencias forman parte de los telómeros, los DPC podrían interferir en la segregación de los cromosomas en telofase. Si se identifican estas secuencias en micronúcleos, los entrecruzamientos podrían ser responsables de pérdidas de material genético.

CONCLUSIONES.

En este trabajo se observó que el Arsenito de sodio (NaAsO_2) en una concentración de 1×10^{-5} M es capaz de inducir DPC en la línea celular WRL-68 derivada de hepatocitos humanos. Los DPC fueron aislados por precipitación selectiva con KCl-SDS.

La prueba de digestión con la endonucleasa de restricción Mbo1 y la prueba de marcaje de DNA por *nick translation* demostraron que el DNA que se obtuvo de los DPC conserva su integridad.

Las sondas generadas resultaron ser funcionales cuando se realizó el ensayo de FISH en linfocitos de sangre periférica, estas sondas hibridaron núcleos interfásicos y algunas metafases.

El saber que se trata de DNA en buen estado, facilitará en gran medida el estudio de estas secuencias, para mejorar el entendimiento de las implicaciones biológicas a las que conduce este tipo de daño genético.

REFERENCIAS.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. **Molecular Biology of the cell**. Garland Publishing, Inc. New York & London; 1986 pp185-194.
- Albores, A., Quintanilla, B., Del Razo, L.M. and Cebrián, M.E. **Introducción a la Toxicología Ambiental**. Editora Lilia A. Albert, Secretaria de Ecología; Metepec, Estado de México; México 1997 pp 247-261
- Aposhian, H.V. ***Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity***. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37(1997) 179-194.
- Bodgan, G.M., Sampayo-Reyes, A. and Aposhian, H.V. ***Arsenic binding proteins of mammalian system: I. Isolation of three arsenite-binding proteins of rabbit liver***. Toxicology 93(1994) 175-194.
- Bohr V. and P.E. Nielsen, ***DNA crosslinks repair in human lymphocytes. Comparison of a alkaline elution whit electron microscopy***. Biochem. Biophys. Acta. 783(1984) 183-186.
- Bradley, M. and G. Disart, ***DNA single- strand breaks, double-strand breaks, and crosslinks in rat testicular germ cells: measurements of their formation and repair by alkaline and neutral filter elution***, Cell Biol. Toxicol.1(1985) 181-195.

- Buchet, J.P., Lauwerys, R. and Roels, H. **Comparison of the urinary excretion metabolites after a single oral dose of sodium arsenite , monomethylarsenate or dimethylarsenate in man**, Int. Arch. Occup. Env. Health. 48(1981)71-79.
- Buongiorno-Nardelli, M. and Amaldi, F. **Autorradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA**, Nature 225(1970)946-947.
- Casanova, M., Conolly, R. and Heck H. **DNA-Protein Cross-Links (DPX) and Cell Proliferation in B6C3F1 Mice but Not Syrian Golden Hamsters Exposed to Dichloromethane: Pharmacokinetics and Risk Assessment with DPX as Dosimeter**. Fundamental and Applied Toxicology. 31(1996)103-116.
- Chan, V.T.M. and McGee, J.O.D. 1990. **Non-radioactive probes: preparation, characterization and detection**. En: *Hibridación in situ ultraestructural*. Segura Valadez M. de L., López Velázquez G., Jimenez Garcia L. Plaza y Valadez (Eds.) México, D.F.
- Chen, C. J., Chen, C. W., Wu, M. M. and Kuo T. L. **Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water**, Br. J. Cancer 66(1992)888-892.
- Clewell, H. J., Gentry, P. R., Barton, H. A., Shipp A. M., Yager, J.W. and Andersen, M. E. **Requirements for a biologically realistic cancer risk assessment for inorganic arsenic**. Int. J. Toxicol. 18(1999)131-147.
- Connaway, C.J., Whysner, L.K. and Verna, G.M. **Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation**, Pharmacol. Ther. 71(1996) 29-55.

- Costa, M., Zhitkovich, A. and Toniolo, P. **DNA-Protein Cross-Links in welders: molecular implications.** Cancer Res.. 53(1993) 460-463.
- Cullen, W.R., McBride, B.C. and Reglinski, J. **The reaction of methylarsenicals with dithiols. Some biological implications.** J. Inorg. Biochem. 21(1984)179-194.
- Dizdaroglu, M., Gajewsky, E., Reddy, P. and Margolis, S. **Structure of a hydroxyl radical induced DNA-Protein cross-link involving thymine and tyrosine in nucleohistone,** Biochemistry 28(1989) 3625-3629.
- Dong, J. And Luo, M.X. **Arsenic induced DNA-strand breaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts,** Mutation Res., 302(1993) 97-102.
- Dong, J. And Luo, M.X. **Effects of arsenic on DNA damage and repair in human fetal lung fibroblast,** Mutation Res., 315(1994)11-15.
- Esterbauer, H. **Aldehydic products of lipid peroxidation,** in: Voitkun, A. and Zhitkovich, A. **Analysis of DNA-Protein crosslinking activity of Malondialdehyde in vitro,** Mutat. Res. 424(1999) 97-106.
- Freshney, R. I. 2000. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques;** 4th ed. Wiley- Liss. Printed in the United States of America. 577pp.
- Gajewski, E. and Dizdaroglu, M. **Hydroxyl radical induced cross-linking of cytosine and tyrosine in nucleohistone,** Biochemistry 29(1990) 977-980.

