



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**“ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE LA
UBIQUITINA EN LOS ENTRECruzAMIENTOS
DNA-PROTEÍNA INDUCIDOS IN VIVO POR
ARSÉNICO EN RATONES MACHO DE LA CEPA
BALB/c”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARTHA ALICIA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

ASESOR: DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: MARTHA ALICIA
HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

FECHA: 29- SEPTIEMBRE - 2006

FIRMA: 



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERVANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Estudio de la presencia de la ubiquitina en los entrecruzamientos
DNA-proteína inducidos in vivo por arsénico en ratones macho de la
cepa Balb/c".

que presenta la pasante: Martha Alicia Hernández Martínez
con número de cuenta: 8909176-0 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Agosto de 2006

PRESIDENTE QFI. Leticia Zúñiga Ramírez

VOCAL Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

SECRETARIO Dra. Patricia Ramírez Noguera

PRIMER SUPLENTE QFB. Rosalba Bonilla Sánchez

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Azucena Lee Mendoza

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

DIOS

Gracias porque siempre has estado conmigo en los buenos y malos momentos, gracias por no permitir que pierda la fe, gracias por la oportunidad que me brindaste al permitir que naciera en una maravillosa familia. Gracias... Gracias por hacer de mí lo que soy.

MAMA

Tu fuerza y tu amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar. Gracias.

PAPA

Tu ejemplo de perseverancia y amor al trabajo han sido la mejor herencia que me has dado espero poder seguir cada uno de tus pasos

NELLY

Gracias por el ejemplo de superación, a pesar de los "obstáculos" que te ha puesto la vida has salido triunfante

LUPIS

Gracias por ser como eres continúa así que la vida te depara grandes triunfos

FLAQUITO

Eres un pequeño angelito que Dios puso en nuestro camino. Gracias por estar con nosotros

ABUE

Gracias donde quiera que estés. No tengo palabras para agradecer me hayas permitido pertenecer a tu familia

SRA. LUCY

Gracias por esas pláticas mañaneras en las cuales me permitía contarme mis penas y usted con esa alegría y fortaleza que la caracteriza me daba ánimos y me orientaba para poder encontrar la vela que iluminaría mi camino. GRACIAS

AMIGUIS (TERCIOPELO)

Gracias por soportarme durante todo este tiempo. Gracias por esas tardes de plática y esparcimiento que hacen más ameno el trabajo de laboratorio. Espero que el tiempo y la distancia no sean impedimento para nuestra amistad.

DRA. PATY

Gracias por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo. Ha sido para mí un ejemplo de superación y tenacidad.

UNAM

Gracias por haberme cobijado con tus alas de sabiduría, esperanza y tenacidad.

FES CUAUTITLAN

Gracias por darme la oportunidad de estudiar en tus aulas, experimentar en tus laboratorios y pasearme por tus jardines. En tus instalaciones no solo aprendí de los libros también me brindaste una lección de amor y amistad además de compañerismo. GRACIAS

La vida no es ningún pasillo recto y fácil
que recorramos libres y sin obstáculos,
sino un laberinto de pasadizos, en el que
debemos buscar nuestro camino.

Pero si tenemos fe, siempre se abre una
puerta ante nosotros; quizá no sea la que
imaginamos, pero sí será la que es buena
para nosotros.

A.J. CRONIN

ÍNDICE GENERAL

Páginas

Índice de tablas	i
Índice de figuras	ii
Índice de gráficas	iii
Resumen	iv

CAPÍTULO I. EL ARSÉNICO

1.1 Características del arsénico	1
1.2 Usos del arsénico y sus derivados	3
1.3 Distribución del arsénico en la naturaleza	5
1.4 Fuentes antropogénicas del arsénico	6
1.5 Exposición humana	6
1.6 Mecanismos asociados a la toxicidad inducida por arsénico	9
1.7 Mecanismos moleculares afectados por el arsénico	14
1.8 Otros blancos celulares afectados por la exposición al arsénico	15

CAPÍTULO II. LOS DPC

2.1 Biomarcadores	17
2.2 Aduetos DNA-proteína	18
2.3 Aduetos inducidos por metales	19
2.4 Consecuencias biológicas de los DPC	20
2.5 Reparación enzimática de los DPC	23
2.6 Proteínas involucradas en los DPC	24

CAPÍTULO III. EL SISTEMA Ub-PROTEOSOMA

3.1 Estructura y función del sistema Ub-proteosoma	28
3.2 Activación del sistema Ub-proteosoma	31
3.3 Control de la ubiquitinación de las proteínas	35
3.4 Las enfermedades y el sistema Ub-proteosoma	35
3.5 La terapéutica y el sistema Ub-proteosoma	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
HIPÓTESIS	41
OBJETIVO GENERAL	42
Objetivos particulares	42
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	43
Materiales, reactivos y métodos	43
Precipitación de los aductos DNA-proteína	44
Determinación de los DPC por fluorescencia	46
Inmunotransferencias	46
RESULTADOS Y DISCUSION	47
CONCLUSIONES	57
PERSPECTIVAS	58
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	60
GLOSARIO DE TÉRMINOS	62
BIBLIOGRAFIA	67
PAGINAS ELECTRONICAS CONSULTADAS	75

Índice de tablas	Páginas
Tabla 1. Características del arsénico.....	3
Tabla 2. Órganos y sistemas del cuerpo afectados por el arsénico.....	13
Tabla 3. Mecanismos moleculares afectados por el arsénico.....	14
Tabla 4. Promedios de la inducción de DPC en hígado de ratones macho.....	47
Tabla 5. Densidades ópticas relativas de las proteínas detectadas.....	49
Tabla 6. Proteínas detectadas por Western blott.....	50

Índice de figuras	Páginas
Figura 1. Mecanismo de daño celular provocado por el arsénico.....	2
Figura 2. Fuentes de exposición al arsénico.....	8
Figura 3. Anillo formado por arsénico con grupos sulfhidrilo de los ácidos lipoicos.....	11
Figura 4. Posible mecanismo de inducción de aductos oxidativos de DNA y DPC ocasionados por As.....	22
Figura 5. Estructura del dominio de las proteínas citoqueratinas	26
Figura 6. Estructura del sistema ubiquitina-proteosoma.....	33
Figura 7. Western blott representativo de los DPC ubiquitinados.....	50
Figura 8. Modo de acción de agentes carcinógenos.....	52

Índice de gráficas

Gráfica 1. Porcentajes de inducción de DPC.....48

Gráfica 2. Promedio de medias de las unidades
relativas de densidad de los DPC de
hígado de ratón..... 49

RESUMEN

En nuestra interacción con el medio ambiente estamos expuestos a múltiples agentes tóxicos. Uno de estos agentes es el arsénico, éste es introducido en el medio ambiente durante los procesos de producción de energía cuando se utiliza carbón, aceite y recursos geotérmicos. Una vez en el ambiente, el arsénico representa un riesgo potencial para la salud de magnitudes no conocidas. Dicho contaminante puede encontrarse en algunas zonas geográficas de nuestro país en el agua potable, esto implica que dicha agua contribuye a incrementar la contaminación de los alimentos tanto de origen animal como vegetal. Existen reportes que indican que los principales alimentos con un alto contenido de arsénico son los pescados, mariscos y algunos cereales de consumo tanto humano como animal. La ingestión crónica de altas concentraciones de arsénico inorgánico en el agua potable se ha asociado con un incremento en la incidencia de algunas enfermedades como el cáncer humano en varios sitios como son la piel, el pulmón, la vejiga y otros órganos internos. Se han reportado casos de gangrena en las extremidades y neoplasmas malignos (Basu, 2001).

Actualmente, existen reportes que indican el efecto del arsénico ocurre sobre las actividades funcionales, es decir, ataca el sistema enzimático. Se sabe además que puede comprometer la estabilidad genética debido a que induce daño al DNA. Si este es dañado intervienen mecanismos de reparación. Una forma de tratar de explicar dicho comportamiento es mediante el uso de biomarcadores que miden la exposición a un compuesto particular (en nuestro caso se estudia al arsénico). Un ejemplo de biomarcador son los aductos de proteínas y DNA (también denominados DPC) que son detectados en sangre, tejidos y células mediante precipitación con SDS-KCl (Costa y cols., 1993; López, 2004; Hartwig, 2003; Hughes, 2002; Thomas, 2001).

En este trabajo se estudio la capacidad de ubiquitinación de proteínas involucradas con un el daño genotóxico inducido por el arsénico o sus metabolitos cuantificado como aductos ADN proteínas (DPC). Existen evidencias que apoyan la posibilidad de que este tipo de daño sea reparado mediante la ruta proteolítica no lisosomal dependiente de ubiquitina y proteosoma (Bredfeldt, 2004).

Este sistema proteolítico no lisosomal es responsable de la degradación de proteínas mal plegadas y dañadas así como de la regulación de diversas moléculas con carácter proteico involucradas en el ciclo celular, la reparación, la respuesta al estrés, la transcripción y la apoptosis.

Considerando estas evidencias y la capacidad de inducir DPC por arsénico en este trabajo estudiamos si los DPC inducidos por arsénico se encuentran ubiquitinados, para ello utilizamos ratones machos de la cepa BALB/c que se expusieron por dosis orales diarias al agente en estudio por 5 días.

Los resultados muestran que el arsenito de sodio es capaz de inducir DPC independientemente de las dosis utilizadas y que algunos de los DPC inducidos in vivo por arsénico en diferentes dosis contienen proteínas ubiquitinadas además de que se ve afectado el patrón de ubiquitinación. Esto nos permite decir que parte del sistema ubiquitina-proteosoma inicia el reconocimiento de proteínas cuya conformación era anormal y que estas se encontraban unidas al DNA.

CAPÍTULO I. EL ARSÉNICO

1.1 Características del arsénico

El arsénico es un metaloide, es el vigésimo elemento más común en la naturaleza; se extrae a partir de minerales que lo contienen en aleación (arsenopirita: FeAsS , nicolita: NiAs ; cobaltito: CoAsS). El arsénico es uno de los más tóxicos elementos que existen. Los enlaces de arsénico inorgánico ocurren en la tierra de forma natural. Los humanos pueden verse expuestos a dicho contaminante a través de la comida, agua y aire de forma natural y/o debido a fuentes antropogénicas. La mayoría del arsénico presente en la superficie del agua existe como As^{5+} y en el agua subterránea existe como As^{3+} . El arsénico trivalente es más tóxico que la forma pentavalente (Córdoba, 2001; Hughes, 2002; Yoshida y cols., 2004; Ballantyne, 1999). La figura 1 muestra los mecanismos de daño celular provocados por el arsénico.

El arsénico existe en formas orgánicas e inorgánicas. Las formas inorgánicas aparecen en compuestos con oxígeno, sodio, potasio, cobre y otros elementos. Posee tres estados de valencia (+3, -3, +5). Dichas formas incluyen el meta arsenito trivalente y el arsenato pentavalente (Saleha y cols., 2001). Las formas orgánicas son los metabolitos metilados del ácido monometil arsénico (MMA), el ácido dimetil arsénico (DMA) y el óxido de trimetil arsénico (TMAO) (Basu, 2001).

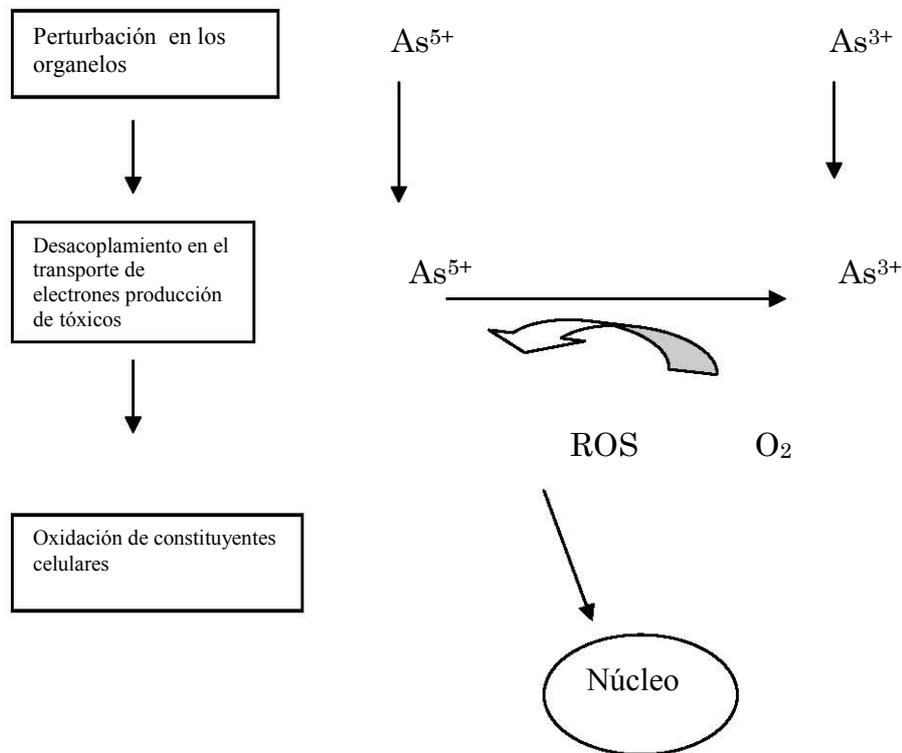


Fig. 1. Mecanismos de daño celular provocados por el arsénico. Se ha postulado que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se debe a las interacciones entre los dos estados de valencia (Del Razo, 2001).

Su ubicación es la 33 en la tabla periódica y se localiza en el grupo 5. Es obviamente un elemento en extremo venenoso. Se presenta en tres formas comunes: la gris, la amarilla y la negra. El arsénico gris metálico (forma α) es la más estable en condiciones normales y tiene estructura romboidal, es un buen conductor del calor. La forma γ (amarilla) se obtiene cuando el vapor de arsénico se enfría rápidamente. Es extremadamente volátil y más reactivo que el arsénico metálico, presenta fosforescencia a temperatura ambiente. La forma β (negra) posee estructura hexagonal, tiene propiedades intermedias entre las formas descritas. Su número atómico es 74.9216 y su símbolo químico es As (del latín *arsenicum* que a su vez proviene de $\alpha\rho\sigma\epsilon\nu\iota\kappa\omicron\nu$, varonil, macho). Su temperatura de ebullición es de 613 °C, su

temperatura de fusión es de 817 °C y su densidad es de 5.72 g/ml. La configuración electrónica del arsénico es 2-8-18-5. Este elemento no tiene color, ni sabor, ni olor, por lo tanto no se puede detectar si está presente en el agua, comida o aire (Smith, 2000; www.lenntech...). En la tabla 1 se resumen las características del arsénico

Tabla 1. Características del arsénico.

Nombre	Arsénico
Número atómico	33
Valencia	+3, -3, +5
Estado de oxidación	+5, +3
Electronegatividad	2, 1
Potencial de ionización (eV)	10.08
Masa atómica (g/mol)	74.922
Densidad (g/ml)	5.72
Punto de ebullición(° C)	613
Punto de fusión (° C)	817

Modificado de <http://enciclopedia.us...>

1.2. Usos del arsénico y sus derivados

El arsénico se ha usado desde tiempos remotos como agente terapéutico y como veneno. En la antigüedad se utilizaba como remedio para la úlcera gástrica y como depilatorio. Se uso en el tratamiento de la malaria, el cáncer y como promotor de la sudoración (en casos de fiebre intermitente). Los médicos han prescrito el arsénico para uso externo e interno desde el siglo XVIII. En 1786, Fowler lo utilizo en procesos febriles y como sedante unido a mezclas bromuradas (Rodríguez y cols., 2003).

Las sales de arsénico son los ingredientes clave de algunos antisépticos, antiespasmódicos, cáusticos, colagogos, hematínicos. Poseen aplicaciones catalíticas, bactericidas, herbicidas, fungicidas. Existen aproximadamente 60 diferentes preparados con arsénico entre los que se encuentran algunos aditivos para alimentos animales, inhibidores de la corrosión, sedantes y tónicos caseros (Manahan, 2003).

Recientemente, el arsénico ha resultado ser altamente efectivo en el tratamiento de la APL (leucemia promielocítica aguda). En Estados Unidos aún en fechas recientes se utilizan los arsenicales como drogas de primera elección en el tratamiento contra la sífilis, además de utilizarse en el tratamiento de la disentería amebiana. El Arsobal o Mel B es un organoarsenical efectivo en el tratamiento del estado neurológico de la tripanosomiasis africana cuyos agentes infecciosos son *Trypanosoma gambiense* o *T. rhodesiense* (Miller, 2002).

