

1
2e1

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO**

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**EFFECTO DEL ARSENITO DE SODIO SOBRE
EL GEN SUPRESOR DE TUMORES p53.**

T E S I S
**QUE PRESENTA PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA**

BASICA

P R E S E N T A :

DANIEL MENENDEZ RENDON

CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F.

MAYO 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Biología Molecular y en el departamento de Genética y Toxicología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá.

"... mariposas, mariposas, que emergieron de lo
oscuro, bailarinas silenciosas, tu tiempo es,
para una mariposa..."

Silvio Rodríguez

A mi madre y a mi padregracias.

A Liz, por su amor, compañía, apoyo y paciencia durante todo este tiempo.
In Ka' Teech,

Este trabajo está dedicado de una manera muy especial

A la Dra. Ostrosky por todas sus enseñanzas, académicas y personales. su enorme amistad y su confianza en mí. Gracias

A Isabel y Julio por su continuo apoyo y cariño.

A mi sobrina María Eugenia por ser una razón más para seguir.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi jurado, Dr. Mancilla, Dr. Hasnberg, Dr. García Carrancá, Dr. Alfaro y Dra. Tusié, por sus correcciones y comentarios sobre este trabajo.

Al Dr. Alejandro García Carrancá por su apoyo y confianza durante todo este tiempo.

Al Dr. Emilio Rojas, por su amistad, el enseñarme a ver este negocio desde otra panorámica y sobre todo por compartir sus conocimientos.

A Ana María Salazar, por su amistad y valiosa participación durante el desarrollo de este trabajo.

A todos mis compañeros de ambos laboratorios Miriam, Carla, Ana, Laura, Benito, Salomón, Jorge, Néstor, Leticia, Marce, Lupita, Manuel, Emilio, Hilda, Francisco, la Sra. Julia, Ana, Paty Ramírez, Luis, Monse, Mari Carmen, Mara, Laura, Adriana, Rocío, Libia, Gaby, Luis Alonzo, Iván, Silvia y Auro por su continuo apoyo.

A Lilia, Josune, Maru, Emilio y Carlos por la amistad que me han brindado desde el inicio de la carrera.

A mis hermanas Gena, Georgina, Isabel y Verónica y respectivas familias, con todo mi cariño.

INDICE

I.-	Resumen.....	1
II.-	Planteamiento del problema.....	2
III.-	Introducción.....	3
IV.-	Exposición a metales.....	4
V.-	Arsénico	
	1) Generalidades.....	5
	2) Exposición ambiental al arsénico.....	6
	3) Efectos del arsénico.....	8
VI.-	El cáncer y su relación con el ciclo celular.....	12
	1) Genes supresores de tumores.....	15
	2) p53.....	17
VII.-	Hipótesis.....	27
VIII.-	Objetivos generales.....	27
IX.-	Objetivos particulares.....	27
X.-	Material y métodos.....	28
XI.-	Resultados.....	33
XII.-	Discusión y conclusiones.....	45
XIII.-	Perspectivas del trabajo.....	49
XIV.-	Referencias.....	50

INDICE DE FIGURAS.

Figura A.	Diagrama del ciclo celular en organismos eucariontes.....	17
Figura B.	Dominios funcionales y regiones de interacción de la proteína humana de p53.....	22
Figura C.	Espectro mutacional de la proteína p53.....	23
Figura 1.	Viabilidad de los linfocitos y de las líneas Jurkat y LCL-EBV tratados con arsenito de sodio 24 horas.....	37
Figura 2.	Vector pcDNA.....	38
Figura 3.	Expresión de la proteína p53 en células tratadas con arsenito de sodio.....	39
Figura 4.	Curva de electroporación-viabilidad de los linfocitos de la sangre periférica humana.....	40
Figura 5.	Viabilidad de los linfocitos normales y electroporados con pcDNA-53 y pcDNA-273 y tratados con arsenito de sodio	41
Figura 6.	Viabilidad de las células Jurkat electroporadas con pcDNA-53 y pcDNA-273 y tratadas con arsenito de sodio.....	42
Figura 7.	Viabilidad por azul tripano de los linfocitos y las células Jurkat electroporadas con el vector pcDNA y tratadas con arsenito de sodio 24 horas.....	43

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1.	Tipos de exposición al arsénico más frecuentes.....	9
Tabla 2.	Propiedades de los oncogenes, los genes supresores y los genes mutadores.....	18
Tabla 3.	Genes supresores de tumores conocidos y propuestos.....	20
Tabla I.	Viabilidad a 24 y a 48 horas de los linfocitos de la sangre periférica tratados con arsenito de sodio.....	44

I.- RESUMEN.

En base a estudios epidemiológicos el arsénico (As) está considerado como un carcinógeno para el hombre. Si bien los mecanismo por el cual este metaolide induce carcinogénesis aún no está determinado, varios reportes muestran evidencias de que los humanos expuestos al arsénico presentan altos índices de cáncer de piel, vejiga y pulmón entre otros tipos. Se sabe también que el arsénico produce daño a nivel cromosómico, induce la amplificación de genes, además de inhibir los mecanismos de reparación del ADN y de alterar la respuesta mitogénica de los linfocitos de individuos con hidroarsenicismo así como de los tratados en cultivo. Por otra parte, se sabe que el control de la proliferación celular está modulado por algunos oncogenes y genes supresores de tumores. Dentro de estos últimos p53 representa uno de los controles de mayor relevancia con el que cuentan las células para impedir el desarrollo de procesos neoplásicos, regulando los puntos de monitoreo en G1 y en el ensamble del huso mitótico durante la fase M del ciclo celular.

El presente estudio propone que la alteración de la proliferación de linfocitos inducida por el arsénico está mediada por daños al ADN y modificaciones en la expresión de p53. Se evaluó entonces, la viabilidad en linfocitos humanos de sangre periférica y en líneas celulares que tienen el gen p53 normal (LCLEBV) o mutado (Jurkat), después del tratamiento a diferentes concentraciones de arsenito de sodio. También se determinaron los niveles de expresión de la proteína p53 por Western-blot en los cultivos tratados con arsénico. Además, se transfectaron por electroporación los linfocitos y las células Jurkat con las formas normal y mutada de p53.

Se observó que las células que presentan el gen p53 funcional responden mejor contra el daño inducido por el arsénico. Aquellas células que fueron transfectadas con la versión mutada de este gen son más sensibles al efecto citotóxico del arsénico. Se mostró también que el arsénico a ciertas concentraciones, induce un incremento en los niveles de la proteína p53, el cual fue dependiente del tipo celular analizado.

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las alteraciones del ADN, por agentes químicos, físicos y biológicos está frecuentemente relacionada con los cambios en el control de muchas de las funciones de las células, entre ellas el control de la proliferación, la diferenciación y la muerte.

Estos eventos se encuentran regulados por los productos de lo que hoy conocemos como oncogenes y genes supresores de tumores, ambos involucrados en el desarrollo del cáncer. Entre los genes supresores de tumores, p53 es uno de los más importantes (Hansen y Oren, 1997). Ha sido llamado el guardián del genoma dado su papel esencial en detener el ciclo celular en ciertos puntos ante la existencia de daño al ADN, permitiendo su reparación y de no ser a si, la eliminación de la célula, evitando que la alteración pase a las células descendientes. Además, el gen p53 está mutado en aproximadamente el 50% de todos los cánceres humanos reportados, lo cual reafirma su importancia.

Dentro de los agentes conocidos que provocan alteraciones al ADN está el arsénico (As). Estudios epidemiológicos han mostrado que este metaloide es un carcinógeno para el hombre. La exposición al As está relacionada con un aumento en la frecuencia del cáncer de piel, vejiga, pulmón, riñón e hígado (Chen y Wang, 1990; Bates et.al.,1992).

Algunos estudios recientes han mostrado que el arsénico induce alteraciones en la proliferación de los linfocitos humanos cultivados (Gonsebat et.al., 1994; 1996). Así también se ha observado que la línea celular epitelial C33-A, que tiene el gen p53 mutado

son más sensibles al tratamiento con arsénico que otras células epiteliales que lo tienen normal (Salazar et.al., 1997, comunicación personal). Con el fin de entender los mecanismos carcinogénicos de este metaloide, se introdujeron versiones normales y alteradas del gen p53 a los linfocitos humanos de sangre periférica y a líneas celulares de tipo linfoide por la técnica de electroporación para evaluar los efectos del arsenito de sodio sobre la viabilidad de las células y de la expresión de la proteína de este gen.

III.- INTRODUCCION.

Los seres humanos estamos continuamente en contacto con una gran variedad de sustancias y compuestos tóxicos, naturales y artificiales, denominados xenobióticos, que se encuentran presentes en los agentes químicos, físicos y biológicos que están en el medio ambiente que nos rodea, en los desechos industriales, alimentos y medicamentos. La exposición de organismos a algunas de estas sustancias, se encuentra relacionada con daños en la información contenida en el material genético de las células y con la aparición de malformaciones congénitas, esterilidad, enfermedades degenerativas y cáncer (Brusick, 1987; Ehling, 1991).

Bajo este escenario de daño al ADN, a pesar de que existen datos que demuestran que algunos de estos agentes pueden favorecer los procesos de resistencia y reparación ya sea por su naturaleza o bien por el programa genético inducido, son mucho más los que provocan alteraciones que inducen masivos y rápidos cambios en la síntesis de varios transcritos y proteínas (Fornace, 1992; Herrlich et.al., 1992). La relevancia de la mayoría

de esos cambios aún no es comprendida y empiezan a ser estudiados, como por ejemplo las alteraciones a nivel de la expresión de genes.

IV.- EXPOSICION A METALES.

El rápido avance tecnológico-industrial y el desarrollo sociocultural del hombre a través de su historia ha incrementado lo que en conjunto se ha definido como "factores de riesgo". Está el caso por ejemplo de los metales y metaloides, algunos de los cuales han incrementado sus niveles en el medio ambiente y por lo tanto los humanos entran con mayor frecuencia en contacto con ellos. Sobresale desde luego la importancia del estudio de sus efectos, puesto que muchos de ellos además de ser tóxicos a corto plazo, son acumulables por lo cual también implica posibles alteraciones a largo plazo, pudiendo ambas tener graves consecuencias para la salud.

La exposición a metales y a metaloides como el arsénico (As), cromo (Cr), zinc (Zn), fierro (Fe), plomo (Pb), níquel (Ni), mercurio (Hg), cadmio (Cd) entre otros ocurre a través de diferentes maneras, como son la exposición ocupacional, ambiental o bien mediante la ingestión de alimentos. Formas iónicas de algunos de estos elementos constituyen lo que se denominan elementos traza del organismo, necesarios para la realización de funciones propias de todos los organismos, como lo serían la del Zn, Cu y Fe que sirven como cofactores para muchas enzimas y proteínas (Valle y Wacker, 1970; IARC, 1980). Sin embargo aún estos cuando se encuentran presentes en grandes

concentraciones pueden provocar una toxicidad severa, incluyendo muerte celular y daño genotóxico.

Por su parte, el Cd, Cr, Ni, As y Hg carecen de una función biológica obvia y son considerados como toxinas ambientales (Klaassen, 1991). Además de la toxicidad aguda causada por la inhibición de las enzimas involucradas en el metabolismo energético, síntesis de proteínas y transcripción, la exposición crónica al Cr, Ni, Cd y As puede resultar en la generación de diversos cánceres. (Snow, 1992). El As, Cr y Ni están considerados como carcinógenos para los seres humanos por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) por lo que la exposición a éstos o a los compuestos que forman, implican un riesgo para la salud (IARC,1980; Homminki, 1990).

A diferencia del Cr (Wolf et.al.,1989),el Ni (Ciccarelli y Wetterhahn,1985) y el Cd (Koizumi y Waalkes,1990) que pueden interaccionar directamente con los ácidos nucleicos y la cromatina, provocando daño genotóxico y mutagénesis (Cavigelli et.al., 1996), los mecanismos por los cuales ocurre la carcinogénesis por As aún no es del todo clara.

V.- ARSENICO.

I- Generalidades.

El arsénico (As) es un elemento clasificado dentro el grupo de los metaloides, que químicamente presenta dos valencias: la trivalente (III) y la pentavalente (V). Ubicuo en la naturaleza, se encuentra distribuido, principalmente en forma de minerales, como los

arsenuros de cobre, níquel y hierro, así también como en sulfuros u óxidos de arsénico. Comercialmente el compuesto más común es el óxido de arsénico (III) que resulta de la fundición del cobre o del hierro (Vahter, 1988), aunque también hay otras fuentes como lo son los productos de la combustión del carbón mineral, la producción de vidrio y cerámica, la fabricación de semiconductores y otros procesos industriales. Otros derivados arsenicales son empleados principalmente en la agricultura y silvicultura como pesticidas, herbicidas y silvicidas (WHO, 1981).