- Gall, J.G. and Pardue, M.L. **Formation and detection of RNA –DNA hybrid moleculaws in cytological preparations**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 63(1969) 378-381.
- Gantt, R. **A cell cycle-associated pathway for repair of DNA-Protein crosslinks in mammalian cells**, Mutat. Res. 183(1987) 75-78.
- Germolec, D. R., Yoshida, T., Gaido, K. J., Wilmer, J. L., Simeonova, P. P., Kayama, F., Bureson, F., Dong, W., Lange, R. W. and Luster, M. I. **Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes**, Toxicol. Appl. Pharmacol. 141(1996) 308-318..
- Gutiérrez-Ruiz, M. L., Bucio, V., Souza, J. J., Gómez, C., and A. Cárbaz. **Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture**, In vitro cell Dev. Biol.,30^a(1994) 366-371.
- Huang, H., Tyan, S.H. and Lin, S.G. **The effect of sodium arsenite on the DNA repair of gamma-irradiated mammalian cells**, in: J.D. Chapman, W.C. Dewey and G.F. Whitmore (Eds.), Radiat. Res.,Vol. 1, 9th ICRR Congres. Abstracts, 359pp.
- Hughes, M. F., Menache, M. and Thompson, D. J. **Dose- dependent disposition of sodium arsenate in mice following acute oral exposure**, Fundam. Appl. Toxicol. 22(1994)80-89.
- IARC (1987) **Arsenic and arsenic compounds**. in: IARC Monographs, Suppl. Vol.7, IARC, Lyon, pp 100-106.
- Jha, A.N., Noditi, M., Nilsson, R.and Natarajan, A.T, **Genotoxic effects of sodium arsenite on human cell**. Mutation Res. 284(1992) 215-221.

- Jover, R., Ponsoda, M., Castell, J.V. ***Evaluation of the cytotoxicity of ten chemicals on humans cultured hepatocytes: predictability of human toxicity and comparison with rodent cell culture systems.*** Toxicol. In Vitro 6(1992) 47-52.
- Larramendy, M.L., Popescu, N.C. and J.A. Dipaolo (1991) ***induction by inorganic metal salts of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in human and in Syrian Hamster cell strains,*** Environ. Mutagen. 3(1991)597-606.
- Lee, T.C., Tzenng, S.F., Chang, W.J., Lin, Y.C. and Jan K. Y. ***Post-treatments with sodium arsenite during G2 enhance the frequency of chromosomal aberrations induced by S-dependent clastogens,*** mutation Res.,163(1986)263-269
- Lee-Chen, S.F., Yu C.T. and Jan, K.Y. ***Effect of arsenite on the DNA repair of UV-irradiated Chinese hamster ovary cell,*** Mutagenesis, 7(1992)51-55.
- Li, J.H. and Roosman, T.G. ***Mechanism of comutagenesis of sodium arsenite with N-metil-N-nitrosourea,*** Biol. Trace Element Res. 21(1989) 373-381.
- Lindahl, T. ***Regulation and deficiencies in DNA repair,*** Br. J. Cancer, 56(1987)91-95.
- Marceau, N. M., Blovin, L., Germain et al ., ***Role of different epithelial cell types in liver ontogenesis. Regeneration and neoplasia.*** In vitro Cell. Dev. Biol. 25(1989) 336-341.

- Marnett L.J. and Burchman P.C. ***Endogenous DNA adducts: potential and paradox***, Chem. Res. Tox. 6(1993) 771-785.
- McCabe, M., Maguire D. and Nowark M. ***the effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocyte mitogenesis in vitro***, Environ. Res.,31(1983)323-331.
- Menzel, D.B., Roos, M., Oddo, S.V., Bergstrom, P., Greene and H., Roth, R.N. ***A physiologically based pharmacokinetic model for ingested arsenic***. In Chapell, W.R., Abernathy C.O. and Cothorn C.R. Eds. Arsenic. Exposure and Health, Science Rewievs Ltd. 40. Nowood, England, pp 209-218.
- Minko, I.G., Yue Zou and R. Stephen Lloyd. ***Incision of DNA-protein crosslinks by UvrABC neclasa suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair***. PNAS Vol. 99 No.4(2002)1905-1909.
- Natarajan, A.T., Csukas, I., Degrassi, F., Van A.A., Zeeland, F., Palitti, C., Tanzarella, R., De Silva and M. fiore(1982), ***Influence of inhibition of repair enzymes on the induction of chromosomal aberrations by physical and Chemical agents***, in: Natarajan, A.T., Obe, G. and Altman, H., (Eds.), Progress in Mutation Research, Vol. 4, Elsevier, Amsterdam, pp.47-59.
- Okui, T., and Fujiwara, Y. ***Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells***, Mutation Res.172(1986)69-76.
- Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., Garcian-Vargas, G., Del Razo L.M and cebrian, M. ***Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico***.

