



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**ALTERACIONES EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR A NIVEL TRANSCRIPCIONAL
POR EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL ARSENITO DE SODIO EN LA LÍNEA
CELULAR C6 (GLIOMA).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA**

P R E S E N T A:

LETICIA RAMÍREZ MARTÍNEZ

ASESORAS: DRA. ESTHER IVONNE LÓPEZ-BAYGHEN PATIÑO
DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**El presente trabajo se realizó en el
Departamento de Genética y Biología
Molecular de la Unidad Zacatenco del
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional,
bajo la dirección de la Dra. Esther López-Bayghen Patiño.**

**Este trabajo fue financiado en parte gracias a los apoyos otorgados por
CONACyT a la Dra. Esther López-Bayghen, proyecto 50414**

AGRADECIMIENTOS

Todos los triunfos nacen cuando nos atrevemos a comenzar....

Gracias a Dios por permitirme concluir una etapa más en mi vida, por llenarme de bendiciones y darme a las personas correctas: "MIS PADRES", que día a día se preocupan por mi bienestar.

A mis padres, por apoyarme en cumplir esta meta, dándome sabios consejos que impulsaron mi crecimiento como persona. En sus sacrificios está mi triunfo y éste es especialmente suyo.

A mi familia, por su apoyo incondicional a Gadiel que siempre ha estado a mi lado en los momentos difíciles brindándome su apoyo y comprensión, quien siempre tuvo palabras de aliento que me motivaron a luchar por cumplir mis metas.

A mis asesoras, Dra. Esther López-Bayghen por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por creer en mí, por la paciencia y todos sus consejos profesionales. Dra. Sandra Díaz por ser parte de mi formación profesional y sus consejos en la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, por sus buenos comentarios, consejos y una agradable estancia en el laboratorio: Jacqueline, Irma, Carla, Yaneth, Marisol, Crystelle, Balam, Gerardo y especialmente a Miriam quien me permitió formar parte de su trabajo. Día a día aprendí algo nuevo de ustedes.

A mis amigos, por ser parte de mi vida, compartir buenos y malos momentos, y por que con humildad y compromiso me brindaron su amistad; Diana, Elizabeth, Itzmel, Angélica, Dalila, Carmen, Claudia, Pilar, Daniela, Alejandro, Franchini, Héctor, Marco y todos aquellos que compartieron conmigo este sueño.

Gracias por su asesoría y apoyo técnico prestado para realizar este trabajo, a la Dra. Miriam Huerta y C. Gerardo Marmolejo.

Si valoras los pequeños logros, pronto alcanzarás grandes éxitos.

I. ÍNDICE

	Página
I. ÍNDICE	
1.1 Índice de Figuras	5
1.2 Índice de tablas	6
1.3 Abreviaturas	7
II. RESUMEN	8
III. INTRODUCCIÓN	
3.1 Arsénico: aspectos generales	
3.1.1 Propiedades físicas y químicas	10
3.1.2 Especies de arsénico	10
3.1.3 Fuentes de exposición a arsénico	12
3.2 Toxicocinética del arsénico	
3.2.1 Absorción	14
3.2.2 Distribución	14
3.2.3 Biotransformación	15
3.2.4 Eliminación	16
3.3 Toxicodinamia del arsénico	17
3.4 Intoxicación aguda por arsénico	19
3.5 Intoxicación crónica por arsénico	19
3.6 Sistema Nervioso Central (SNC) y arsénico	
3.6.1 La importancia de la glía en la regulación de la función neuronal	20
3.6.2 Efectos del arsénico en SNC	22
3.7 Ciclo celular.	
3.7.1 Fases del ciclo celular, regulación del ciclo celular y puntos de control	24
3.7.1.1 Proteínas que regulan las fases del ciclo celular: Ciclina D1	25

3.7.1.2	p53 y la respuesta al daño celular	31
IV.	JUSTIFICACIÓN	41
V.	OBJETIVOS	42
VI.	HIPÓTESIS	42
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
VIII.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	48
IX.	RESULTADOS	49
X.	DISCUSIÓN	57
XI.	CONCLUSIÓN	62
XII.	BIBLIOGRAFÍA	63

1.1 ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Arsénico en el mundo	12
Figura 2. Vía de biotransformación del arsénico inorgánico	16
Figura 3. Genes blanco del arsénico	18
Figura 4. Comunicación neurona-glia	21
Figura 5. Eventos del ciclo celular en células eucariontes	25
Figura 6. Estructura del gen CCD1 de la proteína ciclina D1	27
Figura 7. Expresión de la ciclina D1	27
Figura 8. Modificaciones post-traduccionales de ciclina D1	29
Figura 9. Estructura de la proteína ciclina D1	30
Figura 10. Regulación del ciclo celular	32
Figura 11. Gen TP53	33
Figura 12. Estructura de la proteína p53	34
Figura 13. Región C-terminal	36
Figura 14. Región central	37
Figura 15. Región N-terminal	37
Figura 16. Vía de señalización de p53	40
Figura 17. Viabilidad de células C6 tratadas con arsenito de sodio	50
Figura 18. Arsenito de sodio disminuye proliferación celular	51
Figura 19. Arsenito de sodio produce arresto celular	52
Figura 20. Incremento de los niveles de la proteína p53 por el tratamiento de arsenito de sodio	53
Figura 21. Actividad de p53 como factor transcripcional	54
Figura 22. Efecto del arsenito de sodio sobre los niveles de mRNA de p21 ^{WAF1}	55
Figura 23. Arsenito de sodio disminuye los niveles de ciclina D1	56

1.2 ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Principales especies de arsénico inorgánico y orgánico	11
Tabla 2. Fuentes de contaminación de arsénico y concentraciones	13
Tabla 3. Fuentes antropogénicas del arsénico	14
Tabla 4. Mecanismos de acción del arsénico	17
Tabla 5. Efectos del arsénico después de una exposición crónica	20
Tabla 6. Efectos de arsénico sobre proliferación y viabilidad celular en SNC	24
Tabla 7. Principales ciclinas y Cdk que regulan el ciclo celular	26
Tabla 8. Factores de transcripción que regulan el promotor de ciclina D1	28

1.3 ABREVIATURAS

APL	Leucemia Promielocítica Aguda
ATP	Adenosín trifosfato
As	Arsénico
Bax	Bcl-2 asociada a proteína X
Bcl-2	Por sus siglas en inglés B-Cell Lymphoma 2
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GADD45	Por sus siglas en inglés Growth Arrest and DNA Damage 45 (gen del arresto del crecimiento y daño al DNA 45)
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GSH	Glutación reductasa
GSK3 β	Glucogeno sintasa cinasa 3 β
iAs	Arsénico inorgánico
MAPK	Cinasa activada por mitógenos
MDM2	Por sus siglas en inglés murine double minute-2 (Proteína murina doble 2)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-bromuro difeniltetrazolium
P53IGS	p53 Induced Genes
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDH	Piruvato deshidrogenasa
Ras	Sarcoma de Rous
Rb	Retinoblastoma
SAM	S-adenosilmetionina
SNC	Sistema Nervioso Central

II. RESUMEN

El arsénico es un metaloide presente en el agua de bebida de muchas zonas alrededor del mundo. En Bangladesh, India, Taiwán, México y algunos países de Asia, se exponen al arsénico entre 35 y 77 millones de personas, resultando en problemas de salud como cáncer de piel, diabetes y neurotoxicidad. Se sabe que este tóxico es capaz de cruzar la barrera placentaria y acumularse en el Sistema Nervioso Central (SNC), produciendo alteraciones en el comportamiento, aprendizaje y memoria. Aunque los mecanismos moleculares de la neurotoxicidad por arsénico son poco entendidos, se sabe que la acumulación de este metaloide y sus metabolitos en otros sistemas celulares facilita la formación de especies reactivas de oxígeno, fragmentación del DNA, formación de micronúcleos e intercambio de cromátides hermanas, lo que podría también suceder en SNC, afectando la plasticidad sináptica, la morfología dendrítica y la neurogénesis.

En respuesta al arsénico, se pueden activar o inhibir proteínas que controlan el ciclo celular como p53 y ciclina D1. En los últimos años se han realizado estudios toxicológicos del arsénico en sistemas neuronales; nuestro estudio pretende explorar los efectos de la exposición al arsenito de sodio (NaAsO_2) asociados a cambios a nivel transcripcional de genes relacionados con la proliferación celular en un modelo de células gliales (células de glioma C6). Además de las funciones de soporte, ahora se sabe que las células gliales influyen en la formación de la sinapsis participando también en los procesos de aprendizaje y memoria, regulando la función y la comunicación neuronal.

Las células C6 fueron expuestas a concentraciones crecientes de NaAsO_2 (0-10 μM) a fin de determinar una concentración óptima de trabajo respecto a efectos citotóxicos; a concentraciones 5 y 10 μM la viabilidad celular se afectó sólo un 20%. Analizamos el efecto a nivel de proliferación celular por el método de MTT, tras la exposición a 5 μM de NaAsO_2 ; los resultados mostraron que la tasa de proliferación de células tratadas disminuía más de 60% con respecto al control. Este comportamiento nos llevó a

analizar en primera instancia las fases del ciclo celular, observando que bajo el tratamiento con NaAsO₂ a 5 μM las células se arrestaban en la fase G1, mientras que a 10 μM las células iniciaban mecanismo de muerte celular. Analizamos los niveles de proteínas involucradas en el ciclo celular, como p53 y ciclina D1, por inmunodetección en fase sólida, interacción DNA-proteína por ensayos de retardamiento y análisis de la transcripción de un gen blanco de p53 como p21^{WAF1}.

El NaAsO₂ activó a p53, detectamos un aumento en los niveles la proteína, así como en su interacción con el DNA; sin embargo, p21^{WAF1}, el gen blanco de p53 no sufrió modificación en su transcripción; como consecuencia de la activación de p53, la proteína ciclina D1 disminuyó. En conclusión, el NaAsO₂ altera la proliferación de células C6 arrestándolas en la fase G1; activando la proteína p53 e inhibiendo a ciclina D1.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 ARSÉNICO: ASPECTOS GENERALES

3.1.1 Propiedades físicas y químicas

El Arsénico (As) está clasificado como un elemento de transición o metaloide que pertenece al grupo VA de la tabla periódica, su número atómico es 33 y su peso atómico 74.9 g/mol; sus principales estados de oxidación son ^{+/-} 3 y 5.

El As y sus compuestos orgánicos e inorgánicos generalmente son polvos blancos o incoloros que no se evaporan, no tienen olor y la mayoría de ellos no tienen un sabor especial, por tanto, no es posible identificarlos organolépticamente en las fuentes ambientales; al calentarse a presión atmosférica, sin oxígeno, se sublima y forma un gas amarillo, mientras que cuando se calienta en presencia de aire, el vapor se oxida produciéndose un humo blanco, característico del trióxido de As, el cual durante su oxidación produce un olor a ajo (Bucio Jurado 2005).

3.1.2 Especies de arsénico

El As es un elemento muy complejo que da lugar a múltiples compuestos en forma orgánica e inorgánica con estados de oxidación trivalentes y pentavalentes, siendo estas últimas las formas más estables en la naturaleza. Podemos encontrarlo combinado con otros elementos como oxígeno, cloro y azufre, de esta forma recibe el nombre de arsénico inorgánico (iAs), o bien con carbón e hidrógeno, que es conocido como arsénico orgánico.

Dentro de los tres grupos de arsénico, los más comunes o de mayor uso se citan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Principales especies de arsénico inorgánico y orgánico (Bucio Jurado 2005)

Especie	Nombre	Usos
<u>Inorgánico</u> ★ Especies trivalentes	Tricloruro de arsénico (AsCl ₃)	En la industria de la cerámica y fabricación de arsenicales.
	Trióxido de arsénico (As ₂ O ₃) o arsénico blanco	Purificación de gases sintéticos, conservación de cuero y madera, decoloración y refinamiento de vidrios o como reactivo en la flotación de minerales.
	Arsenito de sodio (NaAsO ₂)	
	Arsina (AsH ₃)	Formada al contacto del agua con arseniuros en escoria de las metalurgias e industria electrónica.
★ Especies pentavalentes	Ácido arsénico (H ₃ AsO ₄ •½ H ₂ O)	Fabricación de arsenatos, vidrio y tratamientos de madera.
	Pentóxido de arsénico (As ₂ O ₅)	Herbicidas, conservadores de madera y fabricación de vidrio.
<u>Orgánico</u> ★ Especies orgánicas	Ácido cacodílico (CH ₃ AsCOOH)	Herbicida y defoliante.
	Arsenocolina [(CH ₃) ₃ AsCH ₂ CH ₂ OH-X], Arsenobetaína [CH ₃ AsCH ₂ COO ⁻], Óxido de trimetilarsina [(CH ₃) ₃ As=O] y Arsenoazúcares	Presentes en alimentos de origen marino.
	Ácido metilarsénico (MMA ^{III y V}) y ácido dimetilarsénico (DMA ^{III y V}).	Resultado del metabolismo de iAs

3.1.3 Fuentes de exposición a arsénico

El iAs está ampliamente distribuido en el ambiente, puede encontrarse en el suelo, aire y especialmente en los nacimientos de agua de forma natural, además de otras fuentes antropogénicas (Hughes 2002). En dichas fuentes, podemos encontrar al As en forma libre, con mayor concentración en aguas calientes y subterráneas, o bien combinado con más de 150 minerales, siendo las principales fuentes de As la purificación de cobre, plomo, oro, plata, hierro, zinc y estaño (Bucio Jurado 2005).

El As puede adherirse a partículas en el agua o sedimentos en el fondo de lagos o ríos que podrían ser acarreados. Finalmente, la mayoría del As termina en los suelos o sedimentos. La contaminación del agua de bebida por As ocurre en gran parte del mundo, como Bangladesh, India, Taiwán, México y algunos países de Asia, donde se exponen entre 35 y 77 millones de personas (Vahidnia *et al.* 2007).

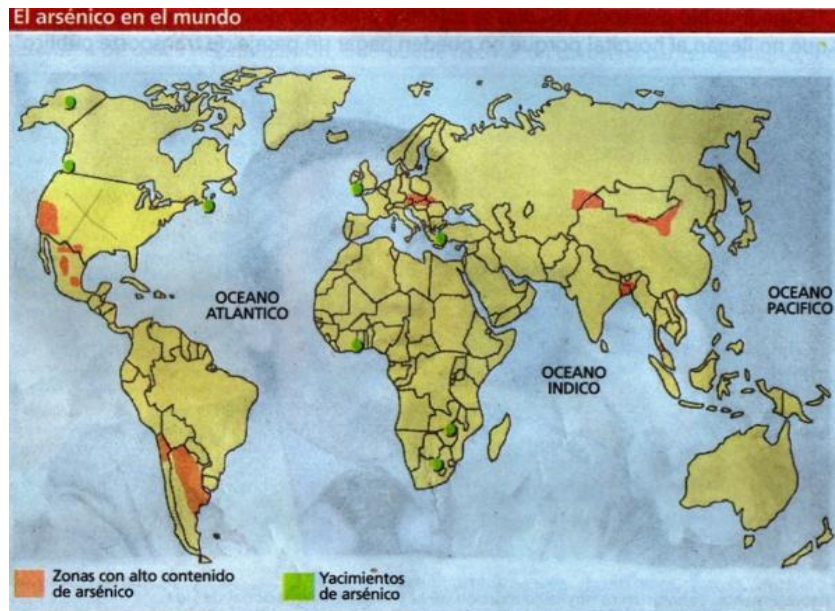


Figura 1: El arsénico en el mundo. Zonas con alto contenido de arsénico (Vahidnia *et al.* 2007).

Los peces y alimentos marinos son capaces de almacenar en sus tejidos compuestos del As en forma trimetilada orgánica, frecuentemente llamada As marino. Generalmente el iAs ingerido por estos organismos es biotransformado a compuestos orgánicos más

complejos considerados de baja toxicidad como la arsenobetaina (AsB), la arsenocolina (AsC) y arsenoazúcares, los cuales al ser ingeridos por los humanos, se absorben en un 70% sin biotransformarse en el tracto gastrointestinal y son excretados rápidamente en la orina. Por tanto la principal fuente de exposición no ocupacional a arsénico (25-50 µg/dL) es por los alimentos, agua y aire (Schulz *et al.* 2002). Una comparación de las concentraciones encontradas en diferentes fuentes y las concentraciones alcanzadas se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2. Fuentes de contaminación de arsénico y sus respectivas concentraciones.

Fuente	Concentraciones
Agua * As ^{III} y As ^V	Superficiales y subterráneas * 2 ppb Áreas mineras * 1000 ppb
Suelo * Erupciones volcánicas * Minerales en subsuelo	Intervalo de 1-40 ppm
Aire	Zonas no antropogénicas * 1-3 ng/m ³ Áreas urbanas * 30 ng/m ³ Zonas industriales * 100-300 ng/m ³
Alimentos	Especies marinas * >20 µg/g

Otras fuentes de exposición son las antropogénicas, de minerías, fundidoras o actividades de agricultura, siendo utilizado para aumentar la dureza y resistencia al calor, por ejemplo en aleaciones de plomo, fabricación de municiones y baterías polarizadas, así como el uso excesivo de pesticidas que contienen compuestos como el arsénico blanco en rodenticidas, ácido cacodílico en herbicidas, arsenito de sodio o

hexaflurato como insecticida, o bisdimetilditiocarbamato como fungicida (Rodriguez et al. 2001; Bucio Jurado 2005).

Tabla 3. Fuentes antropogénicas del arsénico (Bucio Jurado 2005).

Fuentes antropogénicas	
Minería	Refinación de cobre y plomo
Plantas eléctricas	Combustión de carbón
Aserraderos	Conservación de madera
Agricultura	Plaguicidas y herbicidas
Industria automotriz	Baterías
Medicina	Terapia en leucemias
Electrónica	Semiconductores y diodos emisores de luz

3.2 TOXICOCINÉTICA DEL ARSÉNICO

3.2.1 Absorción del arsénico

En los humanos y en la mayoría de las especies animales, la absorción del iAs es principalmente a través del tracto gastrointestinal (95%) cuando se administra en solución acuosa, también se puede absorber a través de tracto respiratorio (30%) dependiendo del tamaño de las partículas inhaladas y de la solubilidad del compuesto arsenical, siendo el iAs la partícula más pequeña (<10 μm) que se encuentra suspendida en el aire debido a las actividades antropogénicas. Otra vía que contribuye en menor proporción es la absorción a través de la piel, el contacto directo con el suelo (0.8%) y el agua (1.9%) (Wester et al. 1993; Wester et al. 2004).