Este metaloide, conocido desde los tiempos de Hipócrates, durante mucho tiempo fue usado en aplicaciones medicinales y clínicas para combatir padecimientos como la anemia, la psoriasis, el asma bronquial, la sífilis, la disenteria amibiana e infecciones parasitarias como la tripanosomiasis y la tricomoniasis. Fueron en estas mismas aplicaciones donde posteriormente se observaron y determinaron sus efectos adversos, lo que llevo a su discontinuación para usos terapéuticos (IARC, 1980).

El arsénico fue el primer metal identificado como un carcinógeno (IARC, 1980), pese a que sus propiedades químicas lo describen como un metaloide con características similares al fósforo y con toxicidad parecida a la de los metales pesados, como el mercurio y el plomo.

2.- Exposición ambiental al arsénico.

Existen diversas formas a través de las cuales el ser humano puede estar expuesto al

arsénico (tabla 1), siendo las vías de incorporación al organismo de mayor importancia para la salud pública, la inhalación y la ingestión de compuestos arsenicales (Vahter, 1988).

Una vez incorporado al organismo, el As desaparece rápidamente de la sangre y es finalmente excretado en la orina. La vida media biológica del arsenito (arsénico trivalente) ingerido es aproximadamente de 30 horas, siendo excretado del 50 al 80% en aproximadamente tres días (Casarett y Doull, 1991; Yamaguchi y Fowler, 1994).

Las formas inorgánicas son metabolizadas mediante reacciones de óxido-reducción y metilación (Scott et.al., 1994) en el hígado, principal órgano biotransformador del arsénico (Klassen,1974; Tam et.al.,1978; Buchet y Lauwerys,1985). Las reacciones de metilación producen formas mono y dimetil arsenicales denominadas MMA y DMA respectivamente, siendo la primera el principal producto. Se ha sugerido que el proceso de detoxificación de las formas inorgánicas más tóxicas y del DMA parecen ser los metabolitos finales que se forman rápidamente y son excretados (EPRI, 1996; Casarett y Doull,1991). Por lo tanto, la capacidad de metilación de los individuos expuestos modularía la toxicidad de los compuestos arsenicales (ATSDR, 1991).

El agua es la forma principal de transporte natural del arsénico (WHO,1981). Este líquido puede estar naturalmente contaminado con elevadas cantidades de As por el alto contenido de este metaloide en rocas del subsuelo. El agua potable por lo general presenta bajas concentraciones de arsénico; sin embargo la actividad industrial y/o agrícola han

producido contaminaciones severas (mayores a 1 mg/l) en pozos, niveles muy por arriba de la norma permitida de 0.05 mg/litro establecida por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1993). (Cebrián, 1983; Sastre et.al., 1992; Tseng, 1977).

En zonas como la Comarca Lagunera y las regiones rurales del noreste de México, así como en el norte de Argentina y Chile, existen poblaciones crónicamente expuestas al arsénico inorgánico a través de la ingesta del agua contaminada ya sea natural o industrialmente (García Salcedo et al., 1984; Gonsebat et.al., 1992). En nuestro país por ejemplo, dicha exposición se ha asociado con una elevada presencia de alteraciones cutáneas y cáncer de piel, aunada a afecciones vasculares periféricas y otras lesiones que disminuyen la calidad y esperanza de vida (García Salcedo et al., 1984; Cebrián, 1983).

3.- Efectos del arsénico.

La intoxicación aguda con As inorgánico manifiesta síntomas a nivel de los sistemas respiratorio, gastrointestinal, cardiovascular, nervioso y hematopoyético, siendo el As trivalente más tóxico que el pentavalente (WHO, 1981). Las manifestaciones en intoxicaciones crónicas por arsénico incluyen: neuritis periférica, anemia moderada, leucopenia, problemas cardiovasculares, cirrosis, cáncer hepático primario y hepatobiliar (Díaz-Barriga et.al., 1990; WHO, 1981; Bencko, 1987).

A nivel celular se ha observado que el As afecta el proceso oxidativo realizado en las mitocondrias, estimulando la actividad de la ATPasa de estos organelos y la oxidación en la ausencia de fosfato inorgánico (Schiller et.al., 1977).

Tabla 1. TIPOS DE EXPOSICION AL ARSENICO MAS FRECUENTES.

Ocupacional: Se da principalmente por el arsénico inorgánico (óxido de arsénico) en el aire del ambiente del trabajo como en:

- a) fundidoras de metales como el cobre, oro, plomo y antimonio,
- b) plantas productoras de arsénico (óxido de arsénico) y de pesticidas que contienen arsénico,
- c) plantas generadoras de energía eléctrica que usan carbón mineral como fuente de combustión.

Ambiental: La exposición se da naturalmente por:

- a) consumo de agua con altas concentraciones de arsénico,
- b) consumo de alimentos (marinos).

O por la contaminación de:

- c) fuentes de agua potable (ríos, lagos, lagunas),
- d) el ambiente de las cercanías de las plantas industriales, fundidoras y productoras de arsénico.

Introgénica: Por el uso de medicamentos (principalmente antiparasitarios) que contienen arsénico, vgr. carbasone, melarsoprol y triparsamida.

(Bencko,1987; ATSDR,1989; WHO,1981 y 1993)

Hay evidencia de que el arsénico no es un mutágeno *in vitro* pero si ha mostrado tener capacidad clastogénica y comutagénica (Rossman,1981; Lee et.al., 1986; Li y Rossman, 1989a y b; Wan et.al., 1982), es decir, es capaz de dañar al ADN y de aumentar la capacidad mutagénica de una serie de compuestos con actividad genotóxica comprobada, por ejemplo, la luz ultravioleta y el alquilante metil metano sulfonato (Okui y

Fujiwara,1986; Li y Rossman,1989). También induce amplificaciones génicas en proteínas de estrés (Welch,1992) e inhibe la reparación del daño inducido por radiación ultravioleta o metil metano sulfonato en el ADN (Li y Rossman, 1989b; Jacobson-Kram y Montalbano,1985; Lee et.al., 1988).

Con el objetivo de identificar y entender los mecanismos involucrados en la toxicidad del arsénico, se han estudiado marcadores biológicos de genotoxicidad en algunas poblaciones expuestas. Estas investigaciones han mostrado que en cultivos de linfocitos de los individuos expuestos laboralmente o por tratamiento médico al arsénico, se encuentra una frecuencia elevada de aberraciones cromosómicas y de intercambios de cromátides hermanas (Burgdoff et al., 1977; Nordenson et.al., 1978 y 1979; Wen et.al., 1981).

Los estudios más recientes se han enfocado a la acción del As a nivel cromosómico, indicando la existencia de daño, tanto *in vivo* como *in vitro*, encontrándose aberraciones numéricas y estructurales así como micronúcleos (Gonsebatt et.al., 1992; Vega et.al., 1994; Ostrosky et.al.,1991). Puesto que los rompimientos son cromatídicos e isocromatídicos (Vega et.al.,1994), esto señala que el arsénico es un agente que actúa en la fase S del ciclo celular para producir daño (WHO,1985). También se ha mostrado el potencial aneugénico del arsénico en cultivos de linfocitos humanos debido a las alteraciones que causa nivel de las proteínas del citoesqueleto inhibiendo tanto la polimerización como la despolimerización del huso mitótico (Ramírez et.al., 1996).

Los estudios de citotoxicidad del arsénico muestran que una exposición crónica en individuos con hidroarsenicismo modifica la respuesta de proliferación inducida por la fitohemaglutinina (PHA) en los linfocitos circulantes, además del daño cromosómico ya mencionado, encontrándose que los parámetros de proliferación, como el índice de marcaje, índice mitótico e índice de replicación estuvieron alterados con respecto a los de grupos controles (Ostrosky-Wegman et al., 1991; Gonsebatt et al., 1992; 1994).

Resultados similares se han reportado en linfocitos humanos tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de arsenato y arsenito, hallándose alteraciones, tanto en la estimulación como en la proliferación, produciendo un retraso en la progresión del ciclo celular. Estos resultados han sido relacionados con la posible acción del arsénico como inmunosupresor de la respuesta celular, lo cual sugiere que la alteración en la respuesta inmune ante una posible exposición crónica de As, podría jugar un papel clave en el incremento en la incidencia de el cáncer en los grupos expuestos estudiados (Gonsebatt et al., 1992, 1994, 1996).

Estudios similares se han llevado a cabo en poblaciones taiwanesas, demostrándose que el hidroarsenicismo no sólo está asociado a una mayor incidencia de el cáncer de piel, sino que también los cánceres de vejiga, riñón, pulmón, hígado y colon tienen una mortalidad incrementada (Vahter, 1988; Mass y Wang, 1996).

VI.- EL CANCER Y SU RELACION CON EL CICLO CELULAR.-

La proliferación de las células involucra a dos de los procesos celulares más importantes: la replicación del ADN y la división celular, esta última resulta en la formación de dos células hijas a partir de una célula precursora y por lo tanto compartiendo la misma información genética (Murray y Hunt, 1993).

La maquinaria que controla el ciclo celular eucariótico está compuesta de complejos proteicos que son activados siguiendo un orden y desencadenando eventos tales como la misma replicación del ADN, la formación del huso mitótico y la segregación de los cromosomas. El ciclo de las células eucariotas está dividido en cuatro fases: G1, S, G2 y M. La fase S es el periodo de síntesis del ADN, durante el cual una segunda copia del genoma entero es generada. En la fase M o de mitosis las dos copias de ADN ya como cromosomas condensados se segregan y la célula se divide en dos células hijas genéticamente iguales. El tiempo que transcurre entre una mitosis y otra se denomina periodo de interfase. Los periodos G1 y G2 son espacios temporales de preparación previos a la replicación del ADN y a la división celular respectivamente y en donde se realiza un crecimiento en la masa celular, principalmente por la duplicación de los demás componentes de la células. Estas fases además sirven como puntos de monitoreo del ciclo.

Existe además, un estado de "reposo" de las células que no se encuentran en proliferación denominado G0, en el cual el metabolismo principal de la célula se encuentra disminuido, incluyendo muchos de los procesos usualmente activos como el de la

transcripción y de la síntesis de proteínas. La falta de factores de crecimiento pueden causar que las células salgan del ciclo y entren a G₀; la estimulación con factores de crecimiento a su vez, pueden inducir la re-entrada al estado de proliferación (Murray y Hunt, 1993; Weinstein y Zhou, 1997; Graña y Reddy, 1995).

La duración del ciclo celular depende del tipo celular que lo esté llevando a cabo y de las condiciones del ambiente celular. Los elementos responsables de permitir que la célula pase de una fase a otra son una serie de proteínas cinasas y fosfatasa que se activan y desactivan unas con otras. Las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk) son las responsables de fosforilar una serie de sustratos necesarios para la progresión del ciclo celular. Los niveles de estas proteínas no varían durante el ciclo, sin embargo sus actividades se regulan por sus interacciones con otro grupo de proteínas denominadas ciclinas, cuyos niveles sí fluctúan durante la realización del ciclo celular (Figura A) . La formación de estos complejos permiten que otras proteínas (que son codificadas por oncogenes y genes supresores de tumores, de los que se hablará más adelante) pueden interactuar y entonces modificar o controlar estos eventos (Graña y Reddy, 1995; Weinstein y Zhou, 1997).

Para asegurar la integridad de la célula y de su material genético, los eventos que ocurren durante el ciclo celular deben seguir una secuencia bien definida, el término de ciertos eventos debe preceder al comienzo de otros. Por ejemplo la replicación del ADN debe completarse antes de que la mitosis inicie para asegurar que ambas células reciban una

copia completa del genoma. Dentro del ciclo celular existen entonces, una serie de puntos de vigilancia para asegurar que el orden y el tiempo de los eventos sea el correcto (Murray, 1992). Estos puntos de monitoreo, como se les ha denominado trabajan como sensores que detectan problemas durante la progresión del ciclo y que mediante una cascada de señales este mensaje llega a efectores específicos que detienen el ciclo celular. En algunos de estos puntos el daño puede ser reparado o bien las células muy dañadas son eliminadas, en su gran mayoría por apoptosis (Hung et.al., 1996; Murray, 1992). Se habla de tres puntos de monitoreo importantes dentro del ciclo celular (Figura A): el de G2 que involucra la inhibición de la topoisomerasa II, el que monitorea la formación del uso mitótico durante M y el de la transición de G1/S. (Murray, 1992)

Una mutación puede hacer que una célula de apariencia normal, no reciba correctamente los mensajes externos y altere su proceso de división. Si bien es cierto que la célula tiene sistemas que detectan y llegan a corregir las mutaciones, algunos daños pasan inadvertidos. La acumulación de alteraciones genéticas puede transformar a la célula en tumorigénica que, a diferencia de una célula normal ya no responde a las señales inhibitorias que controlan su crecimiento, cambia su morfología y adquiere la propiedad de replicarse sin tasa. Finalmente, las células cancerosas invaden los tejidos sanos en cualquier zona corporal, se habla entonces de metástasis.