Mutation Res.250(1991)477-482.

- Petres, J., Baron D. and Hagerdon, M. ***Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation: cytogenetic and biochemical studies***, Environ. Health perspec.,19(1977)223-227.
- Preston,R.J. ***The use of inhibitors of DNA repair in the study of the mechanisms of induction of chromosome aberrations***, Cytogenet. Cell Genet.,33(1982)20-26.
- Ramirez, P., Eastmond, D.A., Lacleste, J.P., Ostrosky- Wegman, P. ***Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide***. Mut. Res. 386(1997)291-298.
- Ramirez, P., Del Razo , L.M., Gutierrez-Ruiz M.C and Gonsebatt M.Er. ***Asenite induces DNA-Protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human cell line***. Carcinogenesis 21(2000)701-706.
- Reitz R. H., Mendrala, A. L. and Guengerich, F. P. ***In vitro metabolism of methylene Chloride in human and animal tissues: Use in physiologically based pharmacokinetic models***. Toxicol. Appl. Pharmacol. 97(1989)230-246.
- Rigby, P.W.J.,Diekmann, M., Rhhodes, C. and Berg, P. ***Labelling of deoxiribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I***. J. Mol. Biol.113(1977)237-251.
- Ross, M. H.(1992). ***Histología Texto y Atlas a color***. Editorial Médica Panamericana. Impreso en México DF. 453-459.

- Schmidt, E., Schmidt, F. **Enzyme diagnosis in disease of the liver and biliary system**. Advance clinical enzymology, vol. 1. Basel:Karger : 1979: 239-292.
- Segura Valadez M. de L.,López Velázquez, G.,Jiménez García L. 1997. **Hibridación *in situ* ultraestructural**. Plaza y Valadez (Eds.) México, D.F.
- Singh N. **Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis**, Mutat. Res. 455(2000) 111-127.
- Snow, E.T. **Metal carcinogenesis:mechanistic implications**, Pharmacol. Ther.,532(1992)31-65.
- Southern, E. M.1985 Introduction.En **Nucleic acid hybridisation. A practical approach**. B.D. Hames & S.J. Higgins (Eds.) IRL Press. USA.
- Squibbo, K. S. and Fowler B.A. (1983) **The toxicity of arsenic and its compounds**. In B.A. Fowler (ed.) Biological and Environmental Effects of arsenic. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands, pp.223-263.
- Stohrer, G. **Arsenic: oportunity for risk assessment**. Arch. Toxicol.,65(1991)525-531.
- Styblo, M. and Thomas, D.J. **In vitro inhibition of glutathione reductase by arsenotriglutathione**, Biochem. Pharmacol., 49(1995)971-977.
- Styblo, M., Del Razo, L.M., LeCluyse, E.L., Hamilton. G.A., Wang, C., Cullen ,W.R. and Thomas D.J. **Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes** , Chem. Res. Toxicol. 12(1999)560-565.

- Sugiyama, S., Cantoni, O. and Costa M. **Characterization of DNA lesions induced by CaCrO₄ in synchronous and asynchronous cultured mammalian cells.** Mol. Pharmacol. 29(1989) 606-613.
- Thompson, D.J. **A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals.** Chem. Biol. Interact. 88(1993) 89-114.
- Toniolo, P., Zhitkovich, A. Costa, M. **Development and utilization of a new simple assay for DNA-protein crosslinks as a biomarker of exposure to welding fumes.** Int. Arch. Occup. Environ. Health 65(1993)s87-s89.
- Vega, L., Gonsebatt, M.E. and Ostrosky-Wegman P. **Aneugenic affect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility affect detected,** Mutat. Res. 334(1995)365-373.
- Voitkun, V. and Zhitkovich A. **Analysis of DNA-Protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro.** Mutat. Res. 424(1999) 97-106.
- Volkers, H.H., Van de Brink, W.J., Leunissen, J.L.M., De Brnbander, M., Zijmans, H. J., Houtnoff, H. J. and Van den Berg, F. F. **DNA in situ hibridisation: towards a routine technique- New developments in detection methods using AuroProbe One.** Aurofile No.2 (Abril 1989).
- Wedrychowski, A., Shmidt, W.N. and Hinilica, L.S. **DNA-Protein crosslinking by heavy metals in Novikoff hepatoma.** Arch. Biochem. Biophys. 251(1986) 397-402.
- Weinberg, R. A. **Tumor suppressor genes.** Science (Washington DC) 254(1991) 1138-1146.

