



03081 13 2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**MECANISMOS MOLECULARES DE LA
ALTERACION PROLIFERATIVA INDUCIDA
POR EL ARSENICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA
EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

ANA MARIA SALAZAR MARTINEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA OSTROSKY WEGMAN

267155

MEXICO, D. F.

1998

**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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

Esta tesis se realizó en el Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la dirección de la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman.

El presente trabajo recibió financiamiento de DGAPA y CONACYT

AGRADEZCO A LOS MIEMBROS DEL JURADO POR
LA REVISIÓN DE ESTE TRABAJO Y POR SUS
APORTES Y COMENTARIOS

Dr. Fabio Salamanca
Dr. Lino Díaz de León
Dr. Marco Cerbón
Dr. Mariano Cebrián
Dr. Luis Benítez
Dr. Fernando Montiel

AGRADEZCO MUY ESPECIALMENTE:

A la Dra. Patricia Ostrosky estos años de amistad y apoyo académico, por darme la oportunidad, enseñarme e impulsarme.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus valiosas críticas, comentarios y sugerencias en el desarrollo de este proyecto:

Dr. Emilio Rojas
Dr. Alejandro García-Carrancá
Dr. Enrique Miranda

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier Mochca por sus enseñanzas y consejos, por prestarme los recursos de su laboratorio que me ayudaron a hacer más fácil el trabajo

A los doctores Maria Eugenia Gonsebatt, Regina Montero y Javier Espinosa por su amistad y apoyo.

A Daniel Menéndez, Carla Santana, Mauricio Rodríguez, Miriam Guido y Rocío Hernández, que me enseñaron sus experiencias, gracias por su valioso apoyo a este proyecto.

A Adriana Monteón y Rocío Montes de Oca con quienes compartí directamente la emoción del trabajo, gracias por su ayuda.

A mis compañeros y amigos de laboratorio por hacer este sitio nuestro segundo hogar: Monse, Ana María Mejía, Luis Herrera, Sandra, Maricarmen, Mahara, Gaby, Tzutzui, Laura, Javier, Iván, Patricia Ramírez, Patricia Guzmán, Luis Serrano, Carlos.

A Auro y Silvia siempre dispuestas a ayudar y cuyo gran trabajo nos permite hacer más fácil nuestros experimentos y trámites académicos.

Mi eterno agradecimiento al Dr. Luis Ostrosky, por cuidarme en una etapa maravillosa de mi vida.

A mis padres y hermanos, por su apoyo y a mi suegra siempre dispuesta ayudarme.

Dedico este trabajo con todo mi amor a

mi hijo Javier

Esperando que algún día comprenda el tiempo que mi
realización personal le roba.

A Javier, por su amor, apoyo, ayuda, comprensión,
por períodos difíciles y los maravillosos
momentos compartidos.

INDICE

	Página
Resumen	1
CAPITULO 1. <i>Introducción</i>	
1.1. Genes que participan en el desarrollo del cáncer	2
1.2. El control del ciclo celular	4
1.2.1. La transición de la fase G ₀ a la fase G ₁ o la salida del estado latente	6
1.2.2. El estado G ₀ y los genes que participan en la inhibición del crecimiento	7
1.2.3. La transición de la fase G ₁ a la fase S	8
1.2.4. El punto de control de la fase G ₂ /M	11
1.3. Eventos bioquímicos asociados con la proliferación celular	12
1.4. Genética molecular del cáncer	15
1.4.1. Oncogenes	16
1.4.2. Genes supresores de tumores	19
1.5. Aspectos generales sobre el supresor p53	22
1.5.1. Características bioquímicas de la proteína P53	23
1.5.2. Mutaciones en el gen p53	26
1.5.3. Funciones de p53	28
1.5.4. Detención del ciclo en muerte celular, una decisión de p53	35
1.5.5. Modificaciones post-traduccionales de P53	36
1.5.6. El papel de p53 en el estudio de la carcinogénesis	36
1.6. El arsénico, un carcinógeno. Características y efectos biológicos	37
1.6.1. Propiedades fisicoquímicas	38
1.6.2. Distribución en el ambiente y vías de exposición humana	39
1.6.3. Biotransformación	40
1.6.4. Efectos biológicos	42
CAPITULO 2. <i>Planteamiento del problema</i>	47
CAPITULO 3. <i>Objetivos e Hipótesis</i>	48
CAPITULO 4. <i>Materiales y Métodos</i>	
4.1. Cultivos celulares	49
4.2. Preparación de soluciones de arsénico y su aplicación en los cultivos celulares	50
4.3. Evaluación de la citotoxicidad	51
4.4. Detección de la expresión de la proteína P53 en las líneas celulares por medio de la técnica de Western blot	52
4.5. Detección de la expresión de la proteína P53 en linfocitos de sangre periférica humana por medio de la técnica de Western	

blot	52
4.6. Análisis del ciclo celular por citofluorometría de flujo	53
4.7. Ensayo de la proteína cinasa p34 ^{cdc2} in vitro	54
4.8. Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en linfocitos de sangre periférica humana	55
CAPITULO 5. <i>Resultados</i>	58
CAPITULO 6. <i>Discusión</i>	80
CAPITULO 7. <i>Conclusiones y Perspectivas</i>	88
CAPITULO 8. <i>Referencias</i>	90
CAPITULO 9. <i>Apéndice</i>	104
CAPITULO 10. <i>Artículos</i>	110
Induction of p53 protein by sodium arsenite	Publicado en Mutation Res.1997
Arsenic-induced cell cycle impairment	Enviado a Publicación, 1998

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Señales genéticas relacionadas con el desarrollo del cáncer	3
Fig. 2	Diagrama del ciclo celular en los organismos eucariontes	5
Fig. 3	Dominios funcionales y regiones de interacción de la proteína humana de p53	25
Fig. 4	Espectro mutacional de la proteína p53	27
Fig. 5	La detención del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis inducida por el daño al ADN	29
Fig. 6	Ruta metabólica del arsénico inorgánico en los mamíferos	40
Fig. 7	Viabilidad celular de las diferentes líneas tratadas 24 horas con arsenito de sodio	63
Fig. 8	Comparación de la viabilidad celular en las células de tipo linfocito tratadas 24 horas con arsenito de sodio	64
Fig. 9	Expresión basal de la proteína p53 en las diferentes líneas celulares estudiadas	65
Fig. 10	Expresión de la proteína p53 en células tratadas 24 horas con arsenito de sodio	66
Fig. 11	Análisis densitométrico de la expresión de la proteína p53 en las células tratadas 24 horas con arsenito	67
Fig. 12	Inmunodetección de p53 en las células RKO ⁺ tratadas 24 horas con arsenito de sodio	68
Fig. 13	Inmunodetección de p53 en las células RKO ⁻ tratadas 24 horas con arsenito de sodio	69
Fig. 14	Análisis de la proteína p53 en las células HeLa tratadas 24 horas con arsenito de sodio	70
Fig. 15	Análisis del ciclo celular en células tratadas 24 horas con arsenito de sodio	71
Fig. 16	Análisis citométrico en las células HeLa tratadas 24 horas con arsenito	72
Fig. 17	Porcentaje de las células HeLa en la fase G2/M	73
Fig. 18	Análisis citofluorométrico de las células RKO tratadas 24 horas con arsenito	74
Fig. 19	Ensayo proteína cinasa p34 <i>in vitro</i> en las células HeLa tratadas con arsenito de sodio durante 24 y 48 horas	75
Fig. 20	Ensayo proteína cinasa p34 <i>in vitro</i> en las células RKO tratadas con arsenito de sodio durante 24 y 48 horas	76
Fig. 21	Detección de la proteína P53 en linfocitos de dos individuos	77
Fig. 22	Expresión de la proteína P53 en linfocitos de dos individuos	78
Fig. 23	Densitometría del RNA de p53 en linfocitos sin proliferar	79

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Funciones de los proto-oncogenes	16
Tabla 2	Ejemplos de genes supresores tumores involucrados en el cáncer humano	20
Tabla 3	Viabilidad con azul tripano de linfocitos humanos de sangre periférica tratados con arsenito de sodio durante 24 y 48 horas	105
Tabla 4	Viabilidad con azul tripano de linfocitos humanos de sangre periférica y las líneas celulares Jurkat y LCL-EBV tratados con arsenito de sodio durante 24 horas	105
Tabla 5	Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células HeLa tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas	106
Tabla 6	Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células HeLa tratadas con arsenito de sodio durante 48 horas	106
Tabla 7	Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células C-33A tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas	107
Tabla 8	Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células C-33A tratadas con arsenito de sodio durante 48 horas	107
Tabla 9	Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células LCL-EBV tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas	108
Tabla 10	Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células Jurkat tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas	108
Tabla 11	Viabilidad con el ensayo de FDA/BrE en las células RKO tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas	109

RESUMEN

Los estudios epidemiológicos indican que el arsénico es un carcinógeno humano y aunque se han propuesto varias hipótesis para explicar la carcinogénesis inducida por este compuesto no ha sido posible dilucidar su mecanismo de acción. Nuestros estudios han mostrado que la proliferación de los linfocitos está alterada en los individuos que consumen arsénico en el agua de bebida y también en linfocitos humanos tratados *in vitro*. Por otra parte, se conoce que el control de la proliferación celular está modulada por proto-oncogenes y genes supresores y que algunos de ellos se asocian con el proceso canceroso. Muchas funciones se atribuyen al supresor *p53*, como son la regulación del ciclo celular y ser un componente importante en la respuesta a daño al ADN.

En este estudio, dado el papel que tiene el gen *p53* en el control de la proliferación celular y en la respuesta a daño al ADN, proponemos que la alteración de la proliferación inducida por el arsénico, está mediada por modificaciones en la expresión de *p53*. Para probar esta hipótesis, se evaluó la expresión de la proteína *P53* y el ciclo celular en líneas celulares que tienen el gen *p53* normal y mutado.

Los resultados indican que el arsenito de sodio induce un incremento en los niveles de la proteína *p53* en forma dosis-repuesta en las células que tienen el gen *p53* funcional. El análisis de la sensibilidad citotóxica al arsénico muestra que las células son más sensibles cuando tienen alterado el gen *p53*. El análisis de la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular indica que las células con *p53* funcional se acumulan en la fase G_2/M ; sin embargo, mediante ensayos de la cinasa *p34 in vitro* se encontró que estas células se detienen específicamente en la fase M.

En estudios previos encontramos que el arsénico altera la polimerización de microtúbulos por lo que proponemos que la inducción de la proteína *p53* se debe a la existencia de un punto de control en "M" que detecta el daño y detiene a las células en metafase.

Capítulo 1

INTRODUCCION

1.1. GENES QUE PARTICIPAN EN EL DESARROLLO DEL CANCER

Los tumores son el resultado de alteraciones en los procesos que controlan el crecimiento normal de la célula, la localización y la muerte celular. Esta pérdida de los mecanismos del control normal puede ser ocasionada por la presencia de mutaciones en tres amplias categorías de genes:

- 1) proto-oncogenes, cuyos productos normales son componentes de los caminos de transducción de señales que regulan la proliferación y que, en su forma mutada, se convierten en oncogenes dominantes;
- 2) genes supresores de tumores, que generalmente tienen un comportamiento recesivo y su pérdida de función en el cáncer conduce al control desregulado de la progresión del ciclo celular, adhesión celular; y
- 3) enzimas de reparación del ADN, en las cuales las mutaciones propician la inestabilidad genética (Fig. 1).

También se propone que las mutaciones en estos genes determinan los cambios en la expresión de proteínas en la superficie celular, en la secreción y la muerte celular, de esta forma contribuyen a desarrollar un fenotipo de metástasis, porque hasta ahora ninguna mutación ha sido todavía específicamente asociada con la metástasis.

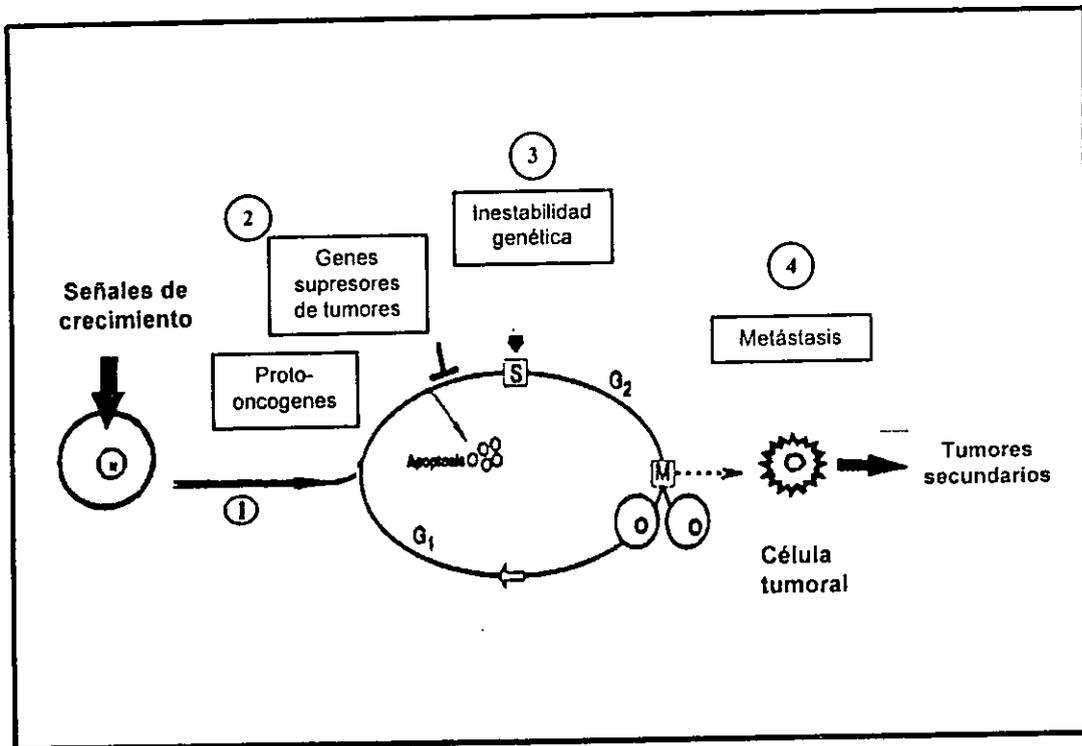


Figura 1. Señales genéticas relacionadas con el desarrollo del cáncer. Tres categorías funcionales pueden distinguirse dentro de las cuales las mutaciones pueden originarse: (1) y (2) en las señales de proliferación de la célula, en el control de la progresión del ciclo celular y la apoptosis (proto-oncogenes y genes de supresores de tumores), (3) en la promoción de la inestabilidad genética a través de mutaciones en los genes de reparación del ADN y (4) los efectos asociados con la metástasis (Tomado de Hesketh, 1997).

La idea de que el cáncer podría ser causado por anomalías genéticas se originó cuando se encontró que ciertas familias parecían tener predisposición al cáncer. Posteriormente, se observó usando el microscopio de luz que los cromosomas de las células cancerosas frecuentemente eran de tamaño o forma anormal cuando se comparaban con los cromosomas de las células normales. Los más recientes descubrimientos han mostrado que hay una conexión entre la susceptibilidad al cáncer y la habilidad de las células para reparar el daño al ADN y que el potencial mutagénico de una sustancia se relaciona con su carcinogenicidad, todo esto es ahora consistente con el concepto general de que los genes celulares (proto-oncogenes) en otra forma (oncogenes) causan el crecimiento neoplásico (Bishop, 1995). Estas observaciones sugieren que el cáncer es originado por la proliferación desregulada, sin embargo, recientemente se ha propuesto que la modulación de los procesos normales que

conducen a la muerte de las células (muerte celular programada o apoptosis) es otro factor necesario para el desarrollo de tumores (Hesketh, 1997).

La característica fundamental de las células cancerosas es la pérdida de la capacidad de controlar su crecimiento y división, las células malignas se dividen cuando y donde no deberían hacerlo, siendo el resultado de su proliferación desorganizada la formación de un tumor. Con el objeto de conocer mejor el proceso canceroso parte de la investigación se ha enfocado en el control de la proliferación celular.

1.2. EL CONTROL DEL CICLO CELULAR

La maquinaria que controla el ciclo celular en los eucariotes está compuesta de complejos proteicos que son activados siguiendo un orden y desencadenando eventos tales como la replicación del ADN, la formación del huso mitótico y la segregación de los cromosomas. Para su fácil entendimiento, el ciclo de las células eucariontes es dividido en cuatro fases: G_1 , S, G_2 y M (Fig. 2). La fase S es el período de síntesis del ADN, durante el cual de una cadena se origina una segunda copia del genoma. 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 período de interfase. Los períodos G_1 y G_2 son espacios temporales de preparación previos a la duplicación del ADN y a la división celular respectivamente.

Existe además, un estado de "reposo" (o latente) de las células que no se encuentran en proliferación denominado G_0 , 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 puede causar la salida de las células del ciclo y su entrada a G_0 , la estimulación con factores de crecimiento a su vez, puede inducir nuevamente la entrada al estado de proliferación (Graña y Reddy, 1995; Weinstein y Zhou, 1997).

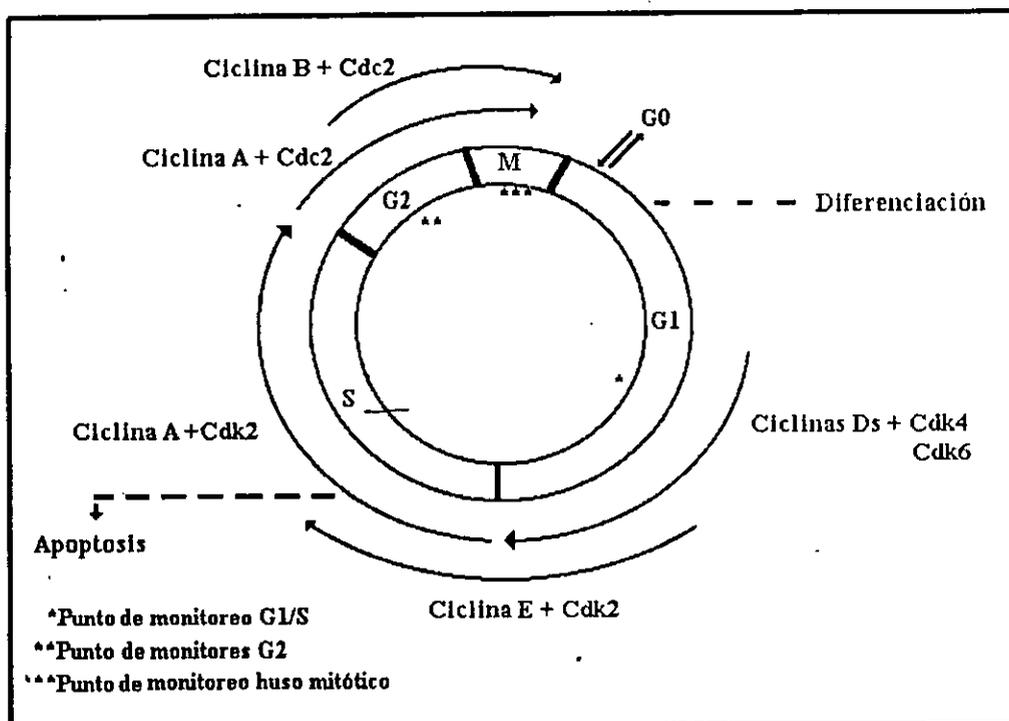


Figura 2. Diagrama del ciclo celular en los organismos eucariontes. Se muestran las cuatro fases del ciclo: G_1 , S, G_2 y M, además de la fase de reposo G_0 . La progresión de una fase a otra está regulada por la interacción de los complejos ciclinas-Cdk; las ciclinas D están implicadas en G_1 , las ciclinas E en la transición de G_1 a S, las ciclinas A con la fase S y en el paso de G_2 a M, finalmente las ciclinas B están involucradas en la transición de G_2 a M. Se indican los puntos de control del ciclo (Tomado y Modificado de Graña y Reddy, 1995).

Para asegurar la integridad de la célula y de su material genético, los eventos que ocurren durante el ciclo celular deben de seguir una secuencia 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 una serie de puntos de vigilancia o control para asegurar que el orden y el tiempo de los eventos sea el correcto (Murray, 1992). Estos puntos de control, son los 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 corregido o bien se toman las decisiones que llevan a la eliminación de las células dañadas (Hung et al, 1996; Murray, 1992).

1.2.1. LA TRANSICION DE LA FASE G_0 A LA FASE G_1 O LA SALIDA DEL ESTADO LATENTE.

El control de la proliferación celular en los eucariontes se realiza primero, en la transición de la fase G_0 al estado en división activa por los mecanismos de transducción de señales a través de los factores de crecimiento y segundo, en dos puntos de control dentro del ciclo celular de las células en división activa: uno en la fase G_1 tardía que dirige la entrada a la fase S y otro en G_2 tardía que regula el inicio de la mitosis (Pardee, 1989).

La interacción de los factores de crecimiento con sus receptores enciende las señales y produce el estímulo de crecimiento celular. Estas señales desde la superficie de la célula al núcleo son mediadas por la activación de la proteína cinasa C y pasan hacia la cinasa MAP-2 (proteína activada por mitógenos) que fosforila a varias proteínas, entre las que están la proteína 2 asociada a microtúbulos, la caseína cinasa II y la proteína cinasa S6 ribosómica. Estas cinasas son activadas primero por mitógenos, ésteres de forbol o péptidos de factores de crecimiento (Boulikas, 1995). Sin embargo, aún no son dilucidados completamente todos los detalles acerca las vías de activación de cinasas mediadas por los factores de crecimiento.

En este sentido, se conoce que las células (fibroblastos BALB/C 3T3) que son cultivadas sin suero entran en un estado llamado G_0 en cual el crecimiento y la división celular son detenidos y la adición de factores de crecimiento inicia una compleja serie de eventos que causan la entrada de las células a la fase G_1 y que culminan en la

síntesis de ADN durante el estado S y en la división de la célula durante la fase M (Lau y Nathans, 1985; Rollins y Stiles, 1989; Norbury y Nurse, 1992).

Han sido identificados diversos genes cuya expresión se estimula por los factores de crecimiento en la transición G_0/G_1 (Sukhatme et al, 1988). Estos genes "inmediatos-tempranos" inducidos por los factores de crecimiento del suero se caracterizan por su inducibilidad en presencia de inhibidores de la síntesis proteica y así, preexisten en las células en estado en reposo; por ejemplo, *c-fos* y *c-jun* modulan la expresión de los genes involucrados en la progresión del ciclo celular (Gutman y Wasylyk, 1991). Los esfuerzos enfocados en los eventos tempranos de la respuesta proliferativa han llevado a la identificación del factor de respuesta del suero (FRS) como un participante importante en el proceso de la activación (Treisman, 1987).

1.2.2. EL ESTADO G_0 Y LOS GENES QUE PARTICIPAN EN LA INHIBICION DEL CRECIMIENTO.

Poco después de concluida la mitosis, las células tienen la opción de entrar en el siguiente ciclo celular o de alcanzar el estado G_0 (Zetterberg y Larson, 1985). Las células en el estado G_0 o también llamadas fuera de ciclo, parecen tener un subconjunto de factores que inhiben la entrada a S, lo cual es mejor reflejado por las diferencias en las especies de ARN entre las células en crecimiento y las células en reposo (Williams y Penman, 1975). Cuando se eliminan los factores de crecimiento de las células en cultivo (por ejemplo, eliminación de suero fetal) entran al estado G_0 . Los genes que específicamente se expresan en estas células en G_0 son de interés especial debido a su uso potencial en la supresión del crecimiento de las células tumorales. Uno de estos genes que detienen el crecimiento (o genes supresores de tumores) es el gen llamado *gas* (de growth arrest specific) que codifica para una proteína de la membrana (Del Sal et al, 1992). El factor TGF $\beta 1$ que inhibe el crecimiento puede arrestar a las células epiteliales en un punto muy cercano a la entrada de S (Moses et al, 1990). Otros genes como *gas1* y *gas2* se expresan esencialmente en las células en el estado

G₀ y codifican para proteínas localizadas en matriz nuclear, citoesqueleto, membrana celular y la red secretoria (Schneider et al, 1988; Manfioletti et al, 1990).

1.2.3. LA TRANSICIÓN DE LA FASE G₁ A LA FASE S.

Los elementos responsables de permitir que la célula pase de una fase a otra son una serie de proteínas cinasas y fosfatasas que se activan y desactivan unas con otras. Las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) son las responsables de fosforilar una serie de substratos 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; la característica principal de las ciclinas, es su degradación proteolítica casi completa en la transición de la metafase/telofase y su resíntesis a través de las fases S y M temprana (Minshull et al, 1989). Se conocen actualmente ocho ciclinas (Xiong et al, 1991; Koff et al, 1992, Pines, 1997).