Actualmente se utiliza en:

- La fabricación de vidrios, esmaltes, pinturas, extracción del salitre, manipulación de aleaciones de metales, fundiciones y otras industrias además de que se utiliza en la elaboración de chips de computadora.
- Como germicida y conservador en viñedos y cultivos de algodón, cereales, papa, soya, tabaco, etc. Como pesticida en baños de animales, conservación de madera, etc.
- Como rodenticida y exterminio de distintos animales dañinos y gérmenes.
- Uno de los usos más importantes del arsénico, actualmente en decadencia, es en la medicina humana y veterinaria.
- El As^{73} se usa como trazador para estimar la cantidad de arsénico absorbido por el organismo y el As^{74} en la localización de tumores cerebrales.

- Ciertos compuestos del arsénico, como el arseniuro de galio (GaAs), se utilizan como semiconductores. El GaAs se usa también como láser. El bisulfuro de arsénico (As_2S_3), conocido también como oropimente rojo y rubí arsénico, se usa como pigmento en la fabricación de fuegos artificiales y pinturas (Manahan,2003; [www. lenntech.com](http://www.lenntech.com)....).

1.3. Distribución del arsénico en la naturaleza

La acción volcánica es la fuente natural más importante del arsénico seguido por volatilización a bajas temperaturas. El arsénico inorgánico de origen geológico se encuentra en el agua subterránea usada como agua potable en diferentes partes del mundo por lo cual es posible encontrarlo en vegetales, animales y organismos marinos de consumo humano. Algunos compuestos del arsénico como la arsenobetaina, arsenocolina, sales de tetrametil arsénico, arsenoazúcares y lípidos unidos al arsénico se encuentran distribuidos en los organismos vivos de manera natural. Los procesos a altas temperaturas como son: las plantas de generación de energía, los incendios de la vegetación y el vulcanismo además de la biometilación natural a bajas temperaturas y la reducción hasta arsinas constituyen otra fuente de emisión de arsénico a la atmósfera. El arsénico vertido a la atmósfera es el As_2O_3 que es adsorbido. Estas partículas se dispersan por acción del viento y son depositadas en tierra cuando el clima es seco. Las arsinas se liberan de sedimentos por oxidación en presencia de aire, se reconvierten a arsénico y en formas no volátiles. Las formas solubles del arsénico incluyen arsenato, arsenito, ácido metil arsénico (MMA) y ácido dimetil arsénico (DMA). El arsénico puede ser transportado por erosión de las rocas, por acción del viento o por acción del agua (Ballantyne, 1999).

1.4 Fuentes antropogénicas del arsénico

Se estima que un 70% de la producción de arsénico mundial usado en el tratamiento de la madera es el arsenato de cromo y cobre (CCA), un 22% en la industria química industrial y el remanente en la industria del vidrio, la farmacéutica y en la industria que se dedica a la elaboración de aleaciones no ferrosas.

La industria de la minería, la fundición de metales no ferrosos y el calentamiento de combustibles fósiles son los mayores procesos industriales que contribuyen a la contaminación antropogénica por el arsénico del aire, agua y tierra. Históricamente, se han usado los pesticidas con alto contenido de arsénico con lo que se contribuye a la contaminación de los cultivos de agricultura. El uso del arsénico en la preservación de la madera contribuye también a la contaminación del medio ambiente (Ballantyne, 1999)

1.5 Exposición humana

Debido a las actividades que se desarrollan como consecuencia del crecimiento de la población, el hombre se ha visto afectado por diferentes contaminantes, entre ellos el arsénico, que tiene múltiples aplicaciones en la vida diaria (Fig. 2)

Entre estas actividades se encuentra el bronceado de vasijas, la pirotecnia, para endurecer y perfeccionar la esfericidad de los perdigones y en la producción de vidrio y cerámica. Varios compuestos del arsénico son usados como insecticidas agrícolas, herbicidas y defoliantes. En combinación con el cobre y el cromo, el arsénico se usa en la preservación de la madera (Ballantyne, 1999).

La exposición ocupacional al arsénico se ha observado en trabajadores de fundidoras ya que inhalan los humos que contienen arsénico entre otros elementos. Este problema también se ha observado en trabajadores de

fábricas que se dedican a la producción de chips semiconductores (Yoshida, 2004).

Otra exposición humana no ocupacional al arsénico es principalmente a través de la ingestión de alimentos y agua. En algunas áreas geográficas el arsénico en el agua potable es una fuente significativa de exposición al arsénico inorgánico. En ciertas partes de Bangladesh y la India cerca del 5% de los pozos de agua tienen altos niveles de arsénico, exceden la cantidad de 1 mg/litro y 27% de los pozos exceden los 300 µg/litro, esto es 6 veces más los niveles máximos de contaminantes permitidos en los Estados Unidos (Liu, 2001). Los terrenos contaminados así como las minas abandonadas son también una fuente potencial de exposición al arsénico. El consumo diario de arsénico total proveniente de alimentos y bebidas se encuentra generalmente entre 20 y 300 µg/día. Algunas estadísticas indican que aproximadamente 25% del arsénico presente en los alimentos es inorgánico, esto depende del tipo de alimento ingerido. Los niveles de arsénico inorgánico en pescados y mariscos son bajos (alrededor de < 1%). Alimentos como la carne, carne de aves de corral, productos lácteos y cereales tienen altos niveles de arsénico inorgánico (Windoffer, 2004).

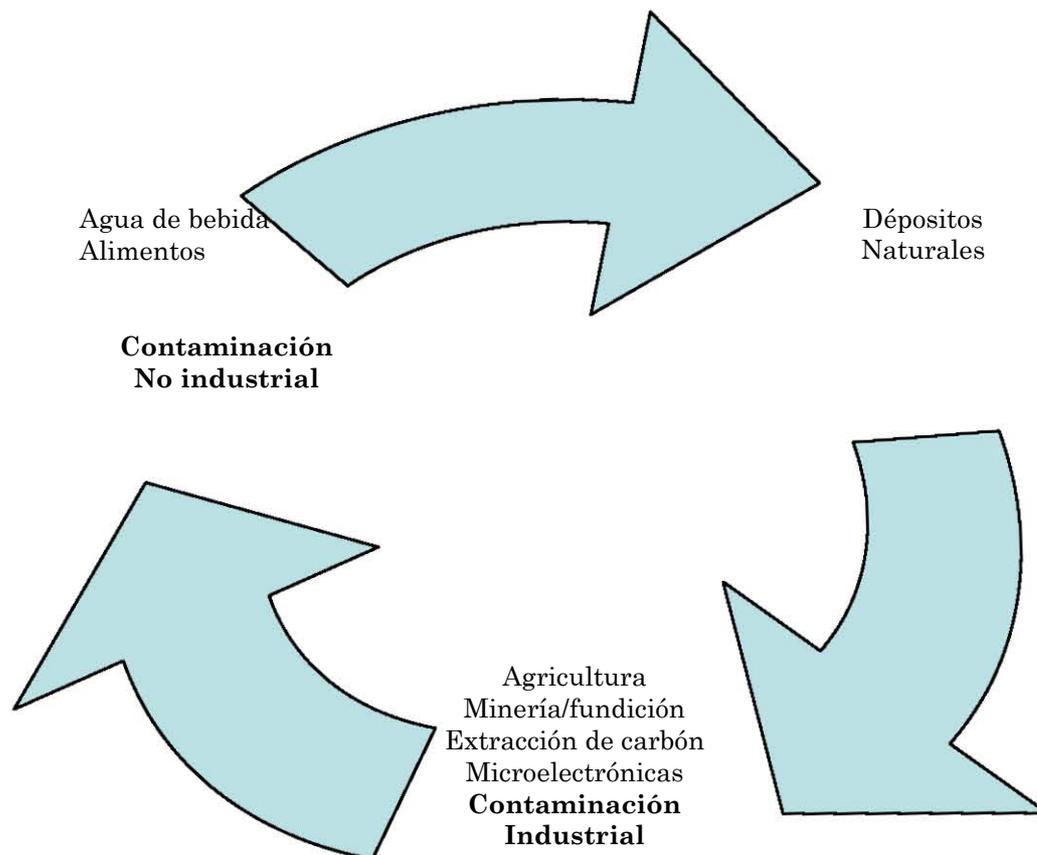


Fig. 2. Fuentes de exposición al arsénico. El arsénico es liberado al ambiente de manera natural como consecuencia de actividades antropogénicas. Los humanos están expuestos vía agua de consumo, consumo de alimentos o por el aire inspirado. (Figura modificada de Goering, 1999)

La ingestión crónica de altas concentraciones de arsénico inorgánico en el agua potable se ha asociado con un incremento en la incidencia del cáncer humano en varios sitios como son la piel, el pulmón, la vejiga y otros órganos internos. Se han reportado casos de gangrena en las extremidades y neoplasmas malignos (Basu, 2001).

Los problemas de salud pública causados por altos niveles de arsénico en el agua potable han incrementado las investigaciones con diferentes temáticas : (i) biotransformación en los humanos del arsénico inorgánico (Aposhian, 1997; Radabaugh et al., 2002); (ii) la toxicidad de las especies metiladas del arsénico trivalente comparadas con el arsenito (Petrick et al ., 2001; Styblo et al ., 2001); (iii) el descubrimiento del ácido monometil

arsénico (MMA(III)) y el ácido dimetil arsénico (DMA (III)) en la orina humana (Aposhian et al., 2000) (Aposhian et al., 2004)

Debido a que no se ha demostrado que el iAs (arsénico inorgánico) es concluyentemente carcinogénico en los humanos, se ha especulado que la potencia carcinógena en los humanos es modulada por exposiciones concurrentes de otros agentes que incrementan el riesgo a padecer cáncer. Por ejemplo, se ha reportado una interacción sinérgica entre la exposición ocupacional al iAs y los fumadores, esto conduce a incrementar el riesgo a padecer cáncer de pulmón. Se ha reportado la aparición de una enfermedad conocida como la enfermedad del pie negro, una enfermedad oclusiva de la vasculatura periférica. (Thomas et al., 2001).

1.6 Mecanismos asociados a la toxicidad inducida por arsénico

La toxicidad del arsénico inorgánico (As) depende de su estado de valencia (+3, -3 o +5) también de las propiedades físicas y químicas. Los compuestos trivalentes (As^{3+}) son generalmente más tóxicos que los compuestos pentavalentes (As^{5+}) y los compuestos más solubles en agua son usualmente más tóxicos que los menos solubles que causan efectos pulmonares cuando son inhalados. Uno de los compuestos inorgánicos más tóxicos es el gas arsina (AsH_3). Los animales de laboratorio son generalmente menos sensibles que los humanos a los efectos tóxicos del arsénico inorgánico. En suma, en los roedores los efectos críticos son la inmunosupresión y la disfunción hepato-renal, mientras que en los humanos los órganos blancos primarios son la piel, el sistema vascular y el sistema nervioso periférico. Los compuestos del arsénico inorgánico solubles en agua se absorben a través del tracto gastrointestinal (> 90%) y los pulmones; se distribuyen primero en el hígado, riñón, bazo, aorta y piel; la excreción a través de la orina es superior al 80%. El arsénico pentavalente se reduce a su forma trivalente y su metilación en el hígado es menos tóxica (Hughes, 2002; Córdoba, 2001).

Aunque en un principio fue descrito como veneno protoplasmático, el arsénico no es un precipitante activo de proteínas. Se ha sugerido que su efecto ocurre sobre las actividades funcionales, esto es, sobre sistema de enzimas, más que sobre factores estructurales de las células vivas.

En estudios realizados en 1998 se explica como el arseniato desacopla la fosforilación oxidativa mitocondrial, sustituyendo competitivamente el ión fosfato por arseniato. Los arsenicales trivalentes tienen gran afinidad por los radicales sulfhidrilo enzimáticos especialmente con aquellos que presentan en su estructura dos radicales contiguos, formando con ellos estructuras cíclicas en ángulos de 45 grados. El sistema de piruvato deshidrogenasa es especialmente sensible a los arsenicales trivalentes por su interacción con dos grupos sulfhidrilo del ácido lipoico, para formar un anillo estable de seis miembros como se detalla en la figura 3.

También tiene acción directa sobre arteriolas y capilares produciendo vasodilatación parálitica, lo que explica los signos y síntomas característicos de la intoxicación, impide además la división celular, observándose anomalías en el núcleo celular.

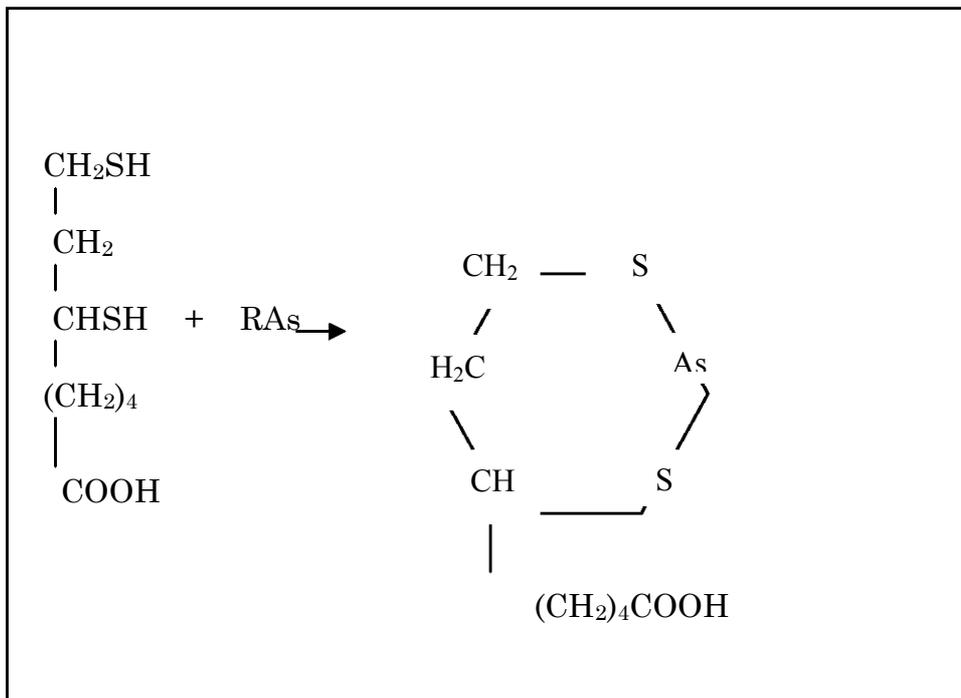


Fig. 3. Anillo formado por arsénico con los grupos sulfhidrilo de los ácidos lipoicos. Este anillo es muy estable por lo que causa gran daño en el organismo receptor del arsénico (Thomas, 2001)

El metabolismo del arsénico tiene un papel importante en los efectos tóxicos. El arsénico inorgánico es metabolizado por un proceso secuencial que involucra la reducción de dos electrones del arsénico pentavalente a arsénico trivalente. La reducción puede ocurrir no enzimáticamente en presencia de un tiol así como glutatión (GSH). La metilación del arsénico es enzimática, requiere S-adenosilmetionina (SAM) y una metiltransferasa (Hughes, 2002; Rossman, 2004; Thomas, 2001).

El arsénico compromete la estabilidad genética por inducción de daños al DNA. El DNA es dañado por procesos endógenos como son las especies

reactivas de oxígeno generadas continuamente por el metabolismo del oxígeno, por lo cual intervienen mecanismos de reparación y con ello la formación de aductos que se incrementan en presencia de arsénico (Hartwig, 2003).

La intoxicación aguda del arsénico está relacionada con su forma química y su estado de oxidación. Las características de la toxicidad severa aguda en humano incluyen malestar gastrointestinal, vómito, diarrea, anuria, shock, convulsiones, coma y muerte. La inhalación aguda del arsénico inorgánico puede causar daño en las membranas mucosas, causa rinitis, faringitis y laringitis y esto resulta en la perforación del septo nasal. Otros síntomas incluyen dermatitis (eritroderma exfoliativo), calambres musculares, anormalidades cardíacas, hepatotoxicidad, supresión de la médula ósea y anormalidades hematológicas (anemia), lesiones vasculares y neuropatía periférica (disfunción motora, parestesia). La dosis letal aguda para los humanos se ha estimado en alrededor de 0.6 mg/kg/día. (Hughes, 2002; Albores, 1979).

En la Tabla 2 puede observarse que la exposición crónica al arsénico inorgánico puede afectar diferentes órganos y sistemas (Hughes, 2002; Tseng, 2004).