Se sabe que el cáncer es un proceso multifactorial y que se requieren numerosas mutaciones para desarrollarlo. Los tumores van adquiriendo sus características como

resultado de una serie progresiva de cambios. La mayor incidencia de cánceres con la edad sugiere que se requieren de 6 a 7 eventos para inducir un cáncer lo cual puede ocurrir en un periodo de 20 a 40 años (Harris,1993). Existen una gran variedad de agentes que incrementa incrementan la frecuencia de transformación de las células. A estas sustancias se les denominan carcinógenos que se clasifican en aquellos que "inician" y aquellos que "promueven" la formación de los tumores indicando la existencia de diferentes estadios en el desarrollo del cáncer.

1) GENES SUPRESORES DE TUMORES.

Los estudios en campos como la virología, la epidemiología, la biología molecular y la genética, se han combinado para que desde hace algunos años se descubrieran tres categorías de genes los cuales, cuando son alterados por mutaciones, pueden contribuir con el desarrollo del cáncer. Estos son: los oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes mutadores (tabla 2, Levine, 1995). Estos tres tipos de genes están involucrado en los procesos de la división celular, diferenciación y proliferación, así como en la fidelidad en la replicación del ADN y en la muerte celular.

El concepto de la supresión de la proliferación en células tumorales, se origina en los experimentos en los que se fusionaban células cancerosas tumorales con células no tumorigénicas de diversas clases, epitelial, linfoide, entre otras (Levine,1993). Las células híbridas resultantes, ya no eran capaces de producir tumores eeen los animales a los que se les inyectaba pese a que retenían la mayoría de las propiedades de las células cancerosas,

entre ellas su inmortalidad. Ocasionalmente algunos formaban tumores. El análisis cromosómico de estos hibridomas mostró que durante la fusión se habían perdido uno o más cromosomas de las células progenitoras. De aquí nació la posibilidad de que en las células normales existieran genes cuyos productos suprimieran la formación y desarrollo de tumores, genes que hoy en día son denominados supresores de tumores.

Los productos de la mayoría de los genes supresores de tumores actúan como reguladores negativos o inhibidores de las vías de transducción de señales. Las mutaciones en estos genes resultan en la desregulación de la división celular. Los genes supresores mutados son recesivos, de modo que se requiere que existan alteraciones en ambos alelos normales para eliminar su función.

Los genes supresores de tumores han sido motivo de estudio por muchos años (Weinberg, 1991). Hoy en día se conocen al menos una docena de ellos (tabla 3, Levine, 1993 y 1995). Muchas de las formas de cánceres humanos hereditarios, tales como el retinoblastoma y el síndrome de Ly-Fraumeni, son provocadas por la transmisión de genes supresores defectuosos, Rb y p53 respectivamente. Las demostraciones experimentales recientes sobre la restauración de la función de estos genes en algunas células tumorales ha dado como resultado el detenimiento del ciclo celular o la muerte celular (Muller et.al., 1993), lo cual confirma la importancia de estos genes en la biología del cáncer.

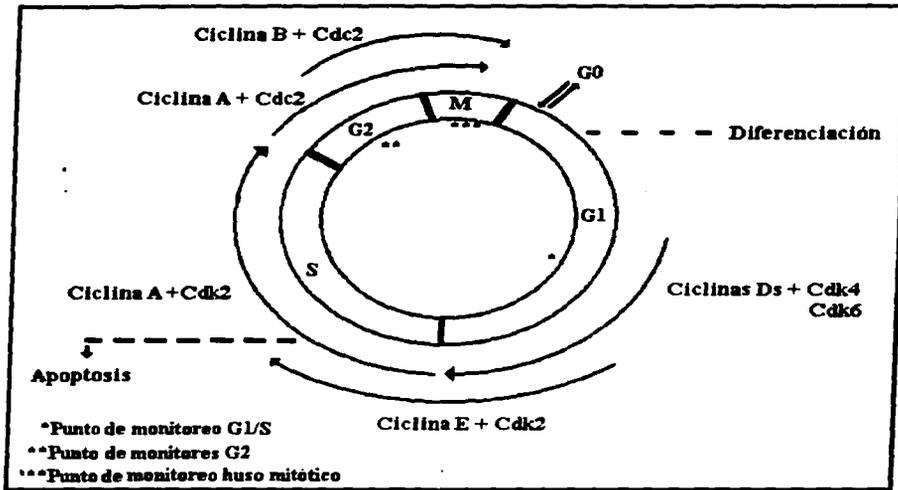


Figura A. Diagrama del ciclo celular en organismos eucariontes. Se muestran las cuatro fases de las que consta el ciclo: G1, S, G2 y M, además de la fase de reposo de G0. La progresión de una fase a otra está regulada por la interacción de los complejos ciclinas-Cdks, de un modo general, las ciclinas D están implicadas en G1, las ciclinas E en la transición de G1 a S, las ciclinas A con la fase S, así como también durante el paso de G2 a M, finalmente las ciclinas B están involucradas en la transición de G2 a M. También se indican los puntos de monitoreo del ciclo.

2) p53

El gen supresor de tumores p53 se localiza dentro del genoma humano en el cromosoma 17, banda p13.1. Consta de 11 exones, que abarcan aproximadamente 20 kb, 10 de éstos, del 2 a 11, comprenden la región que codifica para una fosfoproteína de 393 aminoácidos, con localización primordialmente nuclear. El ARN mensajero del p53 totalmente procesado es de 2.2 a 2.5 kb de tamaño y se expresa en todas las células del

Tabla 2. PROPIEDADES DE LOS ONCOGENES, GENES SUPRESORES DE TUMORES Y GENES MUTADORES.

Propiedad	Oncogenes	Genes Supresores de Tumores	Genes Mutadores
<i>Número de mutaciones requeridas para transformar una célula en cancerosa</i>	Uno (dominante)	Dos (recesivo)	Dos (recesivo)
<i>Función del alelo mutado</i>	Ganancia de función	Pérdida de función	Pérdida de función
<i>Origen de la mutación</i>	Somática	Somática o heredada	Heredada o somática (?)
<i>Funciones</i>	Cascadas de transducción de señales	Regulación negativa de la división celular	Fidelidad en el proceso de replicación del ADN
<i>Ejemplos</i>	Receptores para hormonas de crecimiento; proteínas G; factores de transcripción; ciclinas	Proteínas que regulan factores de transcripción y oncogenes; factores de transcripción	Reparación enzimática de errores en la duplicación del ADN

(Levine, 1995)

cuerpo, presentándose los niveles más elevados en las células del bazo y del timo (Levine, 1993).

La proteína p53 es un factor de transcripción específico que para llevar a cabo su actividad supresora tumoral requiere la transactivación de ciertos genes específicos (Pietenpol et al., 1994). La proteína consta de 4 dominios funcionales que son: 1) hacia el extremo amino terminal, el dominio de activación transcripcional, 2) entre los residuos

102-290, el dominio de unión al ADN que se une a dos copias de cualquier región que presente la secuencia consenso 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy, 3) el dominio de oligomerización, comprendido entre los residuos 319-360 encargado de la formación de los tetrámeros p53, estado activo funcional de la proteína y 4) el dominio básico, carboxilo terminal, encargado de las funciones de regulación putativas negativas (Levine, 1993; Hainaut, 1995; Unger et.al.,1993) (Figura B). Funcionalmente, los extremos N y C terminales son remplazables con dominios transactivadores y de oligomerización ajenos, sugiriendo que el dominio de unión al ADN por sí solo confiere las propiedades supresoras (Pietenpol et.al., 1994).

Tres regiones de la proteína son fosforilables por diversas proteínas cinasas (Meek,1994), entre las que se encuentran las caseína cinasas I, II, cdc2, cdk2 y la proteína cinasa de activación del ADN (ADN-PK) (Figura. A) Sin embargo el significado de la fosforilación de p53 está poco entendida. Las que más han sido estudiadas, son las que lleva a cabo la ADN-PK en los residuos de serina 15 y 37; que al parecer están involucradas en la estabilización de la proteína y en la actividad de paro en G1, respectivamente (Selivanova y Wilman, 1995).

p53 se une a una larga lista de proteínas (Pietenpol y Vogelstein, 1993; Selivanova y Wilman, 1995), lo cual le permite funcionar, no sólo como transactivador sino que también puede actuar como un potente inhibidor de la transcripción de una amplia variedad

Tabla 3. GENES SUPRESORES DE TUMORES CONOCIDOS Y PROPUESTOS

Gene	Localización cromosómica	Tipo de cáncer	Funciones propuestas
<i>Rb</i>	13q14	Retinoblastoma, osteosarcoma	Regula factores de transcripción (E2F-DP1); regula el ciclo celular
<i>p53</i>	17p13	Hueso, seno, cerebro	Factor de transcripción, regula el ciclo celular
<i>APC</i>	5q21	Poliposis adenomatosa familiar	Comunica proteínas de la superficie celular con microtúbulos
<i>WT1</i>	11p13	Tumor de Wilms, nefroblastoma	Factor de transcripción importante para el desarrollo del hígado
<i>NF1</i>	17q11.2	Neurofibromatosis de von Recklinghausen	Proteína Activadora de GTPasa (GAP) para <i>ras</i> en células derivadas de la cresta neural
<i>NF2</i>	22q11.1	Neuroma acústico, meningiomas bilaterales	Como una proteína del citoesqueleto llamada merlina
<i>DCC</i>	18q21	Ninguno demostrado (únicamente mutaciones somáticas)	Proteína tipo adhesina membranal
<i>MTS1</i>	9p21	Blastomas medulares, algunos melanomas, pancreáticos	Proteína de 16 kD que bloquea la actividad de <i>cdk4</i>
<i>MTS2</i>	9p21	Desconocido	Proteína de 15 kD que bloquea las actividades de las <i>cdks</i>

(Levine, 1993 y 1995)

de promotores celulares que carecen de la región consenso mencionada anteriormente. Esta acción se lleva a cabo mediante la interacción del dominio amino terminal de p53 con la proteína de unión a la caja TATA (TBP) (Seto et.al, 1992), subunidad del factor de transcripción basal TFIID. Entre los genes que se ven transreprimidos por p53 se

encuentran por mencionar algunos, c-fos, c-jun, c-myc, beta-actina, hsc-70 (Ginsberg et.al., 1991) Proteínas mutantes de p53 que han perdido su capacidad de suprimir la proliferación celular, son deficientes por lo general, en su habilidad de reprimir la transcripción de estos genes y por lo tanto de unirse a TBP (Seto et.al., 1992; Ginsberg et.al., 1991).

Entre otras proteínas a la que se une p53 están, el factor de replicación A del ADN (RPA) al que inhibe su habilidad de unirse al ADN de cadena sencilla (Dutta et.al., 1993), los factores de transcripción Sp-1, WT-1, los productos oncogénicos de virus ADN tumorales como el antígeno T largo del SV-40, la proteína 5 E1B de adenovirus y la E6 del papiloma virus. Finalmente p53 forma complejos con ácidos nucleicos de una sola hebra, helicasas del ADN y ejerce una actividad de reasociación de hebras de ADN (Oliner, 1993, Selivanova y Wilman) lo cual sugiere su posible participación en los procesos de síntesis y reparación del ADN.