Inicialmente, fue propuesto que la progresión de células en fase S era determinada por la acumulación de una proteína lábil llamada proteína de punto de restricción R (Pardee, 1974; Campisi et al, 1982). Los avances genéticos y bioquímicos muestran que los complejos de Cdc2 (de cell division cycle genes) y de Cdk-2 (clase especial de cinasa-2 dependiente de ciclinas) con las ciclinas, regulan el punto de control G₁/S y son consistentes con el modelo de que esta proteína R corresponde a la ciclina E y A, que son las ciclinas de la fase G₁, encontradas en las levaduras y las células de mamífero respectivamente (Dou et al, 1993; Pines, 1997).

Existe evidencia de que las ciclinas A, D1 y E en asociación con Cdks regulan la transición de la fase G₁ a la S (Pines, 1997). La ciclina A es esencial para la replicación del ADN (Pagano et al, 1992) promoviendo la progresión de las células a través de la fase de S (Rosenbaltt et al, 1992), de esta forma la transición a la fase S es activada por la asociación de la ciclina A con la proteína Cdk2 (Girard et al, 1991; Pagano et al,

1992). Además, la ciclina A está relacionada con la proteína del retinoblastoma (Rb) (ver adelante). La ciclina D1 se asocia con varias proteínas tipo cinasas, incluyendo las Cdk2, Cdk4 y Cdk5 para controlar el punto de la transición G_1/S ; y la asociación de ciclina D1 con antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) el cual es involucrado en la replicación y la reparación del ADN proporciona una unión directa entre la replicación y la fosforilación (Xiong et al, 1993). Varios genes cdk ya han sido identificados; el producto de uno de ellos, el Cdk4, forma un complejo con las ciclinas del tipo D para controlar el paso a través de la fase G_1 , y Cdk4 es regulado en las células humanas a través de p16, en donde p16 secuestra a Cdk4 y de esta forma inhibe la actividad catalizadora de los complejos ciclina D/Cdk4 (Serrano et al, 1993). Otros estudios indican que la ciclina E de las células humanas puede interactuar con dos variantes de Cdc2 (Koff et al, 1992), mientras que algunas investigaciones demuestran que el complejo ciclina E/cdk2 en las células de mamífero pueden controlar la transición de la fase G_1/S (Tsai et al, 1993).

Se pensaba que la cinasa $p34^{cdc2}$ era la reguladora maestra del ciclo celular en las levaduras porque era necesaria para la progresión a través de la entrada y de G_2 tardía (Nurse, 1990). Sin embargo, los estudios posteriores han mostrado que cinasa $p34^{cdc2}$ controla sólo la transición a la fase G_2/M (Lew et al, 1992).

Varios genes responden a las señales de proliferación y su expresión es esencial para la progresión de células a través de la fase de S. La expresión del gen de la histona se activa en la fase S temprana y su expresión permanece a lo largo de la fase de S hasta que concluye la formación del nucleosoma nuevo (Stein et al, 1992). Varios factores de transcripción que están involucrados en síntesis de las histonas durante la fase S o en el empaquetamiento del ADN son regulados por fosforilación, entre los cuales está incluido el factor Oct-1, importante en la regulación de la transcripción del gen de la histona H2B y en la activación de la duplicación del ADN (Fletcher et al, 1987). Otros genes requeridos para la síntesis del ADN y específicamente inducidos durante la fase de S son el gen dehidrofolato reductasa (*dhfr*) (Farnham y Schimke, 1985) y el gen timidilato sintetasa (Nagarajan y Johnson, 1989), así como el gen de la

timidina cinasa regulado en G_1/S por una cinasa *cdc2* y por una proteína parecida a Rb (Dou et al, 1992) y los genes de ciclinas ya mencionados.

Otros de los genes responsables de la progresión a través de la fase S del ciclo son los genes de la familia *myc* (*c -*, *N -*, *L-myc*) que codifican para proteínas relacionadas que parecen activar los orígenes de replicación (Iguchi-Arigo et al, 1988).

La proteína Rb, es una de las piezas centrales en la progresión de la fase G_1 a la fase S; en la fase G_1 temprana, esta proteína se encuentra hipofosforilada y forma complejos con el factor de transcripción E2F, este factor media la transcripción de varios genes virales, así como de algunos genes celulares que contribuyen con las actividades enzimáticas involucradas en la replicación del ADN (Boulikas, 1995; Weinberg, 1995); se ha reportado que la transcripción del factor E2F tiene un papel muy importante en el mando de genes involucrados en la activación de la replicación del ADN porque éste factor activa a los genes *myc* y *dhfr* (Mudryj et al, 1991) así como su participación en la activación de genes que transcriben enzimas necesarias para la síntesis de precursores de los nucleósidos y enzimas que parecen ser requeridas para la replicación del ADN (Weinberg, 1995). De esta forma Rb, actúa durante G_0 o G_1 secuestrando el factor E2F e inhibiendo así la transcripción de un grupo de genes requeridos para entrar a la fase S del ciclo celular. La proteína Rb al final de la fase G_1 es fosforilada por las cinasas Cdk, lo cual hace que cambie la conformación y los complejos Rb-E2F sean liberados, de esta manera, conduce a la transcripción de genes y a un aumento en la actividad metabólica concerniente a la replicación del ADN (Goodrich et al, 1991; Weinberg, 1995). Parece que Rb también regula la actividad de transcripción de las ARN polimerasas I y III, que transcriben ARN ribosomal y de transferencia, respectivamente (White, 1997).

1.2.4. EL PUNTO DE CONTROL DE LA FASE G₂/M.

La transición de G₂/M se caracteriza por alteraciones estructurales muy evidentes en la célula. Estos cambios incluyen el desmontaje de la membrana nuclear por la despolimerización de la capa laminar, el empaquetamiento de la cromatina interfásica en los cromosomas mitóticos, el ensamble de la red de filamentos de actina; y otros cambios como el desmantelamiento de los microtúbulos citoplásmicos y su reensamble en el huso mitótico, así como el apilamiento del aparato de Golgi y la vasicularización del retículo endoplásmico (Alberts et al, 1989).

En este punto de control, p34^{cdc2} tiene un papel crucial. La desfosforilación de un solo residuo tirosina en p34^{cdc2} facilita la entrada de células en la mitosis (Goul y Nurse, 1989). Otros estudios en este campo indican que el ciclo de la célula es principalmente regulado a través de cdc2 en asociación con las ciclinas B en la fase G₂/M (Slingerland et al, 1994). Otro evento importante es la fosforilación de la histona H1 y las láminas por la proteína Cdc2, dicho evento dispara el ensamble de los cromosomas y la ruptura de la lámina nuclear, respectivamente, como un preludio a la mitosis. También el factor promotor de maduración (FPM) compuesto por p34^{cdc2} (o Cdc2Hs en células humanas) y por las ciclinas de tipo B es responsable de activar todos estos eventos de la mitosis regulando el punto de transición G₂ a M (Minshull et al, 1989; Murray et al, 1989; Slingerland et al, 1994; Pines, 1997).

1.3. EVENTOS BIOQUIMICOS ASOCIADOS CON LA PROLIFERACION CELULAR.

La regulación de proliferación celular ocurre a través de la activación de las rutas bioquímicas mediante la interacción de los factores del crecimiento (o mitógenos) con sus receptores en la membrana plasmática. Hay diferentes factores de crecimiento, por

ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor de crecimiento parecido a insulina (IGF); y una sola célula tiene a menudo una variedad de tipos de receptores. Sin embargo, sólo son conocidos cuatro mecanismos básicos de señalización que pueden ser activados por trans-receptores de la membrana:

1) *Activación de adenilato ciclasas.* La función de las adenilato ciclasas (enzimas unidas a la membrana) es generar AMP cíclico a partir de ATP, en respuesta a una variedad de receptores agonistas (por ejemplo, hormonas y neurotransmisores). La actividad de la adenilato ciclasa es regulada positiva o negativamente por proteínas G heterotriméricas específicas (G_s y G_i). El proceso ocurre cuando cambia la conformación del receptor por unión con su factor de crecimiento (ligando), dejando accesible el sitio del receptor con el que se une a la proteína G; la unión del complejo ligando/receptor con la proteína G activa el desplazamiento de GTP a GDP causando la disociación de la subunidad α y de esta forma expone el sitio para la unión y activación de la adenilato ciclasa para generar muchas moléculas de AMP cíclico (Gilman, 1984). En los últimos años al menos ocho isoformas de adenilato ciclasas han sido clonadas y expresadas.

Las mutaciones en las proteínas G ocurren en algunos cánceres humanos, por ejemplo, mutaciones en la proteína GSP/ G_{α_s} conducen a una elevación sostenida de AMP cíclico en algunos carcinomas de tiroides y en tumores ováricos y mutaciones en la proteína GIP2/ $G_{\alpha_{12}}$ en tumores de la corteza suprarrenal y en tumores ováricos endocrinos ((Michiels et al, 1994; Muca y Vallar, 1994). Esta vía de señalización que involucra a las proteínas cinasas dependientes de AMP cíclico es importante porque regulan muchos procesos celulares.

2) *Activación de adenilato ciclasas para generar GMP cíclico.* Se sabe que el GMP cíclico activa a una proteína cinasa específica (cinasa G) que fosforila proteínas blanco en la célula. Si bien, el papel en la señalización por receptores de membrana, con muy pocas excepciones, es poco claro, su acción es especialmente bien conocida en las células de la retina, donde el GMP cíclico actúa directamente en los canales de Na^+

manteniéndolos abiertos. Además de que las concentraciones de GMP cíclico son moduladas en las células fotorreceptoras en respuesta a la luz, también media otros procesos que incluyen, la relajación de músculo liso (Schnapf y Baylor 1987).

3) *Activación de enzimas fosfolipasas* (principalmente PtdIns-PLC β_1) por la interacción de agonistas con receptores transmembranales de siete segmentos que son acoplados a proteínas G heterotriméricas específicas. Los sistemas de señalización que utilizan proteínas G son muy diversos, como se menciona arriba algunas de las proteínas G (G_s y G_i) acoplan receptores para la adenilato ciclasa, mientras que otras (G_p) acoplan receptores para la fosfolipasa C. La interacción factor de crecimiento/receptor es asociada con la activación de la fosfolipasa C unida a la membrana, la cual cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP $_2$) a diaciglicerol (DG) y inositol 1,2,5-trifosfato (IP $_3$). La acción de IP $_3$ incrementa la concentración intracelular de Ca $^{+2}$ libre, llevando a la activación de varias proteínas y enzimas, entre ellas una proteína receptora de calcio, la calmodulina. Se sabe que la progresión de las células de G $_1$ a S es dependiente de Ca $^{+2}$ (Means y Rasmussen, 1988; Reddy, 1994). Por otra parte, el DG activa la proteína cinasa C, la cual fosforila proteínas blanco en residuos de serina y/o treonina. Tanto la proteína cinasa C, como los nucleótidos cíclicos (AMP y GMP) son ampliamente implicados en la proliferación celular (Persons et al, 1988; Reddy, 1994).

Algunas células cancerosas sobreexpresan además de algunas oncoproteínas, los receptores transmembranales o las proteínas G mutadas, por ejemplo, GIP2/ $G_{\alpha 2}$, $G_{\alpha 13}$, GSP/ $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$ (De Vivo et al, 1992; Michaels et al, 1994; Muca y Vallar et al, 1994; Vara Prasad et al, 1994; Rudolph et al, 1995).

4) *Activación de las cinasas*. De las cuales el grupo más importante es el de las cinasas de tirosina, a menudo componentes intrínsecos de la molécula del receptor, este grupo incluye los receptores para muchos factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, PDGF, NGF). Como ya se mencionó, otra vía de transducción de señales activada por la interacción factor/receptor involucra a las cinasas MAP y algunas de las proteínas reguladoras fosforiladas por estas cinasas son también conocidas por

fosforilar a las cinasas dependientes de ciclinas (Izume y Maller, 1991). Además, una cascada de reacciones de cinasas y fosfatasas tras las interacciones factor/receptor, también resulta en la expresión de algunos de los oncogenes, como *c-fos*, *c-myc* y *c-ras*, cuyos productos son críticos en la progresión de las células de G₁ a S.

1.4. GENETICA MOLECULAR DEL CANCER

El cáncer es una enfermedad multifactorial producida fundamentalmente por la acumulación de daño en genes claves que regulan el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. El desarrollo de un tumor es un proceso que puede ser iniciado por mutaciones espontáneas o inducidas por agentes mutagénicos como los carcinógenos químicos y las radiaciones, también ciertos virus pueden causar cambios en el material genético de la célula, la cual podría adquirir mutaciones que escapen de los múltiples controles de la división celular y entonces la acumulación de los cambios pueden dotar a las células de la capacidad de invasión y metástasis.

En la última década ha habido notables avances en el estudio de los aspectos genéticos del cáncer. La investigación en este campo ha permitido importantes aportes al entendimiento del fenómeno de la transformación maligna; se han descubierto alteraciones cromosómicas útiles en el diagnóstico y pronóstico de las entidades neoplásicas y el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido el reciente conocimiento acerca de oncogenes y de genes supresores tumorales. Asimismo, el discernimiento de su función ha abierto perspectivas para la prevención y el tratamiento del cáncer.

En la actualidad se plantea que una célula cancerosa se forma por múltiples alteraciones genéticas, entre éstas se encuentran la **activación** de proto-oncogenes y

la *inactivación* de genes supresores (Bishop, 1991). De hecho, se hace una analogía entre los oncogenes y los genes supresores de tumores, como los *aceleradores* y *frenos* del ciclo celular, respectivamente, por lo que una célula es capaz de "activar" los oncogenes y "desactivar" los supresores, ya sea por cambios estructurales o químicos en el ADN que codifica para ellos. Incluso, se ha propuesto que la activación de dos o más proto-oncogenes a oncogenes, provocan cambios en el fenotipo de la célula para hacerla neoplásica, pero para conseguir un mayor grado de malignidad. Es fundamental que además se produzca la inactivación de un supresor (Bishop, 1995).

1.4.1. ONCOGENES

Hace más de década y media durante los primeros trabajos con retrovirus, fue propuesto que las diferencias entre las células tumorales y normales no involucraban todo su genoma, sino más bien se debían a cambios en algunos pequeños segmentos de material genético a los que se les dio el término de oncogenes o sea genes que causan cáncer (Huebner y Todaro, 1969). Años más tarde se descubrió que las células eucariontas tienen genes homólogos (proto-oncogenes celulares) a los oncogenes de los retrovirus (para revisión Varmus, 1984). Y efectivamente, ahora los miembros de un gran grupo de proto-oncogenes han sido identificados por su homología con las secuencias nucleotídicas de los retrovirus (oncogenes retrovirales).

Los proto-oncogenes son las versiones celulares normales que codifican para factores de crecimiento, receptores, transductores de señales y factores de transcripción. De esta forma participan en la regulación del crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Los proto-oncogenes se convierten en oncogenes por alteraciones que involucran mecanismos como son: inserción viral, amplificación mutación y/o translocación entre otros. Se dice que estas alteraciones los activan porque provocan la desregulación de su actividad normal. En los oncogenes, a diferencia de los genes supresores, la alteración de uno solo de sus alelos es suficiente

Tabla 1. Funciones de los proto-oncogenes

FUNCIONES DE LOS PRODUCTOS DE ONCOGENES	
Clase 1. Factores de crecimiento.	
<i>sis</i>	Factor de crecimiento del PDGF (cadena B)
<i>int-2</i>	Factor de crecimiento relacionado con el FGF
<i>hst (KS3)</i>	Factor de crecimiento relacionado con el FGF
<i>FGF-5</i>	Factor de crecimiento relacionado con el FGF
<i>int-1</i>	Factor de crecimiento ?
Clase 2A. Tirosina cinasas no receptores	
<i>src</i>	Asociada a membrana
<i>yes</i>	Asociada a membrana
<i>fgr</i>	Asociada a membrana
<i>lck</i>	Asociada a membrana
<i>fps/fes</i>	Protein tirosina cinasa
<i>abl/bcr-abl</i>	Protein tirosina cinasa-
Clase 2B. Receptores con actividad de tirosina cinasas	
<i>ros</i>	Parecido a receptor asociada a membrana
<i>erbB</i>	Receptor truncado de EGF
<i>neu</i>	Parecido a receptor
<i>fms</i>	Receptor mutado de CSF-1
<i>met</i>	Parecido a receptor truncado soluble
<i>trk</i>	Parecido a receptor truncado soluble
<i>kit (W locus)</i>	Receptor celular
<i>sea</i>	Parecido a receptor truncado asociado a membrana
<i>ret</i>	Parecido a receptor truncado
Clase 3. Receptores que carecen de actividad cinasa	
<i>mas</i>	Receptor angiotensina
Clase 4. Proteínas G asociadas a membranas.	
<i>H-ras</i>	GTPasa asociada a membrana
<i>K-ras</i>	GTPasa asociada a membrana
<i>N-ras</i>	GTPasa asociada a membrana
<i>gsp</i>	Mutante activada en forma de Gs
<i>gip</i>	Mutante activada en forma de Gi
Clase 5. Protein-serin cinasas citoplasmáticas	
<i>raf/mil</i>	Citoplásmica
<i>pim-1</i>	Citoplásmica
<i>mos</i>	Citoplásmica (factor citosólico)
<i>cot</i>	Protein-serin cinasa citoplásmica ?
Clase 6. Reguladores citoplásmicos	
<i>crk</i>	SH 2/3 proteína que se une (y regula ?) a proteínas que tienen fosfotirosina
Clase 7. Factores de transcripción nucleares	
<i>myc</i>	Proteína unida a secuencia específica de DNA
<i>N-myc</i>	Proteína unida a secuencia específica de DNA ?
<i>L-myc</i>	Proteína unida a secuencia específica de DNA ?
<i>myb</i>	Proteína unida a secuencia específica de DNA
<i>lyl-1</i>	Proteína unida a secuencia específica de DNA ?
<i>fos</i>	Combina con el producto de c-jun para formar el factor de transcripción AP-1
<i>jun</i>	Proteína unida a secuencia específica de DNA; parte de AP-1
<i>erbA</i>	Receptor de factor de crecimiento tipo esteroide
<i>rel</i>	Proteína relacionada NF- κ B
<i>vav</i>	Factor de transcripción ?
<i>ts</i>	Proteína unida a secuencia específica de DNA
<i>ski</i>	Factor de transcripción ?
<i>evi-1</i>	Factor de transcripción ?
<i>gli-1</i>	Factor de transcripción ?
<i>maf</i>	Factor de transcripción ?
<i>pbx</i>	Factor de transcripción quimérico de E2A
<i>Hox2.4</i>	Factor de transcripción ?-
No clasificados	
<i>dbl</i>	Proteína citoplásmica del citoesqueleto ?
<i>bcl-2</i>	Transductor de señal en membrana plasmática?

Tomado y Modificado de Hunter T (1991) Cell 64: 249-270

para inducir transformación, por lo que se dice que tienen un comportamiento dominante (Bishop, 1985).

Hasta recientemente, se conocen las funciones de muchos de los oncogenes en las células normales (Tabla 1). Se ha descrito más de 100 oncogenes y la lista rápidamente se incrementa. A medida que avanzan las investigaciones, se pone de manifiesto en qué forma los oncogenes celulares están implicados en la carcinogénesis. Cabe señalar que la importancia de los proto-oncogenes en la carcinogénesis humana se refleja en la alta frecuencia con la que estos se encuentran mutados en muchos tipos de tumores.

1.4.1.1. LA COOPERACION ENTRE PROTO-ONCOGENES Y EL CONTROL DEL CICLO CELULAR

Existe un gran número de evidencias experimentales que indican que hay cooperación entre los proto-oncogenes para regular el ciclo y por ende para desarrollar la transformación celular. Los primeros hallazgos de que los proto-oncogenes pueden colaborar en el control del ciclo celular mostraron que ciertas combinaciones de oncogenes pueden transformar fibroblastos primarios de roedores primario, mientras que individualmente los mismos oncogenes eran incapaces de transformar las células (para revisión Weinberg 1989; Ruley 1990; Hunter, 1991).

Las combinaciones específicas de oncogenes, conducen al concepto de que los productos oncogénicos que actúan en el núcleo cooperan mejor con aquellos que actúan en el citoplasma (Weinberg, 1985). Por ejemplo, la proteína nuclear Myc coopera con la proteína Ras (proteína citoplásmica asociada a la membrana) para transformar fibroblastos de embrión (Land et al, 1983). Así, es evidente que puede existir cooperación entre los proto-oncogenes y los genes supresores en el control del ciclo celular. Parece probable que los proto-oncogenes constitutivamente activen distintas vías de señalización y también es razonable proponer que un efecto mayor de

cooperación ocurre al final de las cascadas de transducción al nivel de la transcripción (Hunter, 1991), involucrando la inducción y represión génica. Entonces, esto conduciría al incremento de la expresión de genes críticos en el control del crecimiento celular.

1.4.2. GENES SUPRESORES DE TUMORES

La historia del descubrimiento de los genes supresores tumorales, se inició con el estudio de las enfermedades neoplásicas con alta frecuencia en una misma familia, es decir hereditarias. Tal es el caso del retinoblastoma, una de las formas de cáncer humano hereditario. Desde 1971, Knudson postuló que en el retinoblastoma se requieren dos eventos mutacionales para transformar una célula normal en cancerosa, de esta forma para predisponer a una persona a este tipo de tumor, la primera mutación sería en las células gaméticas en una de las copias del cromosoma 13 y al ocurrir la segunda mutación somática (en las células de la retina), entonces el individuo, invariablemente, se vería afectado por la aparición de tumores en la retina. Más tarde, se descubrió que la región que sufre el daño en el cromosoma 13, es la correspondiente al gen *rb* (13q14), esta delección ha sido descrita en varios miembros de una misma familia, según el estudio de Salamanca y colaboradores. De manera que, niños con ambas copias del gen *rb* defectuosas, presentarán tumores en ambas retinas (bilateral) antes de los seis años, mientras que los niños con un alelo dañado en la célula retiniana, por lo general requieren de cierto daño ambiental para inactivar el otro alelo; estos individuos presentan el tumor más tardíamente y usualmente en uno de los ojos (unilateral) (Salamanca et al, 1984; Weinberg, 1995).

Sin embargo, el concepto de la supresión de la proliferación en las células malignas, se origina con los experimentos de fusión de estas células con células normales en cultivo de diversas clases, epitelial, linfocítica, entre otras (Levine, 1993). Las células híbridas resultantes, ya no eran capaces de producir tumores cuando se inyectaban a animales pese a que retenían la mayoría de las propiedades de las

células cancerosas, entre ellas su inmortalidad, pero, ocasionalmente, algunos desarrollaban 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 genes supresores de tumores son sitios vulnerables para daño al ADN porque normalmente funcionan como barreras fisiológicas contra la expansión clonal o la mutabilidad del genoma y pueden impedir el crecimiento y la metástasis de células que son llevadas a la proliferación desenfrenada por los oncogenes. La pérdida de la función de los supresores de tumores puede ocurrir por daño al genoma a través de mutaciones, reorganización cromosómica y no-disyunción, conversión génica o recombinación mitótica. La actividad de los supresores de tumores también puede ser neutralizada por la interacción con otras proteínas celulares o con oncoproteínas virales (Revisiones Bishop, 1991; Harris, 1991; Weinberg, 1991).