3.2.2 Distribución del arsénico

El iAs y sus metabolitos se distribuyen a través de la sangre a los órganos y tejidos depositándose principalmente en hígado, riñón, corazón, pulmones, bazo y vejiga; en menor concentración en músculo y tejido nervioso. Existe una organoespecificidad de distribución del iAs y sus metabolitos que depende aparentemente del tipo de proteínas presentes en cada tejido.

Por su semejanza química con el fósforo, las formas pentavalentes de arsénico afectan procesos biológicos como la producción de ATP, síntesis de DNA y formación de huesos, depositándose en tejido esquelético, mientras que las formas trivalentes de arsénico se unen preferentemente a grupos sulfhidrilo de las proteínas como la queratina, depositándose preferentemente en cabello, piel y uñas (Miller et al. 2002).

3.2.3 Biotransformación del arsénico

En humanos así como en muchos mamíferos, el iAs se biotransforma en varios órganos y tejidos, siendo el hígado el órgano con mayor actividad metabólica, se propone que intervienen dos procesos:

- ★ Reacciones de reducción, que convierten al As^V en As^{III}
- ★ Reacciones de metilación oxidativa que convierten el iAs^{III} en especies metiladas^V.

La metilación del arsénico involucra primero una reducción del As^V a As^{III} , seguida de la adición del primer grupo metilo para obtener ácido monometilarsónico (MMA^V); después se postula una segunda reducción de MMA^V a MMA^{III} previa a la segunda metilación, produciéndose el ácido dimetilarsónico (DMA^V) el cual también sufre una reducción de DMA^V a DMA^{III} . Una tercera metilación puede ocurrir en microorganismos, generándose compuestos trimetilados como el óxido trimetilarsénico ($TMAO^V$), este último sólo se ha encontrado en algunos roedores y en bacterias (Vahidnia et al. 2007).

La reducción de los arsenicales está mediada por procesos enzimáticos y no enzimáticos, los primeros son controlados por dos enzimas reductasas: la As-reductasa y la purina-nucleótido-fosforilasa; y el glutatión reducido (GSH) es el responsable de la reducción no enzimática, en cambio, la metilación es un proceso enzimático mediado por una enzima dependiente de S-adenosilmetionina (SAM), la SAM-As-metiltransferasa (figura 2) (Loenen 2006).

Varios factores pueden influir en la capacidad de metilación del As, entre ellos, la dosis y tiempo de exposición, una dieta alta en metionina y proteínas y el probable polimorfismo genético de las enzimas responsables de la reducción y la metilación del

As. En individuos expuestos crónicamente a altas concentraciones de As se presenta un patrón de excreción urinaria de metabolitos de As modificado, incrementándose la cantidad de MMA y disminuyendo el contenido de DMA.

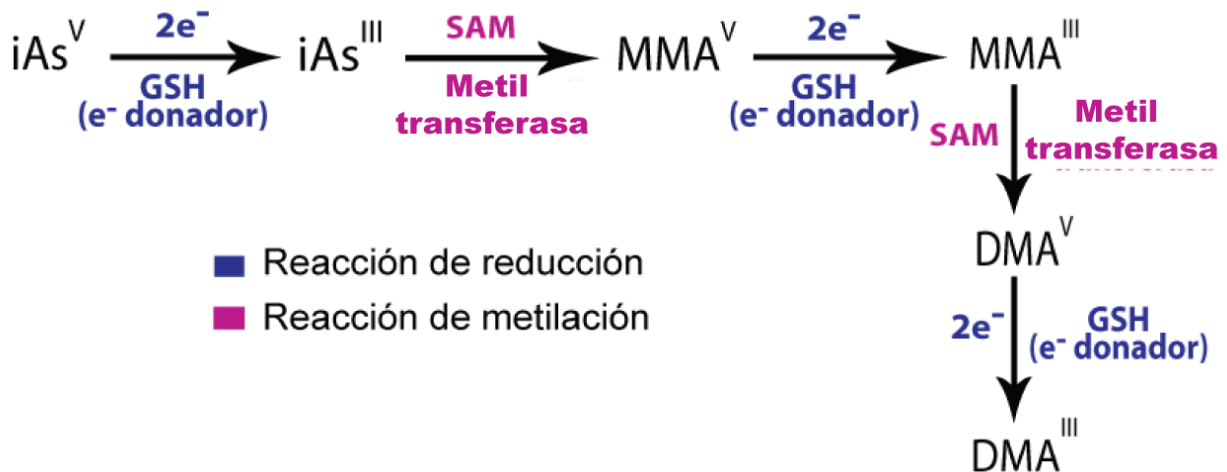


Figura 2. Vía de biotransformación del arsénico inorgánico. La biotransformación del arsénico se da principalmente por dos tipos de reacción: reducción y metilación (Vahidnia et al. 2007).

3.2.4 Eliminación

La excreción de las especies de As se realiza principalmente a través de orina, encontrándose en la orina humana cerca del 10-20% en forma de iAs, 10-15% en forma de MMA y el 60-80% de DMA. Estas fracciones de los compuestos metilados en la orina tienden a disminuir al aumentar la dosis de iAs (Vahter and Concha 2001).

La concentración de arsenicales en orina ha sido tradicionalmente aceptada como el mejor indicador de la exposición de As, debido a que la mayor ruta de eliminación de la mayoría de las especies de As es a través del riñón. La capacidad de metilación de iAs es evaluada generalmente a través de la medición de iAs, MMA y DMA en orina (Hughes 2002).

3.3 TOXICODINAMIA DEL ARSÉNICO

La toxicidad de los compuestos de As depende principalmente de su estado de oxidación y de su composición química. Los principales mecanismos de acción conocidos son genotoxicidad, daño al DNA (procesos de síntesis, segregación y reparación), estrés oxidativo, co-carcinogénesis, promoción tumoral, metilación de DNA, proliferación celular, diferenciación y apoptosis ilustrados en la figura 3.

Tabla 4. Mecanismos de acción del arsénico en Leucemia Promielocítica Aguda (APL) tomado de la revisión “Mecanismos de acción del trióxido de arsénico” (Miller *et al.* 2002)

Procesos afectados	Mecanismo de acción	Efecto Biológico
Inducción de apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> - Concentraciones elevadas de H₂O₂. - Incremento en la expresión de bax. - Inhibición de la actividad de NFκB. - Inhibe polimerización de tubulina GTP-inducida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Actividad de la cascada de Caspasas y liberación de citocromo C. - Fragmentación de DNA. - Inhibición de la actividad glutatión peroxidasa. - Desregulación de bcl-2. - Daño a proteínas de citoesqueleto.
Actividad antiproliferativa	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la actividad de STAT3. - Arresto celular en la fase G1. - Inducción de diferenciación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Activación de inhibidores de Cdk's p21 y p27. - Inducción de la expresión de marcadores de maduración.
Inhibición de angiogénesis	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición del factor de crecimiento vascular endotelial. 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la proliferación endotelial.

Sin embargo, se considera que todos los mecanismos mencionados anteriormente son consecuencia de la capacidad del arsénico para:

- Inducir micronúcleos, intercambio de cromatides hermanas, fragmentación de DNA y metilación del DNA (Kochhar *et al.* 1996; Namgung and Xia 2001; Sandoval *et al.* 2007).
- Generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Del Razo *et al.* 2001).
- Unirse covalentemente a grupos sulfhidrilo en su forma reducida, alterando enzimas necesarias para el metabolismo celular (Scott *et al.* 1993).

- Alterar mecanismos de reparación de DNA por escisión de nucleótidos (efecto sobre el complejo ERCC1) (Hartwig *et al.* 2003)
- Inhibir la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) por metabolitos trivalentes. (Schiller *et al.* 1977; Samikkannu *et al.* 2003)
- Afectar la producción de ATP; al inhibir PDH altera el ciclo del ácido cítrico.
- Inhibir glucosa-6-fosfato
- Alterar la capacidad de unión al DNA de factores de transcripción como son c-Jun y AP-1 (Huang *et al.* 2001; Hu *et al.* 2002)
- Inducir translocaciones de las isoformas de PKC (Cheung *et al.* 2007)
- Alterar expresión proteínas reguladoras del ciclo celular como c-Myc, E2F, p21^{WAF1} y p27 (Woo *et al.* 2006)
- Activar la expresión de proteínas para apoptosis como la cascada de caspasas o MAP cinasas (Namgung and Xia 2001; Cheung *et al.* 2007).

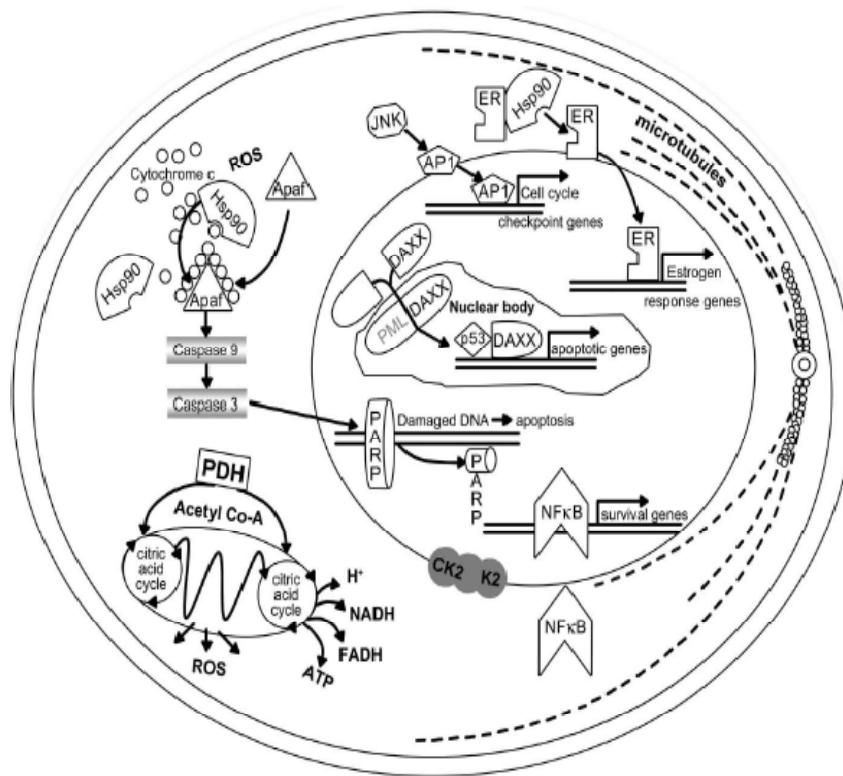


Figura 3. Genes blanco cuya expresión es modificada por arsénico. Las consecuencias de la exposición a arsénico resultan en arresto celular, diferenciación y apoptosis (**resumen de lo reportado en diversos tipos celulares**) (Miller *et al.* 2002).

3.4 INTOXICACIÓN AGUDA POR ARSÉNICO

La exposición aguda, se asocia primordialmente a una ingestión oral dependiente de la dosis y tiempo, causando alteraciones a nivel gastrointestinal como náuseas, vómito, diarrea y puede llegar a causar la muerte. Esto se debe a que el As causa parálisis de los capilares del tracto gastrointestinal, ocasionando la formación de vesículas en la mucosa intestinal, las cuales al romperse ocasionan daño en el tejido que se refleja en una disminución en el volumen sanguíneo, alteración de la presión y como consecuencia hay daño al corazón y cerebro. Por inhalación, la arsina a niveles bajos de 3 y 10 ppm tiene actividad hemolítica, por tanto, puede producir anemia hemolítica seguida de un daño renal (Bashir *et al.* 2006).

3.5 INTOXICACIÓN CRÓNICA POR ARSÉNICO

La principal vía de exposición es a través del consumo diario de arsénico en agua de bebida y a través del aire contaminado por actividades antropogénicas, sin embargo es importante considerar que se caracteriza por presentarse a dosis bajas y largos tiempos. De manera general los efectos se clasifican en carcinogénicos y no carcinogénicos.

Entre los efectos no carcinogénicos destacan los respiratorios, vasculares, hematológicos, inmunológicos y neurológicos (Schulz *et al.* 2002), y dentro de los carcinogénicos podemos citar el cáncer de piel, hígado, intestino y vejiga (Bashir *et al.* 2006). Algunos de los efectos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Efectos del arsénico después de una exposición crónica.

Sistema	Efecto
Nervioso	Neuropatía periférica y encefalopatía
Piel	Hiperqueratosis
Hepático	Hepatomegalia, cirrosis
Hematológico	Anemia
Endocrino	Diabetes
Renal	Degeneración de túbulo proximal

3.6 SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y ARSÉNICO

3.6.1 La importancia de la glía en la regulación de la función neuronal

El sistema nervioso está formado básicamente por dos clases de células: las neuronas y un conjunto de células de sostén llamadas glía. Las neuronas representan la unidad funcional del sistema nervioso y se caracterizan por su habilidad para responder a diversos estímulos, ya que son consideradas fundamentales para la comunicación cerebral (sinapsis).

La glía está formada por:

1. **Astroцитos:** sirven de sostén a las neuronas, regulan la señalización sináptica, están profusamente interconectados a través de las llamadas uniones comunicantes (gap junctions), las cuales permiten el intercambio de moléculas y iones al tener contacto con las paredes endoteliales de los vasos sanguíneos; son responsables de los movimientos del material entre el líquido cefalorraquídeo, sangre y neurona.
2. **Oligodendrocitos:** son células más pequeñas con pocos filamentos y un gran número de microtúbulos en el citoplasma; su principal función es envolver al axón con mielina.
3. **Microglía:** su principal función es mantener el medio ambiente iónico alrededor de las neuronas, así como de proteger al SNC por su capacidad de fagocitar.

4. Células del epéndimo: forman el epitelio que separa el SNC de los ventrículos (contienen líquido cefalorraquídeo) (Drucker 2005).

Aunque las células gliales superan en número a las neuronas, sólo se les atribuyó una labor de mantenimiento, una idea que ha cambiado drásticamente, ya que en los últimos años se ha demostrado que la glía influye en la formación de la sinapsis y ayuda a determinar qué conexiones neuronales se refuerzan o debilitan con el tiempo; tales cambios resultan esenciales para el aprendizaje y la memoria, y eventualmente en la recuperación de la plasticidad sináptica tras accidentes vasculares, por ejemplo. Por tal motivo nuestro interés se centra en el estudio del efecto de un agente tóxico como el arsénico en células gliales como astrocitos, que participan en el proceso de aprendizaje y memoria.

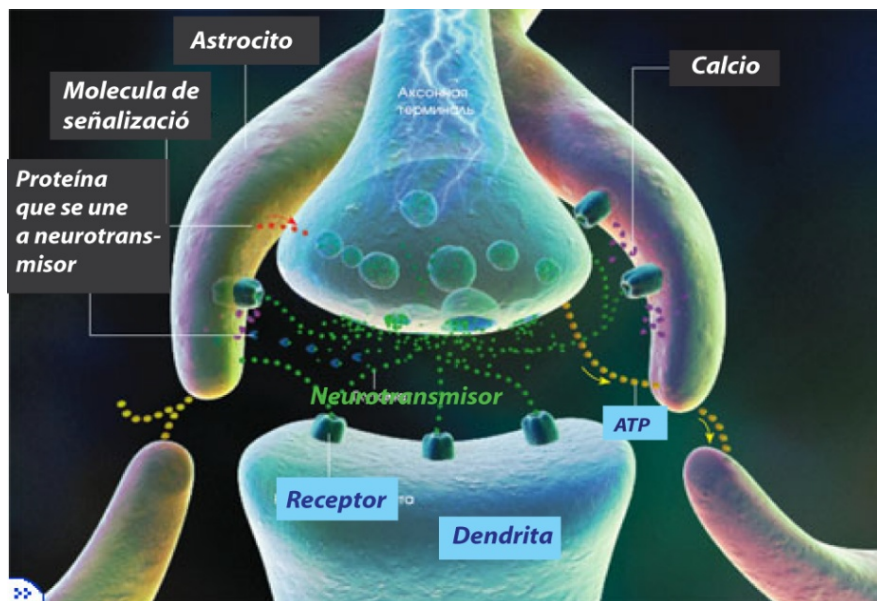


Figura 4. Comunicación neurona-glía. Los astrocitos regulan la señalización sináptica reforzándola, o bien debilitándola en función de calcio y ATP (Fields and Stevens-Graham 2002).

Las células gliales tienen receptores para muchos neurotransmisores que las neuronas emplean para su comunicación sináptica, además de canales iónicos (Stevens *et al.* 2002). El axón transmite una señal en una dendrita mediante descarga de un neurotransmisor y a su vez emite ATP; estos compuestos provocan luego una entrada de calcio en los astrocitos, estableciendo comunicación entre sí mediante la liberación de su propio ATP (Fields and Stevens-Graham 2002; Sul *et al.* 2004).

Los astrocitos se organizan en circuitos cerebrales restringidos que se coordinan con los circuitos neuronales, además pueden reforzar la señalización en la sinapsis mediante la secreción del mismo neurotransmisor que libera el axón. Entonces los astrocitos ayudan a activar neuronas cuyos axones están lejos, lo que a su vez contribuye a la liberación de neurotransmisores en sinapsis remotas.

Por lo tanto, los astrocitos pueden reforzar la señalización secretando el mismo neurotransmisor o bien debilitarla mediante la absorción del neurotransmisor o secreción de proteínas que se enlacen con el mismo, impidiendo así que alcance su blanco. Los astrocitos liberan además moléculas de señalización que provocan que el axón incremente o reduzca la cantidad de neurotransmisor liberado cuando vuelva a activarse. A través de este proceso se regularía la capacidad de las sinapsis remotas para acometer cambios de intensidad, que sabido es contribuye al mecanismo de aprendizaje y memoria (Fields and Stevens-Graham 2002).

3.6.2 Efectos del arsénico en SNC

La exposición a As se ha relacionado con severos problemas de salud como cáncer de piel, desórdenes vasculares, diabetes y desórdenes de SNC como encefalopatías. Algunos reportes muestran que el arsénico es capaz de cruzar la barrera placentaria y acumularse en el neuroepitelio embrionario, lo cual se asocia con defectos en el tubo neural, teratogénesis y abortos espontáneos (Chaîneau *et al.* 1990; Bansal *et al.* 1991; Wang *et al.* 2006).