A nivel trans-activador p53 incrementa la expresión entre otros genes de: a) mdm-2, el cual se une e inactiva p53 en un fenómeno de autoregulación; b) p21 waf-1/cip-1, el cual se une e inhibe al antígeno de proliferación nuclear (PCNA) y a los complejos de ciclinas-G1/Cdk; 4) bax, un activador de la apoptosis. p53 también desregula a bcl-2, que promueve la supervivencia celular. Otros genes transactivados por p53 son el de la

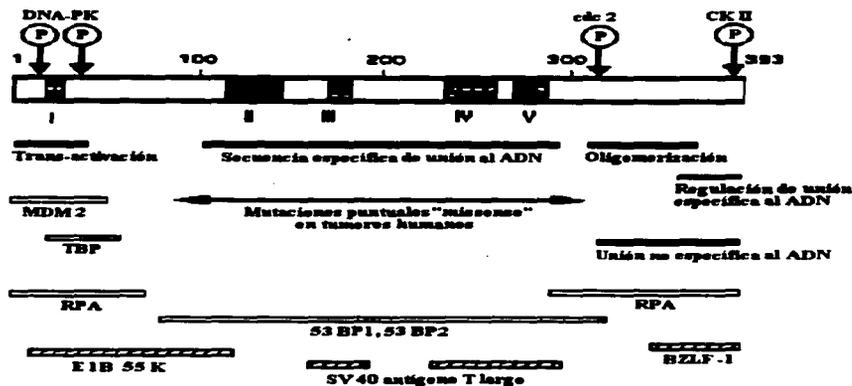


Figura B. Dominios funcionales y regiones de interacción de la proteína humana de p53. Los dominios funcionales de la proteína p53 son: el dominio de trans-activación en la porción amino terminal, hacia la región media, el dominio de secuencia específica al ADN con dedos de zinc y el dominio de oligomerización hacia el extremo carboxilo terminal. Esta zona también tiene una actividad de unión al ADN no específica. Los sitios de fosforilación para la proteína cinasa activada por ADN (ADN-PK): Ser-15 y Ser-37; p34-cdc-2 : Ser-315 y CKIII : Ser-392 son indicados. Se muestran las zonas de la proteína p53 que interactúan con proteínas celulares o virales: la proteína de unión a la caja TATA (TBP), la proteína A de replicación (RPA), el producto del oncogen mdm2, las proteínas de unión 1 y 2 ambas de 53 Kda, y las proteínas virales de adenovirus (E1B 55kda), SV40 (antígeno T largo) y de Epstein Barr (BZLF1). Finalmente, los números romanos indican los regiones conservadas de la proteína. (Selivanova y Wiman, 1995).

creatinina cinasa muscular (MCK), ERCC-3 y GADD45, los dos últimos involucrados en la reparación del ADN (Selivanova y Wiman, 1995; Haffner y Oren, 1995, Marx, 1994). Recientemente se han agregado a esta lista el gen de la proteína de unión de factores de crecimiento tipo insulina 3 (IGRF-BP3), el gen del factor de crecimiento transformante α y el gen E124, el cual es inducido por daño al ADN previo a la apoptosis (Hansen y Oren, 1997). La transactivación de IGF-BP3 es particularmente interesante dado que esta

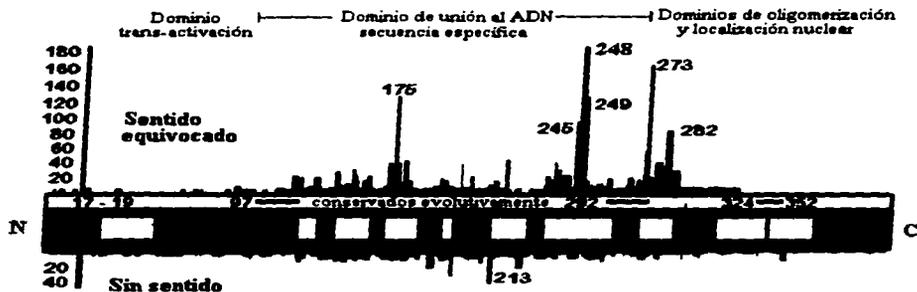


Figura C Espectro mutacional de la proteína p53. Se muestra el análisis mutacional de p53, siendo las barras verticales la distribución de las mutaciones. Se describen siete regiones de las denominadas hotspots dentro de las regiones conservadas de las moléculas: aminoácidos 130-142, 151-164, 171-184, 193-200, 213-223, 234-258 y 270-286. La parte de arriba muestra la distribución de las mutaciones de sentido equivocado, las cuales cambian la identidad de los aminoácidos, alterando la conformación y la estabilidad de la proteína. La parte de abajo muestra la distribución de las mutaciones sin sentido (mutaciones de cambio del marco de lectura, mutaciones silenciosas) que originan proteínas truncadas o inestables. Mientras que las mutaciones de sentido equivocado se localizan en las regiones conservadas de la porción hidrofóbica media de la proteína, las mutaciones sin sentido se distribuyen a lo largo de la proteína. (Harris, 1993)

proteína inhibe tanto las señales de supervivencia y mitogénicas para las células (Buckbinder et.al., 1995).

Las mutaciones en este gen supresor se presentan con una frecuencia bastante alta, más del 50% de una gran variedad de tumores y cánceres (Hollstein et.al., 1991). En la mayoría de los casos, ambos alelos están inactivados, uno por mutaciones puntuales y el otro por una delección parcial o total del gen o del mismo cromosoma (con la consecuente pérdida de la expresión del gene) (Greenblatt et.al.,1994). Dentro de las mutaciones

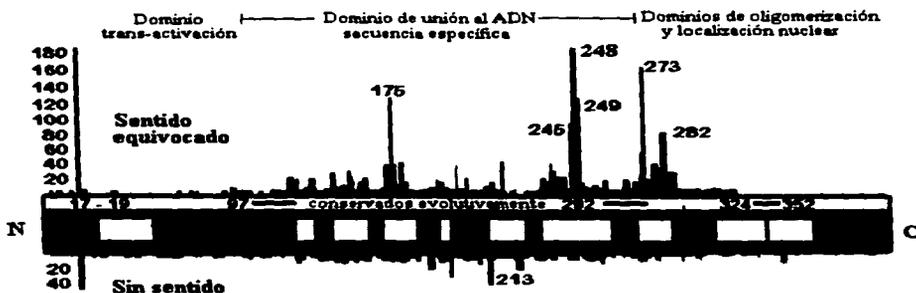


Figura C Espectro mutacional de la proteína p53. Se muestra el análisis mutacional de p53, siendo las barras verticales la distribución de las mutaciones. Se describen siete regiones de las denominadas hotspots dentro de las regiones conservadas de la molécula: aminoácidos 130-142, 151-164, 171-184, 193-200, 213-223, 234-258 y 270-286. La parte de arriba muestra la distribución de las mutaciones de sentido equivocado, las cuales cambian la identidad de los aminoácidos, alterando la conformación y la estabilidad de la proteína. La parte de abajo muestra la distribución de las mutaciones sin sentido (mutaciones de cambio del marco de lectura, mutaciones silenciosas) que originan proteínas truncadas o inestables. Mientras que las mutaciones de sentido equivocado se localizan en las regiones conservadas de la porción hidrofóbica media de la proteína, las mutaciones sin sentido se distribuyen a lo largo de la proteína. (Harris, 1993)

proteína inhibe tanto las señales de supervivencia y mitogénicas para las células (Buckbinder et.al., 1995).

Las mutaciones en este gen supresor se presentan con una frecuencia bastante alta, más del 50% de una gran variedad de tumores y cánceres (Hollstein et.al., 1991). En la mayoría de los casos, ambos alelos están inactivados, uno por mutaciones puntuales y el otro por una delección parcial o total del gen o del mismo cromosoma (con la consecuente pérdida de la expresión del gene) (Greenblatt et.al.,1994). Dentro de las mutaciones

puntuales, el 90% son las denominadas de sentido equivocado, muchas de las cuales ocurren en sitios evolutivamente conservados de la proteína, y algunos llegados a considerar sitios con alta mutabilidad. (Figura C). Esta clase de mutaciones cambia un aminoácido por otro, implicando una posible alteración en la conformación de la proteína y en algunos casos el incremento de su estabilidad, ambos casos resultan en la pérdida de la función de p53 (Harris, 1993). No obstante, el gen p53 no es indispensable para la vida, tal como fue demostrado por Donehower y colaboradores en 1992 al crear ratones deficientes para el gen p53, los cuales presentaron un desarrollo embrionario aparentemente normal.

La pérdida de este gen supresor predispone al cáncer, lo cual sugiere que p53 actúa principalmente mediando la respuesta celular ante un daño al ADN, previniendo la acumulación de mutaciones potencialmente oncogénicas y la inestabilidad genómica. Se han identificado dos mecanismos mediante los cuales p53 puede ejercer tal efecto supresor, ya sea individualmente o por combinación de ambos. Estos son, el arresto del ciclo celular y la apoptosis. ¿Cuál de estos es el que elige la célula? y quizás aún más importante ¿es esta elección, es una función esencial de p53 en su rol como policía molecular?, son preguntas que en el presente se están intentando responder. A esto hay que agregar la relación que tienen otras funciones adicionales de p53, como la inhibición de la angiogénesis (Dameron et al., 1994) y su participación en el envejecimiento celular (Atadja et al., 1995) con su actividad supresora de tumores.

La respuesta celular ante un daño al ADN, consiste de un rápido y substancial incremento en los niveles totales de p53, debido a la estabilización de la proteína, que en C condiciones normales es rápidamente degradada (Kastan et.al., 1992). En este sentido, la expresión de p53 tiene como efecto primario detener la progresión del ciclo celular; se ha demostrado que la proteína p53 está involucrada en los tres puntos de restrcción ya mencionados, aunque se tiene más información en el de G1 (Kastan et.al., 1992; Aloni et.al., 1995), el cual está mediado principalmente por: 1) la inhibición del PCNA, que es una subunidad regulatoria de la ADN polimerasa delta que está involucrada en la replicación del ADN y 2) la inhibición del complejo ciclina G1/Cdk, evitando la fosforilación de proteínas tipo-Rb, tales como p107, p130 y aún la misma pRb, lo cual impide activar la transcripción de los genes requeridos para la progresión de G1 a S. (Levine,1995).

Sin embargo p53, no sólo funciona como freno del ciclo celular, sino que la regulación de la supervivencia celular debe ser aún más importante que el mantener la estabilidad genómica. La apoptosis además de ser considerada como un proceso dentro de la fisiología de las células, puede ser inducida por la acción de estímulos traumáticos o estresantes para éstas, tales como radiación ionizante, exposición a drogas y la sobreexpresión de proteínas celulares y virales (Arends y Wyllie, 1991). Poco es lo que se ha logrado esclarecer de esta función de p53. La introducción de la forma funcional de p53 en algunas líneas celulares tumorales ha resultado en la activación del mecanismo de muerte apoptótica (Yonish et.al., 1991; Shaw et.al., 1992).

Aunque la apoptosis y la supresión de la proliferación son dos fenómenos diferentes, la finalidad de ambos es la misma: prevenir la propagación de mutaciones genéticas a la progenie celular.

VII.- HIPOTESIS.

El arsénico daña al ADN, quizás de manera indirecta y en consecuencia induce al gen supresor de tumores p53

VIII.- OBJETIVO GENERAL.

Evaluar si el arsénico en su forma trivalente (arsenito), induce un incremento en el producto proteico del gen p53.

Examinar si las células que contienen el gen p53 mutado son más sensibles al tratamiento con arsenito de sodio que las células con p53 funcional.

IX.- OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Determinar la viabilidad de los linfocitos de sangre periférica humana y de las líneas linfoideas Jurkat y LCL-EBV después de tratar con arsenito de sodio a diferentes concentraciones.
- 2.- Examinar los niveles de la proteína p53 por Western blots de los cultivos celulares tratados con arsenito de sodio.
- 3.- Evaluar el efecto de la introducción tanto de la versión normal como la mutada del gen p53 en los tipos celulares empleados y determinar la viabilidad al ser tratados con arsenito de sodio.

X.- MATERIALES Y METODOS.

Obtención de linfocitos.

Se obtuvieron 20 ml de sangre periférica heparinizada de un donador sano y las células mononucleares fueron separadas por un gradiente de densidad en 12 ml de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Uniparts) como está descrito por Peper y colaboradores (1968). Brevemente el gradiente en formación se centrifuga a 1600 rpm durante 30 minutos. Se recupera el anillo de células blancas y se le da dos lavados cada uno de 10 ml con medio RPMI 1680 suplementado con aminoácidos no esenciales (10 mM, Gibco) y L-glutamina (2mM, Gibco). El botón de células finalmente se resuspende en 2 ml de dicho medio. Se toman 20ul y se mezcla con 1 ml de azul de tripano (diluído 1:10 en medio RPMI) y se cuenta en un hematocítmetro el número y la viabilidad de las células recuperadas.

Cultivos celulares.

Los linfocitos de la sangre periférica así como los linfocitos transformados con el virus Epstein Barr (LCL-EBV) fueron cultivados en medio RPMI 1680 (Sigma) suplementado con 15% de suero fetal bovino inactivado por calor (Gibco), 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco), 10 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco) y 2 mM de L-glutamina (Gibco). Las células de la línea Jurkat fueron cultivadas también con medio RPMI 1640 con la misma suplementación excepto que se le añadió 10 mM de piruvato de sodio (Gibco). Todas los cultivos celulares fueron incubados a 37 °C con 5% de CO₂ y se crecieron hasta alcanzar 90% de confluencia o bien crecimiento exponencial antes de ser electroporados o tratados con arsénico. Las células mononucleares de sangre

periférica fueron estimuladas con fitohemaglutinina 50ul [10ug/ml] por cada 500 mil células (Gibco) y crecidas bajo las mismas condiciones que las demás líneas.