Se ha descubierto más de una docena de genes supresores de tumores relacionados con el cáncer y que predisponen a la transformación celular por el daño a las dos copias o por pérdida de la heterocigocidad (Levine, 1993 y 1995). El gen supresor de tumores *p53* es el ejemplo más fascinante porque se encuentra mutado en la mitad de casi todos los tipos de cánceres originados de un amplio espectro de tejidos. Otros genes supresores de tumores importantes en la oncología humana como APC, WT1, P16^{INK4} y NF1 pueden tener una distribución más limitada (Tabla 2); *brca1* y *brca2* son supresores recientemente identificados en la aparición de cáncer de mama en familias con alto riesgo a padecer esta neoplasia (Weinberg, 1996). Otro gen recientemente identificado es *p73*, que se encuentra localizado en una región del cromosoma 1 (1p36) y con frecuencia es delecionado en los neuroblastomas, este gen tiene propiedades de oligomerización y transactivación similares al supresor *p53* y también parece participar en funciones como la inhibición del crecimiento y la inducción de la apoptosis. La sobreexpresión de *p73* puede activar genes que son regulados por

Tabla 2. Ejemplos de genes supresores tumorales involucrados en el cáncer humano

Gene	Localización cromosómica	Mutaciones somáticas		Mutaciones heredadas		Función propuesta
		Tipo de neoplasia		Síndrome	Neoplasias típicas	
<i>p53</i>	17p13.1	Mayoría de los tipos de cáncer examinados		Li-Fraumeni	Carcinomas de mama y corteza adrenal; sarcomas; leucemia; tumor cerebral	Factor de transcripción regula el ciclo celular, respuesta daño a ADN
<i>rb</i>	13q14	Retinoblastoma; osteosarcomas; carcinomas de próstata, pecho, vejiga y pulmón		Retinoblastoma familiar	Retinoblastoma; osteosarcomas	Regula factores de transcripción; regula ciclo celular
<i>apc</i>	5q21	Carcinoma de colon, estómago y páncreas		Poliposis adenomatosa familiar	Carcinomas de colon, tiroides y estómago	Comunica proteínas de superficie celular con microtúbulos
<i>wt1</i>	11p13	Tumor de Wilms, nefroblastoma		WAGR* y Denys-Drash	Tumor de Wilms	Factor de transcripción (desarrollo genitourinario)
<i>wt2</i>	11p15	Tumor de Wilms, nefroblastoma		WAGR* y Denys-Drash	Tumor de Wilms	Factor de transcripción
<i>nf1</i>	17q11.2	Neuroblastoma, melanoma		Neurofibromatosis Tipo I	Tumores neuronales	Proteína activadora de GTPasa para Ras
<i>nf2</i>	22q11.1	Shwannomas, meningiomas, mesotelioma		Neurofibromatosis Tipo II	Shwannomas centrales y meningiomas	Como una proteína del citoesqueleto (merlina)
<i>p16 INK4</i>	9p21	Mesotelioma; melanoma; glioblastoma; carcinoma pancreático		Melanoma familiar	Melanoma	Proteína nuclear reguladora negativa de complejos ciclina-Cdk
<i>ts1</i>	9p21	Blastomas medulares, melanomas		Melanoma familiar	Melanoma	Proteína de 16 KDa (regulador negativo de la actividad de Cdk4)
<i>mts2</i>	9p21	Desconocido		Melanoma familiar	Melanoma	Proteína de 15 KDa (regulador negativo de complejos ciclina-Cdk)
<i>vhl</i>	3p25	Desconocido		von Hippel-Lindau	Hemangioblastoma carcinoma renal	Regulación de la estabilidad del ARN?
<i>dcc</i>	18q21	Cáncer colorectal		Ninguno demostrado		Proteína adhesina membranar
<i>brca-1</i>	17q21	Ovario (raro)		Carcinoma de mama y ovario	Carcinoma de mama	Raparación del ADN
<i>brca-2</i>	13q12	Carcinoma pancreático		Carcinoma páncreas	Carcinoma de mama	Raparación del ADN?
<i>hms-2</i> <i>hmlh-1</i>	2p22 3p21-23	Carcinoma de colon, gástrico y endometrial		Carcinoma colorectal no poliposis	Carcinoma de colon, gástrico y endometrial	Raparación del ADN
<i>atm</i>	11q22-23	Ninguno demostrado		Ataxia telangiectasia	Predisposición a malignidad reticuloide	Proteína involucrada en reparación y daño a ADN
<i>p73</i>	p36	Neuroblastoma		Ninguno demostrado		Propiedades de transactivación similares a <i>p53</i>

*WAGR Síndrome que comprende Tumor de Wilms, aniridia, malformación genitourinaria y retraso.

p53 como es *p21* (*Waf*), sin embargo, su expresión no es regulada en respuesta a daño al ADN y no se une al antígeno T del SV40 como lo hace *p53* (Jost et al, 1997; Kaelin, 1998).

Los genes supresores de tumores mejor caracterizados son los que están involucrados en el control de la proliferación celular, sin embargo, la lista de supresores aumenta rápidamente y aparentemente sus funciones son muy diversas.

1.5. ASPECTOS GENERALES SOBRE EL SUPRESOR *p53*

El producto de *p53* fue identificado al final de la década de los 70's, como una proteína asociada al antígeno T en células de roedores transformadas por el virus SV40 (Lane y Crawford, 1979; Kinzer y Levine 1979). Esta proteína de 53 kDa, se describió inicialmente como una proteína oncogénica ya que podía inmortalizar cultivos primarios (Jenkins et al, 1984) y cooperar con el oncogen *ras* para transformar fibroblastos de embrión de rata (Eliyahu et al, 1984; Parada et al, 1984). Posteriormente se comprobó que estas funciones eran propias de la forma mutante de la proteína y que la proteína normal actuaba bloqueando la transformación celular mediada por oncogenes (Finlay et al, 1989; Baker et al, 1990).

Años más tarde, se determinó que en el cáncer colorrectal, una copia del gen *p53* frecuentemente está delecionada y la otra copia se encuentra casi siempre mutada (Baker et al, 1990; Campo et al, 1991), lo cual se extrapoló a un gran número de neoplasias malignas estudiadas (Donehower y Bradley, 1993; Gottlieb y Oren, 1996). Esto colocó a *p53* como un gen supresor tumoral y de importancia vital en la aparición y progresión del cáncer (Levine et al, 1991; Donehower y Bradley, 1993).

La presencia de un gen *p53* en mamíferos cercanos al hombre o el respectivo análogo en especies inferiores como insectos (Ko y Prives, 1996), es un hecho que denota la función universal de *p53* y su aparición ancestral como uno de los reguladores clave del ciclo celular, muestra que pudo tener una función clave en la sobrevivencia y evolución de las especies. Asimismo, en pocos años, tal ha sido la dimensión de las investigaciones sobre el supresor *p53* que la proteína, fue designada "Molécula del Año 1993" (Koshland, 1993).

El gen supresor de tumores *p53* se localiza dentro del genoma humano en el brazo corto del cromosoma 17, en la banda p13.1. Tiene una extensión de aproximadamente 20 kilobases, en la que se localizan 11 exones y 10 intrones. Los exones 2 al 11, comprenden la región que codifica para la proteína, por lo que la región promotora de transcripción se localiza en el primer exón e intrón (Donehower y Bradley, 1993). la región que codifica para la proteína, por lo que la región promotora de transcripción se localiza en el primer exón e intrón (Donehower y Bradley, 1993).

El ARN mensajero del *p53* totalmente procesado es de 2.2 a 2.5 kilobases de tamaño y posee una vida media mayor a las 12 horas. Se ha encontrado en casi todos los tejidos estudiados, que generalmente expresan niveles bajos, sin embargo se encuentra en mayor proporción en tejido embrionario, en las células con daño a ADN y en las células del bazo y del timo (Levine, 1993).

1.5.1. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LA PROTEINA P53

El ARN mensajero humano codifica para una proteína de 393 aminoácidos, la cual posee una señal de localización nuclear mediante la fosforilación específica de su extremo carboxilo terminal. Su tiempo de vida media es de menos de 20 minutos (Smith y Fornace, 1996), mientras que, la proteína mutada se acumula extensamente en el núcleo o citoplasma de las células transformadas, siendo su vida media de 4 a 20 horas (Baas et al, 1994).

La proteína P53 es un factor de transcripción específico que para llevar a cabo su actividad de supresor requiere la transactivación de ciertos genes específicos (Pietenpol et al, 1994). La proteína consta de 3 dominios funcionales:

1) El dominio de **trans-activación transcripcional**, en el extremo amino terminal, comprende los aminoácidos 1-42, es de carácter ácido y altamente hidrofóbico. *p53* incrementa la expresión entre otros genes de *mdm-2*, el cual se une e inactiva *p53* en un fenómeno de autoregulación; *p21(waf/cip1)*, el cual se une e inhibe al antígeno de proliferación nuclear (PCNA) y a los complejos de ciclinas-G1/Cdk; *bax*, un activador de la apoptosis. Otros genes transactivados por *p53* son el de la 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). 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 y el gen *E124*, el cual es inducido por daño al ADN previo a la apoptosis (Hansen y Oren, 1997). IGF-BP3 es particularmente interesante dado que esta proteína inhibe tanto las señales de supervivencia y mitogénicas para las células (Buckbinder et al, 1995).

p53, además de trans-activador puede actuar como un potente inhibidor de la transcripción de una amplia variedad de promotores celulares que carecen de la región consenso (ver adelante). 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 trans-reprimidos 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 (Ginsberg et al, 1991; Seto et al, 1992).

2) El dominio de **unión al ADN**, entre los residuos 120-290 que están implicados en la unión directa de la proteína al ADN y el reconocimiento de secuencias específicas de nucleótidos (en genes cuya transcripción es promovida por la región amino terminal): 5'-

PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy -3'. La región central en su estructura terciaria presenta dos láminas beta-plegadas que sirven de soporte para los tres sitios de unión al ADN: una estructura de horquilla-lámina-hélice (LSH) que interacciona con el surco mayor de ADN y dos horquillas mayores denominadas L2 y L3. La unión al ADN implica la formación de puentes de hidrógeno entre los residuos específicos de las estructuras LSH, L2 y L3 (cuyas conformaciones tridimensionales son estabilizadas por la presencia de un átomo de zinc) con la cadena de fosfatos del ADN, así como con ciertas bases nitrogenadas en el surco mayor (Prives, 1994; Cho et al, 1994).

3) El dominio básico, **carboxilo terminal**, comprendido entre los aminoácidos 300 a 393. Los residuos 319-360 forman una región flexible encargada de la formación de los tetrámeros p53, estado funcional de la proteína, esta región corresponde al dominio de **oligomerización**. Otro dominio funcional bien definido, se ha establecido en los últimos treinta aminoácidos de la proteína, en esta región altamente básica se han localizado varios residuos que son fosforilados por diversas proteínas cinasas; esta fosforilación se ha relacionado con el paso de una forma de P53 inactiva, hacia una P53 activa en cuanto a la capacidad de unión al ADN y trans-activación de la transcripción (Oren y Prives, 1996).

Entre los aminoácidos 360-393, se ha establecido la función de unión de hebras sencillas de ADN o ARN y la de promover el apareamiento entre hebras complementarias; el factor denominado factor de replicación A del ADN (RPA) se conoce por inhibir su habilidad de unirse al ADN de cadena sencilla (Dutta et al, 1993). La unión a los ácidos nucleicos por esta región, no parece ser secuencia-específica, como en el caso del dominio central (Oliner, 1993; Prives, 1994; Selivanova y Wilman, 1995).

En Figura 3, se presentan las regiones de la proteína que son fosforiladas por diversas proteínas cinasas (Meek, 1994), entre las que se encuentran las caseína cinasas I y II, cdc2, cdk2 y la proteína cinasa de activación del ADN (ADN-PK); la fosforilación que lleva a cabo la ADN-PK en los residuos de serina 15 y 37 al parecer

están involucradas en la estabilización de la proteína y en la actividad de paro en G1, respectivamente (Selivanova y Wilman, 1995).

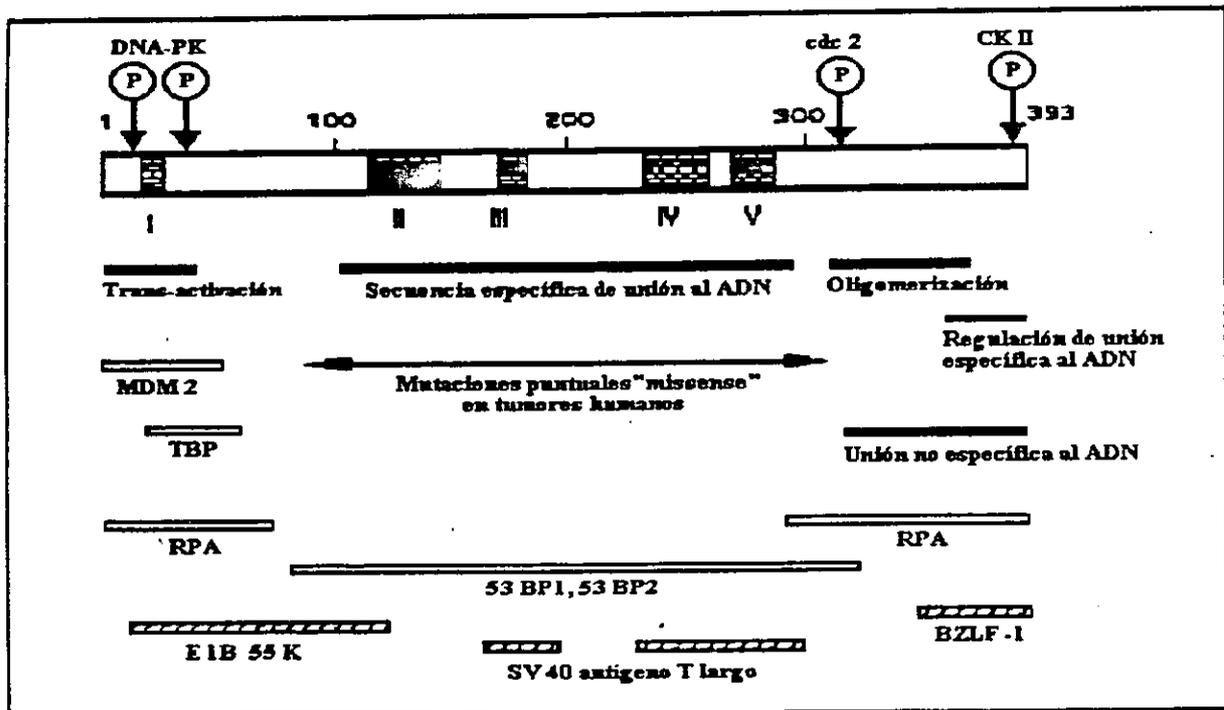


Figura 3. Dominios funcionales y regiones de interacción de la proteína humana de p53. Los dominios funcionales de la proteína p53: el dominio de trans-activación en la porción amino terminal; hacia la región media, el dominio de secuencia específica al ADN con dedos de zinc y el dominio de oligomerización 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^{cdc2}: Ser-315 y CKII: 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 grande) y de Epstein Barr (BZLF1). Los números romanos indican las regiones conservadas de la proteína. (Tomado de Selivanova y Wilman, 1995).

1.5.2. MUTACIONES EN EL GEN SUPRESOR p53

Se ha encontrado que la mayoría de los tumores tanto humanos como inducidos en modelos experimentales, registran la inactivación de la proteína, por mutación en un locus, acompañada generalmente por la delección del alelo restante (Greenblatt et al, 1994).

El gen supresor *p53* es un ejemplo prominente porque está mutado en la mitad de casos de cánceres humanos (Hollstein et al, 1991; el Greenblatt et al, 1994). Aunque los genes supresores de retinoblastoma y APC normalmente son inactivados por las mutaciones sin sentido que producen una proteína alterada o inestable, aproximadamente 80 % de las mutaciones en *p53* son mutaciones con sentido que cambian la identidad de un aminoácido. La mayoría de mutaciones en *p53* son en la región media hidrofóbica de la proteína (Greenblatt et al, 1994), específicamente en los exones 5 al 8, que codifican para las regiones conservadas de la proteína (II, III, IV y V) las cuales son fundamentales para la participación de *p53* en la detención del ciclo celular y apoptosis (Hollstein et al, 1994) (Figura 4). Se ha descrito que la función de la proteína *p53* como un factor de transcripción es particularmente sensible a los cambios conformacionales en la región media hidrofóbica como resultado de las substituciones de aminoácidos (Cho et al, 1994). Los aminoácidos cambiados de esta manera pueden alterar la conformación de la proteína y pueden aumentar la estabilidad de *p53*; también pueden alterar la secuencia específica de unión al ADN y la actividad de factor de transcripción de *p53* (Vogelstein y Kinzler, 1992).

Una explicación para la elevada frecuencia de mutaciones en *p53* es que las mutaciones pueden causar una pérdida de la función del supresor de tumores y una ganancia de la función oncogénica cambiando el repertorio de genes cuya expresión es controlada por este factor de transcripción (Lane y Benchimol, 1990; Dittmer et al, 1993).

El espectro de mutaciones de *p53* en cáncer humano puede ayudar a identificar un carcinógeno particular y puede definir los mecanismos bioquímicos responsables de las lesiones genéticas en ADN que causan el cáncer humano. La frecuencia y tipo de

mutaciones en p53 también pueden actuar como un dosímetro molecular de exposición carcinógena y por eso pueden proporcionar información sobre la epidemiología molecular del riesgo de cáncer humano.

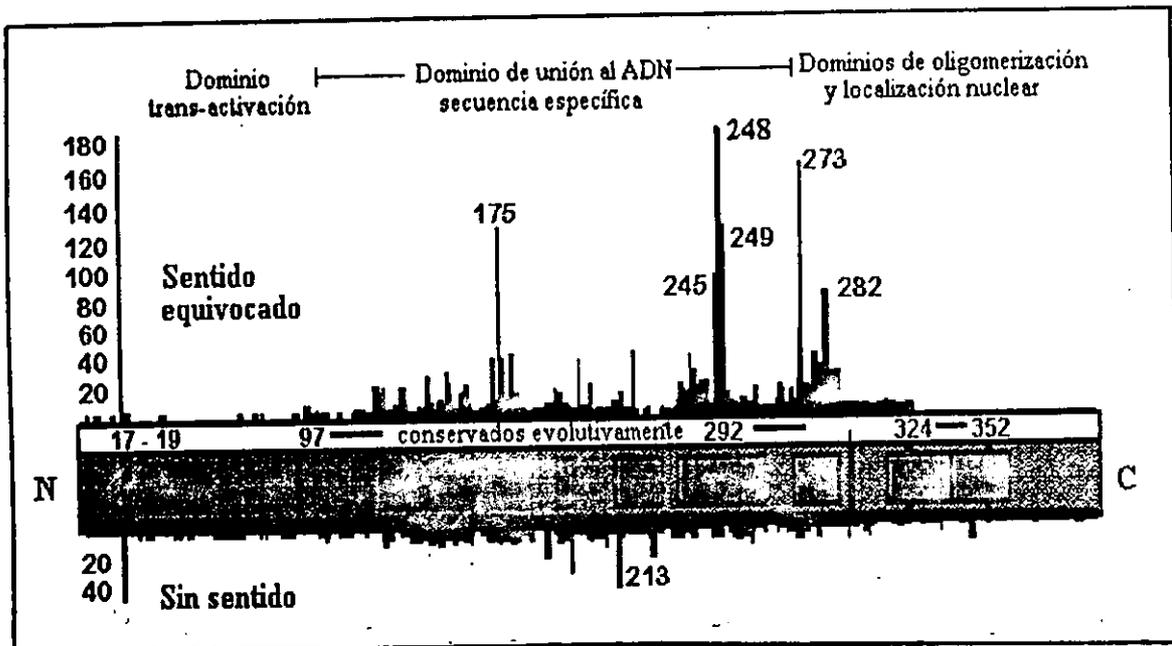


Figura 4. Espectro mutacional de la proteína p53. Se muestra el análisis mutacional de p53, siendo las barras verticales la distribución de las mutaciones. Se describen siete regiones de las denominadas hotspots dentro de las regiones conservadas de la molécula: aminoácidos 130-142, 151-164, 171-184, 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).

Recientemente ha sido planteado que los espectros de la mutación de p53 pueden llevar a la identificación de los carcinógenos que causan un tumor particular (Harris, 1995). Los diferentes carcinógenos parecen causar mutaciones específicas. La exposición a un carcinógeno común, como la luz ultravioleta, se puede correlacionar con mutaciones en sitios dipirimídicos (Brash et al, 1991); la exposición a aflatoxina B1 se correlaciona con transversiones G:C a T:A que llevan a una sustitución del residuo

de serina 249 de p53 en el carcinoma hepatocelular (Hsu et al, 1991; Bressac et al, 1991); y la exposición al humo del cigarro es correlacionada con transversiones G:C a T:A en carcinomas de pulmón (Takeshima et al, 1993).

1.5.3. FUNCIONES DE *p53*

p53 participa en muchas funciones celulares como son: el control del ciclo celular, la reparación del ADN, la diferenciación, la plasticidad del genoma y en la muerte celular programada (Lane y Benchimol, 1990; Levine et al, 1991; Greenblatt et al, 1994). *p53* es un componente en la vía de respuesta al daño al ADN en las células de mamífero (Figura 5). Algunas de estas funciones celulares normales de *p53* pueden modularse y a veces pueden ser inhibidas por interacciones de ciertos virus del ADN con proteínas celulares como Mdm2 o proteínas oncovirales por ejemplo, la proteína X del virus de la hepatitis B. Dada su participación en diversas funciones celulares *p53* es claramente un componente en una vía bioquímica o en las vías centrales a la carcinogénesis humana y las mutaciones en este gen proveen una ventaja selectiva para la expansión clonal de células preneoplásicas y neoplásicas.

La detención del ciclo celular en los puntos de control G₁/S y G₂/M, así como la apoptosis que se lleva a cabo en las células con daño irreparable en su ADN son dos procesos claves regulados por *p53* para controlar la población de células, tanto normales como cancerosas (Donehower y Bradley, 1993; Ko y Prives, 1996; Levine, 1997).

1.5.3.1. DETENCIÓN DEL CICLO EN LA FASE G₁

Varios experimentos han demostrado que *p53* está involucrado en la interrupción del ciclo en la fase G₁ como respuesta a daños al ADN causados por la

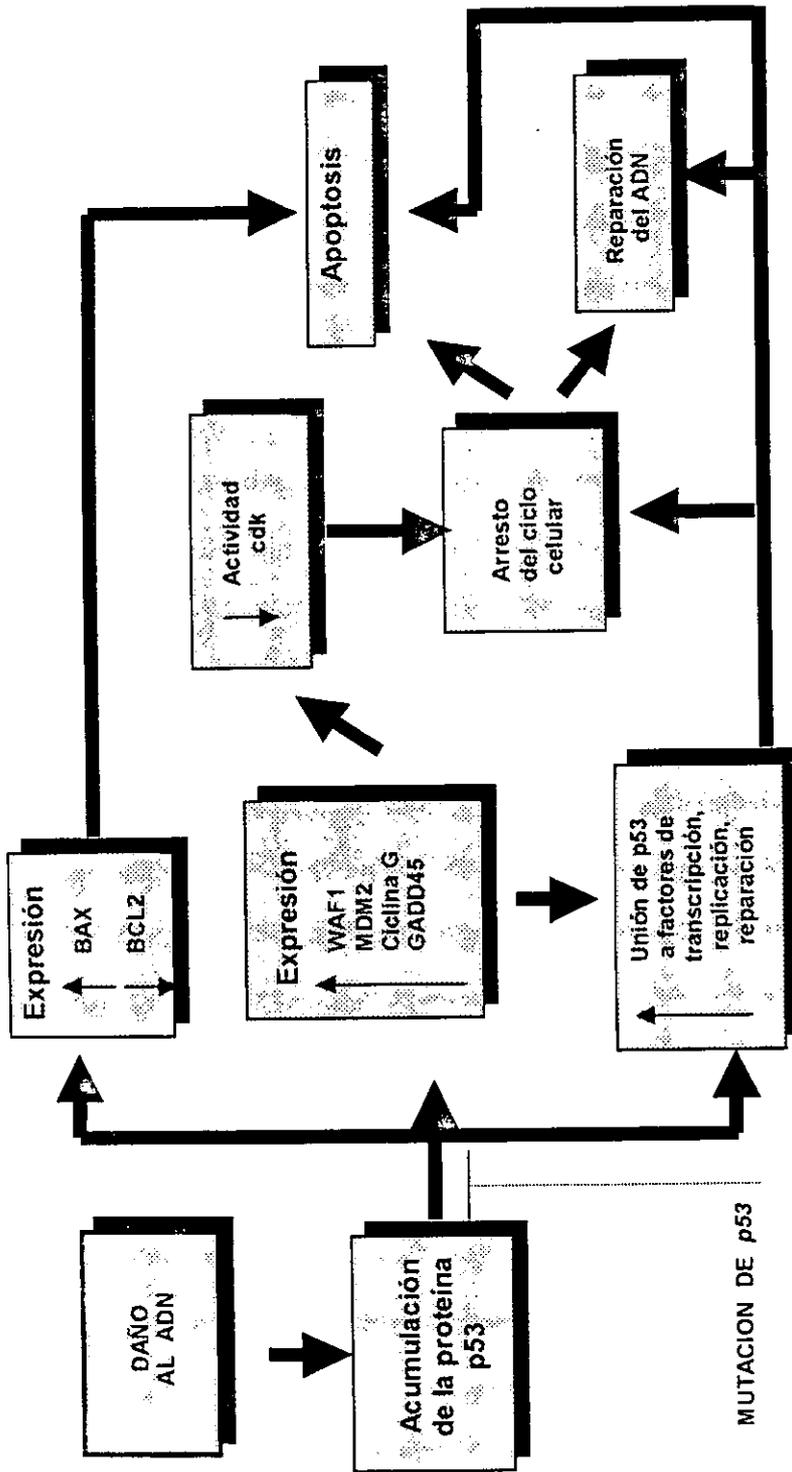


Figura 5. El arresto del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis inducida por el daño al ADN. El daño al ADN conduce a la acumulación de P53 y subsecuentes cambios en la expresión génica e interacciones proteína-proteína (Tomado de Harris, 1995).

exposición a agentes como las radiaciones, sustancias químicas o especies reactivas de oxígeno. Estos agentes producen un incremento en los niveles de la proteína P53 y de su actividad de unión al ADN, que coincide con la inhibición del ciclo en G₁ y la consiguiente inhibición de la síntesis del ADN (Donehower y Bradley, 1993). Estos fenómenos no son observados cuando las células tienen p53 mutado, ni cuando las células son tratadas con agentes que no dañan al ADN, como sucede con el antimetabolito arabinósido de citosina. La interrupción del ciclo celular en el punto de control G₁/S le da tiempo a la célula para reparar el daño antes de iniciar la replicación del ADN. P53 activa (funcional) logra detener el ciclo mediante su unión al ADN y mediante la transcripción de genes que son los efectores físicos para detener el ciclo. Por lo tanto, P53 es una especie de director de varios procesos que se presentan simultáneamente:

- 1) El gen *waf/cip1*, que codifica para una proteína de 21 kDa. Esta proteína participa como mediador de la detención en G₁ inducida por p53 como respuesta al daño en el genoma (Donehower y Bradley, 1993). La transcripción de *Waf/Cip1* es inducida, posterior al daño, por el producto de p53 normal, al unirse a una secuencia específica en la región promotora de *waf/cip*. La proteína *Waf/Cip1* se une e inactiva a ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (como ciclina D-CDK4 ciclina E-CDK2 o ciclina A-CDK2) que son fundamentales para la progresión y regulación del ciclo celular; de esta forma se evita la fosforilación de sustratos críticos para el ciclo celular, como la proteína Rb y las proteínas homólogas de Rb: P107 y P130 (Weinberg, 1995; Hansen y Braithwaite, 1996). Como se ha descrito anteriormente, la proteína Rb hiperfosforilada libera a E2F, factor de transcripción nuclear de varios genes involucrados en la transición de la fase G₁ a S. La pérdida de función de *Waf* por mutación o por expresión alterada, contribuye a la proliferación celular en presencia de señales de crecimiento negativas (Xiong et al, 1993; Harper et al, 1993). También se une al antígeno nuclear de la célula en proliferación (PCNA), que es necesario en la replicación del ADN, lo que tal vez también conduzca al paro del ciclo en G₁ (Gottlieb y Oren, 1996; Levine, 1997). No obstante, también se ha descrito otra vía alterna de

expresión de Waf que es independiente de P53 (Blagosklonny et al, 1997) y ha sido comprobado que en ciertos tipos celulares, P53 es capaz de detener en ciclo en el punto G_1/S sin activar a Waf (Hansen y Braithwaite, 1996).