Estudios de neurotoxicidad demuestran que la exposición a iAs produce delirio, alteraciones en la locomoción, memoria, cognición y déficit de aprendizaje (Rodríguez et al. 2001; Rodríguez et al. 2002; Schulz et al. 2002), asociados a modificaciones en el metabolismo de monoaminas, acetilcolina, glutamato y GABA (Itoh et al. 1990; Nagaraja and Desiraju 1994; Delgado et al. 2000).

A nivel estructural, el arsénico afecta el soma celular y lleva a una disfunción axonal que produce una desmielinización segmentaria. La diferencia en la aparición de la desmielinización o del daño axonal podría depender de la dosis y el tiempo de exposición del arsénico. Por tanto, una exposición aguda y masiva generalmente produce daño axonal; mientras que bajas y largas dosis producen desmielinización segmentaria (Berbel-Garcia *et al.* 2004).

Sin embargo, aunque los mecanismos moleculares de la neurotoxicidad por As son poco entendidos, se sabe que la acumulación de este metaloide y sus metabolitos en el SNC facilita la formación de ROS conduciendo a la neurotoxicidad. El sistema nervioso es especialmente susceptible a daño oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno, altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados y a su relativo bajo nivel de defensa contra toxicidad oxidativa. Por tanto, el estrés oxidativo puede ser un importante elemento en muchas disfunciones neuronales, afectando la plasticidad sináptica, morfología dendrítica y neurogénesis (Garcia-Chavez *et al.* 2006); otro efecto observado después de la exposición a arsénico es la fragmentación de DNA (Namgung and Xia 2001), lo cual desencadena vías de señalización que afectan procesos de proliferación y viabilidad celular en SNC (Tabla 6).

Tabla 6. Reportes de los efectos del arsénico sobre proliferación y viabilidad celular en SNC.

Efecto	Mecanismo	Referencia
Crecimiento celular	Arresto celular Arresto celular en S-G2/M con incremento en la expresión de ciclina B y Cdk1 (SH-SY5Y) Arresto celular G0/G1 y G2/M (U118)	(Zhao et al. 2002; Woo et al. 2006; Cheng et al. 2007; Cheung et al. 2007)
Viabilidad celular	Apoptosis - Activación de MAPcinastas (p38 y JNK1) - Activación de caspasa 3 (IMR-32 y SH-SY5Y) - Activación de la familia bcl2 y p53 (T98G y U118)	(Namgung and Xia 2001; Woo et al. 2006; Cheng et al. 2007; Cheung et al. 2007)

3.7 CICLO CELULAR

3.7.1 Fases del ciclo celular, regulación y puntos de control

En las células eucariontes, el ciclo celular está constituido por una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que llevan a la división celular, para generar dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la madre. El ciclo celular se divide en cuatro fases principales, mencionadas a continuación (Figura 5) (Alberts et al. 2004; Pierce 2005):

- **Fase G1** (Gap 1 o primer intervalo). Metabólicamente muy activa y de larga duración, donde las células crecen, sintetizan RNA y proteínas para la síntesis de DNA y replicación de cromosomas.
- **Fase S** (de síntesis). Se realiza la replicación de los cromosomas, un requisito esencial para que pueda producirse la división celular.
- **Fase G2** (Gap 2 o intervalo 2). Se dan los procesos bioquímicos que preparan a la célula para la división.
- **Fase M** (mitosis). Corresponde a la etapa de división celular, inicia con la condensación del material genético y en ella se llevan a cabo todos los cambios

estructurales que permiten distribuir en forma equitativa los componentes celulares a las células hijas.

- **Fase G₀** (Intervalo 0). Estadio de reposo donde las células pueden iniciar un proceso de diferenciación o apoptosis.

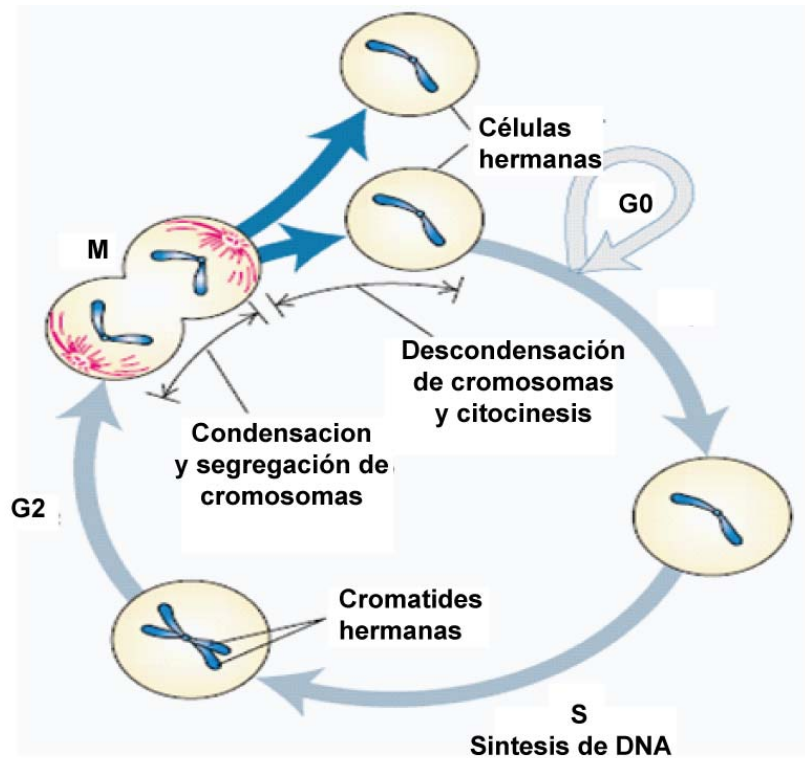


Figura 5. Eventos del ciclo celular en eucarionotes. Tomado de Lodish y cols. 2005. Molecular Cell Biology. 5ª edición.

3.7.1.1 Proteínas que regulan las fases del ciclo celular: Ciclina D1

Los hallazgos experimentales han revelado que el ciclo celular es controlado por una maquinaria compleja de proteínas llamadas ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Cdk's). Las Cdk's son enzimas que transfieren un grupo fosfato del ATP a proteínas clave de la célula necesarias para un paso particular del ciclo celular; su actividad catalítica depende de una subunidad reguladora que consiste en una ciclina específica para cada Cdk (ver Tabla 7) (Alberts et al. 2004; Bashir and Pagano 2005).

Tabla 7. Principales ciclinas y Cdk que regulan el ciclo celular de eucariontes (Lodish et al. 2005).

Ciclina	CDK	Fase del ciclo celular
D (D1, D2 y D3)	Cdk 4 y 6	G1
E	Cdk 2	G1/S
A	Cdk 2	S
B	Cdk 1	M

Las ciclinas integran una familia caracterizada por un dominio de 250 aminoácidos llamado caja tipo ciclina que forma de 4 a 5 alfa hélices. La caja tipo ciclina es el sitio de unión a las proteínas cinasas y está altamente conservado (Alao 2007). La clasificación de estas proteínas depende de la fase del ciclo celular en la que participan (Tabla 7), entonces tenemos ciclinas G1 (ciclina D y E) y ciclinas mitóticas (A y B). Para el objetivo de este trabajo estudiaremos a la ciclina D1, la cual se describe a continuación:

CICLINA D1

a) Gen CCND1 (ciclina D1)

El gen que codifica para la proteína ciclina D1 se denomina CCND1 localizado en el cromosoma 11q13 con una longitud de 15 Kb y cinco exones (Figura 5) (Fu *et al.* 2004). La región reguladora o promotora de este gen comprende aproximadamente 1000 pares de bases río arriba del inicio de la transcripción; su expresión depende de señales extracelulares y cascadas de señalización, además de una regulación transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona.

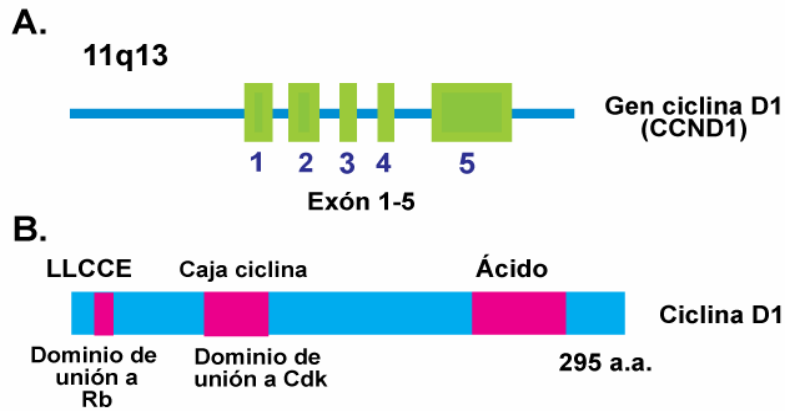


Figura 6. Estructura del gen CCND1 de la proteína ciclina D1. A) Localización y estructura del gen de ciclina D1, **B)** Regiones funcionales de la proteína ciclina D1 (Fu et al. 2004) .

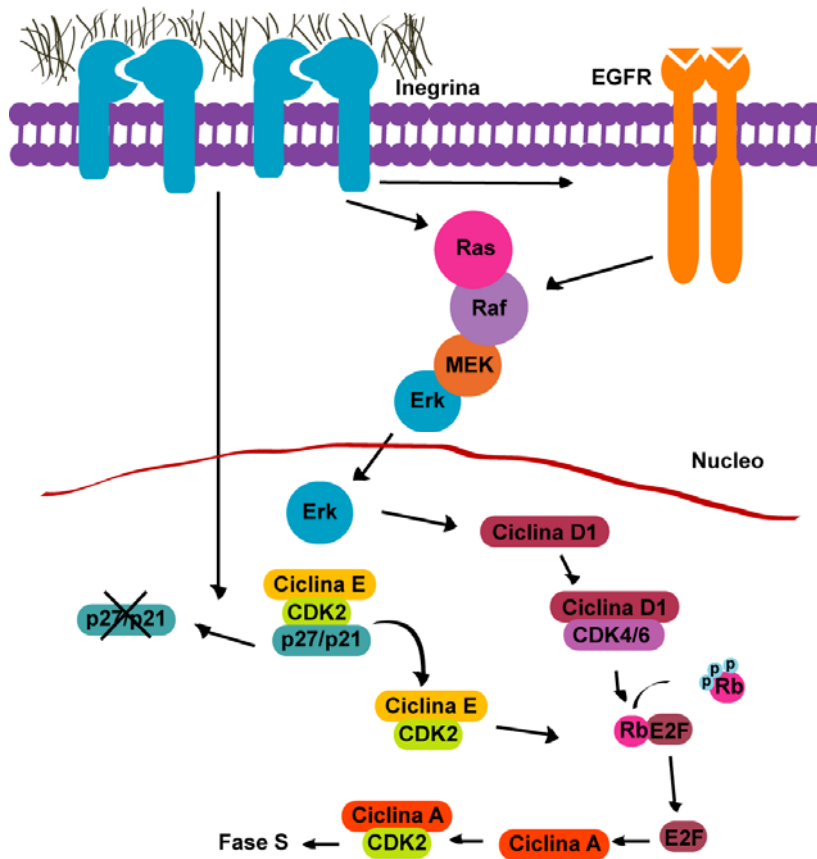


Figura 7. Expresión de ciclina D1. La expresión de ciclina D1 se regula por señales extracelulares (ERK) y en respuesta a mitógenos (MAPK) (Baldin et al. 1993).

b) Características de la proteína ciclina D1

La expresión de ciclina D1 es ampliamente dependiente de señales extracelulares y cascadas de señalización como las proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) o cinasas activadas por mitógenos (MAPK), éstas últimas activadas por factores de crecimiento como PDGF, lo que se traduce en proliferación celular por la promoción de la expresión del gen de ciclina D1 a través de la ruta denominada cascada p42/44 MAPK. Esta señalización induce la unión a proteínas Ras y proteína cinasa Raf-1, que activa a ERK e induce la activación de gen de ciclina D1 por su translocación al núcleo, mientras que la inactivación de Ras causa un decline en los niveles de ciclina D1. Sin embargo, este gen también se regula a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona (Coqueret 2002).

Regulación transcripcional

La regulación a nivel transcripcional se da principalmente a nivel del promotor del gen; diversos estudios han demostrado que el promotor del gen CCND1 tiene diversos sitios de unión a factores de transcripción, los cuales son capaces de unir a diferentes proteínas capaces de regular de manera positiva o negativa la expresión (Fu et al. 2004)(ver tabla 8).

Tabla 8. Factores de transcripción que regulan el promotor de ciclina D1.

Factor de transcripción	Efecto sobre el promotor	Referencia
STAT5	Activación	(Matsumura <i>et al.</i> 1999)
STAT3	Activación	(Bromberg <i>et al.</i> 1999)
NF κ B	Activación	(Hinz <i>et al.</i> 1999)
CREB	Activación	(Lee <i>et al.</i> 1999)
C-Jun	Activación	(Bakiri <i>et al.</i> 2000)
Sp-1	Activación	(Nagata <i>et al.</i> 2001)
E2F	Represión	(Watanabe <i>et al.</i> 1998)
Jun-B	Represión	(Bakiri <i>et al.</i> 2000)
p53	Represión	(Rocha <i>et al.</i> 2003)

Regulación post-traducciona

La ciclina D1 es una proteína inestable de vida media ($t_{1/2}$) corta, aproximadamente de 24 minutos, y es degradada principalmente vía proteosoma 26S por su unión a la

proteína Cul-1 (un componente del complejo SCF ubiquitina E3 ligasa). Sin embargo, cuando la ciclina D1 se asocia con Cdk4 es fosforilada en treonina 286 (T286) por la proteína GSK β , facilitando su transporte nuclear por unión a CRM1 y su posterior degradación en el proteosoma (Fu et al. 2004; Alao 2007).

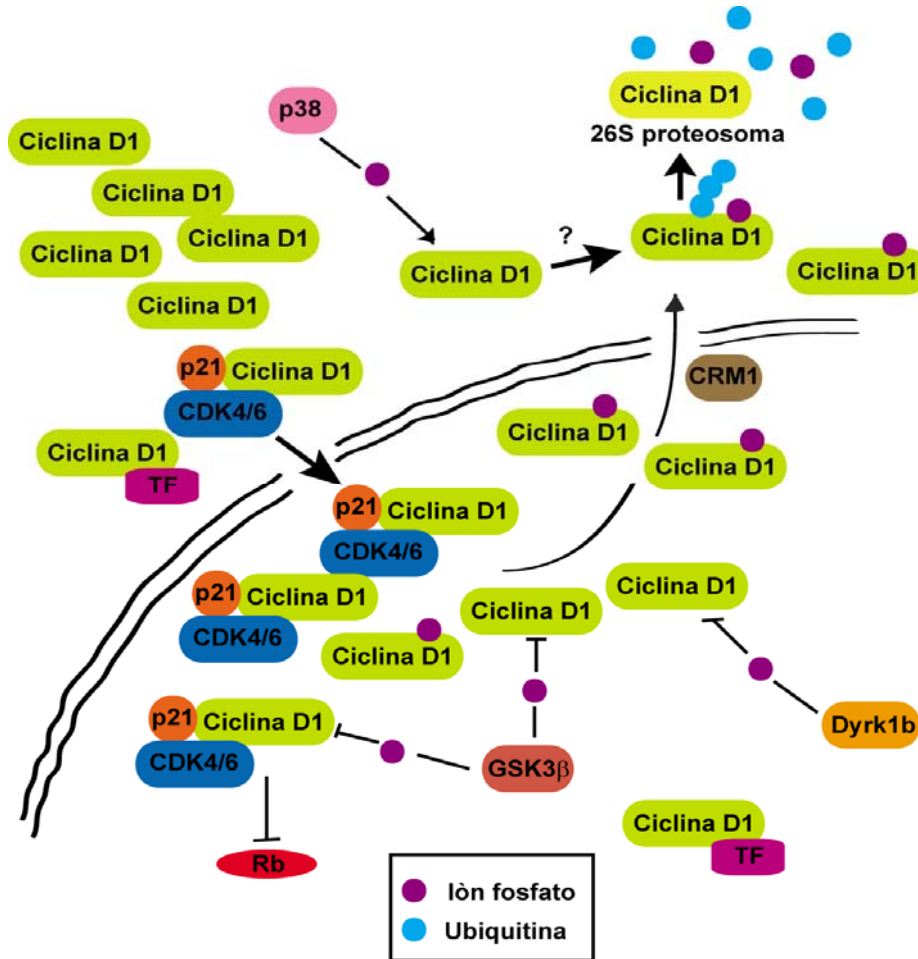


Figura 8. Modificaciones postraduccionales de ciclina D1. La proteína ciclina D1 es degradada por el proteosoma una vez que es fosforilada por GSK β para su transporte nuclear (Alao 2007).

c) Funciones de la ciclina D1

La proteína ciclina D1 participa con cdk4 o cdk6 y regula la transición de la fase G1 a S del ciclo celular. Los niveles más altos de ciclina D ocurren en la fase G1 del ciclo celular y su expresión depende de señales extracelulares y cascadas de señalización inducida por mitógenos y nutrientes (Baldin et al. 1993; Coqueret 2002).

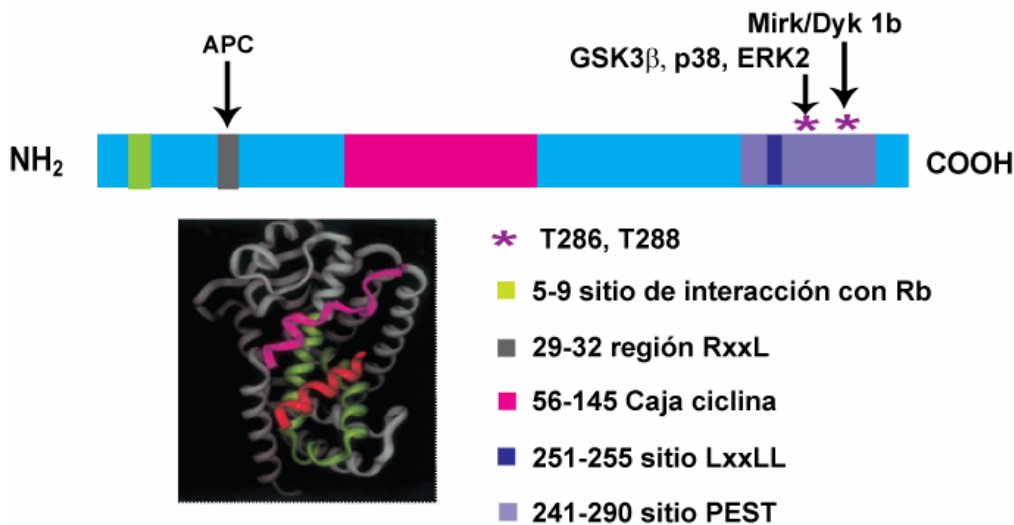


Figura 9. Estructura de la proteína ciclina D1. Regulación de la proteína ciclina D1 por mecanismos como ubiquitinación por GSK3 β y actividad por unión a Cdk's en la caja ciclina (Alao 2007).