Tabla 2. Órganos y sistemas del cuerpo afectados por el arsénico. Uno de los sellos de la toxicidad crónica en los humanos son las lesiones en la piel que se caracterizan por hiperpigmentación, hiperqueratosis e hipopigmentación. La enfermedad del pie negro es una enfermedad vasooclusiva que propicia la gangrena de las extremidades (Hughes, 2002).

Órganos y sistemas afectados	Descripción del daño
Piel	Lesiones en la piel
Cardiovascular	Enfermedad del pie negro
Nervioso	Neuropatía periférica, encefalopatía
Hepático	Hepatomegalía, cirrosis, metabolismo alterado del heme
Hematológico	Depresión de la médula ósea
Endocrino	Diabetes
Renal	Degeneración del túbulo proximal, necrosis papilar y cortical

Los síntomas generales del envenenamiento crónico por arsénico en los humanos son debilidad general, disminución del apetito y la energía, pérdida de pelo, voz ronca, disminución de peso y desordenes mentales. Los principales órganos blanco son la piel (hiperpigmentación e hiperqueratosis), el sistema nervioso (neuropatía periférica) y sistema vascular; también se ha reportado anemia, leucopenia, hepatomegalia e hipertensión portal. La dosis de referencia para la exposición crónica oral es de 0.0003 mg/kg/día. La inhalación crónica que ocurre en los sitios de trabajo puede causar rino-farino-laringitis, traqueobronquitis; dermatitis, hiperpigmentación e hiperqueratosis; leucopenia; disfunción nerviosa periférica provocada por una velocidad de conducción nerviosa anormal y desordenes vasculares periféricos como el síndrome de Raynaud's (Albores, 1979).

1.7 Mecanismos moleculares afectados por el arsénico

El arsénico es un elemento que ha demostrado ser metabolizado por todos los mamíferos, por lo cual se han realizado una gran variedad de estudios que indican los mecanismos moleculares afectados por él (Tabla 3).

Tabla 3. Mecanismos moleculares afectados por el arsénico. Debido a la multiplicidad de blancos afectados por el arsénico es difícil definir un mecanismo de acción definitivo (Thomas, 2004).

Daño	Descripción del daño
Mutagenicidad	Reordenamientos, modificación y sustituciones en pares de bases
Citotoxicidad	Aberraciones cromosómicas (ruptura y fragmentación, endoreduplicación), inducción de apoptosis, formación de micronúcleos.
Tumorigenesis	Los tóxicos se unen a proteínas citosólicas y esto es lo que produce algunos de los efectos tóxicos
Inducción de stress oxidativo	Alteración de los ciclos celulares ciclin cinasas dependientes
Unión a moléculas vitales	<p>Generación de especies reactivas de oxígeno, esto se ha ligado con la activación de $\text{NK-}\kappa\text{B}$ (factor de transcripción que es activado por stress oxidativo) y la inducción de ruptura en las cadenas sencillas del DNA.</p> <p>Incorporación del arsénico durante la formación de ATP durante la glicólisis; reemplazo del fosfato con arsénico.</p> <p>Depleción de carbohidratos por inhibición de la piruvato deshidrogenasa (PDH)</p>

1.8 Otros blancos celulares afectados por el arsénico

El arsénico puede unirse fuertemente a los grupos tiol y ditiol muy comunes en los sitios de unión de numerosos dominios de unión al receptor o sitios activos enzimáticos. En concentraciones por debajo de 10 μM el arsénico inhibe la propiedad de ligando del receptor glucocorticoide en una región que contiene un ditiol. El arsénico también puede unirse a residuos cisteína en el sitio de unión del receptor hormonal α -estrogénico además de que puede bloquear la interacción del estradiol con el receptor α -estrogénico. Se ha reportado que el arsénico puede activar al receptor $\alpha\beta$ -estrogénico e incrementar la transcripción de genes estrógeno dependientes. El trióxido de arsénico puede afectar el crecimiento de células tumorales inhibiendo la angiogenesis. El tratamiento de células endoteliales umbilicales humanas con trióxido de arsénico resulta en alteraciones características dosis y tiempo-dependientes culminando en apoptosis. La sobrerregulación de la producción del factor de crecimiento vascular endotelial puede ser el responsable. Esto se ha sugerido por el tratamiento de la línea HELA cuyos resultados indican que el trióxido de arsénico ejerce sus efectos antiangiogénicos por interrupción de un cruce estimulatorio recíproco entre las células endoteliales y leucémicas.

El citoesqueleto también se ha sugerido como un blanco potencial del arsénico porque su mayor constituyente, la tubulina, posee alto contenido de sulfhidrilo. La interrupción en el ensamble de los microtúbulos y la formación del huso acromático durante la mitosis es lo que promueve la apoptosis. Experimentos en células mieloides leucémicas muestran que el trióxido de arsénico inhibe marcadamente la polimerización inducida por GTP de la tubulina monomérica para la formación de microtúbulos (Miller, 2002).

En 1997, Ramírez y colaboradores reportan en un estudio in vitro usando NaAsO_2 se observan modificaciones en la polimerización y estructura de los microtúbulos.

CAPITULO II LOS DPC

2.1 Biomarcadores

Los humanos se exponen constantemente a mezclas complejas de carcinógenos ambientales y dietéticos, así como a electrófilos endógenos producidos por el metabolismo normal. Algunos de estos químicos y sus metabolitos son especies electrofílicas capaces de reacciones químicas con el DNA. Las nucleobases de DNA modificadas covalentemente (aductos de DNA) tienen pares de bases distorsionadas y si no son reparadas pueden convertirse en mutaciones heredables durante la replicación del DNA, dichos aductos pueden tomarse como biomarcadores de exposición. Los carcinógenos inducen cambios en genes críticos que controlan el crecimiento de las células y su diferenciación lo que puede conducir al inicio de un cáncer (www.pharmacy...)

Por causa de factores como las alteraciones bioquímicas de los xenobióticos, la correlación entre los niveles del tóxico con la magnitud de los diferentes efectos al organismo es por lo regular muy difícil de seguir, por esto se han tenido que utilizar biomarcadores los cuales son observaciones medibles de las alteraciones biológicas y son por lo tanto componentes, estructuras, procesos o reacciones atribuibles a la exposición a sustancias xenobióticas. Los biomarcadores se dividen en tres categorías: de exposición, efecto o susceptibilidad. Los biomarcadores de exposición consisten en la medición de la sustancia xenobiótica o un metabolito de la misma, también puede ser un efecto directamente atribuible al xenobiótico que se encuentra dentro del organismo. Por ejemplo, un biomarcador de exposición a la anilina en humanos consiste en la medición del metabolito p-aminofenol el cual se encuentra en sangre y orina. Los xenobióticos o sus metabolitos pueden ser medidos directamente en tejidos, orina, sangre y heces así como en el aire exhalado y otros fluidos corporales.

Los biomarcadores de efecto son alteraciones en la fisiología, bioquímica o causa directa atribuida a la exposición a sustancias tóxicas. En el caso de la anilina se puede medir el p-aminofenol en sangre pero también puede medirse la producción de metahemoglobina en sangre (un producto de la hemoglobina inútil para acarrear el oxígeno en sangre). La exposición a sustancias como los gases nerviosos, organofosfatos y los insecticidas carbamatos y organofosfatos pueden inhibir la actividad de la enzima colinesterasa la cual puede ser medida fácilmente, en el caso del arsénico se ha propuesto el incremento de aductos entre DNA-proteínas como un efecto por la exposición al arsénico y sus metabolitos en líneas celulares y tejidos animales y humano. Por último, los biomarcadores de susceptibilidad pueden ser un indicativo de vulnerabilidad del organismo a una enfermedad o ataque físico como cambios en la temperatura corporal o ataques a químicos por otros tóxicos, por lo que también están asociados a alteraciones del sistema inmune provocando que los organismos sean más vulnerables a enfermedades como el cáncer, enfermedades infecciosas o parásitos (Manahan, 2003; Ramírez y cols., 2000; López, 2004).

2.2 Aductos DNA-proteína

En las células el DNA está normalmente asociado a diversas proteínas las cuales le ayudan a mantener su organización estructural y conservación del material genético desde la replicación, reparación, recombinación y transcripción. Muchos compuestos endógenos (por ejemplo, los metabolitos de la lipoperoxidación y otros) reaccionan con el DNA y las proteínas produciendo muchas veces uniones covalentes entre las proteínas y el DNA. Los aductos DNA-proteínas representan desde hace algunas décadas un nuevo tipo de daño temprano al DNA incrementándose dramáticamente sobre todo por la exposición a diversos agentes como la luz UV, la radiación ionizante, β -propiolactona, aldehídos (especialmente el formaldehído y el malondialdehído), el arsenito de sodio, el nitrilotriacetato férrico, cromato, níquel y otros, además de algunos agentes quimioterapéuticos como el cis y

trans platino y la neocarcinostatina (Miller, 1991; López, 2004; Voitkun, 1999; Quievryn, 2000).

Un DPC es creado cuando una proteína se une covalentemente al DNA. Estos eventos ocurren después de exposición de las células a una gran variedad de agentes citotóxicos, mutagénicos y carcinógenos. Las proteínas se pueden entrecruzar con el DNA directamente a través de mecanismos que involucran radicales libres oxidativos o se pueden entrecruzar indirectamente a través de un enlace químico o por medio de la coordinación con un átomo metálico. Un subtipo de estos mecanismos de entrecruzamiento involucra una unión sulfhidrilo a un aminoácido. Esto resulta en numerosos tipos de DPCs que son químicamente distintos y cuya formación es influenciada por factores como el metabolismo celular, la fase del ciclo celular y la temperatura. Es posible que los diferentes tipos de entrecruzamiento sean más o menos susceptibles a ser revertidos (por ejemplo, por hidrólisis) y por reparación catalizada por enzimas de acuerdo a las diferentes estructuras químicas y conformaciones físicas. Esto también tiene diferentes consecuencias celulares (Barker, 2005).

2.3 Aductos inducidos por metales

Entre los agentes inductores de DPC más comúnmente encontrados en el ambiente y en los sitios de trabajo se encuentra un gran número de compuestos metálicos. Los DPCs inducidos por compuestos de níquel han sugerido que se encuentran involucrados mecanismos oxidativos. Los iones de níquel tienen una alta afinidad por las proteínas especialmente aquellas que contienen residuos histidina, cisteína y de ácido aspártico.

El análisis de los entrecruzamientos inducidos por iones metálicos demuestra que no todos los DPCs se unen de manera covalente y que un agente puede inducir más de un tipo de entrecruzamiento químico. Zhitkovich y colaboradores han reportado que una proporción considerable de los aductos DNA-cromo son complejos DNA-metal-proteína. Los

aminoácidos más comúnmente involucrados en estos complejos son la cisteína, histidina y ácido glutámico. Las reacciones de la cisteína o la histidina con el cromo trivalente o hexavalente ha demostrado que el Cr(VI) es reducido a Cr(III) y que el Cr(III) forma un complejo con un aminoácido antes de reaccionar con el DNA para formar el entrecruzamiento (Barker, 2005; Farmer, 2004).

En el 2000, Ramírez y colaboradores, realizaron un estudio de inducción de DPC en células hepáticas utilizando diferentes concentraciones de arsenito de sodio y encontraron que existe una relación lineal entre la formación de DPC y el As intracelular presente. Dentro de las proteínas involucradas destacan las citoqueratinas. En el mismo estudio se observa que existe un mecanismo de remoción de DPC (Ramírez, 2000)

2.4 Consecuencias biológicas de los DPC

Se ha especulado que el entrecruzamiento covalente de las proteínas al DNA se interrumpe en los procesos metabólicos del DNA como es la replicación, reparación, recombinación, transcripción, remodelación de la cromatina, etc. De hecho, el efecto de los agentes que causan DPCs en la replicación del DNA ha sido ampliamente investigado. Se ha especulado que los DPCs actúan como un aducto voluminoso que distorsiona la hélice y por consiguiente puede probablemente bloquear físicamente la progresión de la replicación o complejo de transcripción y/o previene el acceso de las proteínas requeridas para la síntesis de la cadena templada, para la transcripción o para el reconocimiento de la reparación y/o incisión. Ellos también son afectados por todos estos procesos al ser fijada la cromatina y prevenir así la remodelación.

Desafortunadamente, nuestro conocimiento acerca de las consecuencias biológicas de los DPCs es obstruido por el hecho de que no hay agentes que induzcan exclusivamente estas lesiones en el DNA genómico (aunque los estudios que usan DNA plasmidico pueden proveer de la visión del proceso

de estas lesiones por las células). Así, es conocido que los agentes inductores de DPC generan otras formas de daño al DNA en adición a los DPCs y la atribución directa de ningún efecto observado como es la mutagénesis o carcinogénesis se confunden inevitablemente con los DPC por el impacto concomitante de estas lesiones.

La exposición al cromo se ha asociado con un incremento en la incidencia de los cánceres respiratorios. Los tipos de mutación causados por los DPCs son principalmente sustituciones en una base única del par de bases G:C, con transiciones G:C→A:T y transversiones G:C →T:A.

El arsénico se ha implicado en la inducción de cáncer de piel, pulmón, vejiga e hígado. Aunque es carcinógeno, el arsénico puede ser mutagénico. Estudios recientes sugieren que el arsénico sólo induce daño al DNA en altas concentraciones; sin embargo, un estudio reciente sugiere que los diferentes tipos celulares difieren en su sensibilidad al arsénico. El arsénico induce daño al DNA en concentraciones biológicamente revelantes, las mayores formas de daño al DNA inducidos por arsénico son los aductos oxidativos en el DNA y DPCs (Fig. 4). Así, se han propuesto múltiples rutas para la inducción de citotoxicidad por arsénico. El tratamiento con arsenito puede causar daño al DNA a través de la producción de HOCl porque esta es una activación de la NADH oxidasa y un incremento en la producción de superóxido después de la adición de NADH en las células musculares lisas humanas tratadas con arsenito. Esta ruta puede resultar en daño al DNA porque la superóxido es convertida a peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa y el resultante peróxido de hidrógeno puede reaccionar con los iones cloruro que forman el HOCl o con los iones metálicos de transición para producir * OH (Barker, 2005).

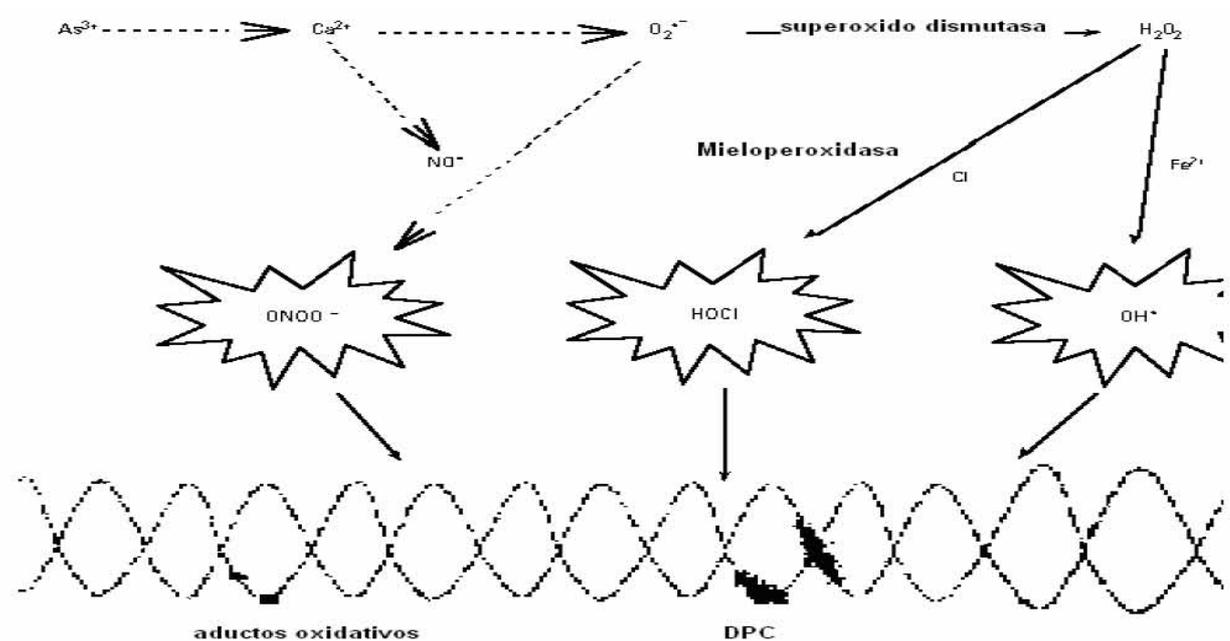


Fig 4. Posible mecanismo de inducción de aductos oxidativos de DNA y entrecruzamientos DNA-proteína ocasionados por arsénico, las líneas indican las rutas bien establecidas. Las líneas quebradas indican las rutas tentativas. Figura tomada de www.ehp.niehs.nih.gov...