- 2) Otro gen necesario para detener el ciclo en G_1 y que es activado por P53 en presencia de daño al ADN es el gen *gadd45* (Ko y Prives, 1996). La proteína GADD45 también se une al PCNA evitando la replicación del ADN; se sabe que PCNA interacciona a su vez con la maquinaria de reparación por excisión de nucleótidos (NER). De esta forma es probable que al interaccionar GADD45 con el PCNA, suceda efectivamente la reparación del ADN durante la detención del ciclo celular (Gottlieb y Oren, 1996).

1.5.3.2. DETENCION DEL CICLO EN EL PUNTO DE CONTROL G_2/M

Recientes hallazgos proponen que P53 también participa en el punto de bloqueo G_2/M . Estos estudios muestran que los cultivos de fibroblastos de ratón con agentes inhibidores de la formación del huso mitótico, como son colcemida o nocodazol, permanecen en G_2 , las células entonces regresan a G_1/G_0 después del fallido intento de división celular. Mientras que, los fibroblastos *p53* $-/-$ tratados de igual manera, ignoran el hecho de la falta del huso, entran nuevamente a las fases G_1 y S, y de esta forma se convierten en células aneuploides o poliploides con elevado grado de inestabilidad genética y mayor grado de malignidad (Cross et al, 1995).

El mismo comportamiento se ha observado en fibroblastos humanos, en donde es anulado *p53* o *rb* (mediante su inactivación con las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano, respectivamente) predispone a la aparición de células aneuploides espontáneamente, lo cual se exagera al someter a las células a colcemida y nocodazol (Di Leonardo et al, 1997). En los fibroblastos normales la expresión de *p53* se eleva para resguardar el estado diploide, y si bien el mecanismo debe involucrar la

transcripción de genes por parte de P53, *waf/cip1* no es encontrado entre ellos (Cross et al, 1995; Di Leonardo et al, 1997).

Se ha propuesto una relación entre *p53* y el citoesqueleto, en células carentes de *p53* aparecen espontáneamente varios centrosomas antes de la mitosis y con ello células aneuploides (Fukasawa et al, 1996). De manera que *p53* regula de alguna forma, el ensamble de un huso apropiado.

Investigaciones recientes indican que la expresión de *p53* se lleva a cabo en la "pseudo-fase G₁" a la que entran las células después de que se detectó la falta de huso y se activaron sistemas de alarma, aún desconocidos, que inhiben la apoptosis para salvar a estas células, ya que por ejemplo se requiere la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-XL (Minn et al, 1996). Así, queda establecido un punto de control al menos después de la mitosis fallida, promovido por *p53*, pero sólo si se previene la amenaza de apoptosis.

1.5.3.3. APOPTOSIS MEDIADA POR *p53*

Actualmente se ha descrito la participación de *p53* en una de las vías hacia la apoptosis, que es inducida por radiación o tratamiento con agentes quimioterapéuticos o agentes que dañan al ADN. Los mecanismos por los que *p53* induce apoptosis en una célula, son objeto de un intenso estudio ya que no son del todo claros, de hecho esta actividad de *p53* es la más controvertida y discutida.

Cuando se tratan con ciertos fármacos o radiación cultivos de células de tal forma que se infringe un daño masivo al material genético, lo que se trata es de imitar a condiciones ambientales *in vivo* que ponen en peligro la integridad del genoma y de los procesos celulares basales. La mejor opción para proteger al resto del organismo entonces es llevar a la célula a la apoptosis, ya que un daño genético de tal magnitud puede provocar la aparición de estados patológicos como es el caso del cáncer (Smith y Fornace, 1996; Weinberg, 1996). Al evitar el proceso de apoptosis las células

neoplásicas formadas aseguran su supervivencia y como consecuencia, se desarrollará un tumor.

El proceso de apoptosis se observa físicamente, por la formación de una escalera de ADN al hacerse migrar por electroforesis en un gel de agarosa o acrilamida, lo cual indica la ruptura de puentes internucleosomales por nucleasas específicas en una forma definida, contrario al barrido de ADN que se observa en las células necróticas (Smith y Fornace, 1996). También se sabe que las células apoptóticas hay una marcada actividad proteolítica y se forman sáculos (cuerpos apoptóticos) que son degradados específicamente por macrófagos del sistema inmune (Duke y Ojcius, 1997). De esta forma la célula muere de una forma ordenada, en la que se encuentran involucradas señales bioquímicas específicas generadas por determinados genes (Weinberg, 1996). P53 es uno de ellos y se sabe que puede provocar apoptosis de varias maneras, utilizando diferentes vías de señales:

1) *Expresión elevada de la proteína P53*. Ha sido asociado a la muerte por apoptosis, niveles muy altos de la proteína P53 activa, comparado con el estado basal de P53 en las células (Gottlieb y Oren, 1996; Livingston, 1996).

2) *Genes activados por P53*. Se sugiere que la muerte celular inducida por P53 en algunos tipos celulares (Sabbatini et al, 1995; Attardi et al, 1996; Ko y Prives, 1996), al menos involucra la activación transcripcional de los genes *bax* e *igf-bp3*. El gen *bax* produce una proteína apoptótica y análoga estructural del producto de *bcl-2*, un gen antiapoptótico (Haldar et al, 1997), se ha establecido que la proteína Bax forma heterodímeros con Bcl-2, pero si se elevan sus niveles, lo cual parece ser que se efectúa por mediación de P53, desplaza a Bcl-2 para formar homodímeros que propician la apoptosis; por el contrario, una proteína Bcl-2 sobreexpresada forma los homodímeros respectivos que protegen a la célula y de esta forma se establece un equilibrio entre dímeros formados que llevarán a una respuesta sobre la muerte o vida de la célula (Nuñez y Clarke, 1994; Smith y Fornace, 1996). El gen *igf-bp3*, codifica para una proteína que es un inhibidor del factor de crecimiento parecido a insulina

(IGF), este mitógeno estimula de forma general la progresión del ciclo celular y al ser anulada su actividad, se podría anular toda señal de sobrevivencia (Gottlieb y Oren, 1996; Ko y Prives, 1996).

En los últimos años, se ha involucrado a los genes *ice* y *apofas*, cuyas proteínas se conoce que promueven la muerte celular (Gottlieb y Oren, 1996; Smith y Fornace, 1996; Levine, 1997). Recientemente han sido descubiertos como reguladores de la apoptosis, varios miembros de genes de proteasas de cisteína parecidos a *ice* (enzima convertidora de interleucina-1 β) entre los más estudiados están Nedd2, CPP32, Ich-2 y mch-2 ((Fernandes-Alnemri et al, 1995). Asimismo, se ha identificado nuevos genes candidatos para la trans-activación de P53 y datos recientes indican que otra familia de genes inducidos por P53, es la denominada *pig*, cuyas proteínas son encargadas de producir grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno, lo cual conduciría a un daño masivo en la célula y provocaría su muerte (Bourdon et al, 1997).

3) *Interacción proteína P53 con proteínas de reconocimiento al daño y reparación del ADN.* Se ha planteado que la interacción de P53 con otras proteínas es necesaria para inducir apoptosis y muy probablemente también la detención del ciclo celular. Cuando se realizaron estudios con mutantes de P53 sin la región amino-terminal, se encontró que no era inducida la muerte celular (Gottlieb y Oren, 1996; Ko y Prives, 1996; Levine, 1997), sin embargo, se encontró que dentro de esta región amino-terminal, el dominio de trans-activación comprendido entre los aminoácidos 1-42 no determina esta función (muerte) y específicamente fue atribuida a la región comprendida entre los aminoácidos 61-94; esta región de carácter básico y rica en prolinas parece ser un dominio de interacción en P53 con las siguientes proteínas:

- c-Abl, que tiene acción de tirosina-cinasa, cuya expresión detiene el ciclo. Se ha detectado que el análogo viral, el oncogen *v-abl* carece de la región correspondiente de unión a p53 en los aminoácidos 61-94 (Levine, 1997).
- ERCC2 y ERCC3, son proteínas forman parte del complejo del factor de transcripción basal TFHII. Estas proteínas son helicasas involucradas en sistemas de reparación del ADN. Son producto de los genes *xp-dp* y *xp-b* que

fueron denominados con las iniciales de la enfermedad hereditaria Xeroderma pigmentoso, en la que se encuentran alterados y que se caracteriza por la hipersensibilidad a la luz UV y la aparición de cáncer de piel (Friedberg, 1992).

- Atm, es una proteína que pertenece al sistema de reparación del ADN en daño producido por radiación ionizante; esta proteína se encuentra alterada en la enfermedad genética Ataxia telangiectasia (Levine, 1997; Bourdon et al, 1997).

- Csb, es otra helicasa que también ha sido implicada en la reparación del ADN; se sabe que esta proteína está alterada en el Síndrome de Cockayne (Friedberg, 1992).

El avance en cuanto a dilucidar las múltiples funciones en las que participa *p53*, es monumental y aunque se ha logrado establecer una conexión entre los sistemas de reparación, la expresión de componentes de la replicación y la respuesta de detención del ciclo o apoptosis, mediada por *p53*, aún se investigan otras funciones adicionales que se le atribuyen *p53* (el "guardián del genoma") tales como la inhibición de la angiogénesis (Dameron et al, 1994) y su participación en el envejecimiento celular (Atadja et al, 1995).

1.5.4. DETENCION DEL CICLO O MUERTE CELULAR, UNA DECISION DE *p53*

En la actualidad se intenta resolver el dilema al que se enfrentan las células cuando responden al daño, ya sea induciendo un alto en el ciclo o la muerte celular. Esto significa que *P53* puede interactuar con blancos específicos en G_1 (como *waf/cip*), y que en ciertas circunstancias generan un bloqueo en la progresión del ciclo celular y en otras activan el programa suicida (cuando el daño al genoma es muy grande para ser reparado) por la activación de genes requeridos para la inducción de la apoptosis (como *bax*), o por la represión de genes (como *bcl-2*) cuyos productos suprimen el proceso apoptótico (Yonish-Rouach et al, 1993).

Varios investigadores están de acuerdo con la decisión depende del tipo de células en estudio y de que pueden existir distintos programas de trans-activación de

transcripción de genes o interacción con otras proteínas, que colaboran a su vez con otros mecanismos bioquímicos y así favorecer a una de las dos opciones (Glottlieb y Oren, 1996; Hansen y Braithwaite, 1996; Levine, 1997).

Diversos estudios se han realizado para resolver el dilema sobre qué vía es elegida. Parece que las proteínas apoptóticas y antiapoptóticas (Nuñez y Clarke, 1994; Smith y Fornace, 1996) constituyen la vía principal de decisión entre la vida y la muerte. Ahora se conoce que estas proteínas en su estructura tridimensional se parecen a proteínas que integran los canales iónicos, por lo tanto, tal vez mediante flujos iónicos intervienen en las señales químicas que participan en la degradación del ADN, en la destrucción de mitocondrias y otros de organelos, así como en la formación de sacos apoptóticos (Decaudin et al, 1997).

También se ha propuesto que puede ser una interacción entre los dominios amino y carboxilo (mediada por otros factores o proteínas), en una P53 unida al ADN, lo que determina que se active la vía a la apoptosis, esto tendría por resultado una conformación de la proteína diferente de la que reconoce el daño al ADN (Glottlieb y Oren, 1996) o de la que se presenta en la trans-activación (Prives, 1994), así sería señalado el inicio de la apoptosis inducida por P53 (Chen et al, 1996).

1.5.5. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE P53

Diversas investigaciones proponen que *p53* puede adoptar un estado de conformación tridimensional diferente y así ejercer los efectos antiproliferativo y proliferativo. En este sentido, se plantea que hay relación entre la conformación y la fosforilación para regular la función de *p53* (Ullrich et al, 1992). Para explicar cómo *p53* incrementa e inhibe la proliferación celular, se propone que la proteína puede adoptar dos conformaciones alternativas, que son determinadas, en parte, por el estado de fosforilación., Ullrich y colaboradores proponen que la fosforilación conduce a la forma antiproliferativa de *p53* "silvestre" e inhibe la transcripción de *b-myb*, *PCNA*, α

polimerasa y otros blancos, llevando así la detención del crecimiento en G₁, entonces, la desfosforilación de esta forma daría una señal positiva para el crecimiento, pero las mutantes de *p53* no cambiarían a la forma fosforilada. Alternativamente, *p53* puede formar en su estado normal antiproliferativo complejos con el antígeno T, E1b y E6, modificando la conformación hacia la forma que favorece el crecimiento celular (Ullrich et al, 1992).

La proteína P53 es fosforilada en múltiples residuos de serinas y es sustrato de al menos dos proteínas cinasas, la caseína cinasa II y p34^{cdc2} (Meek et al, 1990; Milner et al, 1990). La fosforilación de P53 se lleva a cabo en los residuos amino y carboxilo terminal (Fig. 3). Los primeros sitios específicos identificados fueron las serinas 312 y 389 en la región carboxilo terminal en *p53* de ratón (Samad et al, 1986); asimismo, son fosforilados sitios equivalentes (serinas 315 y 392) en el *p53* de monos y humanos (Van Roy et al, 1990; Tack y Wright, 1992). Las serinas 315/392 se encuentran en una región del polipéptido *p53* que es importante para la oligomerización y la unión al ADN, sin embargo las mutaciones en las serinas 315/312 indican que la fosforilación en este sitio no es crítica para la trans-activación de *p53* y su capacidad para adoptar el estado antiproliferativo (Meek y Eckhart, 1990).

Recientemente se ha enfocado especial interés en los sitios de fosforilación amino-terminal de *p53*. Usando mutagénesis dirigida para substituir las serinas en *p53* de ratón, se encontró que las serinas 7, 9, 18 y 37 son sitios de fosforilación *in vivo* (Wang y Eckhart, 1992).

1.5.6. EL PAPEL DE P53 EN EL ESTUDIO DE LA CARCINOGENESIS

La inactivación o la pérdida de *p53* favorece la tumorigénesis por permitir la acumulación de mutaciones oncogénicas (debido a la pérdida del punto de control en G₁), o por fallar en la eliminación de células que han sido demasiado dañadas en su ADN, así permite la selección de células con ventajas para la transformación maligna.

La inactivación de *p53* parece también estar asociada con la inestabilidad genómica que puede generar alteraciones múltiples que conducen al desarrollo de cáncer.

Una de las razones del impacto de *p53* en el campo de investigación del cáncer, fue que explicó a nivel molecular, uno de los posibles mecanismos de acción de la quimioterapia y la radioterapia (Lowe et al, 1993a y b) y la razón de por qué en ciertos pacientes resultaban estos tratamientos paliativos y en otros no. La resistencia a la terapia adyuvante en el cáncer en algunos casos esta ligada a la inactivación funcional del *p53* (Lowe et al, 1993a y b; Oren y Prives, 1996). Los tratamientos de quimioterapia y radioterapia actúan dañando directamente al ADN, por lo que una célula tumoral, que presenta un índice de replicación mayor que una célula normal, es más susceptible al daño que sufre por sustancias como cis-platino, 5-fluoruracilo o la radiación ionizante (Giovannuci et al, 1995) y es *p53* el encargado de eliminar a las células bajo estas circunstancias (Lowe et al, 1993a y b). En diversos estudios (la mayoría de carácter retrospectivo), se ha establecido que en muestras de tumores de pacientes que presentan *p53* mutado o inactivado, se tiene un mal y pobre pronóstico en cuanto al tiempo de sobrevida, mayor agresividad de los tumores, aparición de metástasis y otros indicadores, en relación con tumores de pacientes en los que *p53* fue hallado normal (Thor et al, 1991; Fukuyama et al, 1997); esto es especialmente evidente en pacientes con cáncer colorrectal (Fukuyama et al, 1997; Levine, 1997).

Por otra parte, 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 período de 20 a 40 años (Harris, 1993). Existe una gran variedad de agentes que 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. A continuación presentaré con detalle uno de los carcinógenos ambientales de mayor

interés por sus propiedades peculiares y por representar un problema de salud a nivel mundial.

1. 6. *EL ARSENICO, UN CARCINOGENO: CARACTERISTICAS Y EFECTOS BIOLOGICOS*

Los metales y metaloides representan un grupo importante de contaminantes ambientales, no solo por su amplia distribución en la Naturaleza, sino también por que en los últimos años la actividad tecnológica del hombre ha incrementado su emisión en el ambiente; de ahí que las exposiciones humanas ocupacionales, ambientales o accidentales se presenten con mayor frecuencia, representando un problema serio de daño a la salud y al medio. Se conocen bien los efectos inmediatos en la salud (Buffler et al, 1985), sin embargo, los efectos a largo plazo son menos conocidos aunque existe evidencia de daño genotóxico cuya consecuencia se plantea como cáncer, alteraciones embrionarias y fetales y anormalidades reproductoras (Vianna y Polan, 1984; Najem et al, 1985; Griffith et al, 1989). El estudio de los efectos en la salud a corto y largo plazo es complejo porque la toxicidad de los agentes ambientales varía dependiendo de su interacción con otros agentes tóxicos, de su biotransformación y de los niveles de exposición, no obstante, es relevante tratar de dilucidar los mecanismos de acción de aquellos compuestos que sean carcinógenos con la finalidad que en el futuro se puedan prevenir exposiciones ambientales que perjudican a la salud.

Dentro de este grupo de contaminantes ambientales, el arsénico es uno de los compuestos tóxicos de mayor importancia, fue el primer metaloide que se identificó como carcinógeno para el hombre y está ampliamente distribuido en la corteza terrestre (2 a 5 ppm) (IARC, 1987).

Este metaloide, conocido desde los tiempos de Hipócrates, fue inicialmente empleado en algunas preparaciones medicinales para combatir padecimientos como la

anemia, la psoriasis, el asma bronquial, la sífilis, la disentería amibiana e infecciones parasitarias como la tripanosomiasis y la tricomoniasis. En estos tratamientos se observaron los efectos adversos del arsénico, lo que llevó a su prohibición para el uso terapéutico (IARC, 1980). También fue utilizado en los pigmentos para pinturas, pero este uso cesó, cuando se descubrió que en condiciones húmedas, los mohos convierten el arsénico en los gases altamente tóxicos arsina y trimetilarsina (Duffus, 1983). Ha tenido un amplio uso como pesticida y aunque esta prohibido en México se utiliza aún en el cultivo de los tomates en la Huasteca Potosina (Díaz-Barriga et al, comunicación personal)

1.6.1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL ARSENICO

El arsénico está clasificado como un metaloide, aunque tiene muchas de las propiedades de los metales pesados, pertenece al grupo VA de la tabla periódica, su número atómico es 33 y su peso atómico 74.9. Los estados de oxidación en que se encuentra el arsénico en la Naturaleza son -3, +3 y +5; en el estado -3 el compuesto más importante es la arsina (AsH_3). En los estados +3 y +5 el arsénico forma fundamentalmente arsenitos (As^{+3}) y arsenatos (As^{+5}), los arsenitos son las formas más tóxicas del arsénico.

Los compuestos de arsénico **inorgánico** trivalente más comunes son: el trióxido de arsénico (As_2O_3), arsenito de sodio (NaAsO_2) y tricloruro de arsénico (AsCl_3). Los compuestos de arsénico inorgánico pentavalente son: el pentóxido de arsénico (As_2O_5), ácido arsénico (H_3AsO_4) y arseniatos como los de sodio, calcio y plomo [Na_2HAsO_4 , $\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$, $\text{Pb}_3(\text{AsO}_4)_2$].

Los compuestos **orgánicos** de arsénico son el ácido arsanílico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{AsNO}_3$), las formas metiladas que son producto del metabolismo de arsénico: el ácido

monometilarsónico [$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$] y el ácido dimetilarsínico [$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$]; así como algunos organoarsenicales trimetilados presentes en los alimentos de origen marino, como la arsenobetaina [$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}$], la arsenocolina [$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OHX}$] y el óxido de trimetilarsina [$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$] (Yamauchi y Fowler, 1994; Vahter, 1994).

1.6.2. DISTRIBUCION EN EL AMBIENTE Y VIAS DE EXPOSICION HUMANA AL ARSENICO.

De modo natural el arsénico es encontrado en forma de complejos en ciertas rocas y capas minerales; existen alrededor de 150 minerales que contienen arsénico entre los cuales los arseniuros de cobre, plomo, plata, oro y los sulfuros, son más abundantes. El arsénico al encontrarse en la corteza terrestre es liberado al ambiente como resultado de la actividad volcánica y la erosión de los depósitos minerales.

Las principales actividades humanas que emiten arsénico al medio son: en las plantas generadoras de energía eléctrica, en los procesos de fundición y refinación de metales no ferrosos (Pb, Zn y Cu), así como en el uso de combustibles fósiles (carbón, combustible, madera), el uso de agentes conservadores de la madera y la manufactura de semiconductores para la industria electrónica elaborados de arseniuro de galio (GaAs) e indio (InAs); también el arsénico se usa en los pesticidas y en algunas preparaciones médicas (Vahter, 1994). Otra fuente de emisión de arsénico importante es el depósito inadecuado de desechos químicos con grandes cantidades de arsénico (Salazar, 1994).

Puesto que el arsénico es un elemento que se encuentra ampliamente distribuido en forma natural, las concentraciones en el aire en sitios lejanos a actividades antropogénicas son de 1-3 ngAs/m³, mientras que, en áreas industriales emisoras de arsénico se pueden alcanzar niveles entre 100 y 300 ngAs/m³. Las concentraciones en el agua son generalmente menores a 10 µg/L, entre tanto, en sitios cercanos a minas o contaminados con minerales arsenicales, las concentraciones se

elevan entre 200 y 1000 $\mu\text{gAs/L}$. Los niveles de arsénico en el suelo pueden ser entre 1-40 mg/kg, pero en las áreas agrícolas se encuentran niveles más altos por la presencia de residuos de plaguicidas arsenicales.

Una de las vías de exposición al arsénico es la ingestión de alimento de origen marino, entre los cuales los peces y los crustáceos presentan los niveles más altos de arsénico que van de 0.1-90 $\mu\text{gA/g}$ (Cervera et al, 1993). La ingestión de agua proveniente de subsuelos ricos en depósitos minerales, es la fuente más significativa de exposición tóxica y constituye un problema de salud pública descrito en diversas áreas geográficas del mundo como en Taiwan (Tseng et al, 1968; Gou et al, 1994), Chile (Borgoño et al, 1977), Argentina (Astolfi et al, 1981), México (Cebrián et al, 1994) e India (Das et al, 1994, 1995); en todas las regiones se excede la norma permitida de arsénico (50 $\mu\text{g/L}$) en el agua de bebida establecida por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1993). Mientras que las vías de exposición humana al arsénico a través de aire y suelo son poco significativas.

México es uno de los principales países en la producción de arsénico y es peculiar la existencia de zonas con agua altamente contaminada donde el problema de hidroarsenicismo crónico en los habitantes de estas regiones (Puebla, Chihuahua, Hidalgo, Morelos, Nuevo León, Coahuila y Durango), es preocupante.