- Wen, W.N., Lieu, L.T., Chang, H.J., Wu, S.W., Yau M.L. and Jan, K.Y. **Baseline and sodium arsenite-induced sister-chromatid exchanges in cultured lymphocytes from patients with blackfoot disease and healthy persons**, Hum. Genet. 59(1981)201-203.
- Yamauchi, H. and Fowler, B.A.(1994). **Toxicity and metabolism of inorganic and methylated arsenicals**. Citado por Styblo 1999.
- Yong, Ch., Mitchell, D., Snow, E.T. and Costa, M. **Alteration in restriction enzyme digestion patterns detects DNA-protein complexes induced by chromate**. Carcinogenesis 9(1991)1575-1580.
- Young, B.D. and Anderson, M. C. 1985. **Quantitative analysis of solution hybridisation. A practical approach**. Hammes, B.D. and Higgings, S. J. (Eds) IRL Press Lim. Oxford.
- Zhitkovich, A., y Costa, M. **A simple, sensitive assay to detect DNA- Protein crosslinks in intact cells and in vivo**. Carcinogenesis 13(1999)1485-1489.

APENDICES.

1.-Equipo y material.

Balanza analítica.

Baño María.

Cámara de electroforesis horizontal.

Campana de flujo laminar.

Centrífuga.

Criótubos.

Espectrofotómetro.

Fuente de poder.

Homogenizador.

Incubadora.

Material de vidrio de uso rutinario en laboratorio.

Micropipetas.

Microcentrífuga refrigerada.

Microscopio confocal.

Microscopio de fluorescencia.

Microscopio fotónico.

Potenciómetro.

2.-Material Biológico.

Hepatocitos fetales humanos de la línea celular WRL-68.

Suero fetal Bovino de Gibco BRL.

Anticuerpos: Penicilina y Estreptomina de Gibco BRL.

Endonucleasa de restricción Mbo 1 de Gibco BRL.

Medio esencial DMEM para cultivo de células.

Aminoácidos no esenciales de Gibco BRL.

Tripsina.

DNA polimerasa 1 de *Escherichia coli*.

DNasa 1 (desoxirribonucleasa pancreática de bovino).

Mezcla de Desoxinucleótidos Trifosfatados (dNTP).

Desoxicitocina biotilada (Biotin-14-dCTP).

Proteinasa K (PK).

3.-Reactivos.

Ácido Bórico.

Agarosa.

Albúmina (BSA).

Arsenito de Sodio.

Azul de Bromofenol.

Bromuro de Etidio (EtBr).

Cloruro de Potasio (KCL).

Dodecil sulfato de sodio (SDS).

DMSO.

EDTA.

Glycerol.

PMSF.

Tris -HCl.

Xilen- cianol.

4.-Soluciones.

Para la técnica de precipitación de complejos:

Solución A: SDS2%, PMSF 1mM, Tris-HCl 20mM. Ajustar a pH 7.5

Solución B: KCl 200mM, Tris-HCl 20mM. Ajustar a pH 7.5

Solución C: KCl 100mM, Tris-HCl 20mM. Ajustar a pH 7.5

Solución D: KCl 100mM, Tris-HCl 20mM, EDTA 10mM. Ajustar a pH 7.5

Solución Preblock: 5% leche en polvo libre de grasa, 0.02% de acida de Sodio en 4X SSC.

Solución para detectar Biotina: Diluir Fluorescein-avidin 2µg/ml en 4X SSC/1% (W/V) de Albúmina (BSA).

Medio de montaje para fluorescencia (Antifade): Disolver 0.233 g de 1,4-diazobicyclo- (2.2.2) octano (sigma; 0.21 M final) en 800µl de H₂O y agregar 200µl de 1M tris- Cl, pH 8.0 (0.02M final) más 9 ml de glicerol (Almacenar en oscuridad a -20°C).

Solución de Yoduro de propidio para teñir DNA: Solución Stock – Disolver 1mg de Yoduro de Propidio en 10ml de H₂O estéril (0.15mM final). Solución de Trabajo- Disolver la solución Stock 1/1000 en PBS.

5.-Buffers.

Buffer TBE (Solución stock 10X): Tris base 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM, ajustar a pH 8.0

Buffer PBS (Solución stock 10X): NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄·7H₂O 4.3mM, KH₂PO₄ 1.4mM, ajustar a pH 7.3

Buffer SSC (Solución stock 20X): NaCl 3M, Na₃citrato-2H₂O 0.3M, ajustar pH 7.0