La principal función de la ciclina D1 es activar a la ciclina E a través de dos vías: 1) asociándose a cdk4 para iniciar la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb) (Dowdy et al. 1993; Ewen et al. 1993), y 2) cuando el complejo ciclina D1-cdk4 secuestra a las proteínas Cip/Kip tal como p21 o p27 (Shtutman *et al.* 1999), las cuales inhiben al complejo ciclina E-cdk2; de esta manera se puede fosforilar a Rb (proteína de retinoblastoma), la cual está asociada a E2F, secuestrándola e impidiendo su actividad como factor transcripcional; por lo tanto cuando Rb está hipofosforilada se rompe su asociación seguida de la activación transcripcional de genes como ciclina E, importantes en la fase S (Coqueret 2002).

3.7.1.2 p53 y la respuesta al daño celular

La regulación del ciclo celular es fundamental para el desarrollo normal de los organismos, asegura que la replicación de los cromosomas y su segregación a las células hijas se produzca en el orden apropiado. Por tanto, para que este sistema se lleve a cabo de manera adecuada, el ciclo celular se supervisa en varios puntos de control, para asegurar que los cromosomas tanto en estructura como número se encuentren intactos (Lodish *et al.* 2005).

Cuando las condiciones no son adecuadas para que el ciclo continúe, éste se detiene en diferentes puntos de control como:

1. Límite G1/S, se controla el inicio de la replicación; el DNA pudo ser dañado por agentes químicos e irradiaciones, por tanto este punto de control impide que se copien bases dañadas, supervisado por las proteínas ATM, ATR y p53.
2. Final de G2 y antes del inicio de M, garantiza que el DNA esté completamente replicado antes de la mitosis; se caracteriza por una inhibición en la activación del complejo Cdk-ciclina B (MFC = factor promotor de la mitosis) por la proteína ATR, y participación de ATM y p53.
3. Fase M, en la cual se controla la alineación de los cromosomas; destacan el ensamblaje del huso acromático para la entrada a anafase y la separación de los cromosomas.

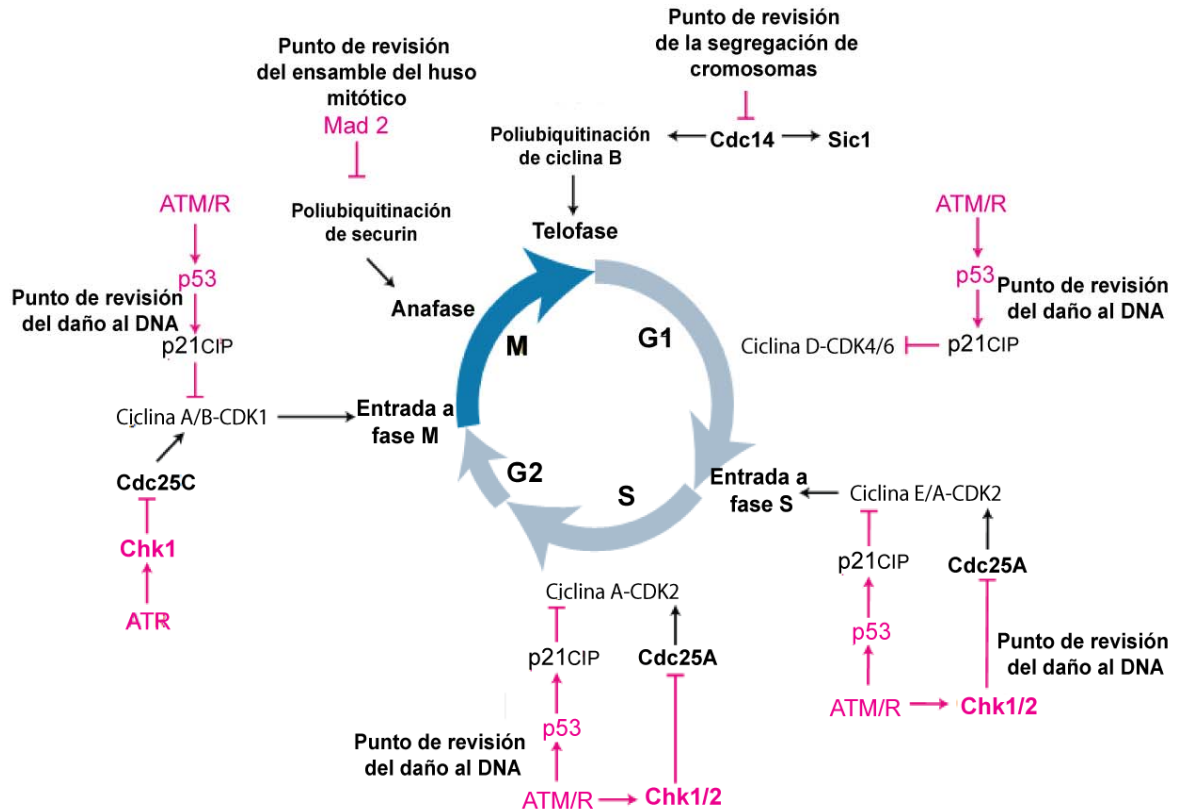


Figura 10. Regulación del ciclo celular. El ciclo celular tiene diferentes puntos de control especialmente en la transición de las fases; cuando se detecta algún daño en el DNA es posible parar el proceso por la activación de proteínas como p53/p21^{WAF} (Lodish et al. 2005).

PROTEÍNA p53

a) Gen TP53

El gen que codifica para p53 se denomina supresor tumoral ya que está implicado en detener la formación y desarrollo de tumores, se localiza en el cromosoma 17p13.1, es una fosfoproteína nuclear y su localización es importante para suprimir el crecimiento (Shaulsky et al. 1991; Moll et al. 1995). El gen de p53 está constituido por 11 exones, de los cuales el exón 1 contiene una secuencia no-codificante; en el exón 2 existen dos sitios putativos de inicio de la transcripción y el exón 11 contiene el codón de terminación y una gran secuencia no codificante; dicho gen se ha estudiado en varias especies, encontrando que su organización es altamente conservada, aunque los

intrones varían de tamaño en el gen se dividen de una manera muy similar, a excepción del intrón 6 que está ausente en la rata.

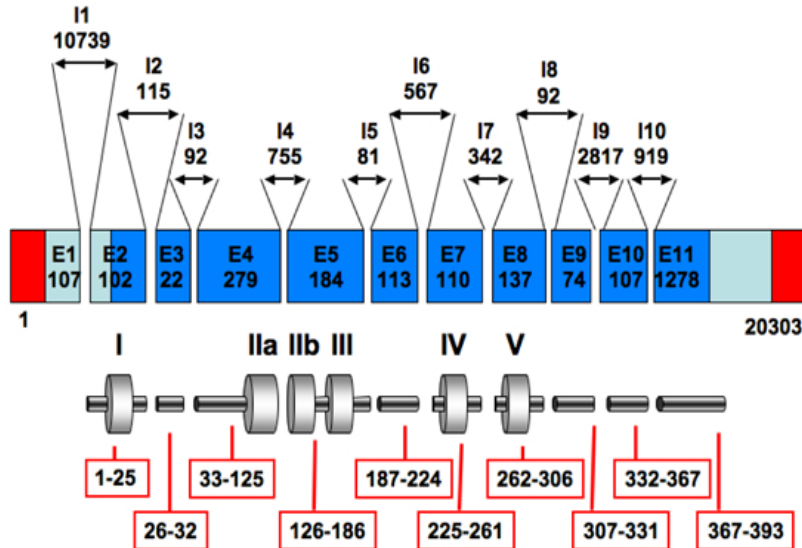


Figura 11. Gen TP53. El gen p53 consta de 11 exones y 10 intrones en el humano, a diferencia del gen de rata que carece del intrón 6 (Levine et al. 2004).

b) Características de la proteína p53

La proteína p53 está implicada en detener la formación de tumores, se activa cuando la célula es sometida a estrés, incluyendo daño al DNA, hipoxia y activación de oncogenes (Papazoglu and Mills 2007). En condiciones normales p53 está presente en bajos niveles en las células y tiene una vida media de 20 minutos, ya que en un estado latente y no funcional es inestable. Sin embargo, en condiciones de agresión o daño celular p53 se estabiliza e incrementan sus niveles de proteína, principalmente por el aumento de su vida media, entonces genera una respuesta que conduce a una parada del ciclo celular y a la reparación del posible daño, aunque si éste es muy grave, p53 provoca la entrada de la célula en apoptosis. Estos procesos son en gran medida dependientes de la capacidad de p53 de activar la transcripción de determinados genes. Bajo estas condiciones, p53 sufre un proceso de activación post-traducciona

muchos de sus residuos son modificados por fosforilación, acetilación o sumoilación (Sionov and Haupt 1999; Somasundaram 2000) .

La proteína p53 consta de 393 aa, que pueden dividirse en tres dominios funcionales:

- 1) Dominio amino terminal (N-), implicado en la activación transcripcional (residuos 1-70) y donde se localiza una subregión rica en prolina.
- 2) Dominio central, zona de unión al DNA específica de secuencia; la región más conservada de la proteína (residuos 100-300).
- 3) Dominio carboxilo terminal (C-) donde hay una región flexible (residuos 300-325), una zona de tetramerización (residuos 325-356) y un extremo básico o regulatorio terminal (363-393) (Somasundaram 2000).

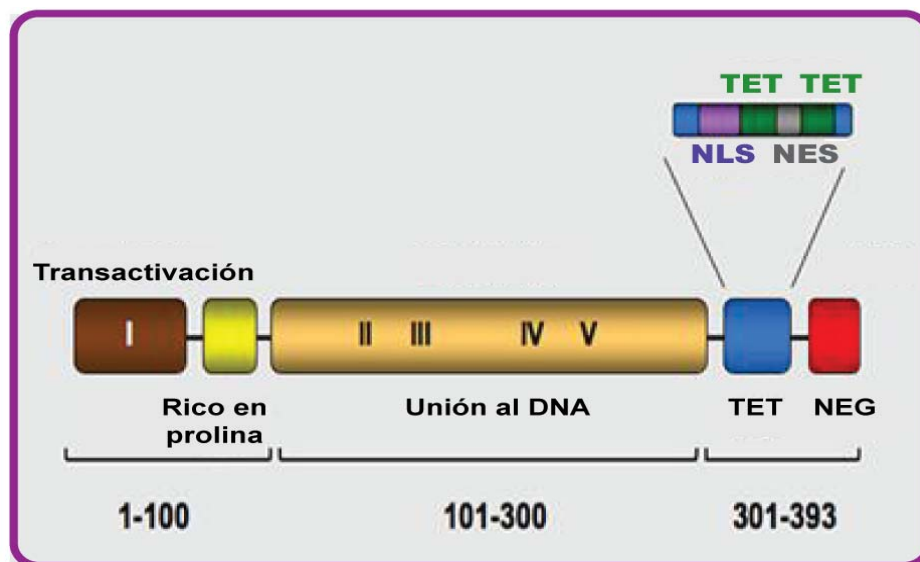


Figura 12. Estructura de la proteína p53. La proteína p53 puede dividirse en I) Dominio amino terminal, contiene el dominio de transactivación y el sitio de unión de mdm2; II) Región central de 40-92 aa, corresponde a la región más conservada y contiene una serie repetida de prolina; III) Región central 101-306 aa, que contiene el dominio de unión al DNA y IV) Dominio de oligomerización 307-355 y TET, contiene señales de localización nuclear y V) Dominio carboxilo terminal 356-393 aa, es la región involucrada en la desregulación de unión al DNA (Somasundaram 2000).

c) Activación de p53

Las señales o sucesos que conducen a la activación de p53 están principalmente asociados a situaciones de estrés celular como daño al DNA por irradiaciones ionizantes o ultravioleta, hipoxia, activación de oncogenes o generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Satyanarayana *et al.* 2008). Estos estímulos provocan un rápido incremento en los niveles de la proteína p53 en la célula, lo cual le permite actuar como un factor de transcripción, unirse al DNA en regiones determinadas por secuencias de bases específicas localizadas en regiones promotoras y regular así sus genes blanco (Wei *et al.* 2006).

La célula tiene sistemas que actúan como sensores para reconocer el daño que se produce en el DNA, roturas de cadena o escisiones; entre estos sensores se encuentra la proteína ATM, cuya función normal está implicada en los procesos de señalización tras daños en el DNA hasta los moduladores del incremento de p53 y la consiguiente parada de ciclo celular. Por ejemplo, la ser6, ser9, ser15, ser20 y ser37 son fosforiladas por cinasas como ATM, DNA-PK o Chk2, en respuesta a daño celular y se sabe que regula genes asociados a reparación o genes asociados a la regulación del ciclo celular, mientras que la fosforilación de la ser46, por las cinasas p38aMAPK o HIPK2 es funcionalmente importante ya que contribuye a la activación de genes apoptóticos (Piette *et al.* 1997; Momand *et al.* 2000; Alarcon-Vargas and Ronai 2002)

Algunas evidencias muestran que la activación e incremento de p53 se asocia con modificaciones post-traduccionales; por tanto modificaciones de la región C-terminal como fosforilación, desfosforilación, acetilación y sumoilación puede inducir la unión de p53 al DNA, ya que estas modificaciones regulan la correcta tetramerización de p53, necesaria para su unión al DNA. Por tanto, tras un estímulo, la regulación post-transcripcional de p53 no sólo aumenta la vida media de la proteína p53, sino que regula su actividad biológica.

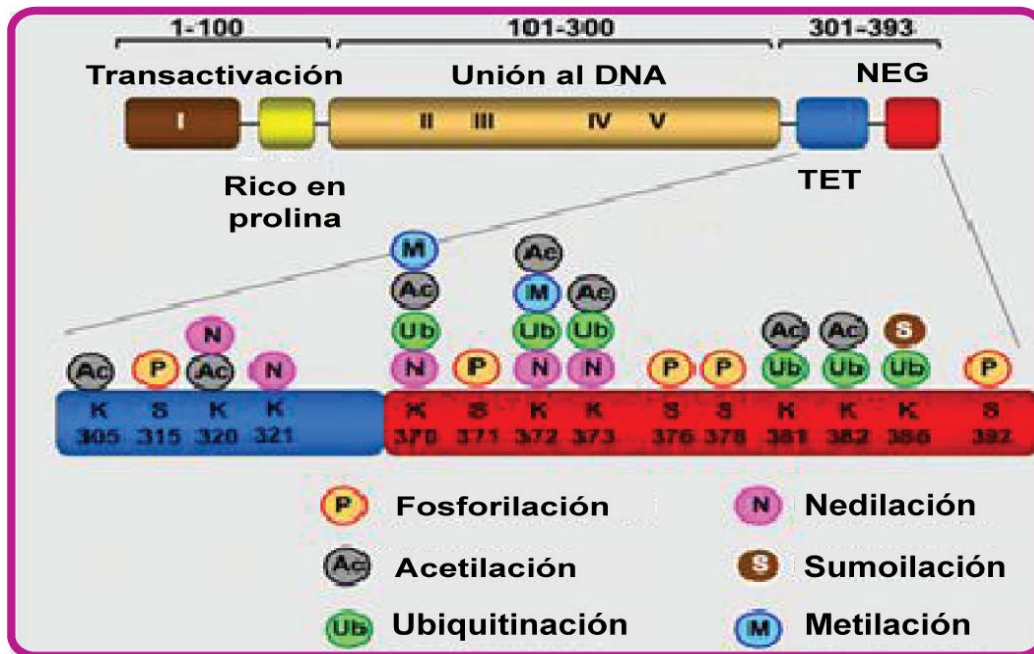


Figura 13. Región C-terminal. Modificaciones de la región que regula el proceso de tetramerización y unión al DNA; además corresponde al sitio de unión a MDM2 (Somasundaram 2000).

La fosforilación de residuos en las regiones amino y carboxilo terminal juega un papel decisivo en la función final de la proteína, en condiciones de reposo de p53, la región C-terminal se pliega sobre el dominio central de la molécula y evita su unión al DNA. La acetilación de residuos de lisina por CREB (p300/CBP) (Gu and Roeder 1997) y la fosforilación de residuos de serina de la región C-terminal facilita la unión de p53 al DNA (Sakaguchi *et al.* 1998), evitando su plegamiento. Por ello se considera que esta región es de suma importancia para la activación de p53 y su unión al DNA.

La región central contiene las secuencias específicas de unión al DNA altamente conservadas, por tanto es donde se han encontrado la mayor parte de mutaciones relacionadas a la inactivación de p53.

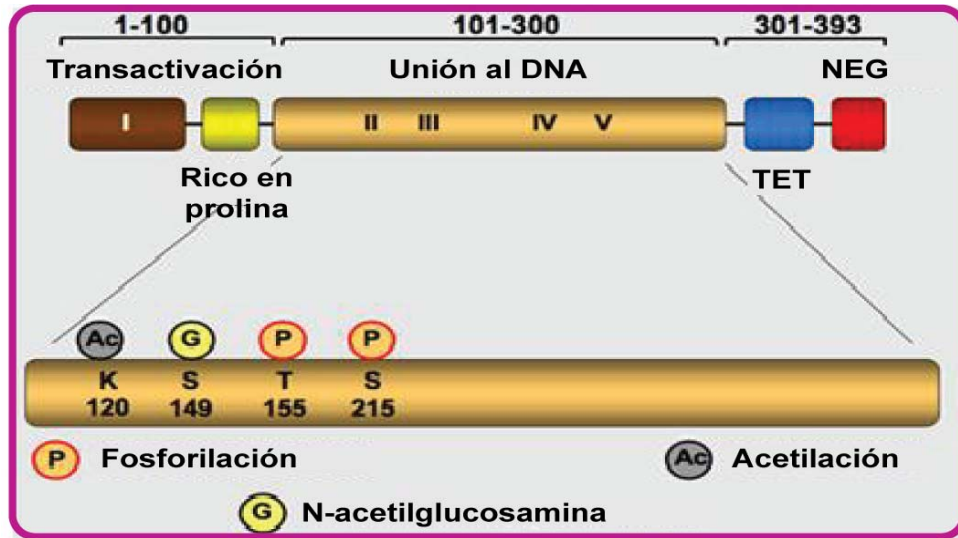


Figura 14. Región central. Modificaciones del dominio de unión al DNA de la proteína p53 (Somasundaram 2000).