1.6.3. BIOTRANSFORMACION DEL ARSENICO

Desde 1945 Challenger propuso la formación de los compuestos metilados en seres vivos, suelo y agua, pero hasta principios de la década de los 70s se cuantificaron las especies metiladas de arsénico en la orina de algunos mamíferos incluyendo al hombre (Braman y Foreback, 1973; Crecelius, 1977). En la actualidad no se conoce aún con exactitud el proceso de biotransformación del arsénico, sin embargo, se propone que este proceso involucra dos eventos: las reacciones de reducción que convierten el As^{+5} a As^{+3} y las reacciones de metilación oxidativa que

convierten el As^{+3} en especies metiladas (Cullen et al 1984; Thompson 1993). De tal forma que, el resultado de la biotransformación del arsénico son los metabolitos, el ácido monometilarsónico (AMMA^{+5}) y el ácido dimetilarsínico (ADMA^{+5}) (Fig. 6). Una tercera metilación podría ocurrir en microorganismos y formar compuestos trimetilados como el óxido de trimetilarsénico (TMO). En la mayoría de los mamíferos se considera al ADMA como el producto final del metabolismo del arsénico. Los compuestos metilados del arsénico no se desmetilan para formar arsénico inorgánico (Buchet et al, 1981).

La metilación se realiza en diferentes tejidos como el cerebro, el pulmón, el intestino, el riñón, aunque es reportado que el principal sitio de metilación se lleva a cabo en la fracción citosólica del hígado. El principal donador de los grupos metilos es la S-adenosilmetionina (SAM) y el glutatión reducido (GSH) es el donador de electrones para la reducción de los compuestos arsenicales (Buchet y Lauwerys, 1985). Ya se ha demostrado la formación de complejos biológicos activos de compuestos inorgánicos y orgánicos de arsénico con GSH (Delnomdedieu et al, 1993; Styblo y Thomas, 1995).

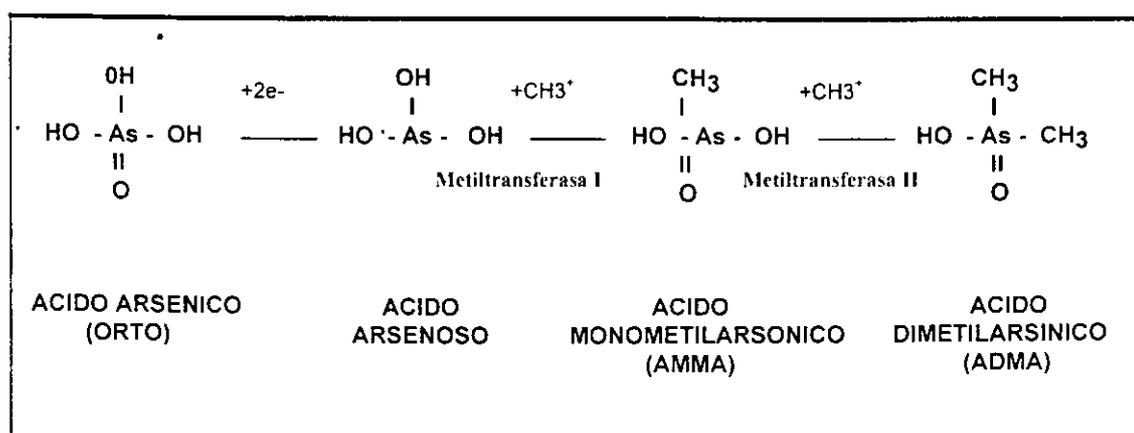


Figura 6. Ruta metabólica del arsénico inorgánico en los mamíferos
(Tomado y Modificado de Yamanaka y Okada, 1994).

El proceso de metilación del arsénico fue sugerido como la vía de detoxificación en los mamíferos pero, estudios recientes proponen a la metilación como una manera de incrementar la genotoxicidad de los compuestos arsenicales, al observar la inducción del rompimiento de la cadena del ADN por acción del ácido dimetilarsínico *in vivo* e *in vitro* (Yamanaka et al, 1989, 1993). Sin embargo, en la actualidad este es un tema que es ampliamente debatido por muchos investigadores (Apostoli et al, 1997; Aposhian et al, 1997).

1.6.3. EFECTOS BIOLÓGICOS DEL ARSENICO

Los efectos tóxicos agudos del arsénico se manifiestan en los sistemas respiratorio, gastrointestinal, cardiovascular, nervioso y hematopoyético. En las poblaciones expuestas crónicamente a arsénico se ha encontrado una mayor incidencia de enfermedades como hiperqueratosis, pie negro, cánceres de piel, pulmón, vejiga, hígado, de tracto gastrointestinal, de cavidad nasal y de riñón (Bojian et al, 1982; Cebrián et al, 1983; Lee et al, 1988; Ostrosky et al, 1991; Bate et al, 1992).

Los estudios epidemiológicos, consideran que el arsénico es un agente carcinogénico para los humanos, sin embargo, no se ha encontrado que los compuestos arsenicales puedan producir cáncer en los modelos animales clásicos (IARC 1980, 1987; Mushak y Crocetti, 1995). Recientemente, se encontró que el arsénico incrementa papilomas inducidos por TPA en ratones transgénicos con el oncogen viral *ras* (Germolac et al, 1997). Asimismo, el ácido dimetilarsínico, un metabolito orgánico del arsénico, en ratas ha mostrado actuar como un promotor en varios órganos previamente iniciados con carcinógenos (Yamamoto et al, 1995).

El arsénico no es un agente mutagénico *in vitro*, aunque recientemente se demostró usando un vector plasmídico deficiente en la reparación del ADN que el arsenito de sodio es capaz de inducir mutaciones en células humanas, al decrecer la actividad de la poli (ADP-ribosa) polimerasa, la cual es implicada en la reparación del

rompimiento de ADN (Yager y Wiencke, 1997). Sin embargo, varios estudios apoyan la capacidad comutagénica del arsénico en una gran variedad de sistemas (Rossman, 1981; Lee et al, 1985; Lee et al, 1986; Li y Rossman 1989a; Li y Rossman 1989b). También ha sido reportado que induce amplificación génica en proteínas de estrés.

El arsénico inhibe la reparación del daño inducido por la radiación ultravioleta o por el metilmetano sulfonato (Jacobson y Montalbo, 1985; Lee et al, 1988; Li y Rossman, 1989). Últimamente, varios estudios apoyan la alteración de los mecanismos de reparación inducida por el arsénico. En esta dirección es propuesto que el arsénico inhibe el reensamble de las cadenas rotas de ADN al interactuar con los grupos ditiolos (Lynn et al, 1997). Además, se ha evaluado la reparación por excisión de nucleótidos en fibroblastos tratados con arsenito después de una radiación con rayos UV, encontrándose alteradas la unión de los fragmentos del ADN y la transcripción acoplada a reparación (Hartwing et al, 1997).

A nivel cromosómico el arsénico induce aberraciones cromosómicas (estructurales y numéricas) y micronúcleos (Ostrosky et al, 1991; Gonsebatt et al, 1992a; Vega et al, 1995). Dado que los rompimientos cromosómicos son de tipo cromatídico e isocromatídico se propone que el arsénico actúa en la fase S del ciclo celular para producir el daño (Vega et al; 1995, Gonsebatt et al, 1997). Asimismo, en los cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio se ha demostrado el efecto aneugénico debido a la alteración de la estructura del citoesqueleto (Ramírez et al, 1997).

También se encontró alterada la respuesta de la proliferación inducida por la fitohemaglutinina (PHA) en los linfocitos de los individuos que consumen arsénico en el agua de bebida (Ostrosky et al, 1991; Gonsebatt et al, 1992b, 1994), siendo evidente un retraso en la progresión del ciclo celular al demostrarse que la cinética de proliferación celular de los linfocitos esta disminuida. Resultados similares se han reportado en linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsénico (Ostrosky et al, 1991; Gonsebatt et al, 1992, 1994).

En cuanto a la modulación de genes, estudios recientes han encontrado que el arsénico trivalente en las células HeLa estimula la actividad transcripcional del complejo AP-1, así como ser un inductor de la expresión de los genes *c-fos* y *c-jun* (Cavigelli et al, 1996); en queratinocitos el arsenato suprime su programación mediante la alteración de los complejos AP-1 y AP-2 (Kachinskas et al, 1997). En el modelo de queratinocitos en cultivo se encontró que el arsenito de sodio potencia la formación de papilomas al estimular genes de los factores de crecimiento y la expresión de *c-myc* (Germolac et al, 1997). En una línea celular de adenocarcinoma de pulmón se encontró hipermetilación en el fragmento promotor de *p53*, este trabajo propone que el mecanismo de carcinogénesis inducida por el arsénico es a través de la alteración de las metiltransferasas y la S-adenosilmetionina (Mass y Wang, 1997)

A nivel celular se ha observado que el arsénico 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). Por otra parte, se ha reportado que el arsénico modifica eventos ampliamente relacionados con la modulación génica, como son la alteración de los niveles intracelulares de calcio, de sodio y potasio, así como la actividad de la proteína cinasa C (Liu y Huang, 1997).

En lo referente a la participación enzimática en el proceso de carcinogénesis originada por el arsénico, se postula que las especies de oxígeno reactivo se encuentran involucradas en la toxicidad del arsénico, cuando en las líneas celulares xrs-5 (más sensibles al arsenito de sodio) y CHO-K se midieron las actividades de la glutatión peroxidasa y de la catalasa se encontró que estas actividades son menores en las xrs-5. Al adicionar ambas enzimas a estas células disminuye la presencia de micronúcleos inducidos por el arsenito, por lo que, estos estudios proponen que el incremento de los niveles intracelulares de antioxidantes podría tener efectos preventivos o terapéuticos contra la intoxicación con arsénico (Wang et al, 1997).

Capítulo 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe un gran número de comunidades expuestas ambiental y ocupacionalmente al arsénico de ahí que represente un problema de salud a nivel mundial. La actividad carcinogénica del arsénico en poblaciones humanas esta ampliamente documentada, aunque el mecanismo por el cual ejerce su efecto (o efectos) se desconoce. Se han realizado estudios previos en el laboratorio relacionados con los efectos del arsénico sobre la función celular, demostrando que la cinética de proliferación celular esta disminuida en individuos que han estado expuestos crónicamente al arsénico, por lo cual ahora nuestros estudios han sido enfocados a buscar alteraciones en la proliferación inducida por este metaloide.

Una forma de abordar el problema es la caracterización de los productos de expresión de proto-oncogenes y genes supresores de tumores cuya participación ha sido relacionada en el cáncer y asociada en la mayoría de los casos a diversos tipos de alteraciones genéticas causantes de cambios en la proliferación, la diferenciación y la muerte celular.

Un gen que tiene un papel relevante en estos procesos es el supresor *p53*, por ello, proponemos que las alteraciones encontradas en la respuesta mitogénica de los linfocitos de individuos expuestos a arsénico en el agua de bebida como expuestos *in vitro*, pueden estar mediadas por modificaciones en la expresión de *p53* y pueden representar uno de los mecanismos por el cual el arsénico es carcinogénico.

Capítulo 3

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS.

El arsenito de sodio es capaz de inducir cambios en la expresión del supresor *p53*, y de esta manera puede producir alteraciones en el ciclo celular y en la proliferación de las células en cultivo. Diferencias en la respuesta al tratamiento con arsénico se encontrarán en las células en cultivo que expresan *p53* en forma normal y en las células que poseen el gen mutado.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar los efectos del arsénico inorgánico en la expresión del supresor *p53*, utilizando líneas celulares que tienen el gen *p53* normal o mutado, así como en linfocitos humanos normales.

Objetivos Particulares.

- 1.- Analizar la sensibilidad citotóxica al arsenito de sodio en linfocitos de sangre periférica humana y en líneas celulares que tienen mutado o normal el gen *p53*.
- 2.- Determinar el efecto del arsenito de sodio sobre los niveles de expresión de la proteína P53 en líneas celulares con la función normal y alterada del gen *p53* por medio de la técnica de Western blot.
- 3.- En modelo biológico de células normales, como es el cultivo de linfocitos de sangre periférica de donadores sanos, evaluar el efecto del arsenito de sodio en la expresión de la proteína P53, por medio de la técnica de Western blot.
- 4.- Analizar el ciclo de los diversos tipos celulares después del tratamiento con arsenito de sodio por medio de citometría de flujo.
- 5.- Estudiar la expresión del ARNm de *p53* en linfocitos de sangre periférica de sujetos sanos, mediante la técnica de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Capítulo 4

MATERIALES Y METODOS

4.1. Cultivos celulares.

Las células HeLa, C-33A, RKO⁺ y RKO⁻ (Tabla 2) fueron cultivadas en medio de DMEM (Sigma) con 10% (v/v) de suero bovino fetal (SFB, Gibco) y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco)(CCL-2 y ATCC). Las células Jurkat (ATCC) y células LCL-EBV fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Sigma) con 10% (v/v) de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina, 10 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco) y 2 mM de L-glutamina (Gibco). Además, se agregó 10 mM el piruvato de sodio (Gibco) al medio de cultivo para las células Jurkat.

Todos los cultivos celulares fueron incubados a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ hasta alcanzar el 90% de confluencia.

Los linfocitos se obtuvieron de 20 ml de sangre periférica heparinizada de donadores sanos y las células mononucleadas fueron separadas por un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Uniparts) como esta descrito por Peper y colaboradores (1968). Brevemente, el gradiente en formación se centrifugó a 1600 rpm durante 30 minutos, el anillo de células blancas se recuperó y lavó con medio RPMI-1640 sin suplementar. Las células mononucleadas fueron estimuladas con fitohemaglutina (PHA) (Gibco) 50 µl (10 µg/ml) por cada 0.5X10⁶ células en medio RPMI-1640 suplementado con 15% de SFB, aminoácidos no esenciales (10 mM) y glutamina (2 mM). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C.

Características de las células utilizadas

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	TIPO	Gen p53***	Función P53****	Referencia
<i>HeLa</i>	Cérvix*	Carcinoma epidermoide	+/+	+	EMBO J. 5: 2285-2292(1986)
<i>RKO+</i>	Colon	Carcinoma	+/+	+	PNAS 90: 3988-3992 (1993)
<i>RKO-</i>	Colon**	Carcinoma	+/+	-	Cancer Res. 56: 5365-5368(1996)
<i>C-33A</i>	Cérvix	Carcinoma indiferenciado	-/-	-	PNAS 88: 5223-5227 (1991)
<i>LCL-EBV</i>	Linfocitos B Transformados con Epstein-Barr	Linfoblastoide	+/+	+	EMBO J. 14: 1382-1391(1995)
<i>Jurkat</i>	Linfocitos T	Leucemia aguda de células T	+/-	-	Mol. Cell Biol. 10:5502-5509 (1990)
<i>Linfocitos</i>	Linfocitos humanos de sangre periférica	Linfoide	+/+	+	Mutation Res. 381: 259-265 (1997)

* infectada con HPV18 (E6)

** infectada con HPV16 (E6)

*** (+) alelo normal, (-) alelo mutado, (+/-) heterocigoto para el gen p53

**** (+) función normal, (-) función alterada de la proteína P53

4.2. Preparación de soluciones de arsénico y su aplicación en los cultivos celulares.

Se preparó una solución estéril acuosa de arsenito de sodio (10 mg/ml) y por diluciones se obtuvieron las concentraciones finales deseadas. Se cultivaron 1×10^6 células durante 24 horas, posteriormente se adicionaron las concentraciones de arsenito de sodio (0.1- 50 μ M). Después del tratamiento con arsénico se dejaron los cultivos por 24 horas más. Se procesaron muestras para la determinación de la

citotoxicidad, para el análisis citofluorométrico, para el ensayo cinasa y para las inmunodetecciones.

4.3. Evaluación de la citotoxicidad.

Después del tratamiento, las células HeLa, C-33A, RKO⁺ y RKO⁻ fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio suplementado y se evaluó la viabilidad celular. Las células Jurkat, LCL-EBV y linfocitos fueron centrifugados, resuspendidas en medio suplementado y se midió la sobrevivencia celular. La viabilidad fue determinada por medio de los ensayos de exclusión por azul tripano y el de diacetato de fluoresceína (FDA)/bromuro de etidio (BrEt).

La viabilidad con azul tripano la cual indica la muerte celular debida a alteraciones de la membrana, se realizó tomando 20 μ l de la muestra celular y fueron mezclados con 900 μ l de medio y 80 μ l azul tripano. Las células se contaron en un hematocitometro y fue calculado el porcentaje de células viables (refringentes) y el porcentaje de células muertas (azules o "acorcholadas"). El método FDA/EtBr el cual pone en evidencia la integridad nuclear de la célula fue realizado mezclando 25 μ l de la muestra de células con 25 μ l de una solución que contiene 30 μ l de FDA en acetona (5 μ g/ml), 200 μ l de EtBr en una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) (200 μ g/ml) y 4.8 ml de PBS. Esta mezcla se colocó sobre una laminilla y fue distribuida con un cubreobjetos. Se analizaron 100 células en un microscopio de fluorescencia; las células viables se observan de color verde fluorescente, mientras que en las muertas los núcleos celulares son teñidos de color anaranjado (Hartmann y Speit, 1996).

4.4. Detección de la expresión de la proteína P53 en las líneas celulares por medio de la técnica de Western blot.

Después de los tratamientos con arsénico, las células fueron cosechadas y los núcleos preparados para la extracción de la proteína como lo describe Blatener y colaboradores (1994), con algunas modificaciones. Brevemente, los núcleos fueron lisados en una solución salina amortiguadora de fosfatos que contenía 1% NP40, 0.5% de desoxicolato de sodio, 0.1% de SDS, 3 mM de PMSF, 20 µg/ml de aprotinina (Sigma) y 10 µl de ortovanadato de sodio (Na_3Va_4) (100 mM). La concentración de proteínas se determinó por medio del ensayo de Bradford.

Para la realización del inmunodetecciones, se calentaron 15 µg del lisado total de proteínas durante 5 minutos en una solución amortiguadora de muestra para corrimiento (2% de SDS, 80 mM de Tris pH 6.8, 10% de glicerol, 5% de mercaptoetanol y 0.01% de azul de bromofenol). Posteriormente las proteínas fueron separadas en un minigel al 10% de SDS-poliacrilamida (Mini Protean, BioRad) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Mini Trans-Blot). La membrana fue bloqueada leche en polvo baja en grasas (1%) y en albumina sérica (1%) y se incubó durante 2 horas con 1 µg/ml del anticuerpo anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology). El blot fue lavado tres veces durante 10 minutos con una solución de tween al 0.1% en TBS, finalmente la membrana fue incubada por una hora con un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Amersham) diluido 1:3000. La membrana nuevamente fue lavada tres periodos de 10 minutos, el blot fue revelado con el método de quimioluminiscencia ECL (Amersham) y expuesto a una placa de rayos X.

4.5. Detección de la expresión de la proteína P53 en linfocitos de sangre periférica humana por medio de la técnica de Western blot.

Los linfocitos de donadores sanos se obtuvieron según se describió anteriormente. En tubos de 15 ml, 7×10^6 linfocitos fueron incubados en medio RPMI-

1640 suplementado con aminoácidos no esenciales, glutamina y 15 % de SFB. Se adicionó a los cultivos 200 μ l de PHA en un volumen total de 8 ml. Después de 24 horas de estimulación, los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de arsenito de sodio por 24 horas. Los linfocitos fueron cosechados centrifugando el paquete celular 2 minutos a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con 1 ml de PBS frío. Rápidamente y bajo condiciones en frío fueron lisados los linfocitos y se realizó la extracción de la proteína como se describió arriba.

Las inmunodetecciones se hicieron del mismo modo que en las líneas celulares con excepción de que fueron aplicados en el minigel 40 μ g de proteína total y la electroforesis se realizó en ambiente de 4-8 °C, la corriente se disminuyó de 150 a 80 voltaje constante.

4.6. Análisis del ciclo celular por citofluorometría de flujo.

Se sembraron 1×10^6 células en las condiciones descritas anteriormente y se trataron con arsenito de sodio durante 24 y 48 horas. Las células fueron tripsinizadas o resuspendidas según el tipo celular, se lavaron con PBS por centrifugación, fueron fijadas con 2 ml de etanol al 70% utilizando vortex y se almacenaron a 4 °C (Göhde et al, 1979). Posteriormente, las muestras fueron procesadas para analizarlas en el citofluorómetro. Brevemente, un alícuota (250,000 células) de la suspensión de células fijadas en etanol se mezclaron con 500 μ l de la solución-I (ácido cítrico 0.1 M, tween 0.5 %) después de agitar por 15 minutos se añadieron 2 ml de la solución-II (Na_2PO_4 0.4M). Finalmente, se adicionaron 50 μ l de la solución de DAPI (5 μ g/ml) y se realizó el análisis de la distribución de fluorescencia de las células en un citómetro de flujo Partec CA-II usando el programa Partec DPAC V2.0 (Partec, Alemania).

4.7. Ensayo de la proteína cinasa p34^{cdc2} in vitro.

Las células HeLa y RKO fueron lisadas con la solución amortiguadora en una amortiguadora de fosfatos con 1% NP40, 0.5% de desoxicolato de sodio, 0.1% de SDS. A esta solución se adicionaron inhibidores de proteasas: aprotinina, quimostatina y leupeptina (a una concentración de 1 mg/ml cada uno), 1 mM de PMSF, y 10 mM de iodoacetamida; además de inhibidores de fosfatasa: fluoruro de sodio (NaF, 50 mM), y Na₃Va₄ (1 mM). Los lisados se incubaron en hielo durante 20 minutos, después fueron centrifugados 20 minutos a 4 °C, los sobrenadantes se guardaron a -70 °C. Se estimó la concentración de proteínas por medio del ensayo de Bradford.

Para la inmunoprecipitación 150 µg del lisado total se incubaron toda la noche con 1 mg de anticuerpo monoclonal anti-ciclina B1 (Santa Cruz Inc.), el cual previamente había sido acoplado a la proteína A/G-sefarosa (Santa Cruz Inc.). Los inmunoprecipitados se lavaron dos veces con 100 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0.05% de NP40 y 0.25% de Triton X100; se realizó otro lavado con la misma solución pero sin los detergentes y finalmente se lavó con la solución amortiguadora para cinasas (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 75 mM NaCl, 10 mM de MgCl₂, y 1 mM de DTT). Los inmunoprecipitados fueron resuspendidos en 30 µl del mismo amortiguador y adicionaron 1 mM de AMPc (Sigma), 50 µg/ml de histona H1 (Boehringer Mannheim) y 3 µCi de ATP (γ ³²P) (Amersham), la actividad específica es 5000 Ci/mmol. La reacción de la cinasa histona H1 se llevó a cabo a 37 °C por 20 minutos y entonces se detuvo agregando 25 µl del amortiguador de muestra SDS 2X; 25 µl de esta mezcla fue separada en un gel al 12% (SDS-PAGE). Después de la electroforesis la histona H1 fosforilada fue detectada por autoradiografía. El tiempo de exposición autoradiográfica fue de 1 hora.

4.8. Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en linfocitos de sangre periférica humana.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido utilizada para estudiar la expresión de genes amplificándolos a partir de sus secuencias de RNA. Esta técnica requiere de la conversión del ARN mensajero a ADN complementario (ADNc) por medio de una Transcripción Reversa (RT) y amplificación del ADN complementario por PCR (RT-PCR) (Rappolee et al, 1988, Kawasaki 1989). La RT-PCR es una metodología especializada para detectar genes cuya expresión es muy baja. Este método es particularmente útil para analizar mensajeros de baja abundancia o cuando la cantidad de muestra disponible es limitada (Piattak et al, 1993, Rashtchian 1994).

4.8.1. Extracción de ARN total en linfocitos de sangre periférica humana.

Los linfocitos de sangre periférica de dos donadores se aislaron como se describió. La extracción del ARN total de las células se realizó de la siguiente manera:

Se homogenizaron 15×10^6 linfocitos en 1 ml de TRIzol (Gibco-BRL) a 4°C. Las muestras se transfirieron a tubos eppendorf y se agregó 200 µl de cloroformo por 1 ml de homogenado. Las muestras se mantuvieron en hielo por 5 minutos, después se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C y al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior acuosa incolora. El ARN quedó en esta última fase, mientras que el ADN y las proteínas se mantienen en la interfase y en la fase orgánica respectivamente.

Se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen equivalente de isopropanol, la muestra guardó a 4°C durante toda la noche. Se centrifugaron las muestras 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C. El ARN (pastilla blanca amarillenta) se lavó dos veces con etanol al 75% y al 80% centrifugando a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4°C. Finalmente la pastilla se disolvió en 50 µl de H₂O-DEPC.

Se leyó la absorbencia de las muestras a las longitudes de onda de 260 y 280. Se determinó la concentración de ARN mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de absorbencia a 260 nm = 40 µg/ml de ARN. También se determinó la pureza del ARN

por medio de la relación de absorbencia obtenida a 260 y 280 nm (260/280 nm). El valor de esta relación en el que se considera puro el RNA es entre 1.8 y 2.