La evidencia de que el arsénico causa citotoxicidad pero no daño al DNA proviene de Mei y colaboradores. Se observa una sensibilidad en las células humanas normales y varias líneas celulares que tienen deficiente la reparación del DNA (Xeroderma pigmentosum (XP)), Síndrome de Bloom (BS) y anemia de Fanconi (FA) después de tratamiento con arsenito de sodio, sin embargo, las células con Ataxia-Telangiectasia (AT) son significativamente más sensibles. Esta sensibilidad parece estar relacionada con la reparación de rupturas en cadenas dobles (DSB) porque las líneas celulares adicionales tienen defecto en la reparación de DSB pero no incrementa la sensibilidad al arsénico. En células con AT la sensibilidad al arsénico puede deberse al efecto sobre la regulación del ciclo celular y no necesariamente causar daño al DNA. La interrupción del ciclo celular se observa en el tratamiento con arsénico lo que causa DPCs. Aunque es poco

lo que se sabe sobre el efecto de los DPCs sobre la progresión del ciclo celular, se cree que estas lesiones interrumpen múltiples funciones del metabolismo/organización del DNA (Barker, 2005; Mourón, 2005).

2.5 Reparación enzimática de los DPC

Los estudios de algunos tipos de DPCs celulares indican que estas lesiones pueden permanecer más que otros tipos de daño y que persisten a través de varios ciclos de replicación y que son parcialmente reparados, esto implica que existen alteraciones permanentes en el DNA con serias consecuencias para la replicación, transcripción y procesos de reparación. Se ha reportado que existe acumulación de DPCs en algunas células de mamífero y en ratones se incrementa su frecuencia con la edad. En las células de mamífero, los procesos de envejecimiento y otros estresantes celulares (la enfermedad, la exposición a las drogas, la radiación ionizante, los contaminantes, etc.) pueden resultar en la acumulación de los diferentes tipos de lesiones en el DNA incluyendo DPCs debido a mecanismos oxidativos. No obstante, la mayoría de los DPCs inducidos por agentes exógenos son removidos del genoma con el tiempo (aunque esto solo se puede notar en estudios acerca de la remoción de los DPCs en los sistemas biológicos e indican que se complican por la inestabilidad química conocida de algunos tipos de DPC). Tanto los entrecruzamientos intercadenas como los DPCs presentan cambios en la maquinaria de reparación del DNA debido a que son grandes y/o están involucradas uniones locales covalentes de ambas cadenas de DNA. En suma ambos tipos de lesiones o ambas subclases pueden ser reparadas por la misma ruta o usando los mismos elementos en común. Por ejemplo, en la reparación por excisión de nucleótido (NER), las enzimas ERCC1 y XPF parecen estar involucradas en la reparación de ambos tipos de entrecruzamientos DNA-intercadenas así como en los DPCs. Se ha sugerido que esta involucrada la degradación proteolítica de las proteínas en los DPC de acuerdo a la investigación en algunas células. Quievryn y Zhitkovich han demostrado que los DPC

inducidos por formaldehído pueden ser removidos parcialmente por degradación proteolítica debido a una disminución de los DPCs que son parcialmente inhibidos cuando las células se incuban con lactacistina, un inhibidor específico de los proteosomas.

En general, los sustratos de la degradación proteolítica no lisosomal son proteínas reguladoras del ciclo celular, factores de transcripción y moléculas de señalización; la inhibición de su degradación, puede afectar la inducción, remoción y reparación de los DPCs mediante diversos mecanismos que inhiben directamente o indirectamente la proteólisis en los aductos (Quiévryn y cols., 2000).

Un estudio reciente ha mostrado que los complejos covalentes de la topoisomerasa I y el DNA inducidos por camptotecina son ubiquitinados y experimentan degradación proteolítica y este mecanismo se encuentra activo en otros tipos de DPCs. La degradación proteolítica no remueve la proteína completa pero puede liberar un pequeño péptido o aminoácido del aducto que puede ser sustrato para otra vía de reparación como la NER (reparación por excisión de nucleótido).

Estudios de la enzima Tdp1 han demostrado que esto es más efectivo sobre los sustratos que contienen una proteína desnaturalizada o digerida proteolíticamente que sobre los sustratos que contienen la proteína nativa. Aunque esta enzima no ha mostrado ser activa para otros complejos covalentes de proteína-DNA es posible que esta u otra enzima similar activa pueda estar involucrada en el paso secundario de reparación de los DPC por la degradación proteolítica (Barker, 2005).

2.6 Proteínas involucradas en los DPC

Es muy importante determinar que proteínas se ven involucradas en los entrecruzamientos con el DNA por varios agentes genotóxicos y como se puede ayudar a comprender las consecuencias biológicas de los DPCs así como los mecanismos de su reparación. Un gran número de investigadores han tratado de identificar las proteínas que están involucradas en los

entrecruzamientos con el DNA usando sistemas in vitro con proteínas purificadas y DNA o por aislamiento de los DPCs de las células expuestas a varios agentes causantes de daño al DNA. Diversas proteínas han mostrado ser útiles para el entrecruzamiento in vitro cuando son combinadas con el DNA y tratadas con un agente inductor de DPC. Algunos reportes sugieren que solo las proteínas unidas al DNA pueden entrecruzarse con el DNA mientras que otros sugieren que cualquier proteína puede entrecruzarse con el DNA. Algunas proteínas relevantes biológicamente han demostrado que se entrecruzan con el DNA in vivo incluyendo actina, lectina, aminoglicosil nucleotidil transferasa, histonas, una proteína de choque térmico (GRP78), citoqueratinas, vimentina, protein disulfida isomerasa y factores/cofactores de transcripción (receptor de estrógeno, histona deacetilasa 1, hnRNP K, HET/SAF-B). En la figura 5 se observa la estructura de las citoqueratinas

Se sabe que la actina puede entrecruzarse con el DNA en las células leucémicas humanas o en los núcleos aislados tratados con compuestos de cromo o radiación ionizante (Barker, 2005).

En 1997, Ramírez et al reporta que en un estudio in vitro usando NaAsO_2 se observa una interrupción en el ensamble y función de los microtúbulos. Las aberraciones de las proteínas del citoesqueleto son la razón principal del fenotipo de algunas patologías.

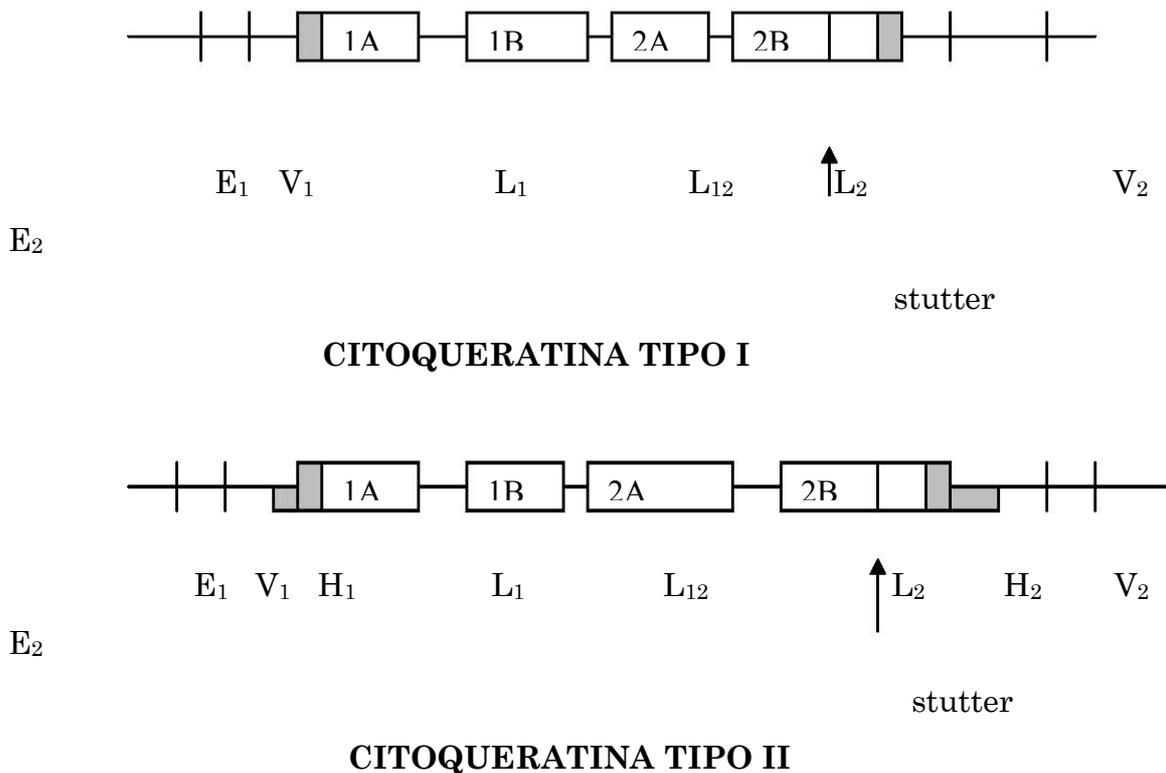


Fig. 5. Estructura del dominio de las proteínas citoqueratinas. El dominio guía central consiste de dominios α helicoidales altamente conservados 1A, 1B, 2A y 2B separados por regiones de unión no helicoidales. Los dominios cabeza y tallo consisten de dominios finales (E1/E2), dominios variables (V1/V2) y dominios homólogos (H1/H2). El interruptor de las repeticiones que ocurren en 2B se conoce como *stutter* (Fuchs, 1994).

No es una sorpresa que las modificaciones en la estructura del citoesqueleto condicionan al desarrollo de condiciones patológicas. En suma, algunas enfermedades se asocian con anomalías en el citoesqueleto y en las proteínas núcleo esqueléticas, aquí se incluyen diversos síndromes cardiovasculares, neurodegeneración, cáncer (invasión), cirrosis hepática, fibrosis pulmonar y enfermedades ampulosas dérmicas (se deben principalmente a alteraciones en las queratinas). Los mecanismos por los cuales algunos microorganismos infectan células específicas dependen de los

elementos citoesqueléticos del huésped. Algunos intentos por modular al citoesqueleto por péptidos u otras drogas específicas han arrojado resultados interesantes y esto ha permitido el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. El impacto sobre el tratamiento del cáncer es un ejemplo de ello: las drogas anti-citoesqueléticas (dirigidas a los microtúbulos) son usadas para inhibir la división celular. Los anticuerpos del citoesqueleto son usados ampliamente para propósitos diagnósticos, por ejemplo, para la caracterización de eventos celulares relacionados con el cáncer (Ramaekers y cols., 2004; Fuchs, 1994; Ramírez y cols., 1997).

Como un órgano interno, el mecanismo natural de estrés que sufren los hepatocitos es un cambio hemodinámico que ocurre en asociación con daño hepático. El mecanismo de citoprotección es realizado por las citoqueratinas del hepatocito permanece sin ser definido pero la fosforilación de las citoqueratinas específicas probablemente sea un contribuidor importante. La estabilidad mecánica realizada por las citoqueratinas está probablemente relacionada con interacciones con desmosomas y hemidesmosomas, otros elementos del citoesqueleto. La importancia de las citoqueratinas reside en la ayuda que prestan a células con estrés o formas no mecánicas de estrés y es evidenciado por numerosos modelos de daño hepático (Omary, 2002).

CAPITULO III EL SISTEMA Ub-PROTEOSOMA

3.1 Estructura y función del sistema Ub-proteosoma

Las células de los organismos vivos requieren de proteínas, carbohidratos, agua y otros microelementos que en conjunto mantienen las funciones, protegen y defienden a dichos organismos; en el desarrollo de sus funciones las proteínas pueden sufrir algún daño o en algunos casos ser destruidas y se requiere crear otras que realicen su trabajo. Para que esta nueva cadena polipeptídica pueda ser útil a la célula debe poseer una conformación tridimensional única, unirse a los posibles cofactores que sean requeridos para el desarrollo de su actividad y, si es el caso, ensamblarse correctamente con las otras subunidades proteicas con las que tiene que actuar. Las proteínas mal plegadas también pueden generarse por la inexactitud de la translación, problemas de plegado o daño oxidativo, dichas proteínas son ubiquitinadas y después de un estricto control de revisión son degradadas (Kaiser, 2005; Janse, 2004)

En ocasiones algunos de estos pasos no pueden llevarse a cabo con éxito y la proteína expone una región de aminoácidos hidrófobicos de un cierto tamaño en su superficie, esto es indicativo de que es una proteína anómala o que se ha plegado de forma incorrecta después de abandonar el ribosoma o que ha sufrido un accidente que la ha desplegado parcialmente o que no ha podido ensamblarse con las demás subunidades con las que debía formar un complejo. Esta proteína no sólo resulta inútil para la célula, sino que puede resultar peligrosa. Muchas proteínas con regiones hidrofóbicas expuestas de forma anormal pueden formar grandes agregados que precipitan en el interior de las células. Para resolver este problema las células han desarrollado potentes mecanismos de control de calidad de las proteínas. Cuando fallan los intentos de volver a plegarla, aparece un mecanismo que la destruye por proteólisis. Esta vía proteolítica se inicia con el reconocimiento de una región hidrofóbica expuesta, de forma anormal en la superficie de la proteína y acaba con la entrada de dicha proteína a un

complejo túnel de proteasas que recibe el nombre de proteosoma. Este proceso depende de un complicado sistema de identificación de proteínas, que lleva a cabo otras funciones clave de la célula mediante la destrucción de algunas proteínas normales previamente seleccionadas.

La degradación de proteínas desempeña un papel crucial en la regulación general del metabolismo corporal. En el estado de desnutrición o de enfermedad, la vía de los proteosomas se aviva en nuestros músculos, proporcionando aminoácidos que pueden convertirse en glucosa requerida para la combustión energética. Se refleja esa degradación excesiva de proteínas en el desgaste y debilidad muscular de los famélicos y en los pacientes con cáncer avanzado, SIDA y diabéticos sin tratar (Lodish, 2000).

Nuestro sistema inmunitario, en su constante búsqueda de células infectadas con virus o cáncer que eliminar, depende también de los proteosomas para generar las señales que identifiquen a tales células dañinas. Aunque suelen degradarse las proteínas celulares hasta dejarlas en sus aminoácidos, los proteosomas dejan sueltos unos pocos fragmentos, de entre ocho y diez aminoácidos, que son capturados y presentados en la superficie de la célula, donde el sistema inmunitario comprueba si son normales o anormales. En estados patológicos y en el bazo y los ganglios linfáticos se producen inmunoproteosomas, tipos de proteosomas especializados que potencian la eficacia de este mecanismo de vigilancia.

Gracias a la degradación de las proteínas por los proteosomas se evita la acumulación de proteínas aberrantes, potencialmente tóxicas. Las células de mamíferos y las bacterianas destruyen de una manera selectiva las proteínas que muestran conformaciones anómalas causadas por una mutación, por errores en la síntesis o por alteraciones de otra clase.

Todas aquellas proteínas que expresen residuos de lisina son blanco del sistema Ub-proteosoma. La puesta en marcha del sistema de Ub-proteosoma requiere entre otras cosas de la activación de las enzimas que llevan a cabo la proteólisis. Esta activación comienza con el reconocimiento por parte del complejo enzimático de residuos lisina en las proteínas blanco del ataque

enzimático. Ciechanover y colaboradores descubrieron que la activación puede darse también a través de reconocimiento de grupos α -NH₂ libres de un residuo N-terminal de una proteína. La ubiquitina también puede conjugarse a un sustrato vía una cadena de cisteína (Cadwell y cols., 2005).

En múltiples enfermedades genéticas humanas se deja sentir la importancia de la degradación de proteínas anómalas como en el caso de la fibrosis quística en la que una mutación en el gen da como resultado una proteína en forma de poro, que traslada el cloruro a través de la membrana externa de la célula. Debido a que estos mutantes de los transportadores de cloruro desarrollan a menudo una conformación inadecuada, los proteosomas los degradan antes de que alcancen la membrana celular.

Otras enfermedades podrían ser, en parte, resultado de un fracaso de los proteosomas en su función degradadora de proteínas anómalas. Hay conjuntos de proteínas mal plegadas que se acumulan junto con proteosomas en determinadas neuronas del cerebro de sujetos con la enfermedad de Parkinson, la de Huntington o la de Alzheimer (Goldberg, 2001; Rockel, 2005).