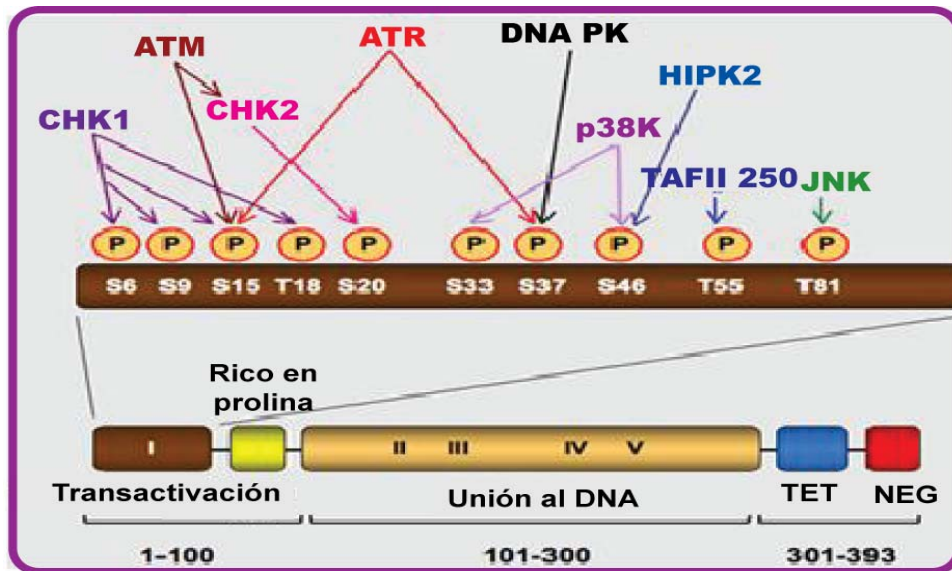


Figura 15. Región N-terminal. Modificaciones después del daño al DNA (Somasundaram 2000).

Mientras que en el otro extremo de la molécula, la región N-terminal, también son esenciales modificaciones de p53 para su correcta unión al DNA y para la transactivación de genes. En este caso se sabe que la fosforilación de varios residuos N-terminales, incluidas las ser15, ser20, ser37 y ser46 tras radiación ionizante (IR) y ultravioleta (UV) son importantes para la estabilización de la proteína. Además de

interactuar con la proteína TFIID y TFIIH formando parte de la maquinaria de transcripción (Lu and Levine 1995).

d) Función de p53

La proteína p53 regula la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a p53; por tanto los genes regulados transcripcionalmente por p53 pueden agruparse dependiendo de las funciones que realizan. Se sabe que p53 regula genes implicados en la inhibición del ciclo celular, en la reparación del daño en el DNA, diferenciación, senescencia, inhibición de la angiogénesis y apoptosis (Aloni-Grinstein et al. 1995; Atadja et al. 1995; Levine et al. 2004).

Regulación del ciclo celular

Uno de los primeros efectos de la activación de p53 es una detención del ciclo celular. La proteína p53 estimula directamente la expresión de p21^{WAF1} un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclina (Cdk), entonces a través de su efecto negativo sobre varios complejos ciclina-Cdks como ciclina D1-Cdk4, ciclina E-Cdk2, ciclina A-Cdk2 y ciclina B-Cdk, p21^{WAF1} inhibe las transiciones de G1-S, y de G2-mitosis. Otros genes implicados en el arresto del ciclo en G2 es Reprimo, y 14-3-3 σ , miembro de una familia de proteínas estructurales, que secuestran el complejo ciclina B1-Cdk1 fuera del núcleo, lo que permite el mantenimiento del bloqueo en G2 (Ishikawa *et al.* 2007).

Al detenerse el ciclo celular, p53 interviene en los procesos de reparación del daño al DNA a través de la regulación de GADD45 (Jin *et al.* 2000), proteína que se une a PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), subunidad de la DNA polimerasa, inhibiendo así la síntesis de DNA. Además regula la transcripción de la unidad R2 de la ribonucleótido reductasa, implicada en la reparación de DNA por escisión de nucleótidos (Somasundaram 2000).

Apoptosis

Otro mecanismo de acción de p53 es llevar a la célula a apoptosis. p53 regula a Bax, un miembro de la familia Bcl-2 que promueve la apoptosis celular por liberación de citocromo C y activación de caspasa 9; el gen Bax tiene sitios de unión a p53 en su promotor y se regula positivamente en respuesta a daño en el DNA, activando la cascada de caspasas (Handayani *et al.* 2007). Además el gen Fas/APO1 que también es blanco de p53 es capaz de activar a caspasa 8 y 10 desencadenando la cascada de caspasas nuevamente (Fuchs *et al.* 1997).

Recientemente, nuevos genes directamente regulados por p53, han sido implicados en apoptosis. Es el caso de genes denominados “p53 Induced Genes” (p53IGs) algunos de los cuales forman parte de genes implicados en los procesos de oxidación celular, donde la apoptosis es dependiente de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de genes como PIG3.

Así p53 puede regular la apoptosis desde dos diferentes ángulos: regulando receptores de muerte que activan la ruta de caspasas desde la membrana y activando la mitocondria generando la liberación de citocromo C, que a su vez es un catalizador de la ruta de las caspasas.

Autorregulación de p53

Los niveles de la proteína p53 dependen principalmente de la velocidad de degradación, más que de la velocidad de síntesis de novo, debido a que p53 regula la transcripción de MDM2, quien regula los niveles de p53, lo que genera el sistema autorregulable (Yin *et al.* 2002).

La degradación de p53 es dependiente de la vía ubiquitina/proteosoma, proceso que marca a la proteína con varias copias de un pequeño péptido (ubiquitina), siendo de esta manera identificada por la maquinaria de degradación del proteosoma. La proteína involucrada en este proceso es Mdm2, actúa como la ligasa E3 de la ubiquitina, una de las enzimas involucradas en el marcaje de p53. Mdm2 interacciona con el extremo

carboxilo terminal de p53 que contiene el dominio de transactivación. La inducción de p53 transactiva al promotor de Mdm2 y cuando se genera la proteína Mdm2 esta se une a p53 y la marca para su exportación fuera del núcleo y su eventual degradación en el proteosoma (Momand et al. 2000; Alarcon-Vargas and Ronai 2002; Yin et al. 2002; Lee et al. 2006).

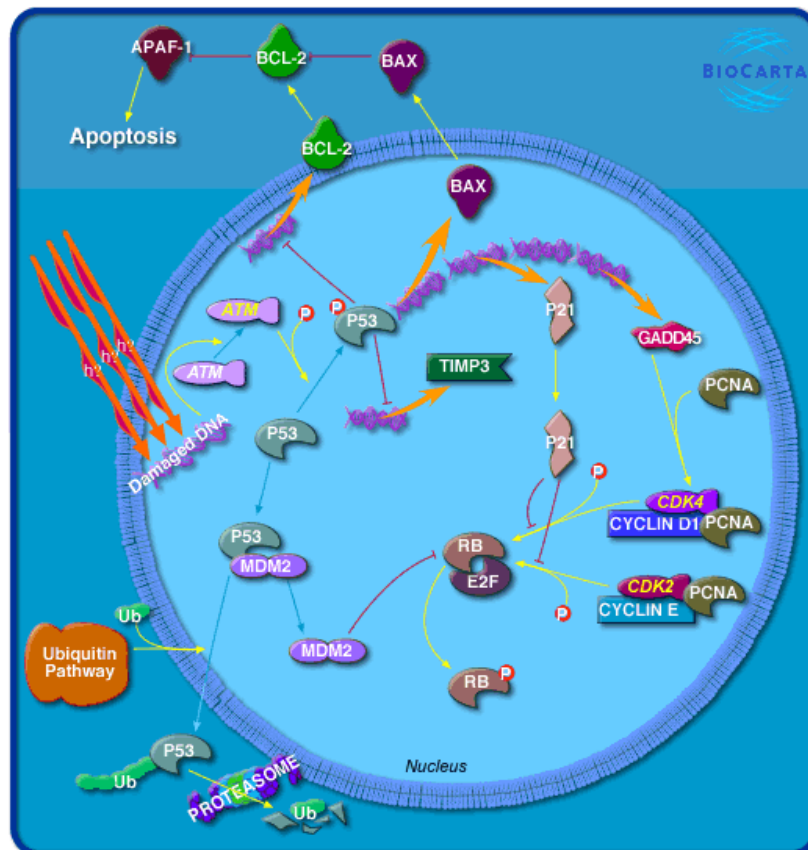


Figura 16. Vía de señalización de la proteína p53. p53 está implicada en la regulación de procesos de arresto celular, senescencia, diferenciación y apoptosis, esto por su capacidad de unión al DNA y regulación transcripcional de genes involucrados en dichos procesos, tales como p21^{WAF1}, *bcl-2*, *gadd45*, *mdm2*, entre otros (Monell 2004).

IV. JUSTIFICACIÓN

El arsénico es un tóxico ambiental encontrado naturalmente en el agua de bebida, en el mundo existen zonas con altas concentraciones de arsénico, lo que representa un problema de salud para la población de Bangladesh y México por ejemplo.

El consumo de arsénico a niveles no letales en agua de bebida (50 ppm) por un periodo de tiempo puede resultar en manifestaciones de toxicidad en diferentes sistemas. Reportes de casos clínicos y en animales de experimentación muestran efectos neurotóxicos a consecuencia de la exposición a este metaloide; por ejemplo daño axonal, desmielinización, pérdida de memoria y déficit de aprendizaje.

Durante años se han investigado los mecanismos de acción en diferentes sistemas; Sin embargo a nivel de SNC poco es conocido sobre la neurotoxicidad, especialmente en células gliales. La glía, a quien se atribuía especialmente la función de soporte, resulta un blanco de interés para estudiar los mecanismos de neurotoxicidad del arsénico, ya que en la actualidad se ha comprobado que se comunican y participan con las neuronas regulando la sinapsis, y con ello los mecanismos de aprendizaje y memoria, que son afectados por el arsénico.

Considerando estos antecedentes nos interesamos en estudiar el mecanismo de acción del arsenito de sodio en células gliales, como la línea celular C6 (glioma de rata con p53 y ciclina D1 wild type), principalmente en el proceso de proliferación celular.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las alteraciones citotóxicas sobre la línea celular C6 de glioma, así como los cambios en los niveles de las proteínas p53 y ciclina D1 producidas por el tratamiento con arsenito de sodio.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto en la viabilidad celular por el tratamiento con arsenito de sodio en la línea celular C6 (glioma).
- Determinar los cambios en la proliferación celular por efecto del tratamiento con arsenito de sodio en células C6.
- Determinar cambios en el progreso del ciclo celular por el arsenito de sodio en la línea celular C6.
- Determinar las modificaciones en los niveles de las proteínas p53 y ciclina D1 causadas por el tratamiento con arsenito de sodio en células C6.
- Analizar el papel de p53 como factor transcripcional, bajo la influencia del tratamiento con arsenito de sodio, mediante el análisis de las interacciones proteína-DNA, así como la expresión de uno de sus genes blanco (p21^{WAF1}).

VI. HIPÓTESIS

El arsénico inorgánico afecta la viabilidad de células del SNC debido a sus propiedades tóxicas. En respuesta al daño sobre el DNA se requiere la expresión de genes que controlan el ciclo celular como p53 quién controla el ciclo celular. La activación de p53 se asocia con el efecto de arresto celular en la fase G1/S o G2/M, principalmente por la inducción en la expresión de genes como p21^{WAF1}, que inhibe la actividad de ciclinas como el tipo D.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las células C6 (glioma) provenientes de un tumor inducido en rata fueron cultivadas a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ en medio DMEM (No. Cat. 12800-058. Gibco BRL) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Cat 10439-016) penicilina (Penprocilina 800,000 U. Laboratorios Lakeside), estreptomycin 150 µg/mL y gentamicina 40 µg/mL.

Tratamientos con arsenito de sodio (NaAsO₂)

Se preparó una solución stock estéril de arsenito de sodio (1M) a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener la concentración final requerida de 0.1µM a 10 µM. Las células C6 fueron sembradas aproximadamente al 85% de confluencia y tratadas con arsenito de sodio a diferentes tiempos de 0 a 72 h y a diferentes concentraciones (0.1µM a 10 µM).

Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular fue medida a 24 h después del tratamiento con arsenito de sodio por dos métodos: el método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-bromuro difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich) como describe Mosmann (Gerlier and Thomasset 1986) y por el método del rojo neutro (Kit Ensayo Toxicológico in Vitro, SIGMA). En ambos casos, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos con 500 µL de medio e incubadas por 24 h con arsenito de sodio a 37°C y 5% CO₂.

Las células se trataron con el reactivo de MTT (5 mg/mL) por 4 h aproximadamente. Para lizar a las células y solubilizar los cristales se adicionó una solución de isopropanol:HCl. La densidad óptica se determinó a 630 nm con el lector de ELISA Opsys MR (Dynex Technologies, Frankfurt, Germany).

En el caso de rojo neutro, después del tratamiento con arsenito de sodio las células se trataron con el reactivo de rojo neutro (0.33%) por 3 h aproximadamente. Posteriormente se incubaron en hielo para fijar y solubilizar el complejo con las soluciones respectivas. La absorbancia se leyó a 490 nm con el lector de ELISA Opsys MR.

Ensayo de proliferación celular

Las células C6 fueron sembradas en placas de 24 pozos en 500 μ L de medio con y sin tratamiento de arsenito de sodio a 5 μ M, se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. El ensayo se realizó por triplicado a intervalos de 12-24 h por 3 días, adicionando reactivo de MTT 4 h antes para determinar la viabilidad celular.

Análisis de ciclo celular

La distribución de las células en las fases del ciclo celular se determinó por la tinción con Ioduro de Propidio (IP), seguida de un análisis por Citometría de flujo. Las células C6 fueron tratadas con arsenito de sodio, después de 30 h las células fueron suspendidas con tripsina y centrifugadas a 12000 rpm 10 min; para fijar a las células, éstas se resuspendieron en una solución de PBS +BSA 1% y etanol 80%, seguido se realizó una permeabilidad de las células con una solución de PBS + tritón 0.25% 15 min. Después de una serie de lavados, para realizar la tinción, las células se incubaron con el yoduro de propidio 1.9 mg/ μ L, RNAsa 10 mg/ μ L, PBS + BSA 1% y tritón por 30 min. La citometría se realizó en el equipo CyAN ADP (Dako); mientras que el análisis del ciclo celular se realizó con el software Winmdi y Cylchred.

Inmunodetección en fase sólida

La detección de las proteínas p53 y ciclina D1 en células C6 tratadas con arsenito de sodio se realizó a través de un ensayo de inmunodetección en fase sólida. Las células C6 fueron cosechadas después del tratamiento con arsenito de sodio (tiempo y concentración indicados en las leyendas de las Figuras), se lisaron con una solución amortiguadora RIPA (40 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glicerol, 0.5% desoxicolato de sodio) complementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (1 mM PMSF y el cocktail comercial de inhibidores de proteasas Complete®, cat. 1697498. Roche Diagnostics. Mannheim, Alemania) en agitación constante a 4°C durante 1 hora. Enseguida el extracto se mezcló en una proporción 1:1 con amortiguador RIPA más 1% Tritón X-100 y 0.2% SDS, se dejó en agitación por 1 hora más a 4°C. Al extracto celular se le determinó la cantidad de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford 1976). Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, para eliminar restos celulares. Las muestras se separaron por electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, posteriormente las muestras del gel obtenido fueron transferidas a una membrana de PVDF. Para bloquear los sitios inespecíficos de interacción, la membrana se sumergió en solución bloqueadora (5% leche baja en grasa en TBS/Tween-20 0.01%) 1 h a temperatura ambiente. Enseguida se realizaron lavados con la solución TBS 1X (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl)/ Tween-20 0.01% y se incubó la membrana con los anticuerpos primarios p53 (cat. sc-126 Santa Cruz, CA dilución 1:1000), ciclina D1 (c. sc-717. Santa Cruz, CA Dilución 1:1000) y actina (dilución 1:50) disueltos en una solución para anticuerpo (Albumina 0.25%, tween-20 0.1% y timerosal 0.01%) toda la noche a 4°C. Después se hicieron lavados y la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con alguno de los anticuerpos secundarios en una dilución 1:3000: anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (c. 62-6520. Zymed Laboratories, San Francisco, CA, E.U.A.) y anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano picante (c. 62-6120. Zymed Laboratories, San Francisco, CA, E.U.A). Nuevamente se realizaron lavados para observar las proteínas de interés con un sistema de detección

quimioluminiscente (Immobilon Western hemiluminescent HRP Substrate. c. WBKL S0 100. Millipore, Billerica, MA, E.U.A.).

RT-PCR

Para este ensayo se empleó 1 µg del RNA total y se usó el sistema Enhanced Avian HS RT-PCR (No. Cat. HSRT20. Sigma Co., St. Louis, MO, E.U.A.). Las condiciones de la transcripción reversa fueron 25°C durante 5 minutos, 37°C 60 minutos y 70°C 15 minutos. Mientras que las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron las siguientes: 94°C por 8 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, durante 35 ciclos. Los productos de PCR se separaron y observaron en un gel de acrilamida 1%, teñido con una solución de bromuro de etidio (1 µg/mL).

En estas reacciones se utilizaron los iniciadores diseñados para humano (Ishikawa et al. 2007) del gen de p21^{WAF1}:

Primer 1 5' ACCCTCTCATGCTCCAGGT 3'

Primer 2 5' CCTTGTTCCGCTGCTAATCA 3'.

El fragmento amplificado fue de 334 pb. Como control positivo y de carga se emplearon iniciadores para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) diseñados para ratón:

Primer 1 5' GACCCTTCATTGACCTCAACT 3'

Primer 2 5' GTCCATGCCATCACTGCCAC 3'

El fragmento producido fue de 409 pb. En ambos casos la reacción se vio favorecida por ser secuencias conservadas. Además debido a la cercanía de tamaño de ambos amplificados, los controles se hicieron en las mismas condiciones. Las bandas obtenidas se cuantificaron empleando el programa Kodak Digital Science 1D v. 3.0.2. (Eastman Kodak Company, New Haven, CT, E.U.A.) y los valores obtenidos se normalizaron con respecto a GAPDH.