Maxipreparación y purificación de plásmidos.

Este procedimiento incluye tres fases: la del cultivo de bacterias, la de la cosecha y lisis de las bacterias y finalmente la purificación del ADN plasmídico. La maxipreparación de los plásmidos mencionados y que fueron donados por el Dr. Carl Miller (UCLA), se llevó de acuerdo a los protocolos convencionales (Sambrook et.al.,1989) con algunas modificaciones basadas en las condiciones de los plásmidos y que se discutirán más adelante. La fase de purificación se realizó mediante el uso de un kit comercial para ese fin, QIAGEN -Plasmid-tip 500 (QIAGEN Inc.USA). El ADN obtenido se cuantificó por espectroscopia de absorción (Labarca y Paigen,1980) y fue concentrado a 1 µg/µl, resuspendiéndose finalmente en una solución amortiguadora 1X de Tris-EDTA (TE).

Transfección de genes en linfocitos de la sangre periférica y en la línea celular Jurkat.

Los linfocitos de la sangre periférica humana y las células Jurkat se electroporaron usando el aparato "Gen Pulser" (Bio Rad Laboratories, Richmond CA.). Las células en crecimiento exponencial se colectaron por centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en una solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS) 1X fría y libre iones calcio y magnesio. Las células se centrifugaron de nuevo, ahora por 5 minutos a 1200 rpm, el botón celular se resuspendió a una concentración de 1.5×10^7 células por ml con PBS 1X frío. Las células se pusieron 10 minutos en hielo para luego añadirles 10 µg de

ADN. Alícuotas de 0.8 ml se transfirieron a las celdas de electroporación, y se dejaron otros 10 minutos en hielo antes de aplicar el pulso eléctrico (Andreason y Evans,1988; Toneyuzo et.al.,1986; Guido et.al.,1992; Xia y Liber, 1995).

Los plásmidos con el gen silvestre (pcDNA-53) como el mutado (pcDNA-273) fueron linearizados con la enzima de restricción Nhe-I antes de ser transfectados a las células. Para obtener el vector pcDNA se realizó una doble digestión del plásmido pcDNA-53 usando las enzimas de restricción Hind III y Xba I para eliminar el gen p53 clonado dentro del poliligador del plásmido. Se corrió el ADN digerido en un gel al 2% de agarosa de bajo punto de ebullición y el ADN de las bandas identificadas como las de doble digestión fue recuperado y limpiado con perlas de vidrio y concentrado a 1 µg / µl antes de ser electroporado.

Las células Jurkat fueron electroporadas aplicando un sólo pulso de 0.5 ms de 600 V (25 uFd), como está reportado (Xia y Liber,1995; Dinchunk et.al., 1992). Por su parte los linfocitos, después de realizar un curva para encontrar las condiciones óptimas, fueron electroporados mediante la aplicación de un solo pulso 0.5 ms a 1.25 kV (25 uFd).

Aplicado el pulso, las celdas fueron colocadas en hielo durante 10 minutos para acelerar la recuperación de las membranas celulares. Posteriormente las células fueron mezcladas con 5 ml de medio de cultivo a 37°C (Andreason y Evans,1988; Xia y Liber, 1995) y se incubaron durante 24 horas a las condiciones ya mencionadas antes de cambiarles el medio nuevamente.

Tratamientos con arsenito de sodio.

Se preparó una solución madre estéril de arsenito de sodio (10 mg/ml) y por diluciones en volúmenes adecuados se obtuvieron las concentraciones finales deseadas. Se cultivaron 1 millón de células durante 24 horas en su medio correspondiente, para luego añadirles varias concentraciones de arsénico: 0.1, 1, 10, 25, y 50 μM y se dejaron los cultivos por 24 y 48 horas más, para luego medir la viabilidad por exclusión de azul tripano y FDA.

Análisis de citotoxicidad.

La viabilidad celular fue determinada después de concluir cada tratamiento usando los ensayos de exclusión por azul tripano y el de diacetato de fluoresceína (FDA)/bromuro de etidio (BrEt), este último para demostrar que la muerte celular no se debe a alteraciones membranales. Brevemente, de una solución que contiene 30 μl de FDA en acetona (5mg/ml), 200 μl de EtBr en una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) (200 $\mu\text{g/ml}$), y 4.8 ml de PBS, se toman 25 μl y se mezclan con 25 de las células previamente centrifugadas y resuspendidas en 1ml de PBS. Esta mezcla se gotea sobre una laminilla y se distribuye con un cubreobjetos. Se leen 100 células en un microscopio de fluorescencia, las células vivas presentan un color verde fluorescente mientras que las células muertas presentan los núcleos celulares teñidos de color anaranjado (Hartmann y Speit, 1996; Strauss, 1991). La viabilidad por exclusión de azul tripano se realizó tomando 20 μl del resuspendido celular y mezclándolo con 1 ml de este colorante (diluido 1:10 en medio RPMI). Se cuenta en hematocitómetro el número y la viabilidad de las células recuperadas.

Cuantificación de la proteína p53 por Western-blot.

Después del tratamiento con arsénico las células fueron cosechadas y los núcleos preparados para la extracción de proteína como lo describe Blatenner y colaboradores (1994), con algunas modificaciones. Brevemente, los núcleos fueron lisados en una solución salina amortiguadora de fosfatos que contenía 1% NP450, 0.5% de deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 3 mM de PMSF, 20 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina y 10 $\mu\text{g/ml}$ de ortovanadato de sodio. Para la realización del Western blot, 50 microgramos de proteína fueron calentados por 5 minutos en una solución amortiguadora de muestra para corrimiento (2%SDS, 80 mM Tris pH 6.8, 10% glicerol, 5% 2-beta mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol), posteriormente fueron separadas en un gel al 10% de SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con leche en polvo al 5% en TBS, posteriormente fue incubada con 1 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology) por 2 horas. El blot fue lavado tres veces durante 10 minutos cada una con Tween al 0.1% en TBS, las membranas entonces fueron incubadas con un anticuerpo anti-p53 obtenido de ratón acoplado a peroxidasa (Amersham) diluido 1:2000 por una hora. La membrana nuevamente fue lavada en tres ocasiones de 10 minutos, el blot fue desarrollado por el método ECL (Amersham) y expuesto a una placa de rayos X.

Estadística.

Los resultados de viabilidad fueron sometido a un estudio estadístico por ANOVA con corrección de Bonferroni para buscar si había diferencias significativas.

XI.- RESULTADOS

1.- Efecto del arsenito de sodio en la viabilidad celular.

Se determinaron los efectos del arsenito de sodio a distintas concentraciones, (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 25 μM) sobre la viabilidad de los linfocitos humanos de la sangre periférica, durante 24 y 48 horas de tratamiento, mediante el ensayo de exclusión por azul tripano. Como se puede observar en la tabla 1, en ambos casos, la viabilidad comienza a bajar significativamente a partir de la concentración 1 μM . Siguiendo el mismo protocolo, pero únicamente por 24 horas y con concentraciones de 0.1, 1, 10, 25 y 50 μM se trataron dos líneas celulares linfoides, una línea de células T humanas transformadas denominada Jurkat y linfocitos B de sangre periférica humana transformados con el virus de Epstein Barr, lo cual los hace una línea celular linfoblastoide (LCL-EBV). Como se observó con los linfocitos de la sangre periférica, la viabilidad en ambas líneas va decreciendo conforme se incrementan las concentraciones de arsenito de sodio, las células Jurkat son más sensibles al tratamiento (Figura 1.). Por su parte, la línea celular LCL-EBV tiene un comportamiento de sobrevivencia similar a la de los linfocitos de sangre periférica en las primeras concentraciones pero, a partir de 10 μM , la viabilidad empieza a disminuir.

2.- Detección de la proteína supresora p53 en las células tratadas con arsenito de sodio.

Entre las diversas funciones que se le han adjudicado al gen supresor de tumores p53 se encuentra el control de la proliferación celular así como su participación en el proceso de muerte celular programada. Se ha reportado que en cultivos de células

pulmonares humanas tratadas con arsénico, se producen cambios en el patrón de metilación del promotor de p53 (Mass y Wang, 1996). Se determinó en los cultivos de células Jurkat y LCL-EBV, mediante la técnica de Western blott, si el tratamiento con arsenito de sodio tenía algún efecto en cuanto a la inducción en los niveles de la proteína p53 (Figura 3). El tratamiento de las células LCL-EBV con arsenito produjo un incremento en los niveles de la proteína p53, con un comportamiento dosis-respuesta (Figura 3a), siendo la máxima inducción a la concentración 25 μ M. Por su parte, las células Jurkat también mostraron esta respuesta con una conducta dosis-respuesta y la máxima inducción resultó ser a la concentración 1 μ M (Figura 3b). Las señales obtenidas en los Western-blots fueron cuantificadas con un programa de análisis de imágenes (Collage™ versión 2.0). Se observó un incremento en la intensidad de las bandas de 4.09 veces mayor con 25 μ M en las células LCL-EBV y de 0.39 veces a 1 μ M en la línea Jurkat con respecto a la de sus controles.

3.- Efectos del arsenito de sodio en los linfocitos y las células jurkat electroporadas con la forma silvestre y mutada de p53.

Para entender un poco más la relación que tiene la proteína p53 con los efectos observados por el tratamiento con arsenito de sodio y valiéndonos de la electroporación como una herramienta para introducir genes a las células, se realizaron las transfecciones en los linfocitos humanos y en las células Jurkat con una versión normal y una versión mutada del gen p53 clonadas en el vector plasmídico pcDNA-I (Figura 2), que tiene dos fuertes promotores que aseguran la transcripción del gen p53. La diferencia entre el

plásmido con el gen normal (pcDNA-53) y el plásmido con el gen alterado (pcDNA-273) es la substitución de una histidina por una arginina en la posición 273., la proteína mutante tiene un efecto dominante sobre la proteína basal, lo cual resulta en que las clonas mutadas no pueden detener la proliferación celular (Harlow et.al., 1985).

En la literatura, las condiciones de electroporación de linfocitos son muy diversas y en ocasiones ambiguas en cuanto al voltaje que debe ser aplicado. Ante esto se realizó una curva de electroporación aplicando diferentes voltajes, pero con una misma amplitud y capacitancia. En la figura 4 se presenta la curva de viabilidad de los linfocitos de la sangre periférica humana, a los cuales se les aplicaron diferentes voltajes, mostrándose el promedio de 3 experimentos separados. Se eligió el voltaje 1.25 kV dado que se recomienda escoger áquel en el cual la viabilidad se encuentre entre un 25 y 50% (Andreason y Evans, 1988). Los linfocitos electroporados con la versión normal de p53 muestran una viabilidad similar a los linfocitos sin transfectar cuando se les trata con arsenito de sodio tanto durante 24 como durante 48 horas. Sin embargo, las células transfectadas con el gen mutado muestran un incremento significativo en la sensibilidad a la citotoxicidad por arsénico a las 24 horas (Figura 5a.), lo cual es mayor a las 48 horas (Figura 5b.).

Por su parte las células Jurkat, cuyas condiciones de electroporación están reportadas (Dinchuk et.al., 1992; Cheng y Hass, 1990), al ser transfectadas con el gen normal incrementaron su viabilidad después del tratamiento con arsenito de sodio por 24 horas con respecto a las células no transfectadas. En contraste, la viabilidad de las células

Jurkat electroporadas con la versión mutada después de la exposición al arsenito resultó estar muy por debajo de la presentada por las células transfectadas con p53 normal y de las células sin electroporar, esta diferencia fue estadísticamente significativa (Figura 6a.).

Se decidió medir los efectos citotóxicos del arsenito en las células Jurkat electroporadas mediante otra técnica diferente a la de azul tripano, eligiéndose el ensayo de FDA que se basa en la integridad nuclear y lisosomal (Figura 6b). La sensibilidad de la medición es mayor, aunque el comportamiento de viabilidad de las células electroporadas ante la exposición con el arsenito es muy similar a la detectada con azul tripano.

Finalmente para ver si los efectos citotóxicos del arsenito sobre las células transfectadas no eran debidos al vector plasmídico pcDNA-I, se realizó una doble digestión enzimática para quitar el gen p53, y el vector fue electroporado tanto en los linfocitos como en las células Jurkat. Estas fueron tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas y se midió la viabilidad por exclusión de azul tripano. Como se muestra en la figura 7, el vector no tuvo efecto.