En todas las células de nuestro organismo existe un complejo enzimático multicatalítico que degrada las proteínas dañadas o malformadas. Este complejo recibe el nombre de proteosoma, se llama así porque contiene muchas proteasas, enzimas que trocean las proteínas. La degradación de una enzima importante o una proteína reguladora es un mecanismo habitual que las células utilizan para frenar o suspender una reacción bioquímica. Por otra parte, muchos procesos celulares se activan con la degradación de una proteína inhibidora clave. Esta eliminación de proteínas reguladoras reviste particular interés en la temporización de las transiciones entre las etapas del ciclo de la división celular.

La función primaria del proteosoma es la degradación de proteínas. Los sustratos del proteosoma incluyen moléculas de señalización, factores de transcripción, moléculas inhibitoras (cuya degradación activa a otras proteínas) y proteínas anti-apoptóticas (por ejemplo, Bcl-2) entre otras.

Cuando la degradación de estas proteínas es interrumpida, los efectos son devastadores, particularmente en la rápida división de las células cancerosas, que presumiblemente requieren de la disponibilidad de proteínas promotoras del crecimiento para acelerar o desacelerar la mitosis, característica del desarrollo del cáncer (Adams, 2003).

3.2 Activación del sistema Ub-proteosoma

Los proteosomas son estructuras gigantes. Mientras que una proteína de tamaño medio tiene entre 40,000 y 80,000 daltons, la mayoría de los proteosomas de los organismos superiores pesan dos millones de daltons. Cada proteosoma está constituido por una partícula central (se denomina 20 S) con aspecto de túnel a la que acompañan una o dos partículas reguladoras (denominadas 19 S) menores, situadas en un extremo o en ambos. Cada subunidad 19 S es capaz de unir las cadenas de poliubiquitina y anclarlas a la proteína sustrato. La formación de una cadena de poliubiquitina requiere de una unión isopeptídica entre el grupo carboxiterminal de una molécula de ubiquitina libre y uno de siete residuos lisina presentes en una sustrato de unión a ubiquitina. Una cadena se forma a través de de una lisina en posición 48 de la ubiquitina, esta es la principal señal de reconocimiento para el proteosoma y generalmente induce a la degradación del sustrato (Kaiser, 2005). La partícula regulatoria 19 S realiza muchas funciones: 1) tiene que reconocer y unir selectivamente los sustratos de proteína a ser degradados; 2) los sustratos deben ser desplegados; 3) las cadenas de ubiquitina tienen que anclarse a las proteínas para poliubiquitinarse; 4) las compuertas formadas por las subunidades α en cada lado del proteosoma 20S se abren y 5) los sustratos desplegados deben ser manejados dentro de la cámara proteolítica del cilindro 20S para su degradación El sustrato es desnaturalizado o desplegada y es introducida dentro del centro proteolítico. La partícula central es un cilindro que consta de cuatro anillos apilados – cada uno compuesto a su vez de siete subunidades – que rodean un canal central que constituye el tracto digestivo del proteosoma. Los dos anillos

externos (llamados anillos α) actúan como puertas de control y alejan así el peligro de que alguna proteína extraviada penetre en la cámara de destrucción (Fig 6).

A su vez, las partículas de los extremos se comportan como guardianes exigentes del paso hacia a partícula central. Son partículas reguladoras que reconocen y se unen a proteínas marcadas para la destrucción; luego, recurren a la energía necesaria para desplegar las proteínas y arrojarlas hacia la partícula central, donde se trocean en fragmentos de tamaño variable.

El proteosoma no elige proteínas al azar para destruirlas. Corresponde a la célula señalar las proteínas destinadas a ese fin. En su inmensa mayoría, esas proteínas se etiquetan primero con ubiquitina (debe su nombre a que se encuentra en muchos organismos diferentes). Con sólo 76 aminoácidos, la ubiquitina es una proteína pequeña: se une a proteínas mayores formando grandes cadenas; esta vía es ejecutada vía un mecanismo dependiente de ATP. Estas colas de poliubiquitina actúan como códigos que encaminan y aceleran las proteínas marcadas hacia el proteosoma.

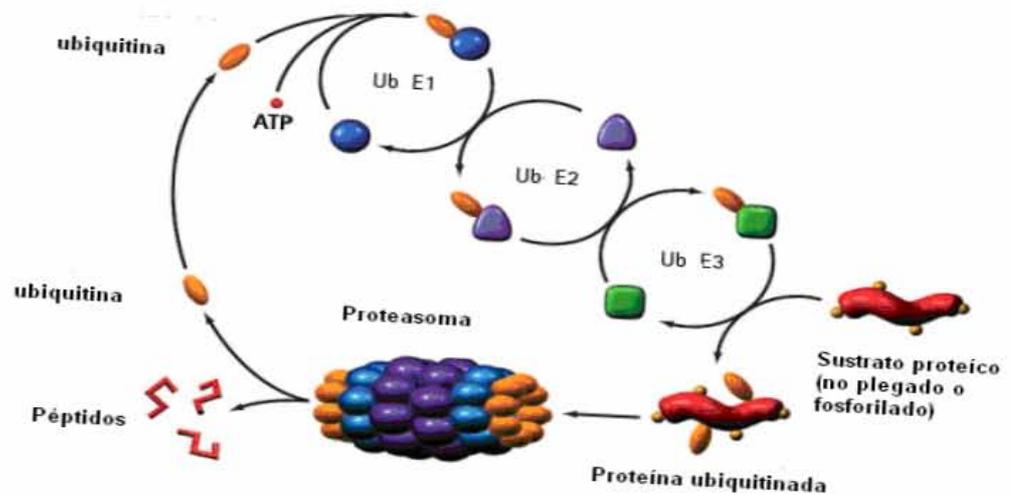


Figura 6. Estructura del sistema ubiquitina-proteosoma. Modificado de www.mayorga.edu/ftd

El control de la destrucción de una proteína no reside en el proteosoma sino en el proceso de la incorporación de las cadenas de ubiquitina.

El proceso de la ubiquitinación de las proteínas se desarrolla en varias etapas. En él participan tres enzimas: E1, E2 y E3. La enzima E1 (solo se conoce una) activa la ubiquitina y la asocia a E2 (se conocen 20 diferentes enzimas E2). La tercera enzima, E3 (se sabe que existen cientos de ellas, son ligasas), facilita la transferencia de la ubiquitina activada desde E2 hasta la proteína. El proceso se repite hasta que hay una larga cola de ubiquitinas que se unen a la proteína. El proteosoma reconoce esa cola y atrae a la proteína hacia su interior. Esta ruta en la cual las proteínas se ubiquitan y degradan se denomina ruta ubiquitina-proteosoma y es crítica no solo dentro del ciclo celular sino también en la respuesta inflamatoria y en la presentación de antígenos (Adams, 2003; Rockel, 2005; Tanahashi, 1999).

Para la elección de determinada proteína para la ubiquitinación existen centenares de E3 distintos que reconocen la información encerrada en las secuencias de aminoácidos de otras proteínas que las convierten en objetivo de la ubiquitinación. La ubiquitinación es un proceso reversible; cuando la proteína es marcada con ubiquitina y no es degradada enzimas catalíticas llamadas deubiquitinasas pueden remover la ubiquitina intacta. Por deubiquitinación de sus sustratos, estas enzimas compiten con el proteosoma que actúa sobre la forma poliubiquitinada. En la competición entre la proteólisis y la deubiquitinación, las proteínas poliubiquitinadas raramente se acumulan en el citoplasma de las células “sanas” ya que estas son degradadas irreversiblemente o deubiquitinadas y rescatadas. Basados en su secuencia homóloga, las enzimas deubiquitinizantes se clasifican tradicionalmente en dos familias: las proteasas específicas para ubiquitina (UBPs o USPs) y las ubiquitin carboxiterminal hidrolasas (UCHs). Ambas familias enzimáticas se clasifican como cistein proteasas que emplean como sitio activo a un tiol para anclarse a la ubiquitina blanco. Es esencial la especificidad del sustrato para la degradación coordinada de las proteínas celulares. Ante condiciones fisiológicas alteradas las células pueden modificar las proteínas mediante la adición de grupos fosfato. Esta fosforilación puede trastornar la actividad de una proteína o su capacidad para unirse a las E3. Estas enzimas reconocen también las proteínas que fracasan en el plegamiento o que están alteradas (Goldberg, 2001; Glickman, 2005; Glickman, 2004; Wolf, 2004; Glickman, 2002; Carrard, 2003)

Existen estudios que muestran que la ubiquitina es componente de un tipo de inclusiones citoplásmicas conocidas como cuerpos de Mallory y cuya formación se relaciona con alteraciones en la degradación de proteínas por el proteosoma contribuyendo con la acumulación de proteínas no funcionales y en la patogénesis de varios de estos desordenes como el Alzheimer (Nakamichi, 2002).

3.3 Control de la ubiquitinación de las proteínas

Dentro de las células existen mecanismos que regulan las modificaciones postraslacionales que controlan la función y producción de las proteínas; la conjugación de la ubiquitina es regulada frecuentemente en respuesta a las señales extracelulares. Esto es muy importante ya que la fosforilación de residuos serina y treonina puede marcar a las proteínas a una rápida degradación por el sistema Ub-proteosoma. En tales casos, la fosforilación inducible permite el reconocimiento de los sustratos fosforilados por la maquinaria de ubiquitinación, más comúnmente por el componente E3. Los miembros de una clase de multisubunidades RING E3s, también llamadas complejo de proteínas Skp1-Cul1-F (SCF) juegan un papel importante en el marcado de los sustratos fosforilados para la degradación proteosomal. La función de las ligasas E3 de SCF tiene la habilidad de que uno de sus componentes, la proteína adaptadora F reconoce específicamente las moléculas fosfoaminoácidos en el sustrato (Gao, 2005)

3.4 Las enfermedades y el sistema Ub-proteosoma

Actualmente han surgido algunos estudios que sugieren que el sistema Ub-proteosoma tiene un papel crucial en la patogénesis de diversas enfermedades. Dichos estudios han reportado la acumulación de agregados proteicos asociados a ubiquitina en diversas enfermedades neurodegenerativas incluyendo la esclerosis amiotrófica lateral, el Alzheimer, el Parkinson, la corea de Huntington, la atrofia espinobulbar muscular, las ataxias espinocerebelares tipos 1,3 y 7 y algunas encefalopatías. Estas enfermedades se deben a modificaciones en las estructuras proteicas. En circunstancias normales, las células repliegan las proteínas mal plegadas por medio de procesos dependientes de chaperonas o la degradación vía el sistema Ub-proteosoma (UPS). Sin embargo, cuando la capacidad del proteosoma es excedida por la producción de proteínas mal

plegadas se produce la formación de agregados proteicos intracelulares. Esta estructura que se asocia con los filamentos intermedios (IF) y la Ub son llamados agresomas. La formación de agresomas es inducida por varias proteínas características de enfermedades como son el regulador transmembranal de fibrosis cística, el fragmento huntingtin, la proteína 2 de resistencia multidrogas y la proteína de la enfermedad de Wilson (ATP7B). La existencia de inclusiones de IF asociadas con la ubiquitina es una característica común de los cuerpos de inclusión observados en varias enfermedades, en la enfermedad de Parkinson son denominados cuerpos de Lewy, son cuerpos de Pick en la enfermedad de Pick, cuerpos citoplásmicos en una miopatía específica y cuerpos de Mallory en las enfermedades alcohólicas del hígado (Harada, 2003).

Mediante el control de la estabilidad de proteínas cruciales, las enzimas E3 regulan el desarrollo de las extremidades, la respuesta inmunitaria, la división celular y la comunicación intercelular los ritmos circadianos y la floración en las plantas. De varias proteínas E3 se conoce incluso su función supresora de tumores u oncogénica, lo que vincula la ubiquitinación al comienzo del proceso canceroso.

Así ocurre con el supresor de tumores Von Hippel Lindau (VHL), una E3 que sufre a menudo una mutación en los tumores renales. La función de VHL consiste en demorar el crecimiento celular limitando el desarrollo de los vasos celulares en los tejidos, cuando se produce la mutación, los tumores recién formados generan un rico suministro sanguíneo y crecen rápidamente; algo similar ocurre con la enfermedad de Parkinson en la que en virtud de una mutación del gen de un tipo de la enzima E3, inductora de la acumulación de proteínas en ciertas células cerebrales y de su aniquilamiento.

Los virus aprovechan en su beneficio los procesos celulares y han adquirido medios para secuestrar el mecanismo de ubiquitinación y degradación de proteínas. Es el caso del virus del papiloma humano (VPH), que provocan verrugas genitales, cáncer de útero o cáncer de recto. La

transformación hacia el desarrollo tumoral se bloquea por la p53 (supresor de tumores). El VPH recurre a la fabricación de una proteína que se enlaza rápidamente a la p53 y a una enzima E3. Esta unión provoca la ubiquitinación de la p53 que es posteriormente degradada por el proteosoma, así las células quedan desprotegidas y proliferan desmesuradamente dando lugar a un cáncer (Goldberg, 2001; Kim, 2005; Tanaka, 1998).

Es importante hacer notar que debido a un incremento en las actividades industriales y humanas el riesgo de contaminación se ha incrementado. La exposición crónica al arsénico se ha asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar enfermedades vasculares y cáncer de pulmón, riñón, vejiga y piel. Se ha sugerido que el mecanismo de toxicidad del arsénico, específicamente del arsénico (III) es a través de la interrupción de la ruta ubiquitina (Ub)-proteosoma, que es la responsable del control de las proteínas dañadas. Esta idea surgió a partir de la observación de que algunas proteínas importantes que son reguladas por la Ub como son la ciclina D, GADD45, p53 y IκB presentan alteraciones en su actividad cuando son expuestas al As (III) (Bredfeldt, 2004)

3.5 La terapéutica y el sistema Ub-proteosoma

La inhibición del proteosoma puede arrestar o retardar la progresión del cáncer por interferir con el orden de la degradación de las proteínas del ciclo celular. La inhibición de la función del proteosoma resulta en la muerte celular programada (apoptosis). Por lo anterior, los inhibidores del proteosoma representan una nueva clase de agentes con una potencial aplicación clínica.

Existen numerosas drogas que inhiben el proteosoma, algunas de las cuales interfieren directamente con la actividad proteolítica de la partícula central 20 S. Estos inhibidores pueden unirse reversible o irreversiblemente a los sitios activos en la partícula central, poseen diferentes niveles de especificidad para el proteosoma. Entre ellos se incluye a los aldehídos

peptídicos sintéticos MG-132 y PS1, lactacistina, NLVS, epoxomicina, eponemicina, TMC-95A y los ácidos peptídico borónicos. Algunos de estos compuestos tienen una alta especificidad, poca estabilidad metabólica y se unen irreversiblemente al proteosoma. Consecuentemente, su utilidad se ha limitado. Desde una perspectiva clínica, quizás los más prometedores inhibidores del proteosoma son los ácidos peptídico borónicos. Estos compuestos son 1000 veces más potentes que sus análogos aldehídos y son extremadamente selectivos hacia el proteosoma. Los ácidos peptídico borónicos bloquean la actividad quimiotripsina del proteosoma de una manera reversible y se disocia del proteosoma más lentamente que los aldehídos. Dentro de esta clase de péptidos, los ácidos dipeptidil borónicos tienen la ventaja de que poseen bajo peso molecular y su síntesis es simple, el ácido dipeptidil borónico (Bortezomib) es extremadamente potente, reversible y es un inhibidor selectivo del proteosoma.

Se tienen bien establecidos los efectos de la inhibición del proteosoma sobre la estabilidad de varias proteínas regulatorias del ciclo celular, incluyendo las ciclinas (por ejemplo, la ciclina B1), los inhibidores cinasa dependientes de ciclina (CDKI, por ejemplo p21 y p27), los supresores de tumores (p53) y los factores de transcripción NF- κ B. Los bajos niveles de p21 o p27 son factores de pronóstico en diversos cánceres pero los inhibidores del proteosoma inducen a la sobreexpresión de los CDKI que inducen la apoptosis en las células cancerosas *in vitro*.