Ensayo de retardamiento y competencia.

- Obtención de extractos nucleares

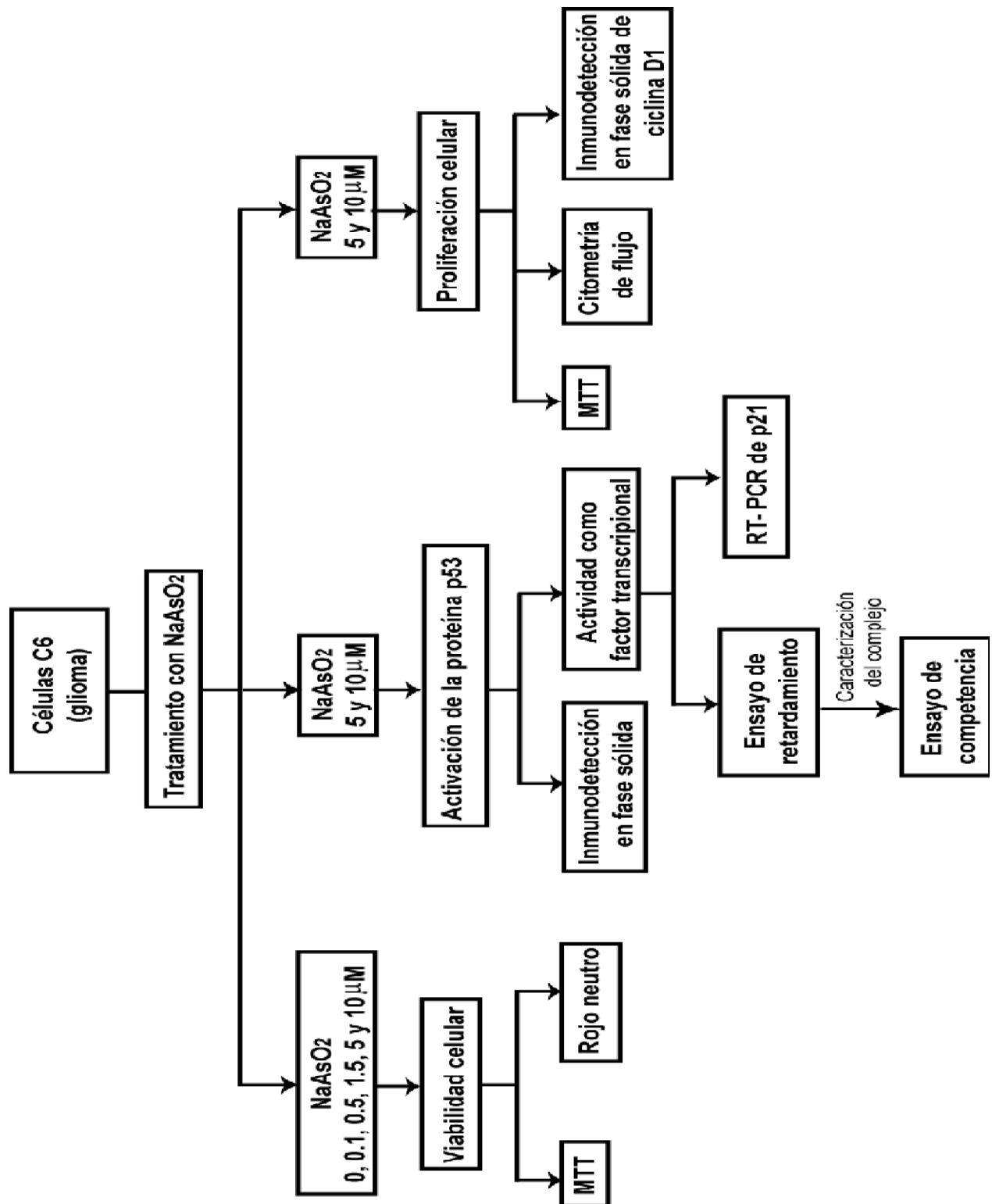
Las células C6 tratadas con arsenito de sodio se cosecharon en el amortiguador Tris-Dulbecco (TD, 0.7 M NaCl, 5mM KCl, 0.8 mM Na₂HPO₄, 50 mM Trizma base, pH final 7.45). Posteriormente, las células se centrifugaron y la pastilla celular se resuspendió en la solución A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT y 0.5 mM PMSF) y se incubó en hielo por 20 minutos. Se agregó NP40 al 10%, agitando vigorosamente y se centrifugó la mezcla a 12,500 rpm por un minuto. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en la solución C (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT y 1 mM PMSF) y se agitaron vigorosamente durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, para cuantificar proteínas en los extractos nucleares por el método de Bradford. Los extractos obtenidos almacenaron a -70°C.

- Ensayos de Retardamiento y Competencia

Los extractos nucleares obtenidos de células C6 se incubaron en solución de unión de proteínas BDG 1X [12 mM Hepes, pH 7.8, 10% glicerol, 0.05 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM ditiotreititol, 2 mM espermidina) y 1 µg de poli(dI-dC) (No. Cat. 27-7880-01. Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, E.U.A.)] durante 10 minutos a 4°C.

Posteriormente se agregó 1 ng del oligonucleótido marcado con ³²P-dATP (p53 5' CTAGTACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGGACT 3') y se incubó la mezcla 10 minutos a 4°C. En el caso de los ensayos de competencia, las mezclas de reacción se preincubaron con 100 ng del oligonucleótido p53 y oligonucleótidos no específicos de unión con p53 como SOX, RBPJk y AP-1 no marcados, durante 10 minutos a 4°C, antes de agregar el oligonucleótido marcado. Las mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida al 6%, usando un amortiguador de baja fuerza iónica como el TBE 0.5X (0.89 M Trizma base, 0.89 M ácido bórico, 0.02 M EDTA), a un voltaje de 120 V. Los geles se secaron al vacío y se expusieron a placas radiográficas (JXA2. JUAMA, México).

VIII. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL



IX. RESULTADOS

Viabilidad celular bajo el tratamiento con arsenito de sodio.

El arsénico inorgánico es considerado como un agente neurotóxico, capaz de inducir apoptosis, en diferentes sistemas, las dosis tóxicas dependerán de la especie y las condiciones genéticas. Inicialmente se evaluó el efecto de este metaloide sobre la viabilidad de células de glioma C6 para establecer una dosis óptima de trabajo, construyendo una curva dosis-respuesta mediante el método de MTT. Como se muestra en la Figura 17A, no existen cambios significativos en la viabilidad celular hasta una concentración de 1.5, 5 y 10 μM , ante la cual las células presentaron una viabilidad aproximadamente del 80, 78 y 75%, respectivamente comparadas con el control.

El efecto antes mencionado en la viabilidad celular se corroboró con un segundo ensayo, midiendo la viabilidad por el método de rojo neutro. La células fueron tratadas sólo a la concentración de 10 μM ; como se muestra en la Figura 17B el porcentaje de viabilidad corresponde a un 76%, similar que en el método de MTT; por lo tanto continuamos trabajando en el rango de 5 -10 μM como las dosis óptimas que permitirían evaluar cambios en la expresión de la proteína y en el ciclo celular sin tener un efecto citotóxico.

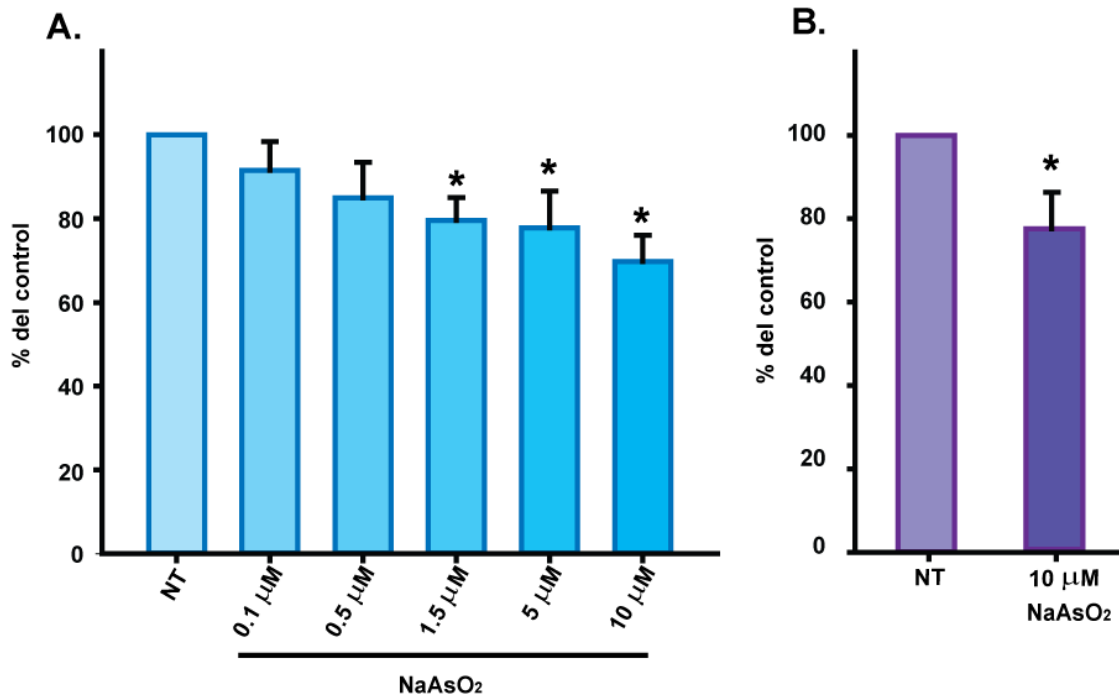


Figura 17. Viabilidad de células de glioma C6 tratadas con arsenito de sodio. A) Células C6 fueron tratadas 24 h con concentraciones crecientes de arsenito de sodio para evaluar viabilidad celular por el método de MTT. **B)** Células C6 fueron tratadas con arsenito de sodio a una concentración de 10 μM para evaluar viabilidad celular por el método de rojo neutro. Expresados en % de control (*p<0.05).

El arsenito de sodio produce arresto en el ciclo celular

El arsénico inorgánico puede inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis en sistemas celulares como APL (Leucemia aguda promielocítica), IMR-32, SH-SY5Y, U87MG, Mieloma y Queratinocitos humanos (Zhao et al. 2002; Woo et al. 2006; Cheung et al. 2007; Sandoval et al. 2007). El arresto celular puede estar asociado con la activación de p53 y con cambios en la expresión de genes involucrados en el proceso de división celular. En este sentido, nos dimos a la tarea de analizar si la proliferación celular se afectaba en las células C6 tratadas con arsenito de sodio. Se inició con el análisis de proliferación celular a diferentes tiempos y a la concentración de 5 μM de arsenito de sodio, para lo cual se empleó el método de MTT. En la Figura 18 se observa que células C6 tratadas con arsenito de sodio disminuyen significativamente su tasa de

proliferación comparada con células no tratadas, aunque a 24 h se observó una disminución en la viabilidad, la proliferación después de este tiempo se mantiene constante hasta 72 h, lo cual nos indica un proceso de arresto celular.

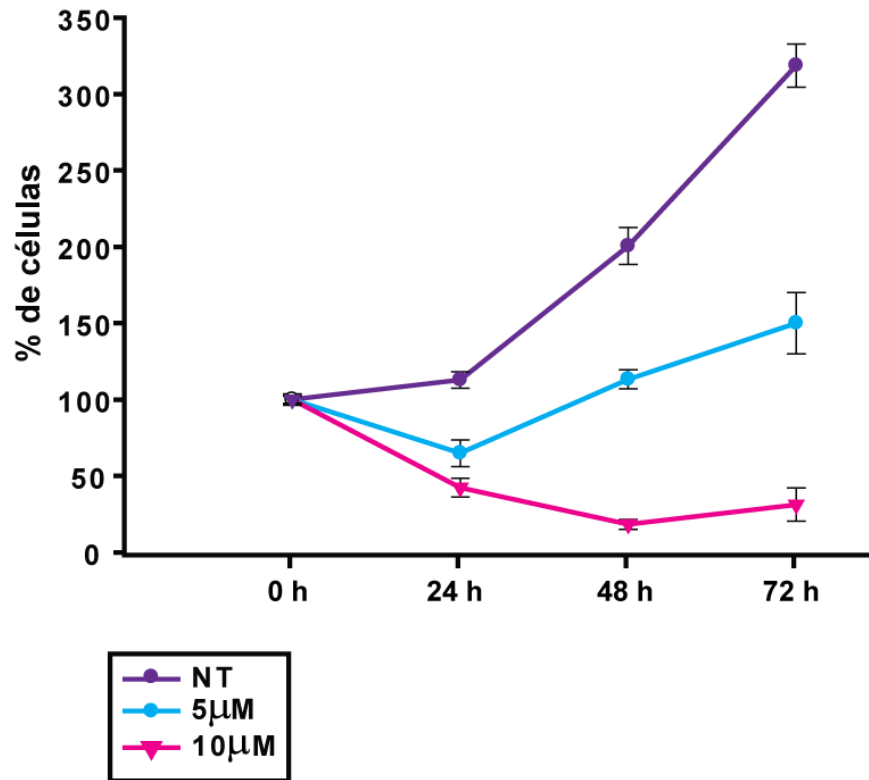


Figura 18. El arsenito de sodio disminuye proliferación en células C6. Ensayo de proliferación celular por el método de MTT en células C6 tratadas con 5 y 10 μ M de arsenito de sodio.

Para confirmar si la inhibición del crecimiento por arsénico era consecuencia de un arresto celular se realizó una tinción con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Las células fueron tratadas con 5 y 10 μ M de arsenito de sodio por 30 h correspondientes a una etapa de alta actividad en la división celular de esta línea celular (Figura 18; células no tratadas). Los resultados mostrados en la Figura 19 indican que a la concentración de 5 μ M el arsenito de sodio incrementa el porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular, en consecuencia el número de células en fase S disminuye significativamente respecto a las células no tratadas, mientras que la fase G2/M se mantiene constante (Figura 18B), ello en relación con la disminución de

síntesis del DNA. En cambio a una concentración de 10 μM los cambios en las fases del ciclo celular no fueron significativos respecto al control, sin embargo el ensayo de proliferación celular mostro que las células no proliferaban y sufrían muerte celular (figura 18), caso observado en la citometría donde se detectó un mayor número de resto celulares (figura 19A).

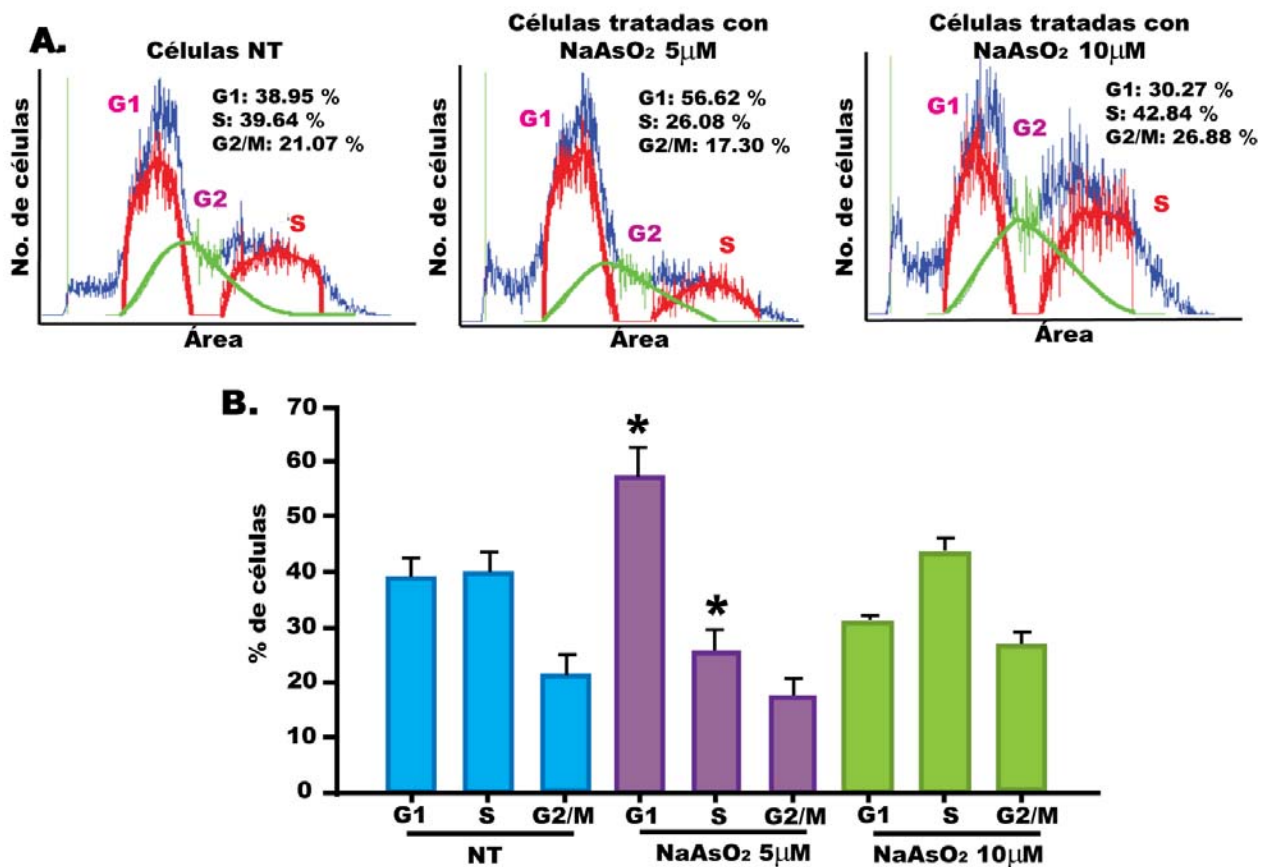


Figura 19. El arsenito de sodio produce arresto celular. A) Arresto de las células C6 en la fase G1 del ciclo celular por efecto del arsenito de sodio a una concentración de 5 μM por 30 h, corroborado por una tinción de IP y análisis de citometría de flujo. B) Las muestras se analizaron por triplicado y el resultado se presenta estadísticamente (* $p < 0.05$)

Activación de la proteína p53 por arsenito de sodio.