4.8.2. Síntesis de oligonucleótidos.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó de acuerdo a la secuencia del cDNA para el supresor *p53* humano. La secuencia de los oligonucleótidos son 5'-[TAC TCC CCT GCC CTC AAC A]-3' (sentido) y 5'[CTC GCT TAG TGC TCC CTG G]-3' (contrasentido), que delimitan un fragmento de 544 pares de bases.

4.8.3. Retrotranscripción (RT).

Se realizó la retrotranscripción del ARN total. Para esto se preparó la siguiente mezcla para la reacción:

	Concentración Final
RNA Total	2 µg (en un volumen máximo de 2.5 µl)
Buffer RT (5X)	50 mM Tris-HCl pH=8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl ₂
DTT (100 mM)	10 mM
dNTPs (10 mM)	0.5 mM de cada dNTP
RT M-MLV (200 U/µl)	400 unidades
Oligo d-T	0.05 µg

El RNA se calentó a 75° C por 5 minutos y se puso en hielo por otros 5 minutos. Se le agregó la mezcla y se incubó a 38°C por una hora. El control negativo consistió de una muestra de agua en sustitución del RNA.

4.8.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El supresor *p53* se amplificó por medio de la técnica de PCR. Para esto se preparó la siguiente mezcla para una reacción:

	Concentración Final
Buffer PCR 10 X	20 mM Tris-HCl pH=8, 50 mM KCl
MgCl ₂ (50 mM)	1 mM
dNTPs (10 mM)	0.2 mM
Oligo I	0.5 mM

Oligo II	0.5 mM
TAQ DNA polimerasa	2.5 unidades
Agua	cbp 40 μ l

A 10 μ l de reacción de RT se le agregó la mezcla de PCR. La reacción se incubó en un termociclador Perkin Elmer Cetus Modelo 9600 con un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 1 minuto a 95° C, 1 minuto de hibridación de los oligos iniciadores a 55°C, 1 minuto de extensión a 72° C y un ciclo final de extensión de 5 minutos a 72° C.

4.8.5. Electroforesis de los productos de RT-PCR

Una vez que se realizó el RT-PCR, se corrió una electroforesis de los productos obtenidos. Se corrieron 15 μ l de producto de RT-PCR con amortiguador de carga 6X para DNA en un gel de agarosa al 2% preparado con TBE 0.5 X.

Se prepararon 180 ml de gel, se pesó la agarosa y se le agregó el TBE 0.5 X y 4 μ l de bromuro de etidio 10 mg/ml (0.2 μ g/ml concentración final). Se cargaron las muestras en el gel y se corrieron a 90 voltios por 1.5 h en un amortiguador TBE 0.5 X. Las muestras se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Posteriormente los geles se expusieron a películas sensibles X-OMAT (Kodak) y se revelaron. Las bandas obtenidas en las películas se cuantificaron por densitometría.

AMPc Monofosfato de adenosina; **ATP** Trifosfato de adenosina; **DAPI** 2,4, diamidino-2, fenilindol; **dNTPs** Dinucleótidos trifosfatados; **DTT** Ditiotritol; **ECL** Enhanced chemiluminescence; **NaCl** cloruro de sodio; **NP40** Nonidet 40; **MgCl₂** cloruro de magnesio; **PAGE** electroforesis en gel de poliacrilamida; **PMSF** fenil-sulfonil-fluoruro de sodio; **SDS** Sulfato de sodio dodecil.

Capítulo 5

RESULTADOS

5.1. Efecto citotóxico del arsenito de sodio.

Los efectos citotóxicos del arsénico se midieron con dos métodos, el ensayo de FDA/BrEt que se basa en la integridad nuclear y lisosómica y el ensayo de exclusión azul tripano que pone en evidencia daño a nivel de la membrana. El método de FDA/BrE mostró una mayor sensibilidad (Apéndice). Para determinar el efecto de arsenito de sodio en viabilidad de las células, se llevó a cabo una curva de dosis-respuesta en las líneas celulares HeLa, C-33A, Jurkat, LCL-EBV y en linfocitos humanos de sangre periférica. La exposición de estas células al arsénico por 24 horas mostró diferentes respuestas citotóxicas; las células C-33A, RKO⁻ y Jurkat fueron más sensibles al tratamiento del arsénico, en comparación, las células HeLa, RKO⁺ y LCL-EBV fueron sensibles a las dosis mayores de 10 μ M de arsenito de sodio (Fig. 7). Por otra parte, cuando los linfocitos se trataron con diferentes concentraciones durante 24 y 48 horas, se observó que la sobrevivencia celular disminuye significativamente a partir de 1 μ M de arsénico (Tabla 3, Apéndice). Cuando se comparó la viabilidad entre las células de tipo linfoide, se encontró una relación inversa, la viabilidad decrece conforme aumenta la concentración del metaloide, sin embargo, las células Jurkat son más sensibles al tratamiento, mientras que, las células LCL-EBV y los linfocitos de sangre periférica muestran un comportamiento de sobrevivencia celular similar en las primeras concentraciones, pero a partir de 10 μ M la viabilidad de la línea LCL-EBV comienza a disminuir (Fig. 8 y Tabla 4, Apéndice).

5.2. Modulación de la proteína p53 en las líneas celulares HeLa, C-33A, RKO, Jurkat y LCL-EBV tratadas con arsenito de sodio.

La expresión basal de la proteína p53 en las diferentes líneas celulares fue determinada por el análisis de inmunodetección utilizando anticuerpos monoclonales específicos para la proteína p53. Se encontraron niveles de P53 similares en las células HeLa, Jurkat, LCL-EBV y RKO⁺, sin embargo, se observó una señal más intensa en las células C-33A, mientras que en las células RKO⁻ el nivel de la proteína basal es bajo (Fig. 9).

Para evaluar la dosis relacionada con los efectos de arsénico en la expresión de p53, las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de arsenito de sodio y se analizó el nivel de la proteína P53 por medio de la técnica de Western blot, utilizando anticuerpos monoclonales de P53. Las células HeLa, LCL-EBV, C-33A, y Jurkat fueron cultivadas con 1, 10, 25 y 50 μM de arsénico durante 24 horas. En las células HeLa y LCL-EBV se encontró que el nivel de la proteína p53 aumenta en forma de dosis-respuesta, hay un aumento de la proteína a partir de la concentración de 10 μM , la inducción máxima de p53 se observó con 25 μM de arsenito y la intensidad de la señal disminuyó en células tratadas con 50 μM . No se detectaron cambios en los niveles de la proteína p53 en las células C-33A tratadas con arsénico (Fig. 10), sin embargo, fue aparente una disminución en la intensidad de la banda con las concentraciones de 25 y 50 μM , lo cual coincide con los datos de muerte celular a estas dosis (Fig.7). En las células Jurkat se observó la mayor inducción del nivel de la proteína con 10 μM de arsénico durante 24 horas de tratamiento, no obstante, la señal disminuyó con las concentraciones más altas de arsenito. La intensidad de las bandas correspondientes a la proteína de p53 fueron cuantificadas con un analizador de imágenes CollageTM 2.0 (Fig. 11)

Los resultados de las inmunodetecciones de P53 realizadas con las células RKO⁺ tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas muestran que los niveles de la proteína aumentan conforme se incrementa la concentración de arsénico (Fig. 12). Sin

embargo, con las células RKO⁻ no se observa aumento en los niveles de P53 y se observa que a partir de la dosis de 5 μ M. de arsénico comienza disminuir el nivel de P53 en comparación con la expresión basal (Fig. 13). La detección de la P53 también se realizó en células HeLa cultivadas con dosis cercanas a 10 μ M, concentración a la cual se observó un incremento de P53 (Fig. 14).

5.3. Análisis del ciclo celular por medio de citometría de flujo.

El análisis citométrico de las células Jurkat y C-33A tratadas con arsenito de sodio (0.1-50.0 μ M por 24 horas) no mostró alteraciones en la distribución de las fases del ciclo celular. Sin embargo, en las células HeLa, se observó un aumento significativo del porcentaje de células en la fase G₂/M con una dosis de 10 μ M; pero a dosis más pequeñas (0.1 y 1 μ M) o más altas (25 y 50 μ M) no se observaron alteraciones en el ciclo con respecto a los controles analizados. Esta variación se observó repetidamente en cuatro experimentos independientes (Fig. 15). En la figura 16 se presenta el modelo citofluorométrico de las células HeLa tratadas con arsenito de sodio; el pico en la fase del ciclo G₂/M sólo se observó con 10 μ M.

El tratamiento de las células HeLa con concentraciones empleando incrementos de arsenito de sodio (2.5-25 μ M) mostró que el porcentaje de las células en la fase de G₂/M aumenta significativamente desde el tratamiento con 5 μ M de arsénico y se mantiene elevado hasta la dosis de 20 μ M, aunque es evidente que el número de células en la fase G₂/M comienza a disminuir desde la dosis de 15 μ M de arsénico (Fig. 17). Cuando se trataron las células RKO con concentraciones cercanas a 10 μ M de arsenito se encontró en la línea celular RKO⁺ un efecto similar a las células HeLa (Fig. 18).

5. 4. Ensayo de la proteína cinasa p34.

Para investigar si la detención de las células HeLa después del tratamiento con arsenito de sodio se presentaba en la fase de G₂ o M, se realizó el ensayo cinasa p34^{cdc2}, se encontró que la fosforilación de la histona H1 presenta un incremento importante cuando se trató con la dosis de 10 μM de arsenito por 24 horas (Fig.19). Este efecto también se observó después de una exposición de 48 horas; el nocodazole se usó como un control positivo (Tisher et al., 1995).

Los ensayos cinasa realizados con las células RKO tratadas 24 horas con 10 μM de arsenito mostró que en las células RKO⁺ hay más sustrato fosforilado por la cinasa p34, similar al encontrado en las células HeLa, este incremento en la fosforilación de la histona H1 no se observó en las células RKO⁻.(Fig. 20)

5.5. Efecto del arsenito del sodio en linfocitos humanos.

Los linfocitos humanos de dos donadores trataron 24 horas con arsenito después de la estimulación previa con PHA (24 horas), fueron procesados para detectar la proteína P53. Los resultados indican que la expresión de P53 se incrementa con la concentración de 1 μM de arsénico (Fig. 21), además se realizaron cultivos de linfocitos con ctinomicina D, un potente inductor de P53. Sin embargo cuando se hicieron inmunodetecciones de P53 paralelamente en otros dos donadores se encontraron diferencias en el patrón de expresión de P53 (Fig. 22), en uno de estos dos donadores se encontró que en el control había niveles elevados de P53, otra característica en este donador fue la detección de P53 como doble banda. En el otro donador analizado se encontró una respuesta similar a los donadores estudiados anteriormente, nuevamente hubo un incremento de la expresión de P53 con 1 μM de arsenito y a dosis más altas disminuye la intensidad de la banda.

Se obtuvo el RNA total de los dos donadores con diferente patrón de expresión de P53 para llevar a cabo la técnica de RT-PCR del gen *p53* en las células en G₀ (sin proliferar). Las autoradiografías se analizaron con el uso de un densitómetro. En la figura 23 se muestran los valores de densitométricos de *p53* corregidos con su control (GADPH) que se utilizó como un control de expresión constitutiva. Se encontró que el nivel de RNA también es diferente en los dos individuos.

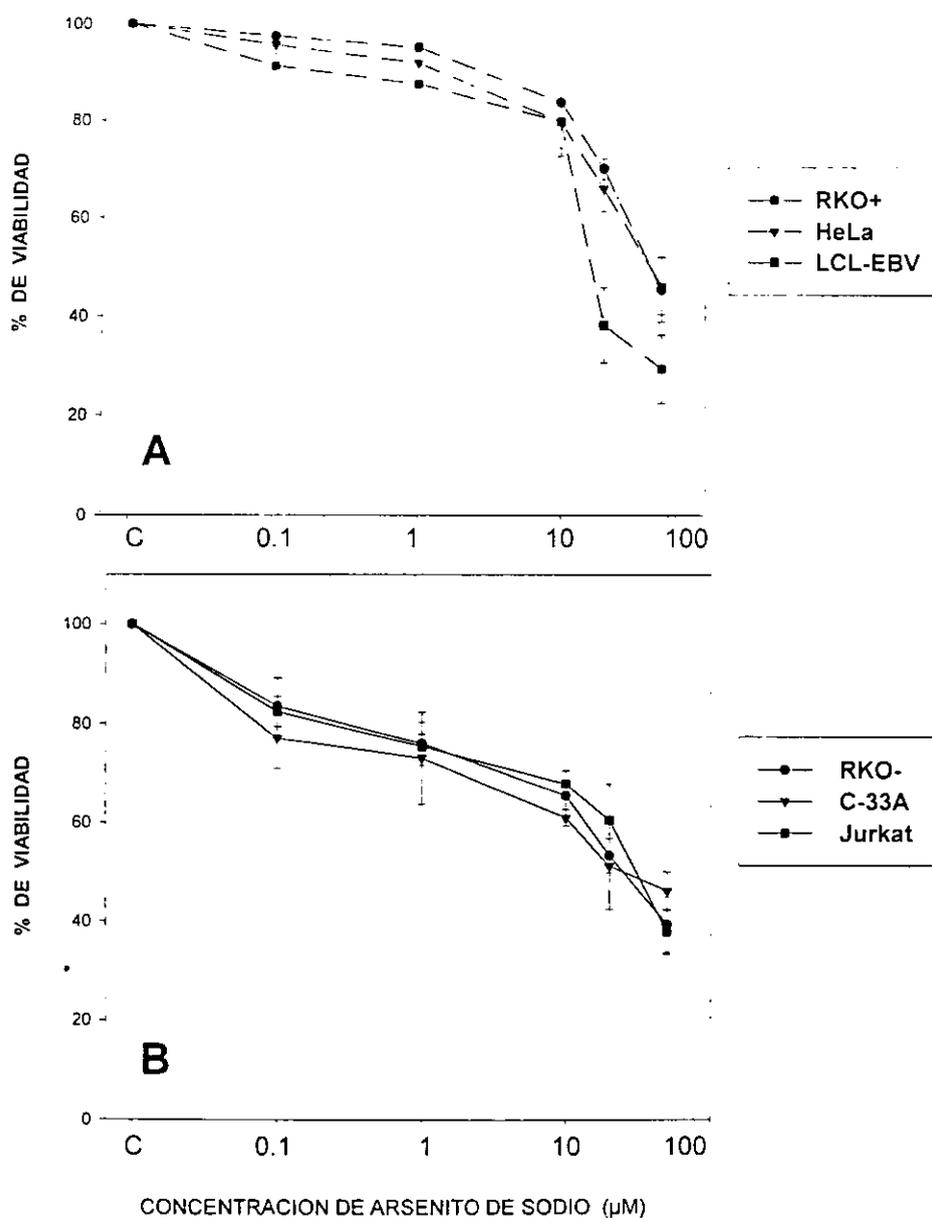


Figura 7. Viabilidad celular de las diferentes líneas tratadas 24 horas con arsenito de sodio. Las viabilidades fueron determinadas mediante el ensayo de FDA/BrEt. **A.** Células con la proteína P53 funcional o parcialmente funcional (HeLa), el tratamiento en estas células fue significativo estadísticamente ($p < 0.001$) a partir de la concentración de $10 \mu\text{M}$. **B.** Células con la proteína P53 no funcional, el tratamiento fue significativamente diferente desde $0.1 \mu\text{M}$ de arsénico (Apéndice).

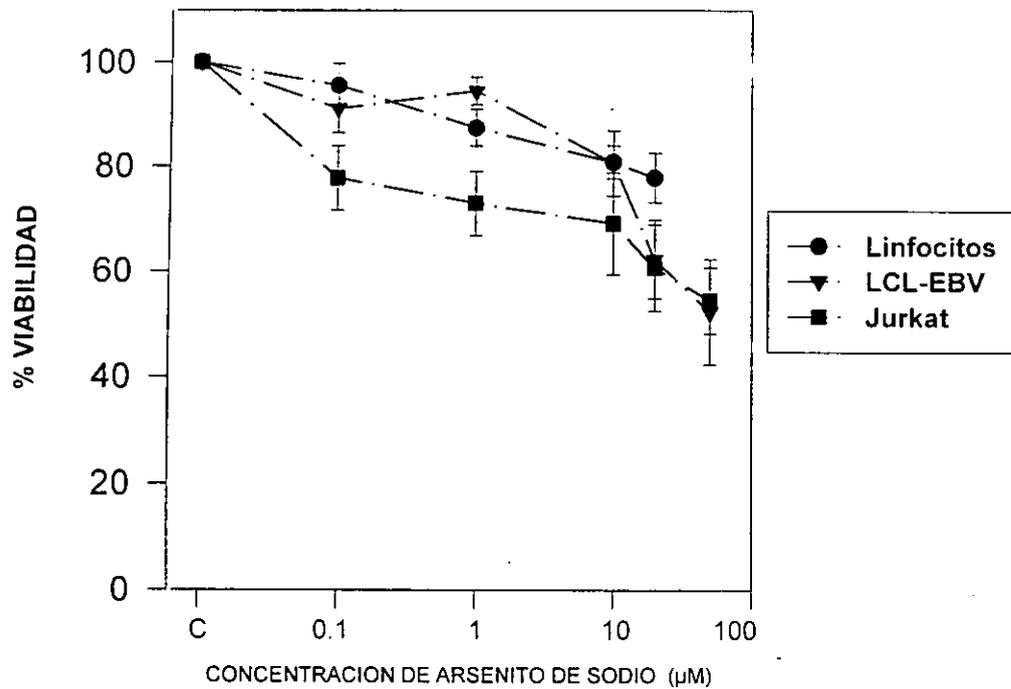


Figura 8. Comparación de la viabilidad celular en las células de tipo linfoide tratadas 24 horas con arsenito de sodio. Las viabilidades se determinaron mediante el ensayo de exclusión azul del tripano. El tratamiento fue estadísticamente significativo ($p < 0.001$) para los linfocitos de sangre periférica humana a partir de la concentración de $1 \mu\text{M}$, para LCL-EBV desde $10 \mu\text{M}$ y para Jurkat a partir del tratamiento con $0.1 \mu\text{M}$ de arsenito (Apéndice).

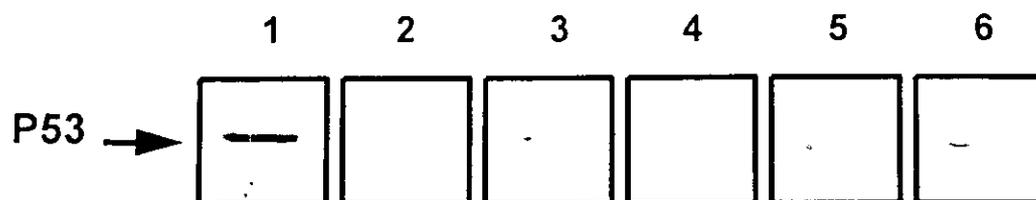


Figura 9. Expresión basal de la proteína P53 en las diferentes líneas celulares estudiadas. 1×10^6 células fueron cultivadas durante 24 horas, como se describió en Materiales y Métodos. Células RKO⁺, HeLa, LCL-EVB, Jurkat, C-33A y RKO⁻ (líneas 1-6 respectivamente). El análisis de la proteína P53 se realizó por la técnica de Western blot utilizando 15 μ g de lisado total.

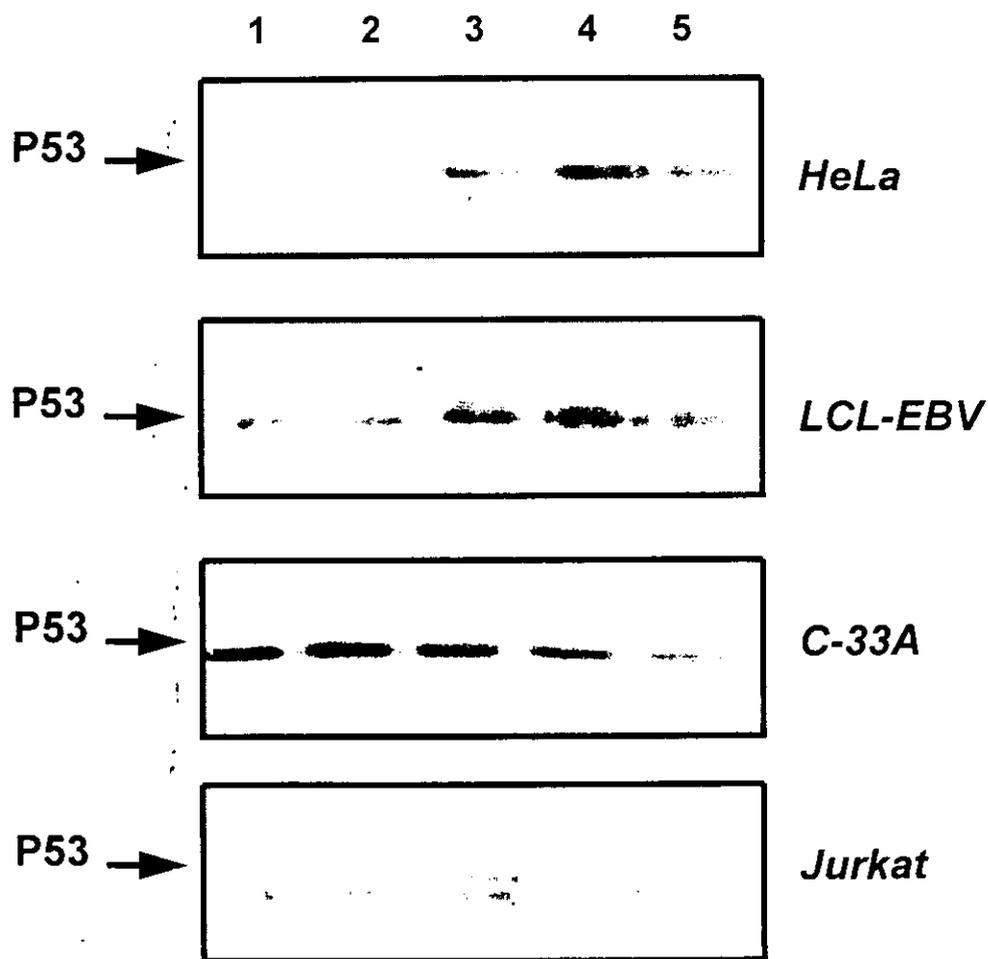


Figura 10. Expresión de la proteína P53 en células tratadas 24 horas con arsenito de sodio. Se realizaron cultivos como se describió en Materiales y Métodos. Las células fueron cultivadas con 1, 10, 25 y 50 μM de arsénico (líneas 2-5 respectivamente); células sin tratamiento (línea 1). El análisis de la proteína P53 se realizó por la técnica de Western blot utilizando 15 μg de lisado total.

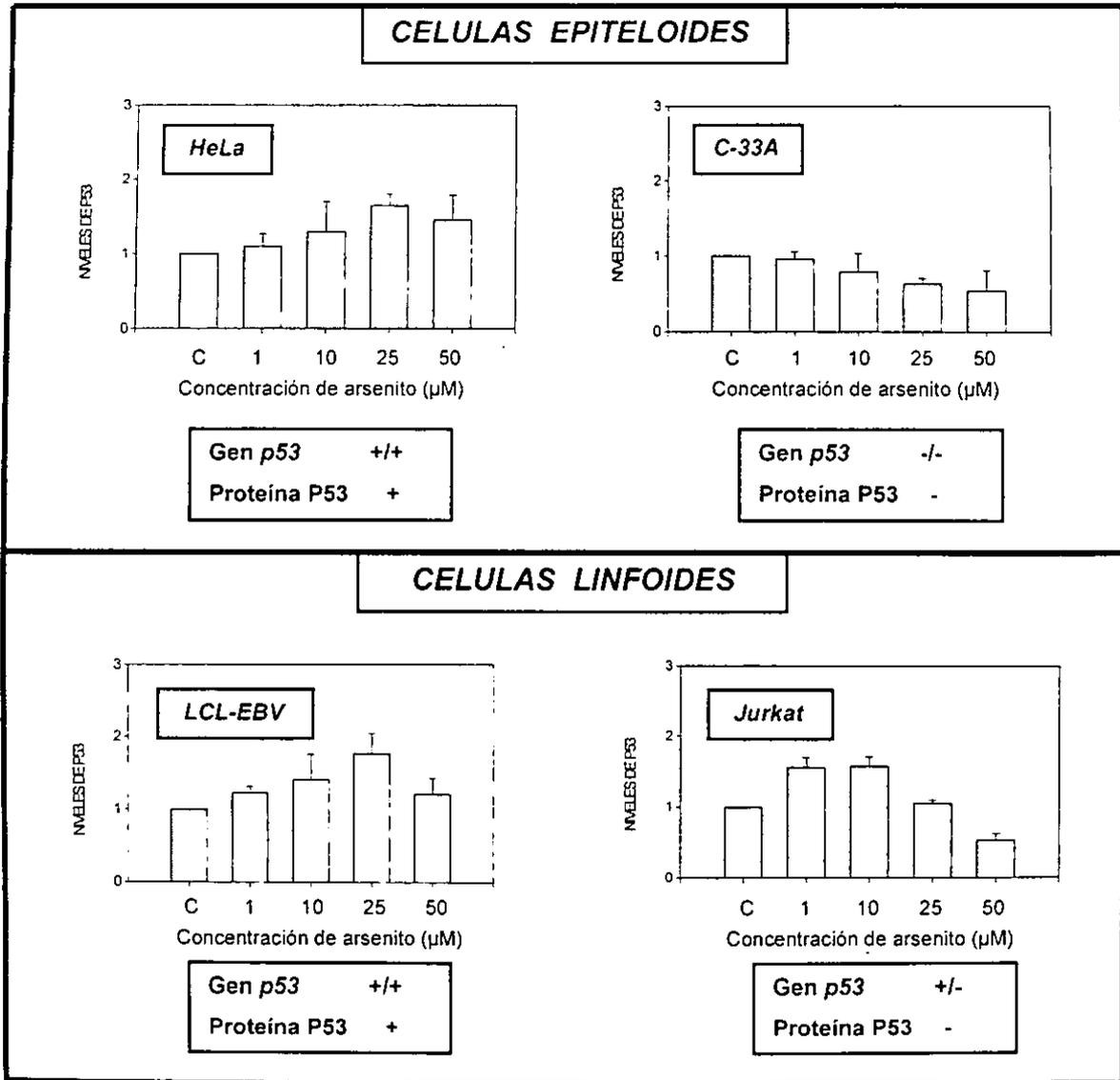


Figura 11. Análisis densitométrico de la expresión de la proteína P53 en las células tratadas 24 horas con arsenito. Los cultivos se trataron con 1, 10, 25 y 50 µM de arsénico; células sin tratamiento (C). Las barras representan el valor promedio con la desviación estándar de tres experimentos representativos ($X \pm D.E.$).