La regulación de NF- κ B por el proteosoma es particularmente interesante, interfiere con la transcripción de NF- κ B lo que aparentemente tiene influencia sobre la supervivencia de la célula tumoral. En circunstancias normales, NF- κ B es secuestrado en el citoplasma e inactivado por el inhibidor de proteína I κ B. Cuando la célula es estresada, I κ B es degradada por el proteosoma. NF- κ B promueve la supervivencia celular por la iniciación de la transcripción de genes que codifican enzimas de respuesta al estrés, moléculas de adhesión celular, citocinas pro-inflamatorias y proteínas pro-inflamatorias además de proteína antiapopticas como son Bcl-2, cIAP1 y cIAP2. NF- κ B es constitutivamente

activa en ciertas enfermedades y ha demostrado que es un promotor de la supervivencia de la célula tumoral y reduce la efectividad de la terapia anticancerígena. La actividad constitutiva de NF- κ B puede correlacionarse con la resistencia a la droga in vitro.

Una de las primeras indicaciones del potencial de inhibición del proteosoma las ha dado el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos al aplicar bortezomib en 60 líneas celulares cancerígenas derivadas de tumores múltiples humanos. Esto demostró que el bortezomib posee una potente actividad anticancerígena ya que penetra a la célula cancerígena e inhibe la proteólisis de las proteínas (Adams, 2003).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad no existen muchos estudios enfocados a la investigación de las características de los entrecruzamientos DNA-proteínas y los mecanismos de reparación que actúan sobre ellos. Esto se atribuye en parte a que los agentes que inducen DPCs inevitablemente inducen otros tipos de daño a las proteínas y al DNA. Las posibles consecuencias bioquímicas de este entrecruzamiento covalente de las proteínas y el DNA son el bloqueo de la replicación, transcripción y recombinación. Existe evidencia acerca de que los DPCs contribuyen a la citotoxicidad, mutagenicidad y efectos carcinógenos de un gran número de agentes entre ellos el arsénico (Barker, 2005; Ramírez, 2000).

El arsénico ha sido vinculado a la presencia de ciertos tipos de daño al organismo tanto animal como humano. Debido al gran crecimiento de la población y con ello el incremento de las actividades, los humanos nos vemos expuestos a grandes cantidades de agentes tóxicos por lo que el estudio de los diferentes daños que causan dichos tóxicos se ha convertido en un problema de salud prioritario. En la actualidad existen algunos estudios que proponen a los DPCs como biomarcadores de exposición a agentes tóxicos. Por lo anterior y sobre la base de que los procesos de bioactivación y detoxificación del arsénico en el organismo ocurren en el hígado así como las evidencias, que relacionan al sistema ubiquitina proteosoma con la reparación de este tipo de daño ampliamente estudiado en nuestro grupo de trabajo, nos interesa conocer si las proteínas involucradas en los DPCs se encuentran ubiquitinadas en el hígado producto de la exposición de ratones machos a arsenito de sodio.

HIPÓTESIS

Considerando que el arsénico induce entrecruzamientos DNA-proteínas modificando la estructura y plegamiento de estas moléculas por su estrecha unión, el sistema proteolítico no lisosomal dependiente de ubiquitina-proteosoma marcará a las proteínas involucradas encontrándolas ubiquitinadas en el hígado de ratones expuestos a arsenito de sodio

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el sistema ubiquitina-proteosoma hepático es capaz de reconocer a las proteínas entrecruzadas *in vivo* con DNA, después de la exposición a arsenito de sodio mediante la identificación de ubiquitina en los entrecruzamientos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a la ubiquitina en los entrecruzamientos DNA-proteína hepáticos inducidos por arsénico después de la exposición diaria oral a diferentes dosis, con objeto de iniciar el estudio de la participación del sistema proteolítico no lisosomal dependiente de ubiquitina en el reconocimiento del daño por nuestro grupo de trabajo.

Estudiar la relación entre las dosis administradas de arsenito de sodio y la cantidad de proteínas ubiquitinadas en los entrecruzamientos DNA-proteína inducidos por arsénico.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

MATERIALES Y REACTIVOS

Material biológico: Ratones macho de la cepa Balb/c de 5 semanas de vida, anticuerpo anti-Ub (Zymed, Invitrogen), anticuerpo conjugado HRP (Santa Cruz), albúmina sérica bovina (Sigma), leche descremada, proteinasa K(2mg/ml) (Sigma)..

Reactivos: Arsenito de sodio, PBS pH 7.4, dodecil sulfato de sodio (10%), cloruro de potasio, PMSF, Tris-HCl, alcohol etílico, EDTA, agua desionizada, solución de Hoeschst 33258 (1mg/ml), kit para determinación de proteínas por el método de Bradford (BioRad), acrilamida-bis acrilamida, azul de Coomassie, membranas de PVDF.

Equipo: pHmetro (Oakton(USA)), balanza analítica(Sartorius (USA)), balanza para animales de laboratorio, pipeteador automático, micropipetas (Eppendorf), mecheros de gas, cámaras para electroforesis (BioRad), cámara para blott (BioRad), espectrofotómetro, fluorómetro (Precision(USA)), microcentrifuga (Hermle(Mex)), vortex (Genie 2(USA)).

Material en general: Celdas para espectrofotómetro, microhomogenizadores, estuche de disección, puntas para micropipeta, pipetas graduadas estériles y no estériles, cajas de Petri estériles, vasos de precipitados, tubos de ensayo, matraces aforados, probetas, agitador magnético, tubos Ependorff.

Tratamiento de los ratones y obtención de muestras

Los ratones macho de la cepa Balb/c se pesaron y se distribuyeron en tres lotes: lote 1: control (administrado con agua destilada), lote 2: administrados con dosis de 2.5 mg de arsénico/kg de peso corporal y lote 3: administrados con dosis de 5.0 mg de arsénico/kg de peso corporal. Marcamos a los ratones y realizamos el cálculo para la administración de cada lote. El tratamiento de los ratones se hizo por vía oral durante 5 días.

Al término del tratamiento se procedió al sacrificio por dislocación cervical de los ratones en un área estéril. Se realizó una incisión en el abdomen y se extrajo rápidamente el hígado que se coloca en una caja Petri estéril con PBS pH 7.4 con inhibidores de proteasas en hielo. Se realizó un corte de peso aproximado a 0.5 g. Se colocaron en tubos Eppendorf etiquetados para cada muestra y se les agregan 500µl de PBS con inhibidores de proteasas pH 7.4. El resto del tejido se coloca en tubos Eppendorf etiquetados y se procede a congelar a -20° C.

Precipitación de los aductos DNA-proteínas

La presente técnica es modificada de un ensayo de SDS-KCl desarrollado para detectar complejos de topoisomerasa-DNA para la detección de los entrecruzamientos DNA-proteína. (Costa y cols, 1993)

El ensayo se basa en la unión del SDS a las proteínas que se unen al DNA (precipitado formado por DPC). La adición de cloruro de potasio a la solución de SDS forma un precipitado de potasio-SDS-proteínas-DNA, que es recuperado por centrifugación a baja velocidad, permitiendo la precipitación selectiva del DNA que contiene los entrecruzamientos proteicos. Así, tanto las proteínas libres (del DNA) como las aductadas al DNA (DPC), precipitan unidas al SDS.

Técnica para el aislamiento y precipitación de DPC

- ◆ Homogenizar en hielo el tejido con 500 µl de PBS con inhibidores de proteasas.
- ◆ Mezclar 500 µl del homogenizado de hígado con 500 µl de solución de lisis A (Tris-HCl 20 mM, PMSF 1 mM, SDS 2% ajusta a pH 7.5).
- ◆ Tomar una alícuota de 10 a 20 µl para cuantificación de DNA total y congelar ambas muestras a -20° C por 12 horas.
- ◆ Expeler los lisados descongelados previamente a 37° C usando una jeringa con aguja de calibre 21 tres veces en el mismo tubo.
- ◆ Una vez lisadas las células agregar 500 µl de solución B (Tris-HCl 20 mM, KCl 200 mM ajustar la solución a pH 7.5).
- ◆ Incubar mínimo 10 minutos a 65° C.
- ◆ Al término de este tiempo, invertir 3 veces los tubos y se colocar en hielo por 5 minutos para precipitar los complejos
- ◆ Centrifugar a 6,000 g durante 5 minutos a 4° C.
- ◆ Transcurrido este tiempo remover el sobrenadante y la pastilla (complejos precipitados). Lavar con 1000 µl de solución C (Tris-HCl 20 mM, KCl 100 mM ajustar la solución a pH 7.5)
- ◆ Incubar a 65° C por 10 minutos
- ◆ Invertir los tubos 3 veces y colocar en hielo por 5 minutos.
- ◆ Centrifugar a 6,000 rpm durante 5 minutos a 4° C.
- ◆ Remover el sobrenadante y agregar 500 µl de solución C
- ◆ Incubar a 65° C por 10 minutos
- ◆ Invertir los tubos 3 veces y colocar en hielo por 5 minutos
- ◆ Centrifugar a 6,000 g durante 5 minutos a 4° C.
- ◆ Remover el sobrenadante y agregar 150 µl de solución C
- ◆ Determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford y agregar 1872 U de DNAsa.
- ◆ Incubar por 1 hora a 37° C.

Inmunotransferencias

Las muestras (40 µg de proteína por carril) se separan vía SDS-PAGE con una cámara Mini-Protean II (BioRad) y posteriormente se transfieren a membranas de PVDF. El inmunoblott para Ub se realiza con anticuerpo monoclonal específico para la Ub (Zymed, Invitrogen) seguido de unión a anticuerpo secundario HRP conjugado (Santa Cruz). El revelado de las membranas se realiza utilizando diaminobenzidina. Las imágenes se escanean usando un Scanjet 3500 C (Hewlett Packard) con resolución máxima y se preparan con Adobe Photoshop 3.0.

Determinación de los DPC por fluorescencia

La determinación de los DPC se realiza indirectamente a través de la lectura de una muestra de DNA total (recolectada antes de la precipitación de los DPC) y otra del DNA que queda en el sobrenadante después de la precipitación de los DPC. El procedimiento consiste en tomar 10 µl de DNA y 100 µl de DNA complejado por separado a los cuales se les agrega una solución que contiene KCl 10 mM, Tris-HCl 20 mM y EDTA 10 mM para la realización del aforo. Se le agrega una solución de Hoechst, un fluorocromo análogo de timina que se intercala en el DNA. Se incuba en la oscuridad y finalmente se leen las muestras en un fluorómetro (filtro de emisión EM/D460/10 y excitación EX/D369/40 BIORAD). Las lecturas obtenidas se interpolan en una curva estandarizada preparada con DNA de timo de ternera para obtener la relación de % del DNA que formó parte de los DPC. Estas lecturas se analizan estadísticamente utilizando Microsoft Excel 2003.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con objeto de determinar la capacidad de ubiquitinación de los DPC inducidos in vivo por arsenito de sodio, ratones machos de la cepa BALB/c se trataron diariamente con 2.5 mg/Kg y 5.0 mg/Kg de peso durante 5 días por vía oral. Después de homogenización del tejido y precipitación de los DPC se evaluó la cantidad formada por medio de un fluorómetro y con la ayuda de una curva estándar se interpolaron las lecturas de las muestras.

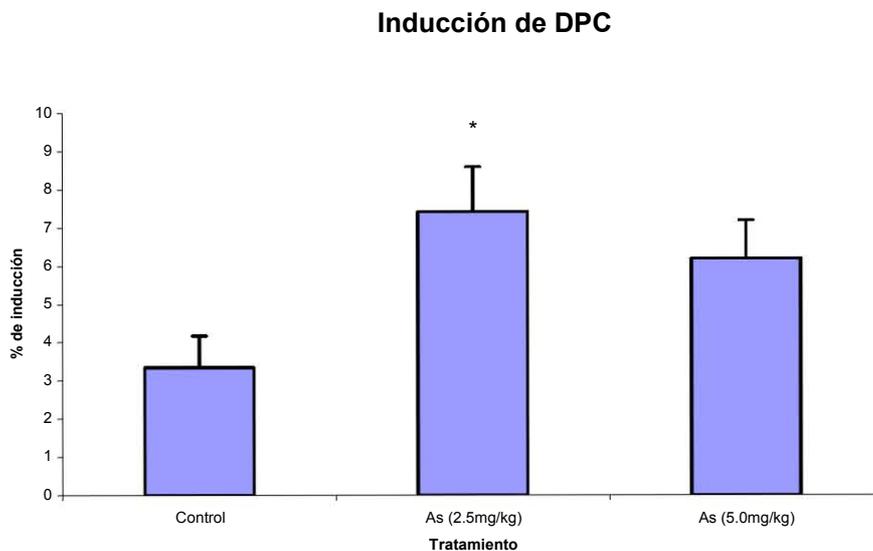
En la tabla 4 se puede observar la proporción de DPC inducidos después de la exposición.

Tabla 4. Promedios de la inducción de DPC en hígado de ratones macho.

TRATAMIENTO	% DE INDUCCIÓN DE DPC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Control (agua destilada)	3.34	0.84
As (2.5 mg/kg de peso)	7.42	1.18
As (5.0 mg/kg de peso)	6.19	1.00

El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas ANOVA y Tukey $P < 0.05$; $F = 71.33$

Podemos observar en la gráfica 1 que la mayor proporción de DPC se indujo con la dosis de 2.5 mg/Kg y resultó estadísticamente significativa respecto al control negativo. Estos resultados corroboran los trabajos previos realizados en el laboratorio de toxicología celular (Arteaga, 2003; Mendoza, 2005).



Gráfica 1. Porcentajes de inducción de DPC. Los DPC fueron inducidos por efecto del arsénico en el hígado de ratones control y tratados después de 5 días de exposición (El asterisco indica los datos estadísticamente significativos)

Es interesante observar que en la dosis mayor la proporción de DPC tiende a disminuir respecto al control y a la dosis menor. Esto sugiere la puesta en marcha de mecanismos de remoción, reparación celular o de respuesta al estrés que anteriormente han sido reportados por diversos autores (*Wei et al., 2003*).

Detección de proteínas ubiquitinadas por Western blott

La detección de las proteínas ubiquitinadas se realizó utilizando una alícuota de las muestras que contenían los DPC. Las proteínas se separaron mediante electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) y agentes desnaturizantes, una vez separadas las proteínas se transfirieron para detectarse por Western blott utilizando anticuerpos monoclonales anti-ubiquitina.

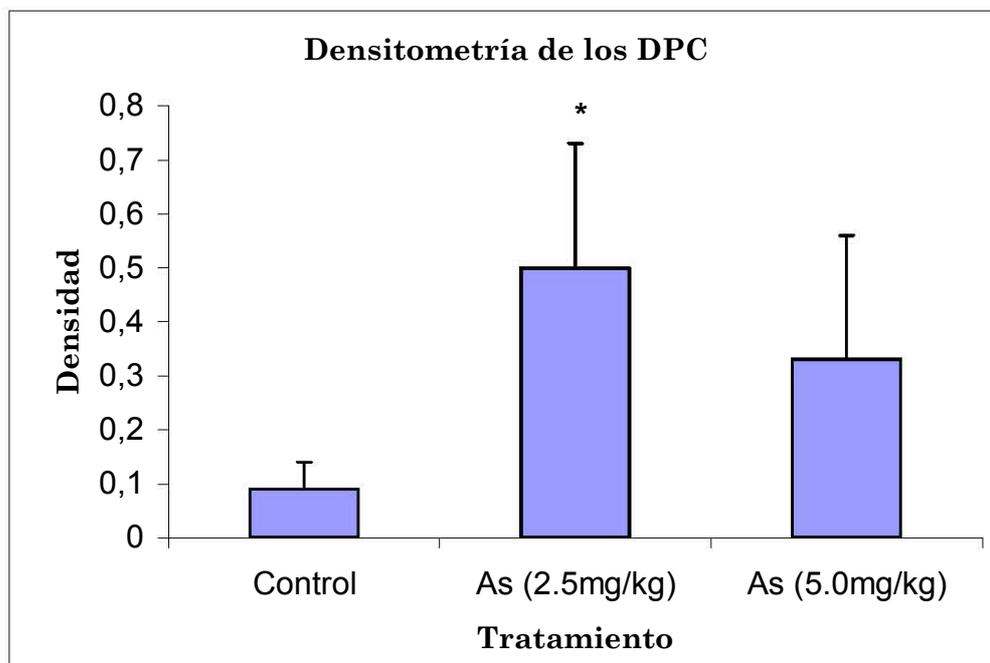
A continuación se muestran las densidades relativas en promedio de las inmunotransferencias en las que se localizaron proteínas entrecruzadas

ubiquitinadas (P1-P4) y que fueron analizadas utilizando el sistema Gel logic 100 de KODAK.