El arsénico puede modular vías de señalización que afecta procesos tales como proliferación celular, diferenciación y apoptosis, incluyendo daño genotóxico (Sandoval et al. 2007). La proteína p53 es activada en respuesta al daño del DNA originado por

una exposición a agentes genotóxicos como el arsenito de sodio. Por tanto, para confirmar la activación de p53 en nuestro sistema, las células C6 fueron expuestas a concentraciones crecientes de arsenito de sodio por un periodo de 24 h y se determinaron los niveles de esta proteína por inmunodetección en fase sólida. El resultado en la Figura 20A muestra que la exposición a arsenito de sodio provoca una activación de p53 pero no significativa.

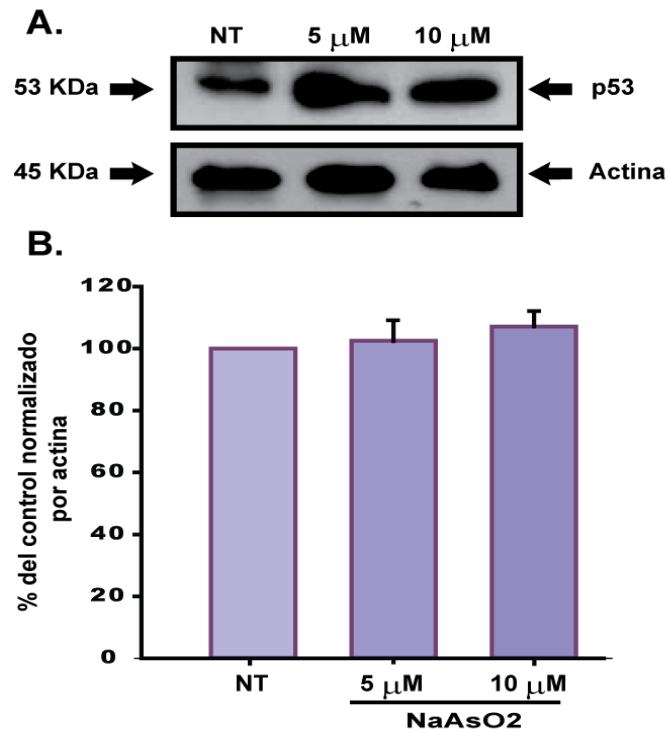


Figura 20. Incremento de los niveles de la proteína p53 por el tratamiento con arsenito de sodio. A) Células C6 tratadas por 24 h a concentraciones crecientes de arsenito (5 μM – 10 μM) de sodio. El efecto sobre p53 se analizó por inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpo anti-p53 y normalizando con la proteína actina. **B)** cuantificación por densitometría con con el software Image Quant.

No obstante, para corroborar la activación de p53, además se consideró su actividad como factor transcripcional, es decir, la capacidad de inducir o inhibir la expresión de genes por su unión al DNA. Por tanto, decidimos realizar ensayos de retardamiento para evaluar la unión proteína-DNA. Para ello se empleó una secuencia consenso de unión a p53 en el promotor del gen p21 y extractos nucleares obtenidos de células C6

tratadas 24 h a concentraciones de 5-10 μM de arsenito de sodio. Detectando un claro incremento de p53, pero en esta ocasión por su unión al DNA equivalente a su activación (Figura 21A).

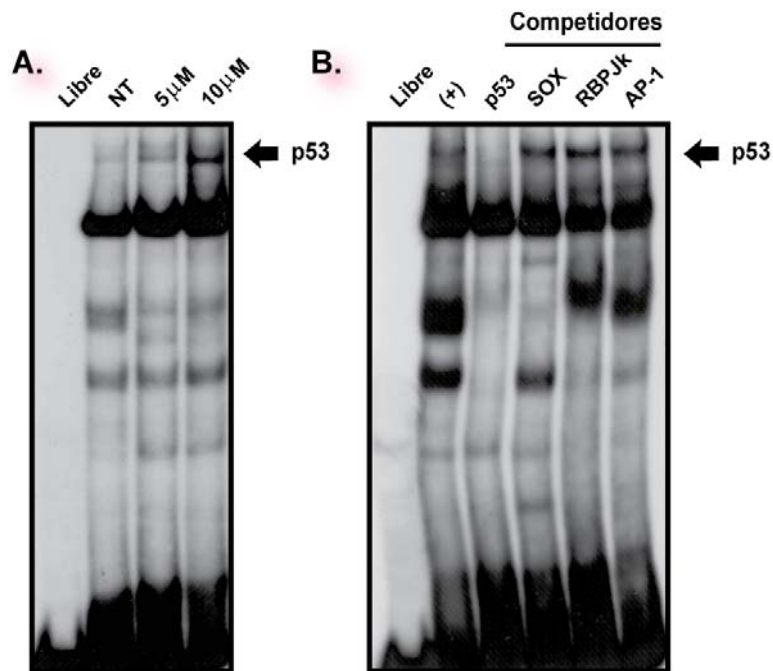


Figura 21. Actividad de p53 como factor de transcripción. Unión de p53 a su secuencia consenso en el promotor del gen de p21 de células C6 tratadas 24 h a 5 y 10 μM de arsenito de sodio; analizado por Ensayos de retardamiento en **A** y caracterización del complejo por Ensayo de competencia (un exceso de 100 veces cada competidor) en **B**.

La interacción p53-DNA fue caracterizada también por ensayos de competencia, para lo cual empleamos secuencias no marcadas, homologas de unión a p53 y secuencias no reconocidas por p53 como AP1, Sox y RBPJk; todas como competidoras y en un exceso molar de 100 veces. Como se esperaba la secuencia homologa abatió la formación del complejo p53-DNA (Figura 21B); contrariamente se observó con el resto de las secuencias, lo cual confirma especificidad de la interacción.

La vía de señalización y activación de p53/p21 juega un importante papel en la regulación de la transición G1/S en respuesta a estrés, como daño al DNA. En células

C6 tratadas con 5 y 10 μM de arsenito de sodio por 24 h, los niveles de p53 se incrementaron notablemente (Figura 18); Sin embargo al determinar los niveles de mRNA de p21^{WAF1} (gen blanco de p53) analizado por RT-PCR los resultados indicaron que no existen cambios a nivel transcripcional de p21^{WAF1} inhibidor de Cdk's a 24 h de tratamiento (Figura 22).

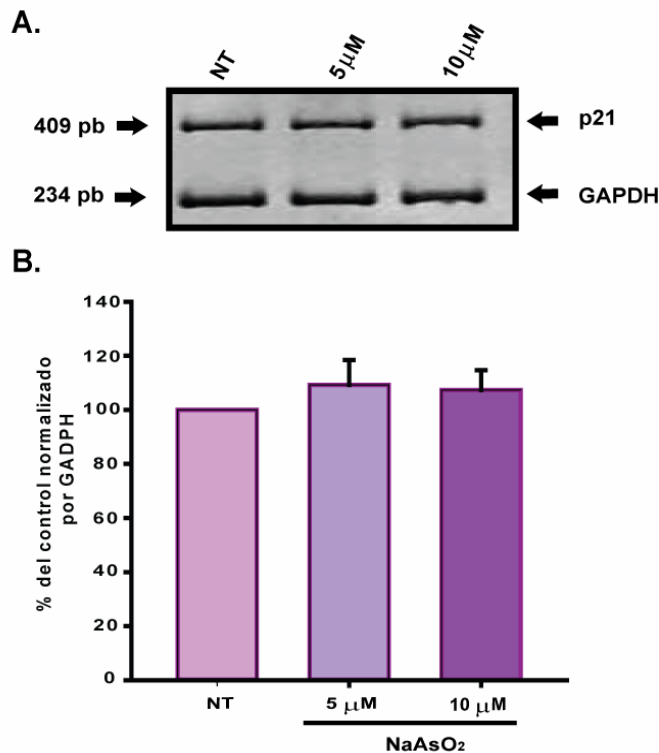


Figura 22. Efecto del arsenito de sodio sobre los niveles de mRNA p21. Células C6 de glioma fueron tratadas 24 h con arsenito de sodio, los niveles de mRNA fueron analizados por RT-PCR (A), cuantificados por densitometría y normalizados por el mRNA de GAPDH (B).

El arsenito de sodio disminuye los niveles de ciclina D1 en consecuencia al arresto celular.

El ciclo celular de eucariontes es controlado por cinasas dependientes de ciclina (Cdk's), que para ser activas son reguladas formando un complejo con las proteínas ciclinas (Bashir and Pagano 2005). Como se ha mencionando, en respuesta al daño del DNA se activa la proteína p53, que es capaz de inducir la expresión del gen p21 y este a su vez inhibe a complejos ciclina-cinasa como ciclina D1-Cdk4,6, vía que tiene como efecto final arresto celular. Entonces, para comprobar si en las células C6 el arresto

celular en G1 por la activación de p53 afecta los niveles de ciclina D1, esta proteína se analizó por inmunodetección en fase sólida. En la Figura 23 se observa que los niveles disminuyen de manera significativa, lo cual permite confirmar el arresto celular y la participación de p53.

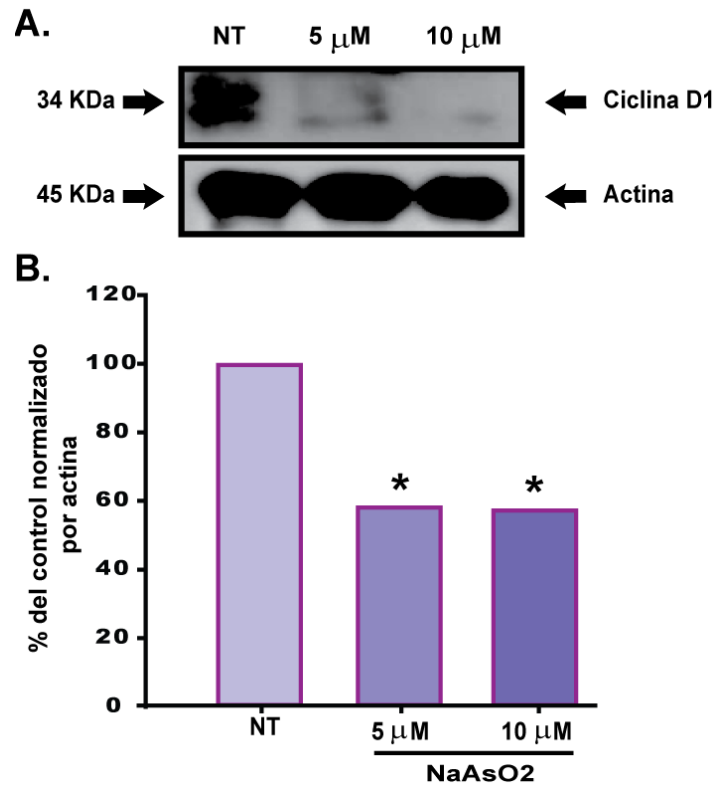


Figura 23. El tratamiento con arsenito de sodio disminuye los niveles de ciclina D1. Células C6 tratadas con 5 y 10 μM de arsenito de sodio por 24 h, se analizaron los niveles de ciclina D1 por inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpo anti-D1 y normalizado con la proteína actina en **A**, cuantificación con el software Image Quant (*p<0.05) en **B**.

X. DISCUSIÓN

La contaminación del agua de bebida por el arsénico se ha convertido en un problema de salud, debido a que este metaloide es capaz de atravesar la barrera placentaria y acumularse en el neuroepitelio embrionario, lo cual trae como consecuencia cambios en el desarrollo y crecimiento de células del SNC como las neuronas y la glía. La exposición durante el desarrollo se asocia a alteraciones en comportamiento, aprendizaje, memoria, actividad motora, entre otros (Rodríguez et al. 2001). Esto implica que es necesario establecer modelos en líneas celulares que nos permitan analizar con detalle los mecanismos moleculares del daño neuroglial.

La apreciación del papel de las células gliales ha dado un giro, ya que se ha demostrado que además de su papel de soporte y migración, participan en numerosas funciones cerebrales como, modulación de la sinapsis, crecimiento axonal, todos importantes en la estabilización de los procesos de aprendizaje y memoria. Por tal motivo estudiamos el mecanismo de toxicidad del arsenito de sodio en células gliales.

Diferentes estudios muestran que el efecto citotóxico del arsénico depende del tipo celular y hay variedad cuando se comparan cultivos primarios con líneas celulares, particularmente en lo que se refiere a la dosis tolerable de cada sistema (Mei *et al.* 2003). Se observó efecto citotóxico mínimo en las células C6 de glioma de rata expuestas a las concentraciones de 5 y 10 μM de arsenito de sodio (Figura 17A), indicativo de una mayor resistencia, probablemente debida a la capacidad de biotransformación dado por la especie. Adicionalmente, datos recientes en nuestro laboratorio indican que la capacidad de las células gliales para metabolizar el arsénico es eficiente, generando DMA (Yaneth Castro, Tesis Doctoral en proceso).

Dado que la determinación de la viabilidad se realizó por el método de MTT, tomando en consideración que el arsénico genera ROS y ello altera la integridad mitocondrial, se ponía en duda el resultado de dicho método, ya que corresponde a una reacción de reducción por enzimas mitocondriales; por tanto para corroborar este resultado se

empleó un segunda medida, el método de rojo neutro, por el cual a una concentración de 10 μM se observa el mismo efecto citotóxico aproximadamente del 22% que cuando se determinó por MTT (Figura 17B), esto permitió establecer el rango de dosis de trabajo que van de 5 a 10 μM de arsenito de sodio y determinar la confiabilidad del método de MTT.

Los mecanismos de toxicidad del arsénico hasta ahora descritos en líneas celulares principalmente giran con respecto a su capacidad de inducir apoptosis en diferentes tipos de células como HL60 (APL), Mieloma, U937 (leucemia monocítica), IMR-32 y SH-SY5Y (neuroblastoma) (Woo et al. 2006; Cheng et al. 2007; Cheung et al. 2007); y la inhibición precedente de crecimiento y arresto celular de cultivos primarios de células cerebrales y líneas celulares como SH-SY5Y, U87MG y T98G (glioma) (Chattopadhyay et al. 2002; Zhao et al. 2002; Sidhu et al. 2006); además la inducción de la diferenciación en cultivos primarios de queratinocitos humanos normales (QHN) (Sandoval et al. 2007). En este estudio, empezamos por establecer dosis de exposición que resultaran no citotóxicas, así, cuando las células C6 fueron expuestas a una concentración de 5 μM se observó una disminución en el crecimiento celular (Figura 18) comparada con el control, siendo mas notable después de 30 h y sugiriendo un mecanismo de arresto celular. Las células C6 tratadas con arsenito de sodio y analizadas por citometría de flujo mostraron un incremento en el porcentaje de células en fase G1, corroborado por la disminución de las células en fase S, síntesis de DNA (Figura 19) y confirmando el arresto celular a una concentración de 5 μM ; de manera diferente se observó que a la concentración de 10 μM las células en las diferentes fases del ciclo no mostraban cambios significativos, sin embargo en las imágenes de la citometría se percibía una gran cantidad de restos celulares y en el ensayo de proliferación, esta disminuía respecto al tiempo.

Durante arresto celular (fase G1) se han asociado moléculas involucradas en la vía p53/p21 por daño al DNA, que en consecuencia inhiben el complejo ciclina D1-Cdk 4/6 impidiendo así la progresión del ciclo celular. La exposición a arsénico resulta en una activación de la proteína p53 en diferentes sistemas celulares, entre ellos QHN

(Sandoval et al. 2007) y SH-SY5Y (Robledo 2008); sin embargo respecto a células gliales la activación de p53 está en discrepancia. Zhao y col. en el 2002 demuestran que células de glioma expuestas a una especie de arsénico inorgánico (Trióxido de arsénico As_2O_3), son arrestadas en fase G1 y G2 dependiendo del estado de la proteína p53 (*wild-type* o mutada), observando sin embargo un incremento en sus niveles; en 2007 el mismo grupo usando ensayos de microarreglos, demuestran que el mRNA de p53 en una línea de glioma *wild-type* y otra mutada, incrementa sus niveles después de un tratamiento de 24 h con arsénico a una concentración de 2 μM (Zhao et al. 2002; Zhao et al. 2007), mientras que Cheng y col. en 2007 demuestran que de 1-25 μM de trióxido de arsénico por 24 h los niveles de p53 disminuyen dependiente de la dosis. No obstante, en este trabajo al exponer células C6 (p53 *wild-type*) a arsenito de sodio, se observó un incremento en los niveles de la proteína p53 por inmunodetección en fase sólida (Figura 20) y significativamente por ensayos de retardamiento (Figura 21A). Tomando en consideración lo descrito aquí, lo más probable es que los tiempos y status de las células en los que se determina la activación de los niveles de p53 sean los que dictaminan estas diferencias: se ha probado que neuronas diferenciadas por 7 días muestran una menor cantidad de p53, al compararlas con las que aún proliferan (Tieu *et al.* 1999).

La proteína p53 puede ser activada mediante estímulos como daño al DNA y su actividad protectora esta dada principalmente por su actividad como factor transcripcional; entonces la función de p53 es la transactivación de genes blanco involucrados en arresto celular y apoptosis, entre ellos p21^{WAF1}. En este sentido analizamos la unión de p53 al DNA para confirmar el incremento en los niveles de proteína por un ensayo de mayor sensibilidad, así como su actividad de transactivación. Por ensayos de retardamiento se demostró que los niveles de proteína p53 se incrementan de manera dependiente de la concentración de arsenito de sodio (Figura 21A), con ello la unión al DNA, por la formación del complejo p53-DNA previamente caracterizado (Figura 21B). Sin embargo, respecto a su capacidad de transactivación, el mRNA de p21^{WAF1} no sufrió alteraciones después de la exposición a arsenito de sodio (Figura 22); este último comportamiento puede ser atribuido a que p21^{WAF1} es regulado

a diferentes niveles tal como transcripción y degradación ubiquitina-proteosoma, al reportarse que la inhibición de la actividad del proteosoma resulta en la acumulación de p21^{WAF1} (Chen *et al.* 1999). Weng y col. en el 2005 demuestran que el mRNA de p21^{WAF1} en células C6 no es inducido significativamente por crisina (compuesto polifenólico presente en plantas), sin embargo, describen que para detectar la acumulación de p21^{WAF1} es necesaria su estabilización, con lo cual se previno su degradación por la vía p38/MAPK mediante fosforilación, contribuyendo al mecanismo de arresto celular (Weng *et al.* 2005).