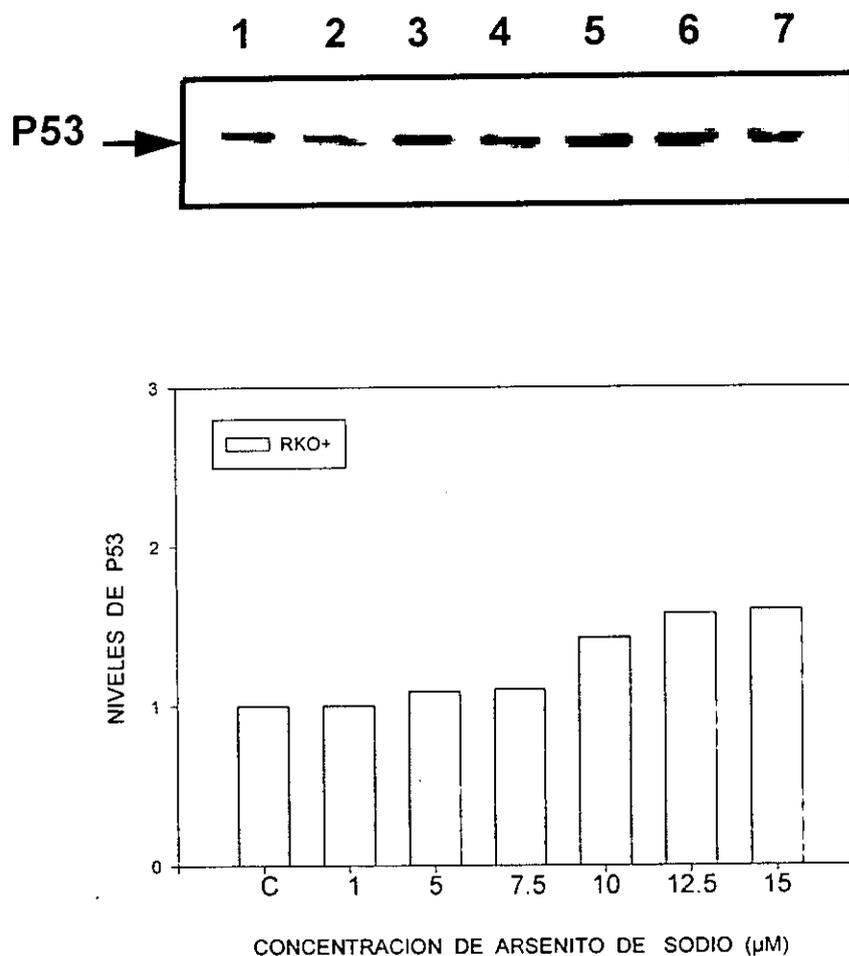


Figura 12. Inmunodetección de P53 en las células RKO⁺ tratadas 24 horas con arsenito de sodio. Las células fueron cultivadas con 1, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 µM de arsenito (líneas 2-7 respectivamente); células sin tratamiento (línea 1). La proteína se analizó por la técnica de Western blot utilizando 15 µg de lisado total. El estudio densitométrico de las bandas representa el valor promedio de dos experimentos.

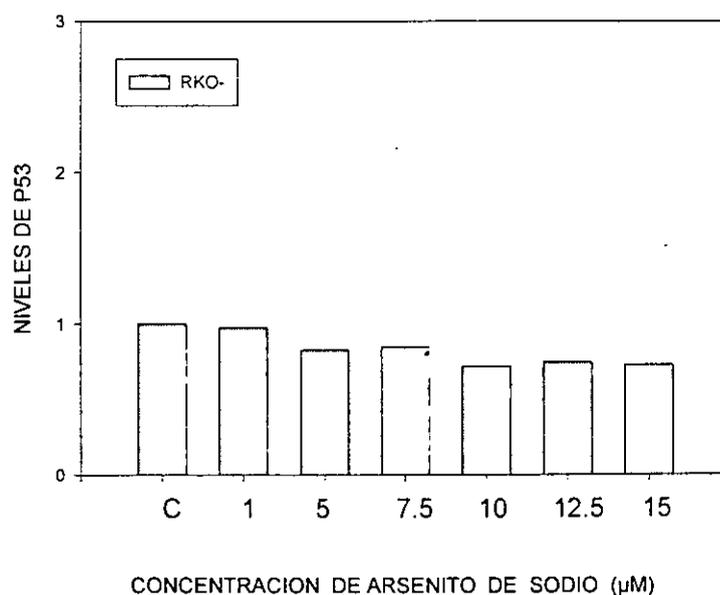
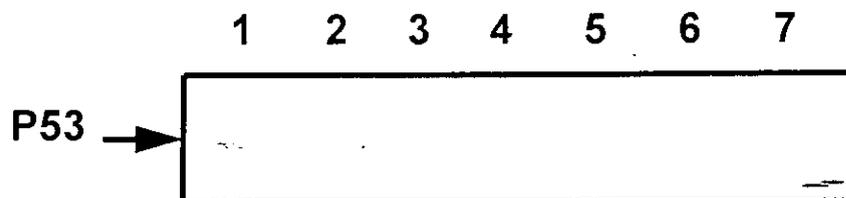


Figura 13. Inmunodetección de P53 en las células RKO⁻ tratadas 24 horas con arsenito de sodio. Las células fueron cultivadas con 1, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 μM de arsenito (líneas 2-7 respectivamente); células sin tratamiento (línea 1). La proteína se analizó por la técnica de Western blot utilizando 15 μg de lisado total. El análisis densitométrico de las bandas representa el valor promedio con la de dos experimentos.

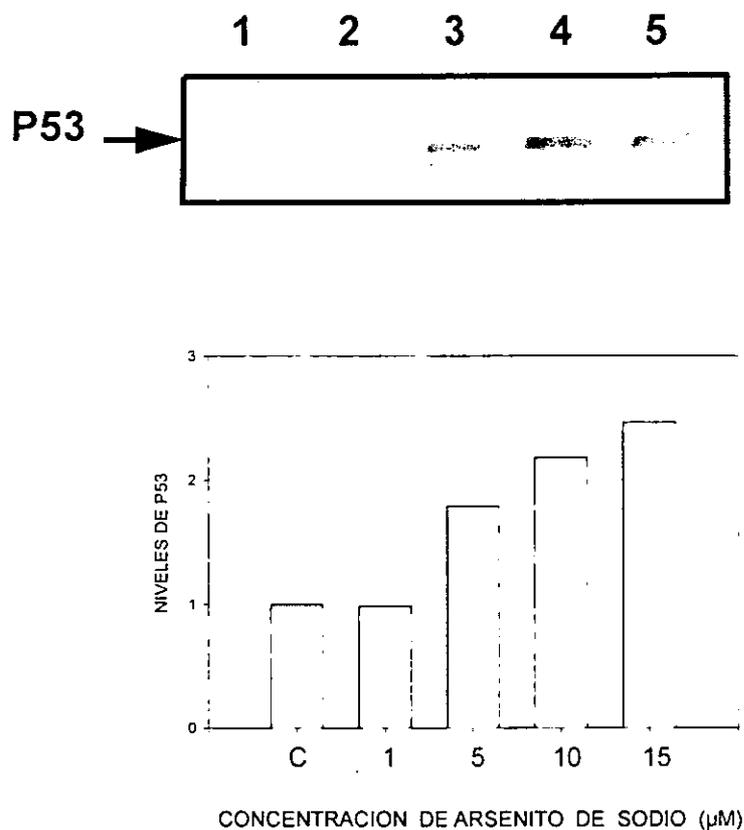


Figura 14. Análisis de la proteína P53 en las células HeLa tratadas 24 horas con arsenito de sodio. Las células fueron cultivadas con 1, 5, 10 y 15 μM de arsenito (líneas 2-5 respectivamente); células sin tratamiento (línea 1). La proteína se analizó por la técnica de Western blot utilizando 15 μg de lisado total. Se muestra el estudio densitométrico de las bandas.

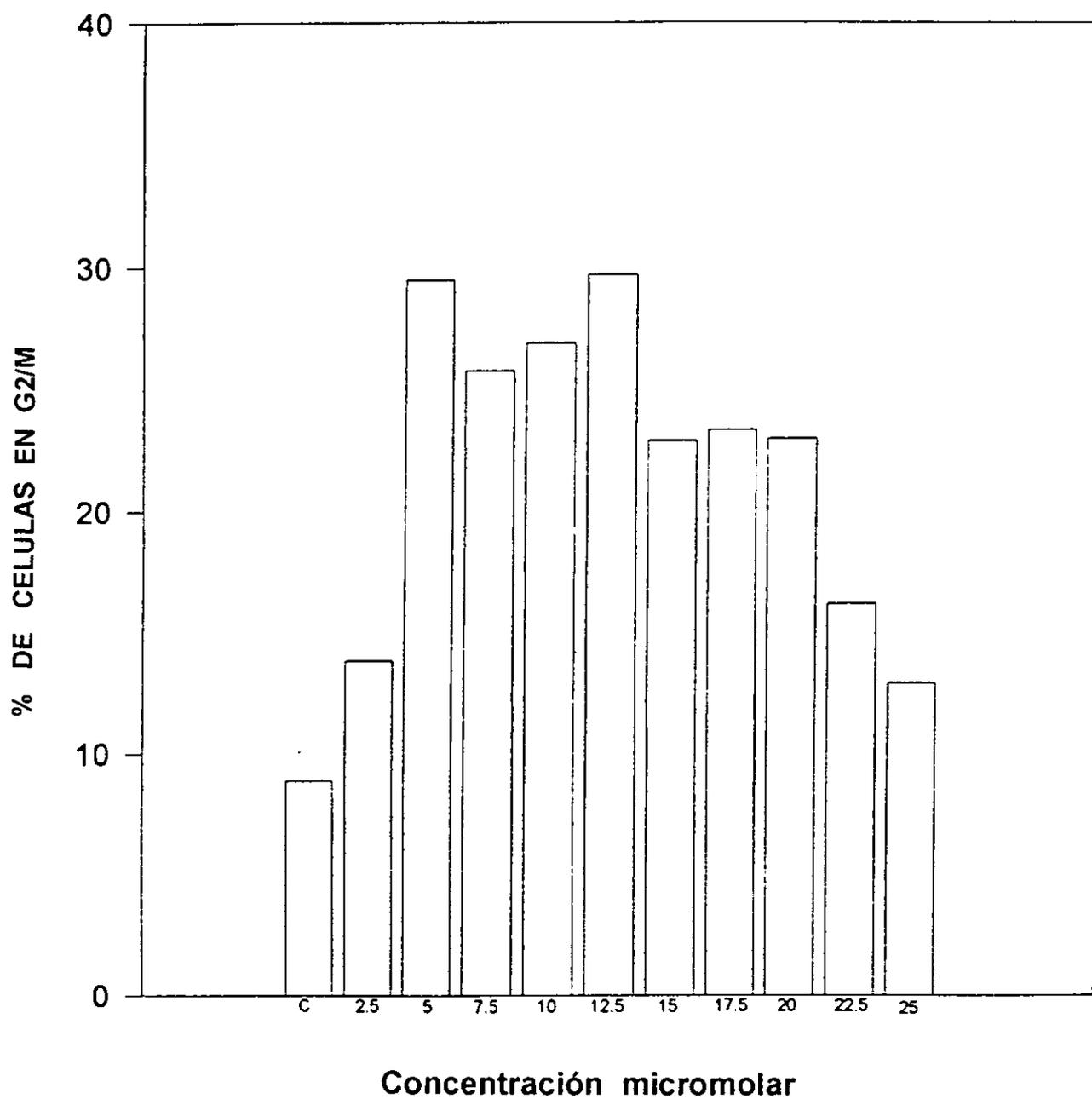


Figura 17. Porcentaje de las células HeLa en la fase G2/M. Las células se trataron 24 horas con arsenito de sodio. Los valores muestran el porcentaje promedio de tres experimentos por separado.

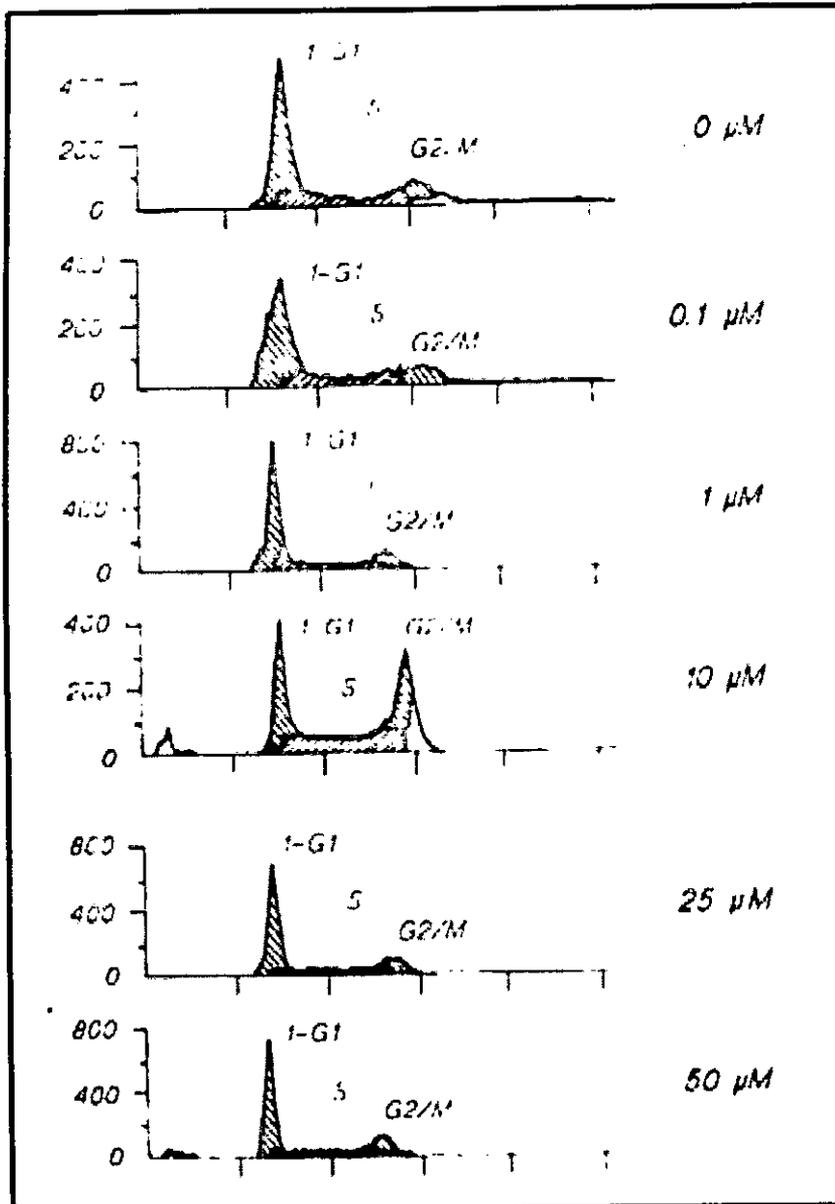


Figura 16. Análisis citométrico en las células HeLa tratadas 24 horas con arsenito. Las células se cultivaron con diferentes concentraciones de arsénico y se analizó el ciclo mediante el citómetro de flujo.

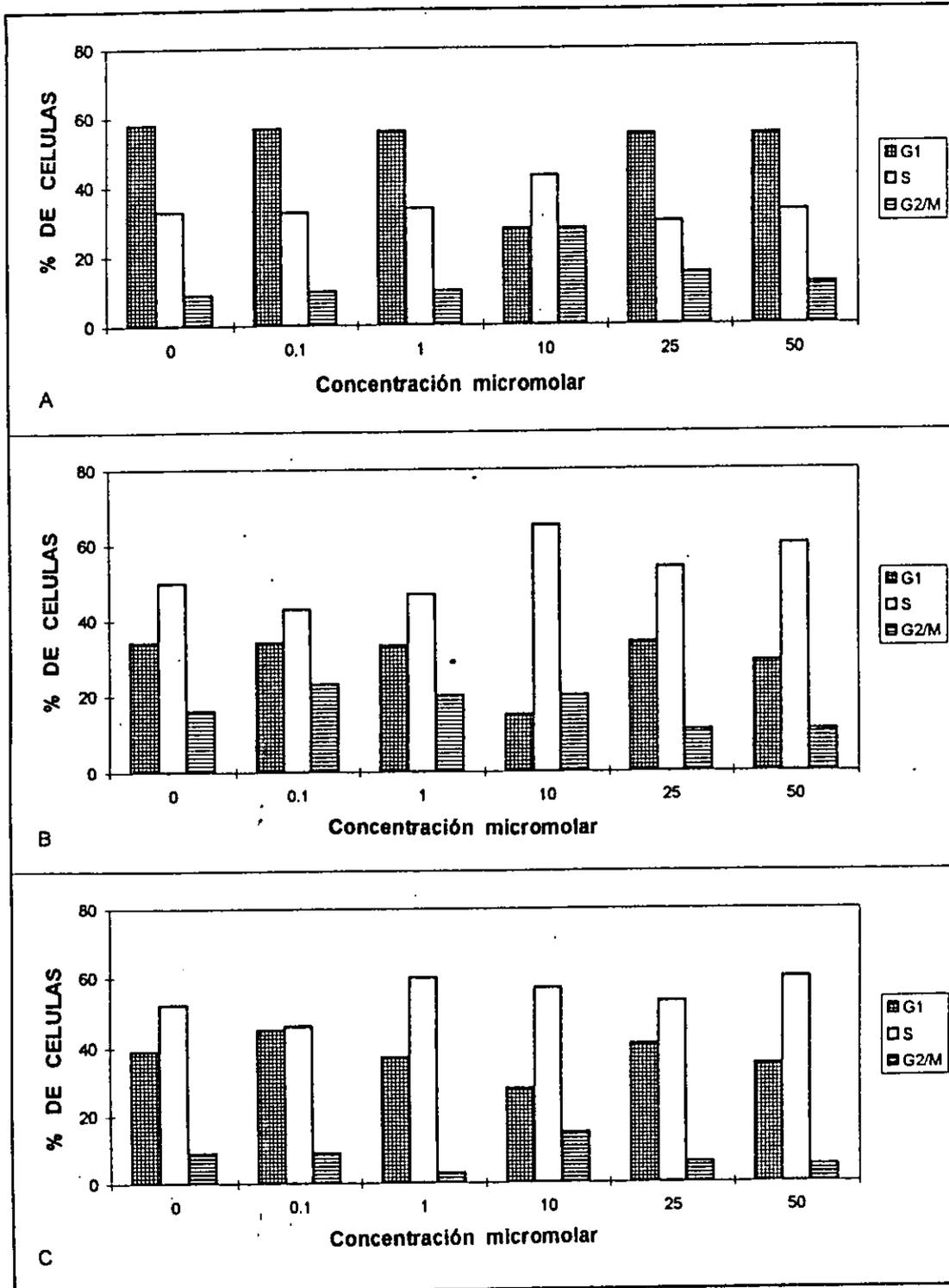


Figura 15. Análisis del ciclo celular en células tratadas 24 horas con arsenito de sodio. A) Células HeLa, B) Células C33-A, C) Células Jurkat. El análisis se realizó mediante citometría de flujo. Las barras representan el porcentaje promedio de cuatro experimentos por separado de las células en las fases G₁, S y G₂/M.

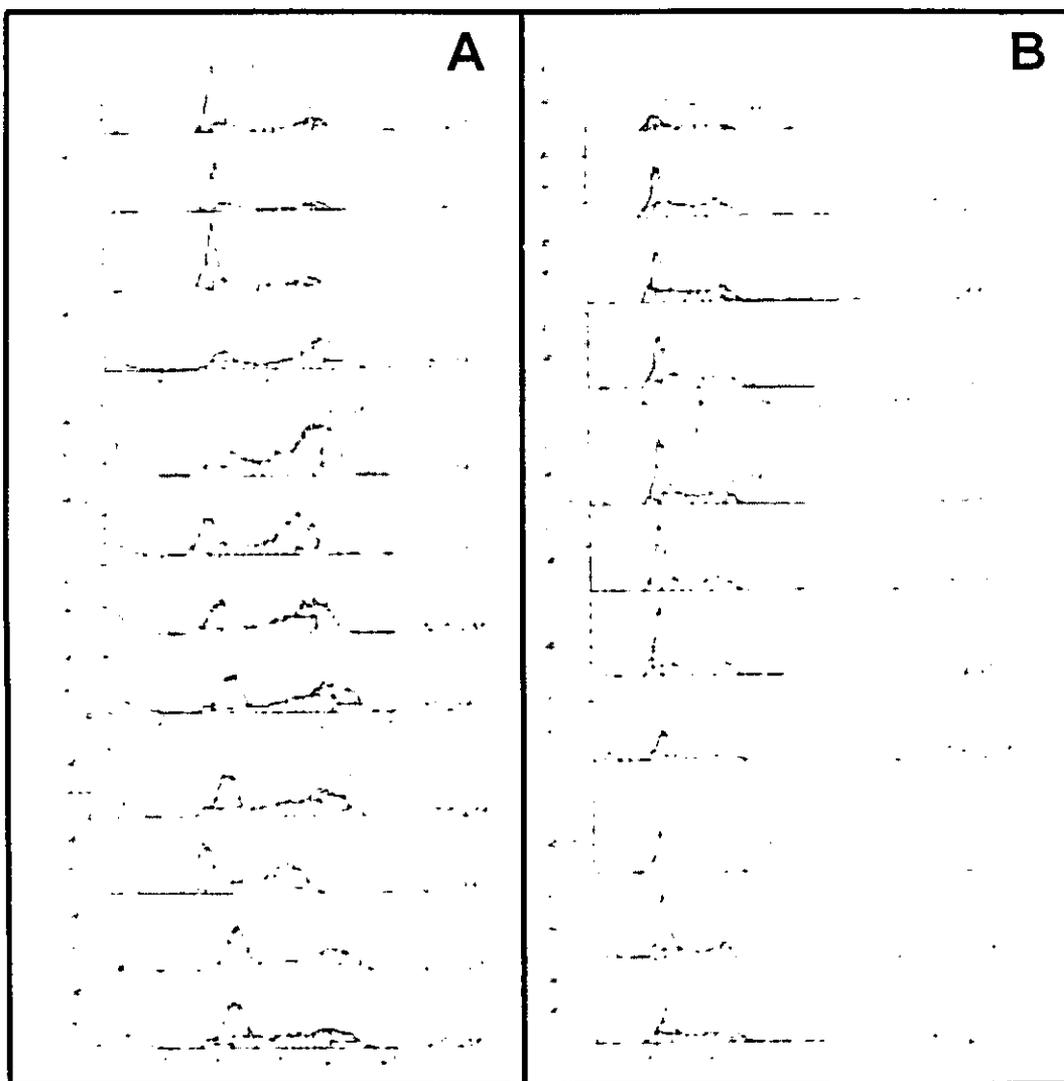


Figura 18. Análisis citofluorométrico de las células RKO tratadas 24 horas con arsenito. Los cultivos se trataron con concentraciones cercanas a 10 μM de arsénico. **A.** En las células RKO⁺ se observa un incremento de células en fase G2/M entre 7.5-20 μM . **B.** Células RKO⁻.