Tabla 5. Densidades ópticas relativas de las proteínas detectadas. La detección se realizó por Western blott en homogenados de hígado de ratones macho. N= 4 experimentos

Tratamiento	Promedio de las unidades relativas de densidad			Promedio de medias
	P1 P4	P2	P3	
Control	0.0761 0.1464	0.0445	0.1084	0.093
As (2.5 mg/Kg de peso)	0.6439 0.3561			0.5
As (5.0 mg/Kg de peso)	0.3333 0.4922	0.1744		0.33

El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas ANOVA y Tukey $P < 0.05$; $F = 10.05$



Gráfica 2. Promedio de medias de las unidades relativas de densidad de los DPC de hígado de ratón. N= 4 experimentos. El asterisco indica los resultados significativos.

El peso molecular de las proteínas ubiquitinadas se calculó teniendo como referencia a la ovoalbúmina (45 KDa), los PM estimados se muestran a continuación.

Tabla 6. Proteínas detectadas por Western blott. La detección se realizó en homogenizados de hígado de ratones macho.

Tratamiento	Peso molecular estimado (KDa)			
	P1	P2	P3	P4
Control	42.7	35.2	25.5	10.8
As (2.5mg /kg de peso)	47.2			12.3
As (5.0mg /kg de peso)	47.6		21.9	10.4

El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas ANOVA y Tukey $P < 0.05$; $F = 0.016$

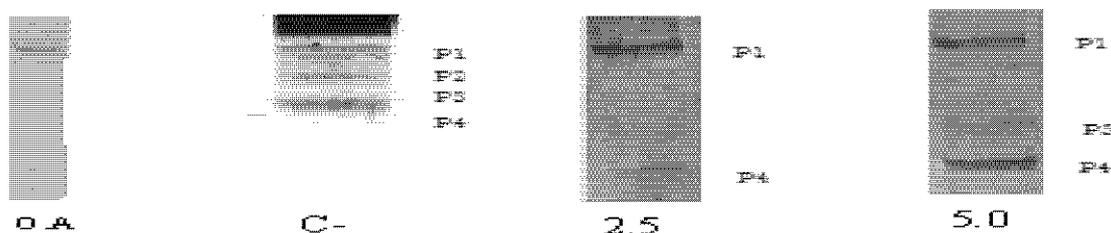


Fig. 7. Western blott representativo de los DPC ubiquitinados. Estos DPC fueron inducidos en hígado de ratón expuesto a arsenito de sodio.

Es importante hacer notar que en el análisis densitométrico hecho a las muestras de los DPC inducidos por arsénico en el hígado de los ratones tratados (Tabla 5) se observa que en el tratamiento de 2.5 mg/Kg de peso

corporal hay ausencia de las bandas 2 y 3, mientras que las densidades de las bandas 1 y 4 se ven incrementadas respecto al control mientras que en el tratamiento de 5.0 mg/Kg de peso corporal se observa la presencia de las bandas 1, 3 y 4 con la disminución de la densidad de la banda 1 y el incremento de la densidad de la banda 4.

Las proteínas entrecruzadas y ubiquitinadas se compararon con la distancia de migración de una proteína muy bien caracterizada y de PM conocido como lo es la ovoalbúmina.

Se puede observar que en las muestras control se evidencia la presencia de 4 proteínas (Tabla 6 y Figura 7) cuyos pesos moleculares oscilan entre los 42.7KDa (peso estimado) y los 10.8 KDa pasando por una proteína de 35.2 y una de 25.5. En cuanto al tratamiento de 2.5 mg/Kg de peso se observa la presencia de una proteína de 47.2 KDa y una de 12.3, mientras que en el tratamiento de 5.0 mg/Kg de peso se observa la presencia de una proteína de 47.6 KDa, una segunda de 21.9 y una tercera de 10.4 KDa este comportamiento puede ser atribuido a la presencia de la ubiquitina en los DPC.

Existen estudios en los cuales se ha propuesto a los entrecruzamientos DNA-proteínas (DPC) como biomarcadores de exposición a agentes carcinógenos debido a que incrementan su cantidad en sistemas biológicos como resultado de la exposición a una gran variedad de agentes químicos y físicos, muchos de ellos carcinógenos reconocidos. Los biomarcadores se usan: a) como medida de la actividad de un carcinógeno o sus metabolitos activos en un fluido corporal, b) para la determinación de la interacción de los productos (aductos) de un carcinógeno con el DNA o proteína; o c) para cuantificar algunos de los efectos tóxicos causados por los aductos (Minko y cols., 2002; Farmer, 2004).

El modo de acción de los carcinógenos involucra la interacción de una molécula electrofílica con un sitio nucleofílico en el DNA, esto produce un aducto, el cual si no es reparado puede provocar una mutación o alteración en la función de un gen (Fig.8). Los carcinógenos también pueden reaccionar

con otros sitios nucleofílicos intra- y extracelularmente (por ejemplo, proteínas, glutatión) (Goering, 1999).

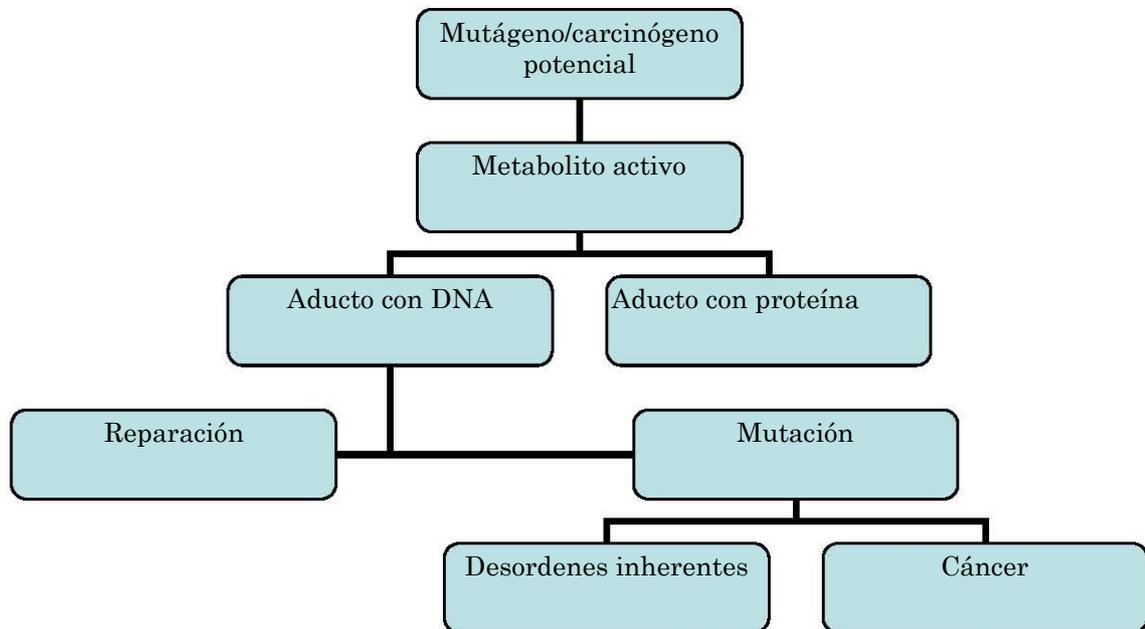


Fig. 8. *Modo de acción de agentes carcinógenos. Esto puede aplicarse a agentes como el arsénico, el formaldehído y el malonaldehído entre otros (Figura modificada de Farmer, 2004)*

El significado biológico de los DPCs en términos de genotoxicidad y citotoxicidad esta poco explorado por lo que su estudio ha sido motivo de este trabajo.

En estudios realizados previamente por nuestro grupo de trabajo utilizando modelos *in vitro* (cultivos de cortes de hígado de ratón) y en ratones BALB/c se ha observado la presencia temprana (a las 3 horas y 9 días de exposición) de los entrecruzamientos de DNA-proteínas inducidos por arsénico y flúor (Arteaga, 2003; Castro, 2003, Escárcega, 2004; López, 2004).

En el presente trabajo también fue posible observar una inducción significativa de los entrecruzamientos DNA-proteína en el hígado de ratones

macho de la cepa BALB/C por exposición al arsénico en diferentes dosis administrado por vía oral durante 5 días (Tabla 4).

En la gráfica 1 se observa un incremento en la formación de entrecruzamientos DNA-proteína en la dosis de 2.5 mg/Kg. de peso corporal. Es importante hacer notar que cuando la dosis se incrementa a 5.0 mg/Kg. de peso corporal se observa una disminución en el porcentaje de formación de dichos entrecruzamientos efecto que en estudios anteriores también se presentó. Estos resultados sugieren la remoción de los mismos o de su reparación ante una situación de estrés oxidativo producto del metabolismo del arsénico.

Se han sugerido múltiples rutas de reparación de este tipo de daño. Uno de los mecanismos propuestos de reparación del DNA es la reparación por escisión de nucleótidos (NER), este mecanismo es efectivo en la remoción de los DPCs inducidos por radiaciones ionizantes (Minko y cols., 2002).

Otro mecanismo propuesto recientemente es la reparación por hidrólisis espontánea. Este mecanismo fue detectado en células expuestas a formaldehído (FA), en dichas células se detectó que las estructuras que se entrecruzaban con el DNA eran histonas. Los cinco tipos de histonas son capaces de formar entrecruzamientos aunque las histonas H1 y H3 son más susceptibles. En el caso del FA la formación de entrecruzamientos de DNA-histonas inician con una rápida reacción del FA con las histonas seguido de conjugación con los grupos amino del DNA. Los grupos amino epsilon de la lisina de las histonas y los grupos amino exocíclicos de las bases adenosina/guanosina son los involucrados en la formación de los entrecruzamientos (Quiévryn, 2000; Voitkun, 1999).

El tercer mecanismo propuesto involucra a la ruta Ub-proteosoma. Quiévryn y Zhitkovich han demostrado que los DPCs inducidos por el formaldehído son removidos parcialmente por degradación proteolítica. Estas observaciones muestran que existe una disminución de los DPCs cuando las células son incubadas con lactacistina, un inhibidor específico de los proteosomas. Un estudio previo demostró que los complejos covalentes de

la topoisomerasa I y el DNA inducidos por camptotecina son ubiquitinados y posteriormente degradados proteolíticamente, este mecanismo puede aplicarse a otros tipos de DPCs como son los inducidos por arsénico (Barker, 2005; Quievryn, 2000).

Con este trabajo de tesis se conoció que diversas proteínas entrecruzadas con el DNA por efecto del arsénico están ubiquitinadas. Estos resultados son muy importantes ya que si consideramos que el sistema Ub-proteosoma es un mecanismo habitual que las células ponen en marcha con el objeto de mantener una homeostasis proteica de síntesis, función y estructura para desempeñar varios fenómenos celulares como la transducción de señales, comunicación celular y organización entre otros. Cuando estos mecanismos no se desarrollan de la mejor manera al presentarse alteraciones estructurales, de síntesis, reparación o expresión de macromoléculas como el DNA y las proteínas, la degradación de este daño está regulada por el sistema ubiquitina-proteosoma ya que evita la acumulación de proteínas aberrantes potencialmente tóxicas o dañinas en la célula.

En algunas enfermedades hepáticas es común la presencia de cúmulos proteicos llamados cuerpos de Mallory, estos cúmulos están constituidos de componentes fosforilados anormalmente, ubiquitinados y entrecruzados con proteínas como las hsp, citoqueratinas y otras proteínas relacionadas con el estrés oxidativo. Algunos estudios de espectrometría de masa muestran que los mayores componentes de dichos cúmulos son p62 y algunas citoqueratinas (Stumptner, 2002). El control de la destrucción de estas proteínas puede residir en el proteosoma así como en el proceso de la incorporación de las cadenas de la ubiquitina (Goldberg, 2001; Kirkpatrick, 2003).

Específicamente en el caso del arsénico, motivo de nuestro estudio, las citoqueratinas han demostrado ser un blanco celular del metal. En el 2000, Ramírez y cols. estudiaron la inducción de DPC en células hepáticas humanas utilizando para ello diferentes concentraciones de arsénico, debido

a la alta afinidad del arsénico a los grupos tiol se encontró que los entrecruzamientos del DNA se realizaron con proteínas de la matriz nuclear cuyo peso oscila entre ~ 39, 49 y 52 kDa. Un posterior análisis por inmunotinción y microscopía confocal reveló que dentro de las proteínas involucradas en los DPC las citoqueratinas participaban considerablemente (Ramírez y cols., 2000; Ramírez y cols., 2006).

Sería interesante conocer específicamente el tipo de proteínas entrecruzadas y ubiquitinadas en respuesta a la exposición a arsénico ya que en base a nuestros resultados y a los de trabajos previos (Ramírez et al. 2000) se ha observado que la variedad de proteínas entrecruzadas por efecto del arsénico *in vitro* e *in vivo* es amplia. *In vivo* existe una diversidad en cuanto a su cantidad y PM (Figura 7).

Esto puede deberse a que las células al encontrarse en situaciones de estrés ponen en marcha mecanismos de remoción o reparación de dicho daño y en base a nuestros resultados creemos que la ruta Ub-proteosoma es uno de ellos, lo que fomenta que las proteínas entrecruzadas y ubiquitinadas incrementen su cantidad (Gráfica 2).

Los mecanismos por los que el arsénico induce citotoxicidad y genotoxicidad asociadas con fenómenos de transformación celular y cáncer aún no se conocen completamente. Como ya se ha visto el arsenito (As (III)) causa inhibición enzimática, depleción de grupos sulfhidrilo, generación de especies reactivas de oxígeno, alteración en la expresión de los genes y cambios en la actividad de las cascadas de transducción de señales. Existe evidencia de que los arsenicales inorgánicos estimulan la cascada de proteínas activadas por mitógeno (MAPK) además de activar factores de transcripción, entre ellos el AP-1.

Para finalizar, es importante resaltar que los resultados aquí expuestos nos permiten evidenciar que el tratamiento con arsénico durante 5 días de ratones macho de la cepa BALB/c por vía oral a diferentes dosis provoca un incremento significativo en la cantidad de DPCs formados y que algunos de los DPC inducidos contienen proteínas ubiquitinadas lo que pudiera estar

relacionado con el comienzo de la activación de mecanismos de reparación no lisosomales en el hígado de ratones expuestos al arsenito.

Sin duda los reportes muestran que existen diferentes tipos de proteínas celulares capaces de ver afectada su función, estructura, así como los mecanismos de regulación celular. Por lo que consideramos que el estudio de las proteínas asociadas aun tipo de daño celular como los DPC y que ponen en riesgo su función, estructura y organización en respuesta a la exposición de agentes tóxicos es importante ya que podemos conocer la manera en que la célula es capaz de remover el daño por mecanismos indispensables en la homeostasis proteica como el sistema ubiquitina-proteosoma.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos y al análisis efectuado se puede concluir que:

1. El arsenito de sodio [As (III)] en concentraciones de 2.5 mg/kg de peso corporal y 5.0 mg/kg de peso corporal tiene la capacidad de inducir la formación de entrecruzamientos DNA-proteína en un sistema in vivo en el hígado de ratones de la cepa BALB/c, observándose un efecto independiente de las dosis de tratamiento ya que la concentración de 2.5 mg/Kg. de peso presenta una mayor capacidad de inducción.
2. Es posible evidenciar que algunos de los DPC inducidos in vivo por arsénico en diferentes dosis contienen proteínas ubiquitinadas.
3. Es posible evidenciar que el arsénico afecta el patrón de ubiquitinación de las proteínas presentes en los DPC inducidos por diferentes dosis de arsénico.

PERSPECTIVAS

En nuestro equipo de trabajo el uso de sistemas de cultivo in vivo en hígado de ratones de la cepa BALB/c nos ha permitido corroborar la capacidad inductora del arsénico para la formación de DPC, no obstante aún hay un largo camino por recorrer para poder entender los mecanismos celulares involucrados en el manejo del arsénico por lo cual podemos plantearnos las siguientes preguntas:

∞ ¿ De que manera se regulan los conjugados de Ub-proteína?

Existen algunas evidencias que indican que dichos conjugados obedecen a un fino mecanismo de balance que oscila entre la ubiquitinación y la deubiquitinación. Kirkpatrick y colaboradores argumentan que el As (III) afecta los procesos de ubiquitinación de las proteínas después de que ocurre la conjugación.

∞ ¿ Qué tipo de proteínas forman a los DPC?

Ramírez y cols., 2000, han mostrado evidencias de que algunas de las proteínas presentes en los conjugados de proteínas y DNA son la tubulina y unas pequeñas estructuras de la matriz nuclear llamadas citoqueratinas. Estas estructuras se han encontrado en algunos desordenes de los epitelios ocasionados por exposición al arsénico. En particular han estudiado al par de citoqueratinas 8/18 que se ven involucradas en el desorden denominado enfermedad hepática criptogénica. En el 2005, Barker propone que además de las mencionadas por Ramírez (Ramírez y cols., 2000) se pueden ver involucradas otras proteínas como la actina, los aminoglicosidos, las histonas, la proteína reguladora de glucosa y el receptor de estrógenos entre otros (Barker y cols., 2005).