Como se ha mencionado, el ciclo celular es altamente regulado por la expresión y función de proteínas como Cdk's, ciclinas, p53/p21^{WAF1} y Rb. El complejo ciclina D1-Cdk 4/6 en células eucariontes es la llave para la progresión de la fase G1/S, la activación de este complejo fosforila a la proteína Rb, quien libera a E2F y activa a genes blanco que participan en la progresión de la fase G1 a S (Donjerkovic and Scott 2000). En diferentes reportes se muestra que el arsénico es capaz de arrestar a las células modificando a su vez el nivel de ciclinas y la actividad de Cdk's; en células de neuroblastoma se observó que después del tratamiento con arsénico, ciclina B1 aumenta sus niveles, mientras que ciclina D y E disminuyen significativamente (Woo *et al.* 2006) por un arresto en G2/M; pero en células de glioma expuestas al arsénico disminuye los niveles de ciclina B1 combinado con arresto en G2/M en células con p53 mutado y disminución en los niveles de ciclina D1 en relación con un arresto celular en G1 cuando p53 es *wild-type* (Zhao *et al.* 2002).

Al contar con el antecedente de arresto celular en fase G1, en el presente estudio nos interesamos por conocer si existían cambios significativos en los niveles de la proteína ciclina D1 en las células C6 después del tratamiento con arsenito de sodio. En la Figura 23 se muestra que los niveles de ciclina D1 disminuyen de manera significativa, reforzando la hipótesis de arresto celular por arsenito de sodio relacionado con la activación de la proteína p53, y correspondiente al comportamiento antes observado en otras líneas celulares del SNC.

En este trabajo estandarizamos las condiciones para analizar los efectos del arsenito de sodio a nivel molecular, demostramos que a dosis no citotóxicas, como aquellas a las cuales están expuestas las personas en las regiones endémicas, la activación de p53, la disminución en la tasa de proliferación, el arresto del ciclo celular y la disminución clara en ciclina D1, son indicios claros del daño celular inducido por el arsenito de sodio.

XI. CONCLUSIONES

El arsenito de sodio disminuye la tasa de proliferación en las células C6, generando un arresto celular en la fase G1, asociado a la disminución de la proteína ciclina D1 en respuesta a la activación/estabilización de la proteína p53.

La exposición a arsénico activó a la proteína p53, en consecuencia afectó su actividad como factor transcripcional por un aumento en la interacción DNA-proteína; sin embargo su actividad de transactivación no se pudo determinar, ya que los niveles de mRNA de p21^{WAF1} no se vieron afectados, posiblemente por su rápida degradación vía proteosoma.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Alao J. P. (2007) The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular cancer* **6**, 24.
- Alarcon-Vargas D. and Ronai Z. (2002) p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis* **23**, 541-547.
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A. and Lewis J. (2004) *Essential Cell Biology*, 2a Edition. WH Freeman and company, New York. USA.
- Aloni-Grinstein R., Schwartz D. and Rotter V. (1995) Accumulation of wild-type p53 protein upon gamma-irradiation induces a G2 arrest-dependent immunoglobulin kappa light chain gene expression. *The EMBO journal* **14**, 1392-1401.
- Atadja P., Wong H., Garkavtsev I., Veillette C. and Riabowol K. (1995) Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 8348-8352.
- Bakiri L., Lallemand D., Bossy-Wetzel E. and Yaniv M. (2000) Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *The EMBO journal* **19**, 2056-2068.
- Baldin V., Lukas J., Marcote M. J., Pagano M. and Draetta G. (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & development* **7**, 812-821.
- Bansal S. K., Haldar N., Dhand U. K. and Chopra J. S. (1991) Phrenic neuropathy in arsenic poisoning. *Chest* **100**, 878-880.
- Bashir S., Sharma Y., Irshad M., Gupta S. D. and Dogra T. D. (2006) Arsenic-induced cell death in liver and brain of experimental rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **98**, 38-43.
- Bashir T. and Pagano M. (2005) Cdk1: the dominant sibling of Cdk2. *Nature cell biology* **7**, 779-781.
- Berbel-Garcia A., Gonzalez-Aguirre J. M., Botia-Paniagua E., Orts-Castro E., Lopez-Zuazo I., Rodriguez-Garcia J. L. and Gil-Madre J. (2004) [Acute polyneuropathy and encephalopathy caused by arsenic poisoning]. *Revista de neurologia* **38**, 928-930.
- Bromberg J. F., Wrzeszczynska M. H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R. G., Albanese C. and Darnell J. E., Jr. (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* **98**, 295-303.
- Bucio Jurado W. (2005) [Arsenic intoxication: information and case report]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **43**, 57-60.
- Coqueret O. (2002) Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* **299**, 35-55.
- Chaîneau E., Binet S., Pol D., Chatellier G. and Meininger V. (1990) Embryotoxic effects of sodium arsenite and sodium arsenate on mouse embryos in culture. *Teratology* **41**, 105-112.

- Chattopadhyay S., Bhaumik S., Nag Chaudhury A. and Das Gupta S. (2002) Arsenic induced changes in growth development and apoptosis in neonatal and adult brain cells in vivo and in tissue culture. *Toxicology letters* **128**, 73-84.
- Chen Y. J., Lin J. K. and Lin-Shiau S. Y. (1999) Proliferation arrest and induction of CDK inhibitors p21 and p27 by depleting the calcium store in cultured C6 glioma cells. *European journal of cell biology* **78**, 824-831.
- Cheng T. J., Wang Y. J., Kao W. W., Chen R. J. and Ho Y. S. (2007) Protection against arsenic trioxide-induced autophagic cell death in U118 human glioma cells by use of lipoic acid. *Food Chem Toxicol* **45**, 1027-1038.
- Cheung W. M., Chu P. W. and Kwong Y. L. (2007) Effects of arsenic trioxide on the cellular proliferation, apoptosis and differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer letters* **246**, 122-128.
- Del Razo L. M., Quintanilla-Vega B., Brambila-Colombres E., Calderon-Aranda E. S., Manno M. and Albores A. (2001) Stress proteins induced by arsenic. *Toxicology and applied pharmacology* **177**, 132-148.
- Delgado J. M., Dufour L., Grimaldo J. I., Carrizales L., Rodriguez V. M. and Jimenez-Capdeville M. E. (2000) Effects of arsenite on central monoamines and plasmatic levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in mice. *Toxicology letters* **117**, 61-67.
- Donjerkovic D. and Scott D. W. (2000) Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell research* **10**, 1-16.
- Dowdy S. F., Hinds P. W., Louie K., Reed S. I., Arnold A. and Weinberg R. A. (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* **73**, 499-511.
- Drucker R. (2005) *Fisiología Médica*. El manual moderno, México.
- Ewen M. E., Sluss H. K., Sherr C. J., Matsushime H., Kato J. and Livingston D. M. (1993) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* **73**, 487-497.
- Fields R. D. and Stevens-Graham B. (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science (New York, N.Y)* **298**, 556-562.
- Fu M., Wang C., Li Z., Sakamaki T. and Pestell R. G. (2004) Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**, 5439-5447.
- Fuchs E. J., McKenna K. A. and Bedi A. (1997) p53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires Fas/APO-1-independent activation of CPP32beta. *Cancer research* **57**, 2550-2554.
- Garcia-Chavez E., Jimenez I., Segura B. and Del Razo L. M. (2006) Lipid oxidative damage and distribution of inorganic arsenic and its metabolites in the rat nervous system after arsenite exposure: influence of alpha tocopherol supplementation. *Neurotoxicology* **27**, 1024-1031.
- Gerlier D. and Thomasset N. (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods* **94**, 57-63.

Gu W. and Roeder R. G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606.

Handayani T., Sakinah S., Nallappan M. and Pihie A. H. (2007) Regulation of p53-, Bcl-2- and caspase-dependent signaling pathway in xanthorrhizol-induced apoptosis of HepG2 hepatoma cells. *Anticancer research* **27**, 965-971.

Hartwig A., Pelzer A., Asmuss M. and Burkle A. (2003) Very low concentrations of arsenite suppress poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian cells. *International journal of cancer* **104**, 1-6.

Hinz M., Krappmann D., Eichten A., Heder A., Scheidereit C. and Strauss M. (1999) NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Molecular and cellular biology* **19**, 2690-2698.

Hu Y., Jin X. and Snow E. T. (2002) Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF-kappaB DNA binding activity and related gene expression. *Toxicology letters* **133**, 33-45.

Huang C., Bode A. M., Chen N. Y., Ma W. Y., Li J., Nomura M. and Dong Z. (2001) Transactivation of AP-1 in AP-1-luciferase reporter transgenic mice by arsenite and arsenate. *Anticancer research* **21**, 261-267.

Hughes M. F. (2002) Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology letters* **133**, 1-16.

Ishikawa K., Ishii H., Murakumo Y., Mimori K., Kobayashi M., Yamamoto K., Mori M., Nishino H., Furukawa Y. and Ichimura K. (2007) Rad9 modulates the P21WAF1 pathway by direct association with p53. *BMC molecular biology* **8**, 37.

Itoh T., Zhang Y. F., Murai S., Saito H., Nagahama H., Miyate H., Saito Y. and Abe E. (1990) The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicology letters* **54**, 345-353.

Jin S., Zhao H., Fan F., Blanck P., Fan W., Colchagie A. B., Fornace A. J., Jr. and Zhan Q. (2000) BRCA1 activation of the GADD45 promoter. *Oncogene* **19**, 4050-4057.

Kochhar T. S., Howard W., Hoffman S. and Brammer-Carleton L. (1996) Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chromosome alterations in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology letters* **84**, 37-42.

Lee R. J., Albanese C., Stenger R. J., Watanabe G., Inghirami G., Haines G. K., 3rd, Webster M., Muller W. J., Brugge J. S., Davis R. J. and Pestell R. G. (1999) pp60(v-src) induction of cyclin D1 requires collaborative interactions between the extracellular signal-regulated kinase, p38, and Jun kinase pathways. A role for cAMP response element-binding protein and activating transcription factor-2 in pp60(v-src) signaling in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **274**, 7341-7350.

Lee Y. S., Wan J., Kim B. J., Bae M. A. and Song B. J. (2006) Ubiquitin-dependent degradation of p53 protein despite phosphorylation at its N terminus by acetaminophen. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **317**, 202-208.

Levine A. J., Finlay C. A. and Hinds P. W. (2004) P53 is a tumor suppressor gene. *Cell* **116**, S67-69, 61 p following S69.

- Lodish H., Arnold B., Paul M., Chis K. and Krieger M. (2005) *Biología Celular y Molecular*, 5a Edition. Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Loenen W. A. (2006) S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochem Soc Trans* **34**, 330-333.
- Lu H. and Levine A. J. (1995) Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5154-5158.
- Matsumura I., Kitamura T., Wakao H., Tanaka H., Hashimoto K., Albanese C., Downward J., Pestell R. G. and Kanakura Y. (1999) Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *The EMBO journal* **18**, 1367-1377.
- Mei N., Lee J., Sun X., Xing J. Z., Hanson J., Le X. C. and Weinfeld M. (2003) Genetic predisposition to the cytotoxicity of arsenic: the role of DNA damage and ATM. *Faseb J* **17**, 2310-2312.
- Miller W. H., Jr., Schipper H. M., Lee J. S., Singer J. and Waxman S. (2002) Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer research* **62**, 3893-3903.
- Moll U. M., LaQuaglia M., Benard J. and Riou G. (1995) Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4407-4411.
- Momand J., Wu H. H. and Dasgupta G. (2000) MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **242**, 15-29.
- Monell C. (2004) p53 Signaling Pathway.
- Nagaraja T. N. and Desiraju T. (1994) Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Human & experimental toxicology* **13**, 353-356.
- Nagata D., Suzuki E., Nishimatsu H., Satonaka H., Goto A., Omata M. and Hirata Y. (2001) Transcriptional activation of the cyclin D1 gene is mediated by multiple cis-elements, including SP1 sites and a cAMP-responsive element in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 662-669.
- Namgung U. and Xia Z. (2001) Arsenic induces apoptosis in rat cerebellar neurons via activation of JNK3 and p38 MAP kinases. *Toxicology and applied pharmacology* **174**, 130-138.
- Papazoglu C. and Mills A. A. (2007) p53: at the crossroad between cancer and ageing. *The Journal of pathology* **211**, 124-133.
- Pierce B. (2005) *Genetics: A conceptual approach*, 2a Edition. WH Freeman and Company, New York. USA.
- Piette J., Neel H. and Marechal V. (1997) Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* **15**, 1001-1010.
- Robledo J. (2008) EFFECTS OF SODIUM ARSENITE ON p53 IN THE SH-SY5Y CELL LINE, in *Departamento de Genética y Biología Molecular*. Cinvestav.

Rocha S., Martin A. M., Meek D. W. and Perkins N. D. (2003) p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Molecular and cellular biology* **23**, 4713-4727.

Rodriguez V. M., Carrizales L., Jimenez-Capdeville M. E., Dufour L. and Giordano M. (2001) The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat. *Brain research bulletin* **55**, 301-308.

Rodriguez V. M., Carrizales L., Mendoza M. S., Fajardo O. R. and Giordano M. (2002) Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicology and teratology* **24**, 743-750.

Sakaguchi K., Herrera J. E., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassilev A., Anderson C. W. and Appella E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & development* **12**, 2831-2841.

Samikkannu T., Chen C. H., Yih L. H., Wang A. S., Lin S. Y., Chen T. C. and Jan K. Y. (2003) Reactive oxygen species are involved in arsenic trioxide inhibition of pyruvate dehydrogenase activity. *Chemical research in toxicology* **16**, 409-414.

Sandoval M., Morales M., Tapia R., del Carmen Alarcon L., Sordo M., Ostrosky-Wegman P., Ortega A. and Lopez-Bayghen E. (2007) p53 response to arsenic exposure in epithelial cells: protein kinase B/Akt involvement. *Toxicol Sci* **99**, 126-140.

Satyanarayana A., Hilton M. B. and Kaldis P. (2008) p21 Inhibits Cdk1 in the Absence of Cdk2 to Maintain the G1/S Phase DNA Damage Checkpoint. *Molecular biology of the cell* **19**, 65-77.

Scott N., Hatlelid K. M., MacKenzie N. E. and Carter D. E. (1993) Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chemical research in toxicology* **6**, 102-106.

Schiller C. M., Fowler B. A. and Woods J. S. (1977) Effects of arsenic on pyruvate dehydrogenase activation. *Environmental health perspectives* **19**, 205-207.

Schulz H., Nagymajtenyi L., Institoris L., Papp A. and Siroki O. (2002) A study on behavioral, neurotoxicological, and immunotoxicological effects of subchronic arsenic treatment in rats. *Journal of toxicology and environmental health* **65**, 1181-1193.

Shaulsky G., Goldfinger N., Tosky M. S., Levine A. J. and Rotter V. (1991) Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene* **6**, 2055-2065.

Shtutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D'Amico M., Pestell R. and Ben-Ze'ev A. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5522-5527.

Sidhu J. S., Ponce R. A., Vredevoogd M. A., Yu X., Gribble E., Hong S. W., Schneider E. and Faustman E. M. (2006) Cell cycle inhibition by sodium arsenite in primary embryonic rat midbrain neuroepithelial cells. *Toxicol Sci* **89**, 475-484.

Sionov R. V. and Haupt Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**, 6145-6157.

Somasundaram K. (2000) Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci* **5**, D424-437.

Stevens B., Porta S., Haak L. L., Gallo V. and Fields R. D. (2002) Adenosine: a neuronal transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* **36**, 855-868.

Sul J. Y., Orosz G., Givens R. S. and Haydon P. G. (2004) Astrocytic Connectivity in the Hippocampus. *Neuron glia biology* **1**, 3-11.

Tieu K., Zuo D. M. and Yu P. H. (1999) Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of bcl-2 and p53 proteins. *Journal of neuroscience research* **58**, 426-435.

Vahidnia A., van der Voet G. B. and de Wolff F. A. (2007) Arsenic neurotoxicity--a review. *Human & experimental toxicology* **26**, 823-832.

Vahter M. and Concha G. (2001) Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacology & toxicology* **89**, 1-5.

Wang A., Holladay S. D., Wolf D. C., Ahmed S. A. and Robertson J. L. (2006) Reproductive and developmental toxicity of arsenic in rodents: a review. *International journal of toxicology* **25**, 319-331.

Watanabe G., Albanese C., Lee R. J., Reutens A., Vairo G., Henglein B. and Pestell R. G. (1998) Inhibition of cyclin D1 kinase activity is associated with E2F-mediated inhibition of cyclin D1 promoter activity through E2F and Sp1. *Molecular and cellular biology* **18**, 3212-3222.

Wei C. L., Wu Q., Vega V. B., Chiu K. P., Ng P., Zhang T., Shahab A., Yong H. C., Fu Y., Weng Z., Liu J., Zhao X. D., Chew J. L., Lee Y. L., Kuznetsov V. A., Sung W. K., Miller L. D., Lim B., Liu E. T., Yu Q., Ng H. H. and Ruan Y. (2006) A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* **124**, 207-219.

Weng M. S., Ho Y. S. and Lin J. K. (2005) Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical pharmacology* **69**, 1815-1827.

Wester R. C., Maibach H. I., Sedik L., Melendres J. and Wade M. (1993) In vivo and in vitro percutaneous absorption and skin decontamination of arsenic from water and soil. *Fundam Appl Toxicol* **20**, 336-340.

Wester R. C., Hui X., Barbadillo S., Maibach H. I., Lowney Y. W., Schoof R. A., Holm S. E. and Ruby M. V. (2004) In vivo percutaneous absorption of arsenic from water and CCA-treated wood residue. *Toxicol Sci* **79**, 287-295.

Woo S. Y., Lee M. Y., Jung Y. J., Yoo E. S., Seoh J. Y., Shin H. Y., Ahn H. S. and Ryu K. H. (2006) Arsenic trioxide inhibits cell growth in SH-SY5Y and SK-N-AS neuroblastoma cell lines by a different mechanism. *Pediatric hematology and oncology* **23**, 231-243.

Yin Y., Stephen C. W., Luciani M. G. and Fahraeus R. (2002) p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nature cell biology* **4**, 462-467.

Zhao S., Tsuchida T., Kawakami K., Shi C. and Kawamoto K. (2002) Effect of As₂O₃ on cell cycle progression and cyclins D1 and B1 expression in two glioblastoma cell lines differing in p53 status. *International journal of oncology* **21**, 49-55.

Zhao S., Zhang J., Zhang X., Dong X. and Sun X. (2007) Arsenic trioxide induces different gene expression profiles of genes related to growth and apoptosis in glioma cells dependent on the p53 status. *Molecular biology reports*.