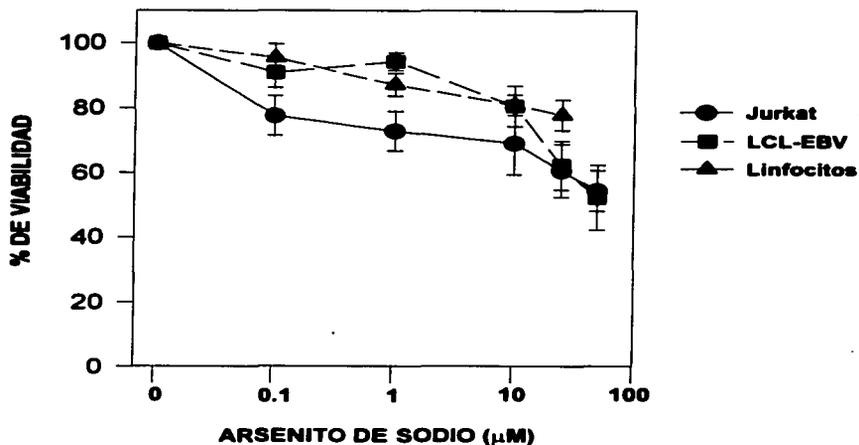


Figura 1 Viabilidad de los linfocitos y las líneas celulares Jurkat y LCL-EBV tratados con arsenito de sodio 24 horas × 10⁶ células / ml fueron sembradas durante 24 hr. Posteriormente se les trató con diferentes concentraciones de arsenito de sodio (0.1, 1, 10, 25 y 50 μM). La viabilidad se midió por exclusión de azul tripano. A partir de 0.1 μM los efectos fueron estadísticamente significativos (p<0.001). El tratamiento en las células Jurkat fue significativamente diferente (p<0.001) al de los linfocitos de la sangre periférica.

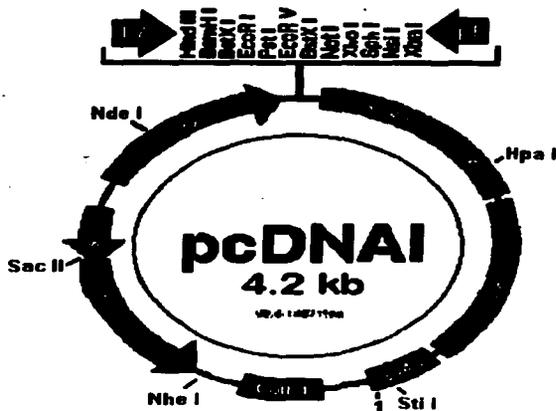


Figura 2. Vector plasmidico pcDNA. Tanto la versión normal como la mutada del gene supresor de tumores p53, fueron clonados en dicho vector. La presencia de los promotores de citomegalovirus y de SV40 asegura la expresión del gen. La diferencia entre la versión silvestre y la mutada es que en esta última, en la posición 273 de una histidina por una arginina. Se muestra el sitio de corte de la enzima de restricción Nhe-I.

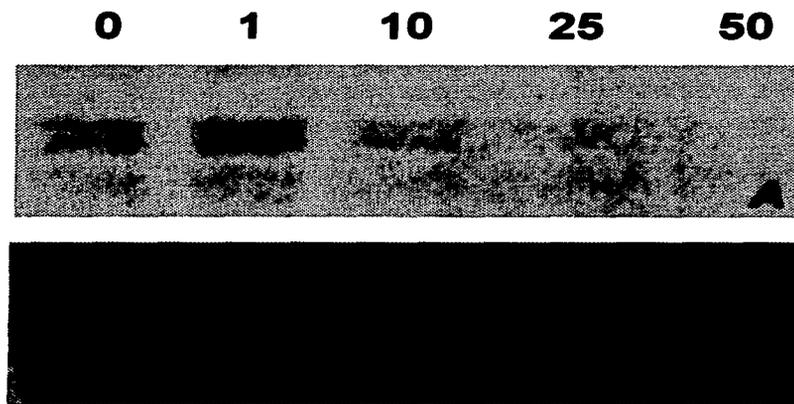


Figura 3. Expresión de la proteína p53 en las células tratadas con arsenito de sodio. La proteína p53 fue analizada por Western blot en cultivos de 24 horas en presencia de arsenito de sodio a las condiciones indicadas arriba (μM). A) Jurkat; B) LCL-EBV.

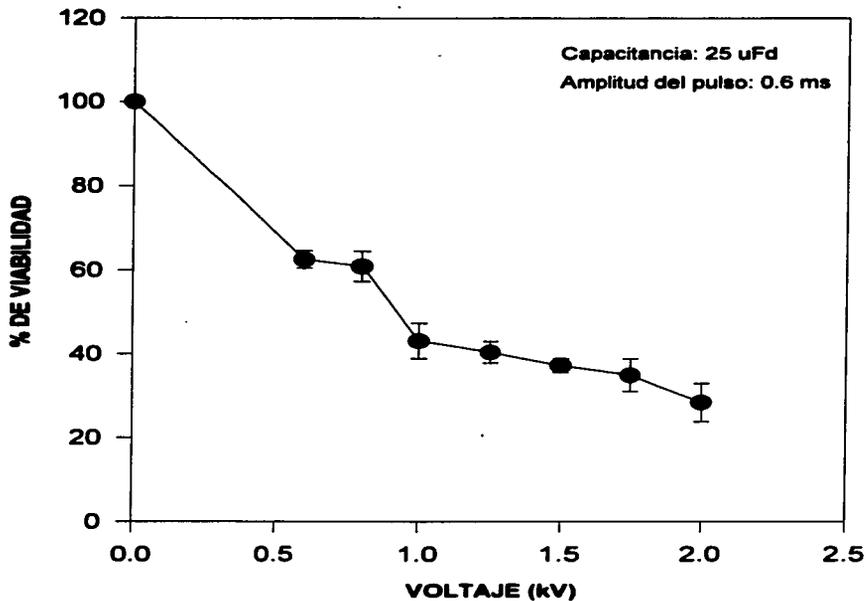


Figura 4 Curva de electroporación-viabilidad de linfocitos de sangre periférica humana.

Las células (5×10^6) fueron electroporadas a distintos voltajes 0.6, 0.8, 1.0, 1.25, 1.50, 1.75 y 2.0 kV a una capacitancia constante (25uFd) y aplicando un pulso de 0.6ms de amplitud. La viabilidad fue medida 24 horas después de aplicado el pulso por exclusión del colorante azul tripano.

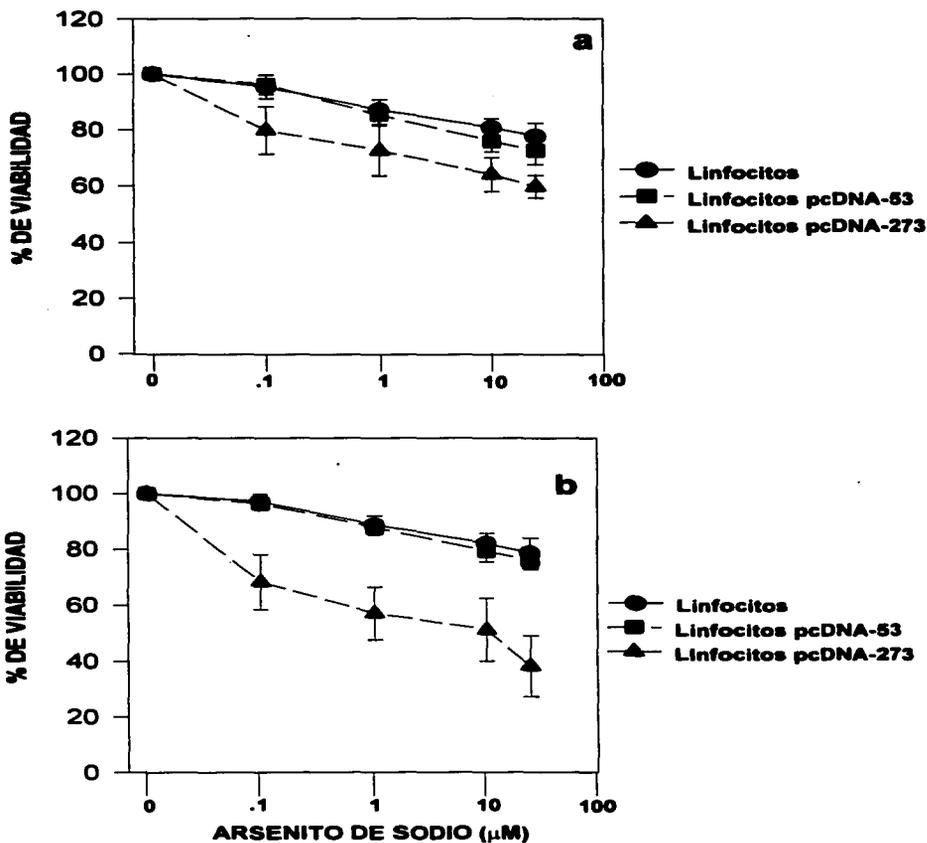


Figura. 5 Viabilidad de los linfocitos normales y electroporados con pcDNA-53 y pcDNA 273 y tratados con arsenito de sodio. a) Viabilidad a 24 horas; b) Viabilidad a 48 horas. Ambas viabilidades fueron determinadas mediante el ensayo de exclusión de azul tripano. El tratamiento en ambos tiempos en las células transfectadas con pcDNA 273 fue estadísticamente diferente ($p < 0.001$) al de las otras dos condiciones.

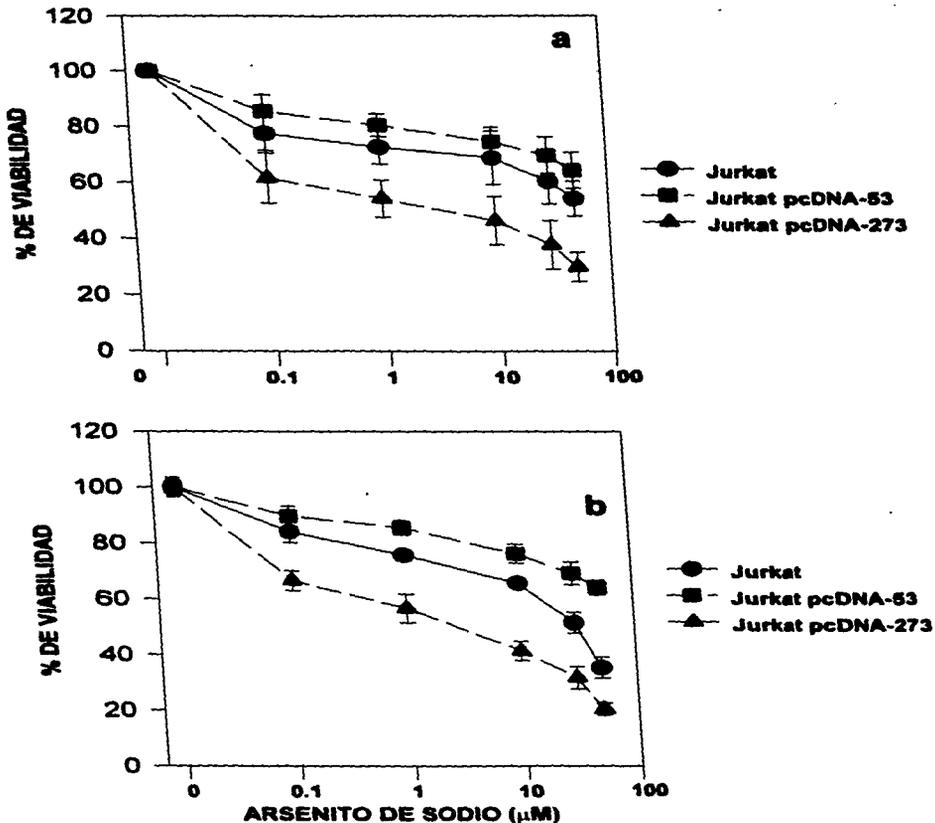


Figura 6 Viabilidad de células Jurkat electroporadas con pcDNA-53 y pcDNA-273 y tratadas con arsenito de sodio 24 horas: a) Por exclusión de azul tripano; b) Por FDA. El tratamiento en las células transfectadas con el gen mutado, en ambos ensayos, fue estadísticamente diferente ($p < 0.001$) al de las otras dos condiciones.