∞ ¿Es posible que en un futuro se pueda controlar los blancos para la ubiquitina o las proteínas ubiquitinadas?

El año pasado, Iwaya y cols., 2005 manifiestan que es posible una terapia que controle los blancos a los cuales debe unirse la ubiquitina con lo cual se reduciría el potencial maligno de las células cancerosas. Una posible explicación del mecanismo de dicha terapia es que la inhibición de la actividad del proteosoma es reversible con lo cual se controlan algunos de los efectos de una ubiquitinación anormal que pueda causar el desarrollo o el mantenimiento del fenotipo canceroso.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

APL: leucemia promielocítica aguda

As: Arsénico

As³⁺: Arsénico trivalente

AsH₃: Hidruro de arsénico

ATP: Trifosfato de adenosina

BS: Síndrome de Bloom

CCA; Arsenato de cromo y cobre

CK: Citoqueratina

DSB: Ruptura en cadenas dobles

DMA: Ácido dimetil arsénico

DNA: Deoxyribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico

DNAsa: Enzima que corta al DNA

DPC: DNA protein cross linking, entrecruzamientos DNA-proteína

FA: Anemia de Fanconi

GTP: Trifosfato de guanosina

HCl: Ácido clorhídrico

HOCl: Ácido hipocloroso

iAs: Arsénico inorgánico

KCl: Cloruro de potasio

mg: Miligramo

μM: Micromolar

MMA: Ácido monometil arsénico

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NER: Reparación por escisión de nucleótido

NK-κB: Factor kappa de los natural killer

PBS: Buffer de fosfatos

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PK: Proteinasa K

PMSF: Fluoruro de fenil metano sulfonilo

ROS: Reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno

SAM: S-adenosil metionina

SDS-KCl: Complejo de dodecil sulfato de sodio y cloruro de potasio

Ub: Ubiquitina

UV: Luz ultravioleta

XP: Xeroderma pigmentosum

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aberraciones cromosómicas: Cambios estructurales fácilmente observables en la metafase del ciclo celular y que tienen su origen en rupturas (procesos clastogénicos) de las cadenas de DNA no reparadas o mal reparadas.

Ácido lipoico: Este ácido permite la protección del organismo contra algunas especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres responsables del envejecimiento prematuro y fotoenvejecimiento.

Aducto: Complejo formado entre la molécula de DNA y un compuesto químico ajeno a la estructura polinucleotídica de la doble hélice a través de un enlace covalente causando distorsiones genéticas.

ATP: Trifosfato de adenosina. Molécula que se encuentra en todos los seres vivos y constituye la fuente principal de energía utilizable por las células para realizar sus actividades.

Biomarcador: Sustancia que puede ser metabolito del organismo, sustancias xenobióticas u otro indicador que puede ser medido como consecuencia de la exposición a una sustancia tóxica por efecto de la misma o la susceptibilidad a otro tipo de daño al organismo.

Cáncer: Crecimiento anormal, desordenado y potencialmente ilimitado de las células de un tejido o un órgano.

Carcinógeno: Define a cualquier agente químico, biológico o físico que puede en potencia inducir cáncer. El término aplica con más frecuencia a sustancias químicas introducidas en el medio ambiente por la actividad humana.

Ciclinas: Son una clase de proteínas que se encuentran en las células eucariotas que se sintetizan y degradan en sincronía con el ciclo celular y regulan el paso a través de las fases del ciclo.

Cinasas: Son enzimas cuya función es la de activar determinadas proteínas por fosforilación. A su vez, las concentraciones de estas enzimas se encuentran reguladas por otras proteínas, llamadas ciclinas.

Citotoxicidad: Efecto tóxico manifestado como muerte celular.

Daño genético: Pérdida, ganancia o reordenación del material hereditario ocasionado por la interacción de un agente genotóxico con dicho material.

Desmosomas: Son parches gruesos en la región de la membrana celular entre dos células. Contienen proteínas especializadas como la queratina, desmoplaquina y filamentos de desmina que incrementan la rigidez de los tejidos.

Entrecruzamiento: Proceso de recombinación que implica la rotura de la doble hélice de DNA de dos cromátidas no hermanas y el intercambio recíproco de los fragmentos. Los entrecruzamientos entre cadenas de DNA son las lesiones citotóxicas más relevantes producidas por muchos agentes quimioterapéuticos.

Genoma. Es la totalidad de la información genética presente en un organismo.

GTP. Trifosfato de guanosina. Cuando estas moléculas se unen a las células se activa la transducción o conversión de un mensaje exterior en un mensaje interior que desencadena una actividad química dentro de la célula.

HOCl. Ácido hipocloroso. Es generado por la mieloperoxidasa liberada por los macrófagos activados. Contribuye a la disfunción vascular y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad.

Mitocondria. Diminuta estructura celular de doble membrana responsable de la conversión de nutrientes en energía.

NADH. Dinucleótido de nicotinamida y adenina. Es un cofactor intermediario el cual al ser oxidado bajo condiciones aerobias rinde seis moléculas de ATP.

NER. Reparación por excisión de nucleótidos. Es un mecanismo que permite tanto la reparación de fotoproductos irradiados con radiación UV como las lesiones al DNA provocadas por sustancias químicas nocivas.

PDH. Piruvato deshidrogenasa. Es un complejo mitocondrial formado por tres enzimas (E1, E2 y E3). Este complejo cataliza la reacción de conversión del piruvato a acetil CoA.

Proteasas. Son enzimas proteolíticas que catalizan las uniones peptídicas en las proteínas.

Proteosoma. Es un complejo proteico encargado de realizar la degradación proteica llamada proteólisis de aquellas proteínas que han sido marcadas por el sistema dependiente de ubiquitina.

Protoplasma. Se refiere al espacio interior de las células delimitado por la membrana.

SAM. S-adenosil metionina. Es un importante agente biológico que actúa como donante de metilos en la mayoría de las reacciones biológicas de metilación y proporciona el grupo propilamino para la síntesis de poliaminas.

Toxicidad: Capacidad de una sustancia de producir efectos adversos con base en datos verificables a partir de pruebas en animales o estudios epidemiológicos.

Topoisomerasa. Enzima esencial para la replicación

Transición. Consiste en el cambio de una base purica por otra purica y simultáneamente de una pirimidica por otra pirimidica.

Transversión. Es el cambio de una base purica por una pirimidica y a la inversa.

Tubulina. Proteína constituyente de los microtubulos que dan soporte a las estructuras celulares como cilios y flagelos.

Ubiquitina. Es una proteína que se localiza en todas las células. Su principal función es la de marcar otras proteínas para su destrucción.

Xenobiótico. Es todo compuesto químico que no forma parte de la composición de los organismos vivos. Suelen ser contaminantes de determinados ambientes y generalmente ejercen algún tipo de efectos sobre los seres vivos, aunque no tengan toxicidad aguda.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, J. 2003. The proteasome: structure, function and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews*, 29 (I), 3-9.
- ALBORES, A., Cebrian, M.E., Tellez, I., Valdez, B. 1979. *Boletín sanitario panamericano* 86, 196.
- APOSHIAN, H.V., 1997. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 397-419.
- APOSHIAN, H.V., Gurzau, E.S., Le, X.C., Gurzau, A., Healy, S.M., Lu, X., Ma, M., Zakharyan, R.A., 2000. Occurrence of monomethyl arsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 693-697.
- APOSHIAN, H.V., Zakharyan R.A., Avram M.D., Sampayo-Reyes, A., Wollenberg M.L. 2004. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 90, 327-335.
- ARTEAGA, L.S. 2003. Estudio de la capacidad inductora in vivo de aductos ADN-proteínas por efecto del arsénico. Tesis de licenciatura QFB, FESC 1, UNAM, 38-58.
- BALLANTYNE, B. General and applied toxicology, second edition, vol 3. Macmillan reference, Oxford, 1999, 2050-2055.

- BASU, A., Mahata, J., Gupta S., Giri, A.K.2001. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen arsenic: a review. Mutation research/reviews in mutation research, 488(2), 171-194.
- BREDFELDT, T.G., Kopplin, M.J., Gandolfi, A.J. 2004. Effects of arsenite on UROtsa cells: low-level arsenite causes accumulation of ubiquitinated proteins that is enhanced by reduction in cellular glutathione levels. Toxicology and Applied Pharmacology198, 412-418.
- CADWELL, K., Coscoy, L. 2005. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. Science 309, 127-130.
- CALDERON, R.L. 2000. The epidemiology of chemical contaminants of drinking water. Food and chemical toxicology 38, 513-520.
- CARRARD, G., Dieu, M., Raes, M., Toussaint, O., Friguet, B. 2003. Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35, 728-739.
- CASTRO, B.V. 2003. Inducción de aductos AND-proteínas en rebanadas de hígado de ratón por efecto del arsénico. Tesis de licenciatura QFB, FESC 1, UNAM. 41-52.
- CORDOBA, D.P. Toxicología. Ed. El manual moderno, Colombia, 2001.
- DEL RAZO, L.M., Quintanilla-Vega,B., Brambila-Colombres, E. , Calderón-Aranda, E.S.,Manno, M., Albores,A. 2001. Stress

proteins induced by arsenic. *Toxicol. And Applied Pharmacology* 177, 132-148.

- ESCARCEGA, R.L., 2004. Estudio de los efectos tóxicos de arsénico y flúor sobre la formación de aductos ADN-proteínas en el sistema de cultivos de cortes de hígado de ratón BALB/c. Tesis de licenciatura QFB, FESC 1, UNAM
- FARMER, P.B. 2004. DNA and protein adducts as marker of genotoxicity. *Toxicology Letters* 149, 3-9.
- FUCHS, E. 1994. Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength. *The Journal of Cell Biology* 125 (3), 511-516.
- FUCHS, E., Webel, K. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function ad disease. *Ann. Rev. Biochemical* 63, 345-382.
- GAO, M., Karin, M. 2005. Regulating the regulators: control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Molecular Cell* 19, 581-593.
- GLICKMAN, M.H., Ciechanover, A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373-428.
- GLICKMAN, M.H., Raveh, D. 2005. Proteasome plasticity. *FEBS Letters* 10, 1-9.

- GOERING, P.L., Aposhian, H.V., Mass, M.J., Cebrián, M., Beck, B.D., Waalkes, M.P.1999. The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicological Sciences* 49, 5-14.
- GOLDBERG, A.F., Elledge, S.J., Harper, J.W. 2001. Proteosomas. *Investigación y Ciencia*. Marzo, 22-27.
- HARADA, M., Kumemura, H., Omary, M.B., Kawaguchi, T., Maeyama, N., Hanada, S., Taniguchi, E., Koga, H., Suganuma, T., Ueno, T., Sata, M.2003. Proteasome inhibition induces inclusion bodies associated with intermediate filaments and fragmentation of the Golgi apparatus. *Experimental Cell Research* 288, 60-69
- HARTWING, A., Blessing, H., Schwerdtle, 2003. Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. *Toxicol.* 193, 161-169.
- HUGHES, M.F. 2002. Arsenic toxicity and potencial mechanisms of action. *Toxicol. Letters* 133, 1-16.
- IWAYA, K. Mukai, K. 2005. Accumulation of ubiquitin-conjugated cytokeratin fragments in tumor cells. *Seminars in Cancer Biology* 15, 309-318.
- JANSE, D.M., Crosas, B., Finley, D., Church, G.M. 2004. Localization to the proteasome is sufficient for degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (20), 21415-21420.
- KAISER, P., Huang, L. 2005. Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biology* 6(10), 233.1-233.8.

- KIM, R., Emi, M., Tanabe, K., Murakami, S. 2005. Role of the unfolded protein response in cell death. Apoptosis.
- LOPEZ, M.A. 2004. Inducción de aductos AND-proteínas por Monometil arsénico (MMA) en cultivos de cortes de hígado. FESC 1. UNAM
- NAKAMICHI, I., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I. 2002. Formation of Mallory body-like inclusions and cell death induced by deregulated expression of keratin 18. *Molecular Biology of the Cell* 13, 3441-3451.
- MANAHAN, S.E. Toxicological chemistry, second edition, Lewis publishers, Inc., 2003.
- MILLER, W.H, Jr., Schipper, H.M., Lee, S.J., Singer, J., Waxman, S. 2002. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *J. Biol. Chem.* 275, 11414-11419.
- MINKO, I.G., Zou, Y. 2002. Incision of DNA-Protein Cross-links by UvrABC Nuclease Suggest a Potential Repair Pathway Involving Nucleotide Excision Repair .*PNAS* 99, 1905-1909.
- OMARY, M.B., Ku, N.O., Toivola, D.M.2002. Keratins guardians of the liver. *Hepatology* 35(2), 251-257.
- PETRICK, J.S., Jagadish, B., Mash, E.A., Aposhian, H.V., 2001. Monomethylarsonous acid (MMA (III)) and arsenite: LD (50) in hamster and in vitro inhibition of piruvate dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 651-656.

- QUIEVRYN, G., Zhitkovich, A. 2000. Loss of DNA-protein crosslinking from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis* 21(8), 1573-1580.
- RADABAUGH, T.R., Sampayo-Reyes, A., Zakharyan, R.A., Aposhian, H.V., 2002. Arsenate reductase II. Purine nucleoside phosphorylase in the presence of dihydrolipoic acid is a route for reduction of arsenate to arsenite in mammalian systems. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 692-698.
- RAMAEKERS, F.C.S., Bosman, F.T. 2004. The cytoskeleton and disease. *Journal of pathology* 204, 351-354.
- RAMIREZ, P., Del Razo, L.M., Gutierrez-Ruíz, M.C., Gonsebatt, M.E. 2000. Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expresión in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis* 21(4), 701-706.
- ROCKEL, T.D., Stuhlmann, D., Mikecz, a. 2005. Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus. *The Journal of Cell Science* 118, 5231-5242.
- RODRIGUEZ, V.M, Jiménez-Capoeville, M.E., Giordano, M. 2003. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol. Letters* 1455, 1-18.
- ROSSMAN, T.G., Uddin, A.N., Bums, F.J. 2004. Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, 198, 394-404.

- SALEHA, B.B., Danadevi, K., Jamil, K. Ahuja, Y.R., Visweswara, R.K. 2001. In vivo genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay. *Toxicology* 162, 171-177.
- SMITH, A.H., 2000. The arsenic challenge bulletin of United Nations World Health Organization, 24-29.
- STUMPTNER, C., Fuchsbichler, A., Heid, H., Zatloukal, K., Denk, H. 2002. Mallory body –a disease- associated type of sequestosome. *Hepatology* 35(5), 1053-1062
- STYBLO, M., Shan,L., J.T.D. 2001. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic (review). *Toxicol. and Applied Pharmacology* 176,124-144.
- TANAHASHI, N., Kawahara, H., Murakami, Y., Tanaka, K. 1999. The proteasome-dependent proteolytic system. *Molecular Biology Reports* 26, 3-9.
- TANAKA, K. 1998. Molecular biology of the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247, 537-541.
- THOMAS, D. J., Styblo, M., Shan L. 2001. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* 176, 127-144.
- THOMAS, D.J., Waters, S.B., Styblo, M. 2004. Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol. and Applied Pharmacology* 198, 319-326.

- TSENG, C.H. 2004. The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicol. and Applied Pharmacology* 197, 67-83.
- VOITKUN, V., Zhitkovich, A. 1999. Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. *Mutation Research* 424, 97-106
- WINDOFFER, R. 2004. Phrenic pathology in arsenic poisoning. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5), 2436-2448.
- WINDOFFER, R., Wöll, S., Strnad, P., Leube, R.E. 2004. Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Molecular Biology of the Cell* 15(5), 2436-2448.
- WOLF, D.H., Hilt, W. 2004. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1695, 19-31.
- YOSHIDA, t., Yamauchi, H., Fan, S.G., 2004. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol. and Applied Pharmacology* 198,243-252.

Páginas consultadas en Internet

- ◆ www.ehponline.org/members/1994/suppl-3/285-288kato/kato
- ◆ www.pharmacy.umn.edu/faculty
- ◆ www.ehp.niehs.nih.gov/members/2002/suppl-5/753-756bau/bau-full.html
- ◆ <http://enciclopedia.us.es/index.php/Ars%E9nico>
- ◆ <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/As.htm>
- ◆ www.encuentros.uma.es/encuentros52/proteolisis.html