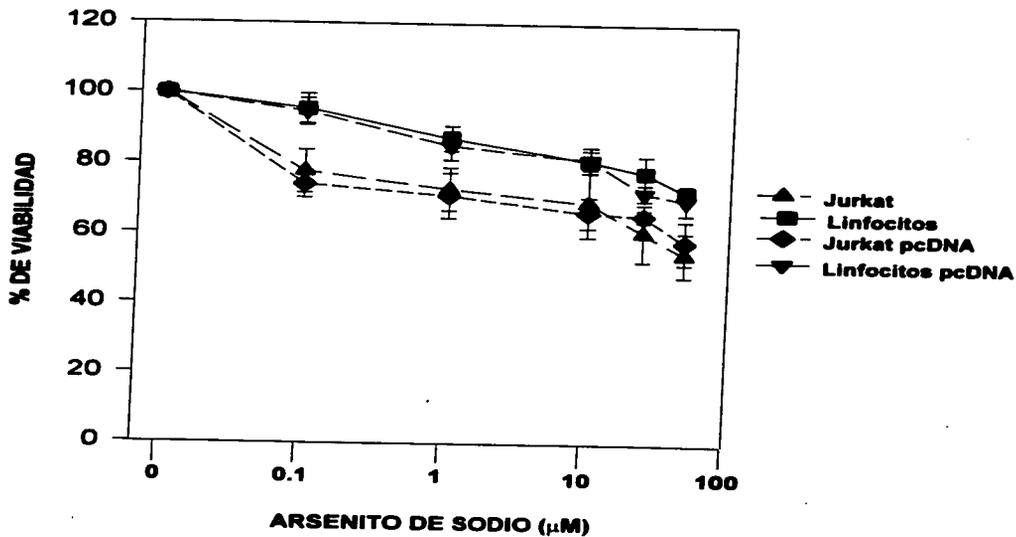


Figura 7 Viabilidad por azul tripano de linfocitos y células Jurkat electroporadas con el vector pcDNA y tratadas con arsenito de sodio 24 horas.

Tratamiento (uM)	24 HORAS		48 HORAS	
	X	D.E.	X	D.E.
Control	100.00	+/- 0.00	100.00	+/- 0.00
0.001	91.37	+/- 3.54	83.82 **	+/- 5.17
0.01	86.48	+/- 2.06	73.65 *	+/- 9.86
0.10	79.88 *	+/- 8.49	68.35 *	+/- 9.88
1.0	72.67 *	+/- 9.02	57.14 *	+/- 9.41
10.0	64.16 *	+/- 6.03	51.27 *	+/- 11.30
25.0	59.87 *	+/- 3.98	38.19 *	+/- 10.98

X : promedio (n=13)

D.E.: desviación estándar

* p< 0.001 v.s. su control

• p< 0.001 v.s. su control

** p< 0.05 v.s. su control

Tabla I Viabilidad a 24 y a 48 horas de los linfocitos de sangre periférica humana tratados con arsenito de sodio .

XII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

El efecto citotóxico del arsenito de sodio sobre los linfocitos humanos y las líneas celulares linfoides empleadas mostró un comportamiento similar de dosis respuesta, aunque con diferencias en cuanto a la sensibilidad que éstas presentan al tratamiento, tal vez debido al estatus del gen p53 y de su proteína. Aquellas células con el gen p53 funcional sobrellevan mejor los efectos citotóxicos del As que las células que tienen alterado este gen, lo cual apoya lo observado en células epiteliales tratadas con As (Salazar et.al., comunicación personal). De este modo, los linfocitos de sangre periférica obtenidos de un individuo sano (donde se espera que el gen p53 no tenga alteraciones) y las células LCL-EBV, que presentan una función normal de la proteína p53 pese a que una de las proteínas de este virus, la BZLF-1, interactúa con ésta (Allday et.al., 1995), tienen una viabilidad mayor a la mostrada por la línea celular Jurkat la cual contiene mutaciones heterocigóticas para p53 en cuatro codones diferentes: 196, 256, 259 y 260 (Cheng y Hass, 1990 ; Hassapoglidou et.al., 1993; Yamato et.al., 1995).

La sugerencia de que la proteína p53 se encuentra involucrada en los efectos citotóxicos del arsenito de sodio, también está apoyada por la inducción mostrada en los niveles de la proteína p53, tanto de las células LCL-EBV como de las células Jurkat cuando fueron tratadas con el arsenito. Las diferencias que existen en estos incrementos entre las líneas celulares, así como las de la concentración a la cual se alcanza la máxima inducción, sugieren que la estabilización de la proteína p53 varía y es dependiente del tipo

celular. Resultando como se esperaba, un mayor nivel de la proteína en la células que presentan una versión normal del gene.

Los resultados de viabilidad tanto de los linfocitos de sangre periférica como de las células Jurkat que fueron electroporados apoyan la participación de p53 en los efectos observados. Las células transfectadas con la versión normal se comportan como las células sin electroporar en el caso de los linfocitos o bien incrementan la viabilidad como en las células las Jurkat. Esto último tal vez por el restablecimiento del fenotipo normal, lo cual está reportado que ocurre cuando se reintroduce una forma normal del gen p53 a células que están alteradas en este gen (Bates, et.al., 1996; Cheng y Hass, 1990). Mientras que la viabilidad de las células que fueron electroporadas con la versión mutada de p53 mostró ser significativamente menor que los controles y que las células con pcDNA-53. Estas diferencias en la viabilidad, pudieran deberse a la existencia en el citoplasma de la proteína p53 mutada, o normal en caso de la transfección con pcDNA-53, la cual entonces competiría con la proteína p53 endógena (que en el caso de las células Jurkat se encuentra mutada) para formar los tetrámeros de la proteína p53 activa, formandose en el caso de las células con pcDNA-273, proteínas alteradas de p53 que no realizaran correctamente sus funciones.

No obstante de no poder seleccionar las células que al transfectarse lograron incorporar ya sea la versión normal o mutada del gen p53 (dado la carencia de un marcador de selección en el vector plasmídico), los cambios observados en la viabilidad de

las células. que fueron electroporadas nos sugiere, aunque no de manera determinante, que esos genes se están introduciendo y expresando. Ni la electroporación ni el vector pcDNA influyen de manera importante en la viabilidad de las células al ser tratadas con arsenito de sodio.

El ensayo por exclusión del azul tripano se basa en la permeabilidad de las membranas de las células. fenómeno que la electroporación altera para permitir la introducción a las células del material exógeno de interés (Weaver, 1995). esto nos llevó a pensar que la electroporación podría estar afectando la viabilidad celular. De aquí el motivo de usar el ensayo de FDA, para determinar este parámetro.

La proteína p53 está involucrada como ya se mencionó, en el punto de monitoreo de la fase M de las células, donde se detectan errores relacionados con la formación del huso mitótico. Se ha observado que las células de mamífero que carecen del gen p53 funcional, incrementan su ploidía cuando son cultivadas con drogas que afectan este punto del ciclo, tales como el nocodazol y la colchicina (Cross et.al., 1995). Se ha sugerido que tanto las células con el gen p53 funcional como las que no lo presentan, salen de la mitosis con igual proporción, sin embargo aquellas con la proteína normal pueden irse hacia apoptosis o bien detenerse en la fase G1. Esto sugiere que en este punto se monitorea la ploidía celular y previene que células que han pasado por una mitosis aberrante pase de G1 a S (Cross et.al., 1995). Los datos obtenidos en este estudio, indican que el arsenito de sodio induce un incremento en los niveles de la proteína p53, lo cual pudiera deberse en

respuesta a la existencia de cierto tipo de daño indirecto en el ADN. Esta activación puede ser producto de la ruptura del huso mitótico durante la mitosis, ya que está reportado que el arsénico inhibe la polimerización y la despolimerización de microtúbulos (Ramírez et.al., 1997). Dado que el arsénico produce daño al ADN, quizás indirectamente, nosotros esperaríamos algún incremento en la expresión de p53 en respuesta a este daño.

Para finalizar, resulta interesante mencionar que datos obtenidos de linfocitos tratados con 10^{-9} M de arsénico han mostrado un incremento en el índice mitótico. Linfocitos de individuos crónicamente expuestos a arsénico a través del agua (aprox. 0.4 mg/l) mostraron un incremento en el número total de linfocitos y en su índice mitótico; mientras que un decremento en la cinética de proliferación celular comparada con los controles a 72 horas de cultivo fue también observado (Gonsebatt et.al., 1994). Esto sugeriría que el arsénico pudiera estar modulando la activación o la inactivación de p53 o de otros oncogenes que controlan la proliferación celular. Se requieren entonces más estudios acerca de la modulación de la actividad de los oncogenes empleando concentraciones bajas de xenobióticos.

XIII.- PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.

Dentro de lo que sigue por hacer en este estudio, es seleccionar las células que se electroporaran con la versiones normal y la versión mutada del gen p53 con el fin de tener una seguridad plena de la introducción y participación de estos genes en los efectos inducidos por el arsénico. El análisis del ciclo celular, cuyos experimentos ya están en marcha, nos pueden revelar más de cerca los efectos que tiene el arsénico sobre el ciclo y definir un poco más el papel que está desempeñando p53 en éstos

XIIV.- REFERENCIAS

- 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. *EMBO J.*, 14, 1392-1401.
- Allday M.J., Sinclair A., Parker G., Crawford D.H. and Farrell P.J. (1995)** Epstein-Barr virus efficiently immortalizes human B cells without neutralizing the function of p53. *EMBO J.*, 14, 1382-1391.
- Andreasson G.L. and Evans G.A. (1988)** Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *BioTech.*, 6, 650-660.
- Andreasson G.L. and Evans G.A. (1989)** Optimization of electroporation for transfection of mammalian cells. *Anal.Biochem.*, 180, 269-275.
- Atadja P., Wong H., Garkavtsev I., Veillette C. and Riabowol K. (1995)** Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 92, 8348-8352.
- ATSDR (1989)** Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Public Health Service, Oak, Ridge National Laboratory, USA.
- ATSDR (1991)** Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic substrates and Disease Registry. U.S. Public Health Service, Atlanta G.A.
- Bates M.N., Smith A.H. and Hopenhayn-Rich C. (1992)** Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am. J. Epidemiol.*, 135, 462-476.
- Bates S. and Voudsen K.H. (1996)** p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Develop.*, 6, 12-18.
- Bencko V. (1987)** Arsenic. In: *Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational Occurrence and Exposure.* Fishbein L., Furst A. and Mehlman M.A. (Eds). Princeton Scientific Publishing Co., Princeton, New Jersey, pp. 1-30.
- Blattner C.H., Knebel A., Rudhle-Pohl A., Sachsenmaier C.H., Herrich P. and Rahmsdorf J. (1994)** DNA damaging agents and growth factors induce changes in the program expressed gene products through common routes. *Environ.Mol.Mut.*, 24, 3-10.
- Brusick D. (1987)** Principles of Genetic Toxicology, 2da. ed., Plenum Press, Londres, pp.1-2.
- Buchet J. and Lauwerys R. (1985)** Study of inorganic methylation by rat liver in vitro: relevance for the interpretation of observations in man. *Arch. Toxicol.*, 57, 125-129.
- Buckbinder L., Talbott R., Velasco-Miguel S., Takenaka I., Faha B., Seizinger B.K. and Kley N. (1995)** Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature*, 377, 646-649.
- Burgdoff W., Kurvink K. and Cervenka J. (1977)** Elevated sister chromatid exchange rate in lymphocytes of subjects treated with arsenic. *Hum.Genet.*, 36, 69-72.
- Casarett and Doull's Toxicology. (1991)** In Amdur M.O., Doull J. and Klassen C.D. (Eds). Pergamon Press, New York, pp. 623-680.
- Cavigelli M., Li W.W., Lin A., Su B., Yoshioka K. and Karin M. (1996)** The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J.* 15, 6269-6279.
- Cebrián M. E. (1983)** Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum. Toxicol.*, 2, 121-133.
- Ciccarelli R.B. and Wetherhahn K.E. (1985)** In vitro interaction of ⁶³ nickel (II) with chromatin and DNA from rat kidney and liver nuclei. *Chem.Biol.Interact.*, 52, 347-360.
- Chen C.J. and Wang C.J. (1990)** Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res.*, 50, 5470-5474.
- Cheng J. and Hass M. (1990)** Frequent mutations in p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol.Cell Biol.*, 10, 5502-5509.
- Cross S.M., Sánchez C.A., Morgan C.A., Schimke M.K., Ramel S., Idzerda R.L., Reskind W.H. and Reid B.J. (1995)** A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*, 267, 1353-1356.
- Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A. and Bouck N. (1994)** Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, 265, 1582-1584.

- Díaz-Barriga F., Lamas E., Mejía J., Carrizales L., Santoyo M., Vega L. and Yañez L. (1990)** Arsenic-Cadmium interactions in rats. *Toxicology*, 64, 191-203.
- Dinchuk J.E., Kelley K.A. and Callahan G.N. (1992)** Flow cytometric analysis of transport activity in lymphocytes electroporated with a fluorescent organic anion dye. *J. Immunol. Meth.*, 155, 257-265.
- Donohewer L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A., Butel J.S. and Bradley A. (1992)** Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356, 215-221.
- Dutta A., Ruppert J.M., Aster J.C. and Winchester E. (1993)** Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature*, 365, 79-82.
- Ehling U.H. (1991)** Genetic risk assesment. *Ann.Rev.Genet.*, 25, 255-280.
- EPRI (1996)** Human exposure to arsenic in drinking water.Final Report. Electric Power Research Institute. EPRI-TR-107027. USA.
- Fornace A. Jr. (1992)** DNA-Damage inducible genes in mammalian cells. *Ann.Rev.Genet.*, 26, 505-524.
- García-Salcedo J., Portales A., Blakey E. y Díaz R. (1984)** Estudio transversal de una cohorte de pacientes con vasculopatía por intoxicación crónica arsenical en poblados de los municipios de Francisco I. Madero y San Pedro Coahuila, México. *Rev.Fac.Med. (Torreón)*, 1, 12-16.
- Ginsberg D., Mechta F., Yaniv M. and Oren M. (1991)** Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 88, 9979-9983.
- Göhde W., Shumann J., Buchner T., Otto F. and Barlogie B. (1979)** Pulse cytophotometry. Application in tumor cell biology and clinical oncology. Flow cytometry and sorting. In: *Melamed M.R., Mullaney P.F. and Mendelson M.L. (Eds.), John Wiley and Sons Inc. New York.*
- Gonsebatt M.A., Vega L., Herrera A., Montero R., Rojas E., Cebrián M.E. and Ostrosky-Wegman P. (1992b)** Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutat.Res.*, 283, 91-95.
- Gonsebatt M.A., Vega L., Montero R., García-Vargas, G., Razo L.M.del, Albores A., Cebrián M.E. and Ostrosky-Wegman P. (1994)** Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water.
- Gonsebatt M.A., Ostrosky-Wegman P., Vega L., Salazar A.M., Montero R., Guzmán P., Blas J., Razo L.M. del, García-Vargas G., Albores A., Cebrián M.E. and Kelch M. (1997)** Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat.Res.*, en prensa.
- Graña X. and Reddy P. (1995)** Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Oncogene*, 11, 211-219.
- Guido M., Zamorano R., Garrido-Guerrero E., Garilio P. and García-Carrancá A. (1992)** Early promoters of genital and cutaneous human papilloma viruses are differentially regulated by the bovine papilloma virus type 1E2 gene product. *J.Gen.Virology*, 73, 1395-1400.
- Haffner R. and Oren M. (1995)** Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr.Opin.Genet.Develop.*, 5, 84-90.
- Hainaut P. (1995)** The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr.Opin.Oncol.*, 7, 76-82.
- Hansen R. and Oren M. (1997)** p53; from inductive signal to cellular effect. *Curr.Opin. Gen. Dev.*, 7, 46-51.
- Harlow E., Williamson N.M., Ralston R., Helfman D.M. and Adams T.E. (1985)** Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Mol.Cell Biol.*, 5, 1601-1610.
- Harris C.C. (1993)** p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assesment. *Science*, 262, 1980-1981.

- Hartmann A. and Speit G. (1996)** Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 27, 98-104.
- Hassapoglidou S., Diamandis E.P. and Sutherland D.J.A. (1993)** Quantification of p53 protein in tumor cell lines, breast tissue extracts and serum with time-resolved immunofluorometry. *Oncogene*, 8, 1501-1509.
- Herrlich P., Ponta H. and Rahmsdorf, H.J. (1992)** DNA damage-induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.*, 119, 187-223.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. and Harris C.C. (1991)** p53 mutation in human cancers. *Science*, 253, 49-53.
- Homminki H. (1990)** Environmental carcinogenesis. In Cooper C., Grover P. (Eds). *Chemical carcinogenesis and mutagenesis I*. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp.33-61.
- Hung D.T., Jamison T.F. and Schreiber S.L. (1996)** Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chem. Biol.*, 3, 623-639.
- IARC (1987)** IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Suppl. 7, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- IARC (1980)** Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human. Some metals and metallic compounds. Vol. 23, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- IARC (1992)** Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. Vainio H., MaGee P., McGregor D. and McMichael A.J.(Eds.) International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Klaassen C.D. (1990)** Heavy metals and heavy metals antagonists. In Gilman A.G., Rall T.W., Nies A.S. and Taylor P. (Eds). Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Pergamon Press. New York, pp.1592-1614.
- Klaassen C.D. (1974)** Biliary excretion of arsenic in rats, rabbits and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 29, 107-108.
- Koizumi T. and Waalkes M.P. (1990)** Effects of zinc on the binding of cadmium to DNA- assesment with testicular interstitial cell and calf thymus DNAs. *Toxicity In Vitro.*, 4, 51-55.
- Labarca C. and Paigen K. (1980)** A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal.Biochem.*, 102, 344-352.
- Levine A.J. (1993)** The tumor suppressor genes. *Annu.Rev.Biochem.*, 62, 623-654.
- Levine A.J. (1995)** Tumor suppressor genes. *Sci. Am. Science & Medicine*, 1, 28-35.
- Meek D.W. (1994)** Post-transcriptional modifications of p53. *Seminar.Cancer Biol.*, 5, 203-210.
- Muller R., Mumberg D. and Lucibello F.C. (1993)** Signals and genes in the control of the cell-cycle progression. *Biochem.Biophys.Acta*, 1155, 151-179.
- Murray A.W. (1992)** Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, 359, 599-604.
- Murray A.W. (1994)** Cell cycle checkpoints. *Curr.Opin. Cell Biol.*, 6, 872-876.
- Murray A.W. and Hunt T. (1993)** *The cell cycle: an introduction*. New York: Oxford University Press.
- NRC (1989)** *Biological Markers in Reproductive Toxicology*. National Research Council. Comission on Life Sciences, National Academic Press, Washington, D.C. pp 15-29.
- Nordenson S., Beckman G., Beckman L. and Nordström S. (1978)** Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. *Hereditas*, 88, 47-50.
- Nordenson S., Salmonson S., Brun E. and Beckman G. (1979)** Chromosome aberrations in psoriatic patients treated with arsenic. *Hum. Genet.*, 48, 1-8.
- Oliner J.D. (1993)** Discerning the function of p53 by examining its molecular interactions. *BioEssays*, 15, 703-707.

- Ostrosky-Wegman P., Gonsbatt M.A., Montero R., Vega L., Barba H., Espinosa J., Palao A., Cortinas C., García-Vargas G., Ruzo L. del and Cebrián M. (1991)** Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res.*, 250, 477-482.
- Pepper R.J., Tina W.Z. and Mickelson M.N. (1968)** Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. *J.Lab.Clin.Med.*, 72, 842-846.
- Pietenpol J.A. and Vogelstein B. (1993)** No room at the p53 inn. *Nature*, 365, 17-18.
- Pietenpol J.A., Tokino T., Thiagalingam S., El-Deiry W., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1994)** Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 91, 1988-2002.
- Ramírez P., Eastmond D.A., Laclette J.P. and Ostrosky-Wegman P. (1996)** Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *En prensa*
- Salazar A.M., Ostrosky-Wegman P., Menéndez D., Miranda E., García-Carranca A. and Rojas E. (1997)** Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Comunicación personal.*
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989)** Extraction and Purification of plasmid DNA. *Plasmid Vectors. In: Molecular Cloning: a laboratory manual.(2ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.33 - 1.52.*
- Sastre M.S. R. de, Varillas A., Kirschbaum P., Boemo A., Rodríguez H., Salim B. de, Chalabe G. de y Franco J. (1992)** Chronic endemic regional hydroarsenicism. Arsenic in the environment and its incidence on health. *Internat. Sem. Proceed. A.M. Sancha Ed.*, pp. 123-130.
- Selivanova G. and Wilman K.G. (1995)** p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv. Cancer Research*, 66, 143-179.
- Seto E., Usheva A., Zambetti G.P., Momand J., Horikoshi N., Weinmann R., Levine A.J. and Shenk T. (1992)** Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc.Natl.Aca.Sci.USA.*, 89, 12028-12032.
- Schiller C.M., Fowler B.A. and Woods J.S. (1977)** effects of arsenic on pyruvate deshydrogenase activation. *Environ. Health Perspec.*, 19, 205-207.
- Scott N., Hatleid K., MacKenzie N. and Carter D. (1994)** Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 102-106.
- Shaw P., Boverly R., Tardy S., Sahli R., Sordat R. and Costa M. (1994)** Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA.*, 89, 4495-4499.
- Snow E.T. (1992)** Metal carcinogenesis: mechanistic implications. *Pharmacol. Ther.* 53, 31-65.
- Stewart N., Hicks G.G., Paraskevas F. and Mowat M. (1995)** Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene*, 10, 109-115.
- Strauss G.H.S. (1991)** Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Research*, 252, 1-15.
- Tam K., Charbounneau S., Bryce F. and Lacroix G. (1978)** Separation of arsenic metabolites in dog plasma and urine following intravenous injection of ⁷⁴As. *Annal. Biochem.*, 86, 505-511.
- Tsang W.P. (1977)** effects and dose-response relationship of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. *Environ. Health Perspct.*, 19, 109-119.
- Unger T., Mietz J.A., Scheffner M., Yee C.L. and Howley P.M. (1993)** Functional domains of wild-type and mutant p53 proteins involved in transcriptional regulation, transdominant inhibition and transformation suppression. *Mol.Cell Biol.*, 13, 5186-5194.
- Vahter M. (1988)** Arsenic. In *Clarkson T.W., Fiberg L., Nordberg G.F. and Sager P.R. (eds). Biological Monitoring of Toxic Metals*, Plenum Press, New York. pp. 303-321.

- Vallee B.L. and Wacker W.E.C. (1970)** Metalloproteins. In Neurach.Pf. (ed.) The protein composition, structure and function. Academic Press, New York, vol. 5, 2nd. edn.
- Weaver J.C. (1995)** Electroporation theory: Concepts and mechanisms. Chapter 1 In: Nickoloff J.A. (Ed) Methods in Molecular Biology 48, Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols, Humana Press, Towana, New Jersey, pp.3- 28.
- Wagner A.J., Kokontis J.M. and Hay N. (1994)** Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21 waf1/cip1. *Genes and Dev.*, 8, 2817-2830.
- Weinberg R.A. (1991)** Tumor suppressor genes. *Science*, 254, 1138-1146.
- Weinstein I.B. and Zhou P. (1997)** Cell cycle control gene defects and human cancer. In: *Enciclopedia of Cancer*, volume 1, Academic Press Inc. USA., 256-267.
- Wen W.N., Lieu T.L., Chang H.J., Wu S.W., Yau L.L. and Jan K.Y. (1981)** Baseline and sodium arsenite-induced sister chromatid exchange in lymphocytes cultured in vitro. *Mech.Ageing Rev.*, 21, 377.
- WHO (1981)**. Arsenic. World Health Organization. *Environmental Health Criteria*, 18, Ginebra.
- WHO (1985)** Guidelines for the study of genetics effects in human populations. World Health Organization. *Environ.Health Criteria*, 46, Ginebra.
- WHO (1992)** Revision of the WHO guidelines for drinking water quality. World Health Organization. Report of the final task group meeting, Ginebra.
- Wolf T., Kasemann R. and Ottenwalder H. (1989)** Molecular interaction of different chromium species with nucleotides and nucleic acids. *Carcinogenesis*, 10, 655 -659.
- Xia F. and Liber H.L. (1995)** Electroporation of human lymphoblastoid cells. Chapter 12. In: Nickoloff J.A. (Ed) *Methods in Molecular Biology 48, Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols*, Humana Press, Towana, New Jersey, 151-160.
- Yamaguchi H. and Fowle B. (1994)** Toxicity and metabolism of inorganic and methylated arsenicals. In: *Arsenic in the Environment Part II. Human Health and Ecosystem Effects*. Jerome O.Nriagu, John Wiley & Sons, Inc.
- Yamato K., Yamamoto M., Hirano Y. and Tsuchida N. (1995)** A human temperature-sensitive p53 mutant p53 Val-138: Modulation of the cell cycle, viability and expression of p53-responsive genes. *Oncogene*, 11, 1-6.
- Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A. and Oren M. (1991)** Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 353, 345-347.