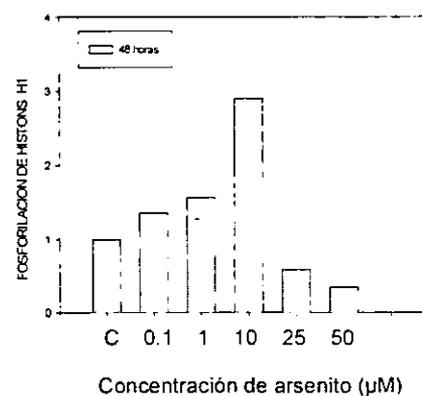
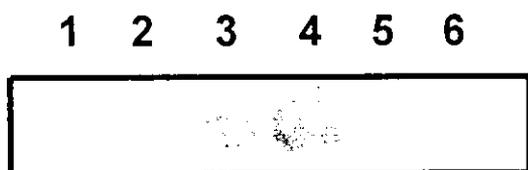
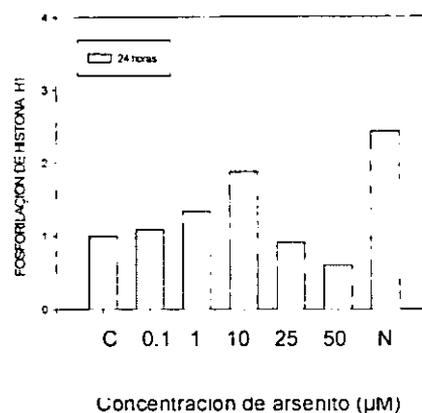
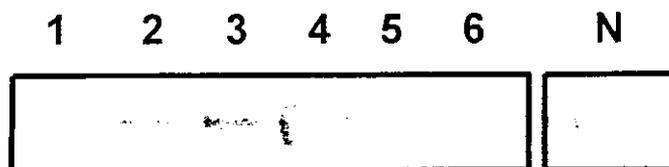


Figura 19. Ensayo proteína cinasa p34 *in vitro* en las células HeLa tratadas con arsenito durante 24 y 48 horas. Cultivos control sin tratamiento (C), línea 1; células tratadas con 0.1, 1, 10, 25 y 50 µM de arsenito, líneas 2-6 respectivamente. El nocodazol (N), se usó como un control positivo a 24 horas. La proteína se analizó por la técnica de Western blot utilizando 15 µg de lisado total. Se presenta el estudio densitométrico este experimento.

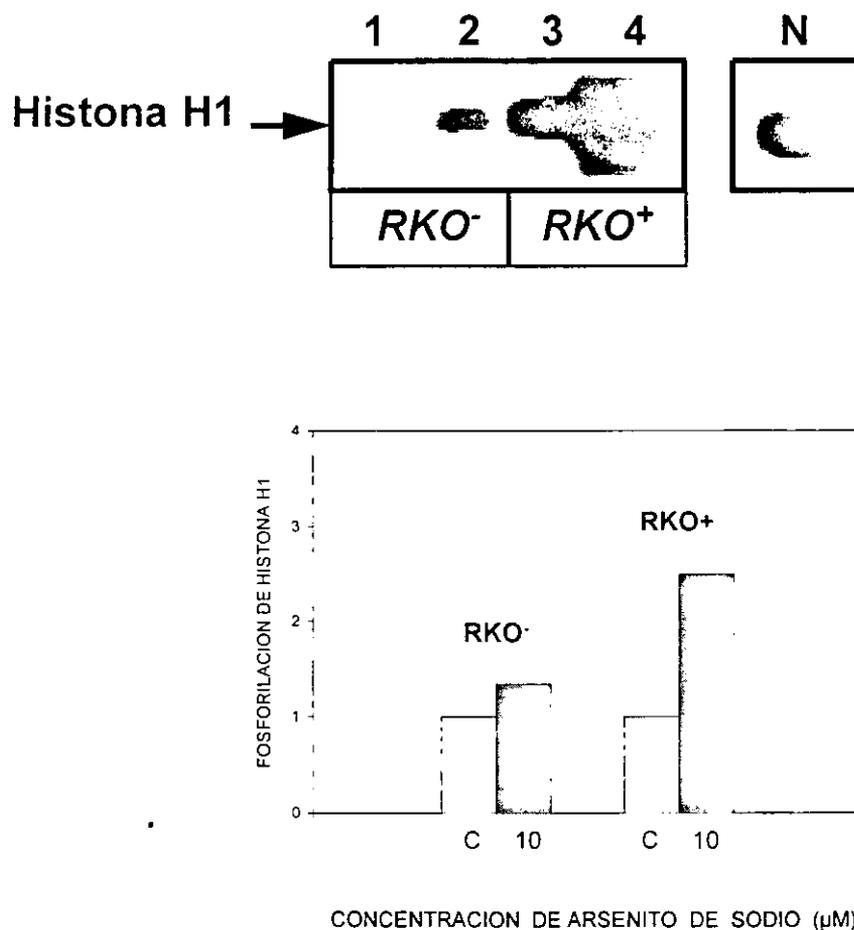


Figura 20. Ensayo de la proteína cinasa p34 *in vitro* en las células RKO tratadas con arsenito durante 24 horas. Cultivos control sin tratamiento con arsenito (C), líneas 1 y 3. Células tratadas con 10 μM de arsenito, líneas 2 y 4. El nocodazol (N), se usó como un control positivo. Se muestra el análisis densitométrico de este experimento.

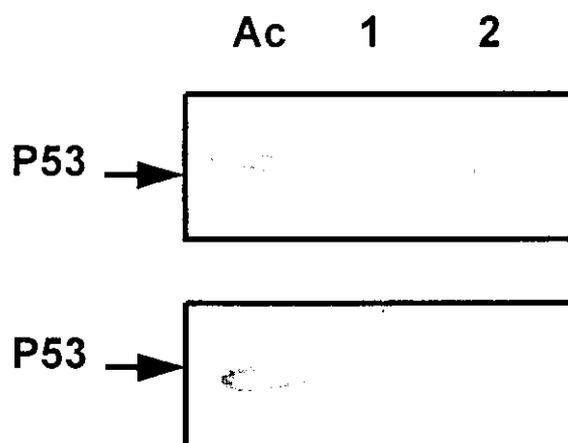


Figura 21. Detección de la proteína P53 en linfocitos de dos individuos. Las células fueron cultivadas durante 24 horas con 1 μM de arsenito de sodio (línea 2). El carril 1 muestra los cultivos control, sin tratamiento. Se usó como control positivo actinomicina (Ac). El análisis de la proteína P53 se realizó por la técnica de Western blot utilizando 40 μg de lisado total y 15 μg del control positivo.

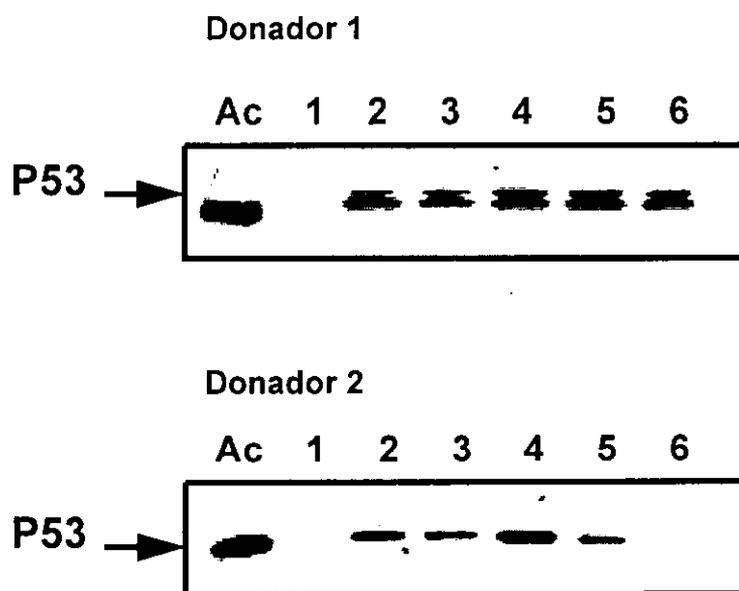


Figura 22. Expresión de la proteína P53 en linfocitos de dos individuos. Las células fueron cultivadas durante 24 horas con 0.1, 1, 5 y 10 μM de arsenito de sodio, líneas 3-6 respectivamente. Linfocitos sin proliferar (G0) en el carril 1. Los cultivos sin tratamiento en el carril 2. Se usó como control positivo actinomicina (Ac). El análisis de la proteína P53 se realizó por la técnica de Western blot utilizando 40 μg de lisado total y 15 μg del control positivo. Se presenta el estudio densitométrico de este experimento.

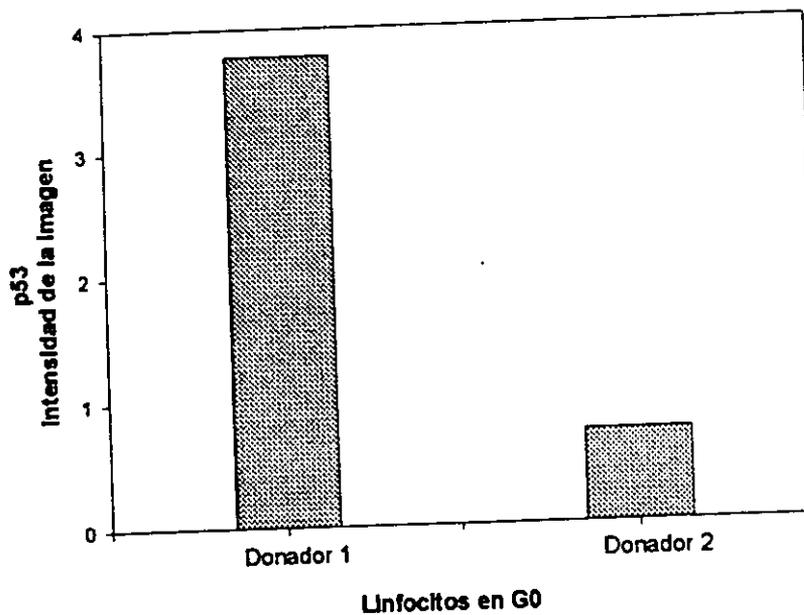


Figura 23. Densitometría del RNA de p53 en linfocitos sin proliferar (G0). El análisis se realizó mediante RT-PCR. Los datos se corrigieron con el valor del control de expresión constitutiva .

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Capítulo 6

DISCUSION

Los estudios epidemiológicos indican que el arsénico es un carcinógeno humano y aunque se han propuesto varias hipótesis para explicar la carcinogenesis inducida por este compuesto no ha sido posible dilucidar su mecanismo de acción. Nuestros estudios han mostrado que la proliferación de los linfocitos esta alterada en los individuos que consumen arsénico en el agua de bebida y resultados similares se observaron en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

Por otra parte, se conoce que el control de la proliferación celular esta modulada por ciertos proto-oncogenes y genes supresores de tumores y algunos de ellos son asociados con el proceso canceroso. El supresor *p53* se encuentra mutado en aproximadamente el 50 % de todos los tipos de cáncer reportados. Muchas funciones se atribuyen al supresor *p53*, entre las que se le imputan son la regulación del ciclo celular y ser un componente importante en la respuesta a daño al ADN.

En este estudio, dado el papel que tiene el gen *p53* en el control de la proliferación celular y en la respuesta a daño al ADN, propusimos que la alteración de la proliferación inducida por el arsénico, esta mediada por modificaciones en la expresión de *p53*. Para probar esta hipótesis, se evaluó la expresión de la proteína P53 y el ciclo celular en líneas celulares que tienen el gen *p53* normal y mutado, así como en linfocitos de sangre periférica de donadores sanos. Se utilizaron cuatro líneas de tipo epitelial (C33-A, HeLa, RKO⁺ y RKO⁻) y dos líneas linfoides (LCL-EVB y Jurkat), así como linfocitos de un donador sano.

Las células C-33A poseen mutaciones en los exones 6 y 7 del gen *p53*, lo que hace que la proteína P53 no sea funcional (Sheffner et al, 1991). Mientras que las células HeLa no tienen mutaciones en el gen *p53*, sin embargo, su funcionalidad ha sido muy discutida por la presencia del virus del papiloma tipo 18, no obstante, algunos datos demuestran su funcionalidad cuando menos parcial (Schneider-Gädicke y Schwartz, 1986; Butz et al, 1995). Más adelante será discutido ampliamente. En tanto, las células RKO⁻ poseen un gen *p53* normal, pero la actividad de la proteína ha sido disminuida por la acción de la proteína E6 del virus del papiloma tipo 16 (Havre et al, 1995). De manera que la diferencia entre las células HeLa con una función parcial de P53 y las células RKO⁻ con la función de P53 anulada, (ambas infectadas con un papilomavirus), radica en que a las células RKO⁻ fueron trasfectadas con el promotor de E6, mientras que las células HeLa están infectadas con el virus completo. Por supuesto que la regulación de *p53* en estas dos líneas puede también ser diferente por el tipo de papilomavirus.

Los linfocitos del donador sano y los transformados con el virus del Epstein-Barr (LCL- EBV) poseen una función normal de la proteína P53 (Allday et al, 1995), mientras que las células Jurkat las cuales son de linfocitos T derivados de una leucemia aguda linfoblástica tienen un *p53* con un alelo mutado en cuatro codones diferentes: 196, 256, 259 y 260, se plantea que estas mutaciones son dominantes sobre el alelo normal lo que tiene por resultado una proteína P53 no funcional (Cheng y Hass 1990).

Los datos de este trabajo mostraron que la respuesta citotóxica inducida por el arsenito de sodio es diferente en las líneas celulares estudiadas, esta sensibilidad diferencial al arsénico fue dependiente del estatus de *p53* en las células, puesto que las células con mutaciones en *p53* y/o alteraciones en la funcionalidad de la proteína P53 son más sensibles al metaloide. De tal forma, ante el tratamiento con arsénico la línea que mostró una mayor sensibilidad al efecto citotóxico del arsenito, fueron las células C-33A y RKO⁻, las dos líneas linfoides mostraron una viabilidad similar a las células HeLa y RKO⁺. Las curvas de citotoxicidad inducidas por el tratamiento con

arsénico en los tres tipos de células linfoides utilizados mostró que los linfocitos son más resistentes que las células LCL-EBV y estas más que las Jurkat.

Estos resultados de sensibilidad citotóxica diferencial al arsénico dependientes del estatus del gen *p53* fueron apoyados por los datos de transfección del gen normal y mutado en células Jurkat y linfocitos humanos de sangre periférica (Menéndez, 1997), los cuales indicaron que en las células Jurkat la viabilidad después de la exposición al arsénico se incrementa cuando son transfectadas con el gen normal, con respecto a las células Jurkat que no fueron transfectadas, sin embargo, este efecto no se encontró en los linfocitos. Mientras que la sensibilidad a efectos de tóxicos del arsénico aumentó en las células Jurkat y en los linfocitos electroporados con el gen *p53* mutante. Se plantea que el aumento de la viabilidad en las células Jurkat transfectadas con el *p53* normal en comparación con las células no transfectadas probablemente se debe al restablecimiento del fenotipo normal de *p53* (Salazar et. al, 1997).

Para demostrar el papel de *p53* se hicieron inmunodetecciones de P53 en todas las líneas celulares mencionadas expuestas a diferentes dosis de arsenito de sodio. La inducción de la expresión de la proteína P53 en las diferentes líneas celulares mostró que en presencia del arsenito de sodio, en las células con *p53* total o parcialmente funcional (RKO+, LCL-EBV, HeLa y Jurkat) hay un aumento de la proteína en relación con la dosis de exposición. Mientras que en las células RKO- y C33A no hay inducción de la proteína P53, sin embargo en las células C33-A se observa cierta expresión basal de P53 la cual disminuye con las dosis más elevadas de arsénico, esto es debido a la alta citotoxicidad que se observa en estas células a concentraciones altas. Una característica conocida de P53 es su vida media notablemente corta, considerando que las mutantes de *p53* son generalmente más estables (Milner, 1991), las células C-33A que contienen un gen *p53* mutado exhibieron un nivel de la proteína basal más alto que las otras líneas celulares que se usaron, sin embargo, se sabe que la proteína no es funcional (Scheffner et al, 1991) y por otro lado los niveles de P53 fueron similares en las células con el gen *p53* funcional.

En las células HeLa infectadas con un papilovirus y continuamente expresando la proteína E6 (Schneider-Gädicke y Schwartz, 1986), la unión de E6 a P53 tiene como resultado la ubiquitinación de P53, siendo blanco selectivo para la degradación proteolítica, manifestándose en la disminución de la vida media y en bajos niveles de P53 en queratinocitos inmortalizados con papilomavirus (Sheffner et al, 1990; Lechner et al, 1992). Por ello, una explicación a los resultados observados inducción de P53 en estas células es que, al incrementarse la exposición al arsénico la cantidad de moléculas de proteína P53 escapan a la inactivación por degradación vía ubiquitinación y parte de la funcionalidad de P53 no es afectada. De hecho otros investigadores han demostrado que HeLa a pesar de la presencia de E6 responde efectivamente ante el tratamiento con mitomicina C, cisplatino y radiación UV (Butz et al, 1995).

La funcionalidad de P53 en el presente trabajo se evaluó, valorando la cinética celular y su alteración ante el tratamiento con diferentes dosis de arsenito de sodio. La alteración del ciclo celular solo se presentó en las células HeLa y RKO+ en las que observamos una acumulación de células en la fase G₂/M. Por lo tanto, el análisis de la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular indica que las células con p53 funcional se acumulan en la fase G₂/M; sin embargo, mediante ensayos de la proteína cinasa p34 *in vitro* se demostró que estas células se detienen específicamente en la fase M del ciclo celular. Se sabe que en este punto de control, p34^{cdc2} tiene un papel crucial, un evento importante es la fosforilación de la histona H1 por la proteína cdc2 que dispara el ensamble de los cromosomas como un preludio a la mitosis, de ahí que el ensayo proteína cinasa p34, sea un método útil para discernir si las células son detenidas en la fase G₂ o en la fase M.

Los datos nos llevan a proponer que en las células RKO⁺ que poseen P53 funcional al inducir el arsénico la expresión de P53 el resultado es la detención de las células en metafase al detectarse el daño en los microtúbulos. Mientras que en las células HeLa proponemos que como resultado de la exposición al arsénico, el nivel de la proteína se incrementa, y esto lleva a la falta de equilibrio entre las concentraciones

de E6 y P53; de manera que al haber más proteína E6, resulta en cierta funcionalidad de P53, que permite entonces que las células tratadas con arsénico tengan la capacidad de detectar el daño, produciendo un paro subsecuente de las células en metafase.

En este sentido nuestra propuesta es apoyada por investigaciones que indican que el arsénico, como los metales pesados, tiene la habilidad de unirse a grupos sulfhidrilo y por lo tanto interfiere con varias propiedades y funciones de las células normales. El arsénico, en linfocitos humanos, aún en el estado en G₀, produce alteraciones ultraestructurales que están relacionadas a la alteración del citoesqueleto, (Vega et al, sometido a publicación). El As tiene un efecto parecido a la colchicina y puede alterar el ensamble de los microtúbulos y la estabilidad del citoesqueleto (Ramírez et al, 1997); además, induce arresto mitótico (Vega et al, 1995).

Recientemente se ha presentado que *p53* está involucrado en el punto de control que modula el ensamble del huso mitótico, en el que se postula que detecta la despolimerización del huso, múltiples minicromosomas, cromosomas dicéntricos y efectos adversos en los cuerpos polares del huso, microtúbulos, proteínas del cinetocoro y ADN centromérico (Rudner y Murray, 1996). La falta de una proteína P53 funcional en células de mamífero resulta en un incremento de la ploidía cuando son cultivados con nocodazol o colcemid. Estos resultados han sido interpretados como indicadores de que *p53* tiene un papel en este punto de control. Una explicación alternativa es que las células con *p53* "silvestre" y las células deficientes de *p53*, salen de la mitosis en proporción similar, pero que las células con *p53* funcional, son enviadas a la muerte o a detenerse en la fase G₁. Tal comportamiento apoya la activación por el arsénico de un punto de control que monitorea o que supervisa la ploidía de la célula, e impide que las células con una mitosis anormal progresen de la fase G₁ a S, una transición de ciclo de la célula que se conoce está regulada por *p53* en respuesta a daño inducido al ADN. El progreso a través de este punto de control después de una mitosis no concluida, también llevaría a un aumento en el número de centrosomas encontrados en las células deficientes de *p53* (Fukasawa et al, 1996).

Se ha reportado que en las células HeLa dosis bajas de drogas que despolimerizan los microtúbulos, como vinblastina o nocodazol inducen la producción de formas bipolares y la anafase es retardada. Es posible que ciertas líneas humanas tengan controles diferentes o adicionales en el punto de control del huso que depende de *p53*, porque algunas líneas celulares humanas que carecen de *p53* funcional, por la presencia de la proteína del papilomavirus E6 o por la expresión del antígeno T SV40, son detenidas en metafase después de la exposición con inhibidores del huso (Kung et al, 1990). Sin embargo, es interesante que otras líneas celulares humanas, como fibroblastos humanos diploides infectados con SV40 y fibroblastos de pacientes con ataxia telangiectasia, se convierten en poliploides espontáneamente después del tratamiento con inhibidores del huso (Naeim et al, 1994; Schimke et al, 1991; Lopes et al, 1993).

Otra posibilidad es que el arsénico este induciendo daño en el ámbito de algunos sistemas de reparación (Li y Rossman, 1989; Jacobson-Kram y Montalbano, 1985; Lynn et al, 1997; Hartwing et al, 1997; Yager y Wiencke, 1997). De manera que los datos de expresión de P53 indican que el arsenito induce un aumento en el nivel de la proteína en respuesta a daño de ADN, que podría ser debido a la inhibición de la actividad de la ligasa del ADN, aunque debe considerarse que esta inhibición enzimática por el arsénico se ha demostrado en células CHO (Li y Rossman, 1989), las cuales son menos sensibles a los efectos del arsénico que las células humanas, en donde se utilizaron dosis en el rango de 6-10 mM, estas concentraciones son 100% más altas que las que empleamos en las células humanas. Igualmente es probable que el arsénico este induciendo un incremento en la expresión de P53 porque el daño sobrepone la capacidad de reparación y las células sean enviadas a apoptosis (otra de las funciones de P53) (Gottlieb y Oren, 1996; Livingston, 1996). Si bien nuestros datos muestran muerte celular no podemos discernir el mecanismo de citotoxicidad.

La inducción de la expresión de P53 en linfocitos humanos de sangre periférica por el tratamiento con arsenito de sodio, representa un avance importante para

entender la inducción de cáncer por este metaloide, porque permite investigar en las células normales a este gen "maestro" en el control de la proliferación y con un papel clave en el proceso canceroso, además porque es interesante tener acceso a muestras de sangre de personas expuestas al arsénico y realizar estudios *in vivo*. Un hallazgo interesante es haber encontrado diferencias entre personas en el comportamiento de la expresión de P53, lo cual puede indicar que el estatus de *p53* es diferente y que la respuesta al daño inducido por el arsénico depende de la funcionalidad de este gen. Pero no se descarta que sea las diferencias encontradas sean consecuencia la susceptibilidad individual de las personas en los mecanismos de reparación y/o los patrones de metilación.

Los datos de la expresión de la proteína P53 en linfocitos correlacionan con los estudios del transcrito, mediante la técnica de RT-PCR, la cual permite analizar RNAs mensajeros de baja abundancia o de muestra limitada (Piattalk et al, 1993, Rashchian 1994). Esta técnica permitió detectar diferencias en *p53* a nivel del transcrito entre los dos individuos analizados. Por supuesto, más individuos deben ser analizadas para investigar esta cuestión.

Datos preliminares obtenidos con linfocitos humanos con relación a determinar si el aumento en la expresión de la proteína P53 es debida a su estabilización o a un aumento en la tasa transcripcional del gen apuntan a que el incremento de los niveles de *p53* en respuesta al daño parece ser un efecto post-transcripcional por incremento en su vida media, aunque no se descarta que se requiera síntesis de novo de *p53* o que se requiere la síntesis de otro producto involucrado en la inducción o estabilización de *p53* a través de fosforilaciones, unión a otras proteínas u oligomerización de *p53* como se ha reportado (Kastan et al, 1991; Price y Calderwood, 1993; Fritsche et al, 1993).

La concentración alrededor de 10 μM de arsenito de sodio parece ser una dosis importante ya que con estas concentraciones nosotros observamos inducción de la proteína P53 y un arresto de células en la fase M. Podrían considerarse que 10 μM .

constituyen una concentración umbral que induce la expresión de P53 y la inducción subsecuente de los sistemas de reparación del ADN y de detectar fallas en la división celular a nivel de microtúbulos o citoesqueleto, dosis más altas por citotóxicos y desencadenar otros mecanismos.

Cabe señalar que linfocitos tratados *in vitro* con 10^{-9} M de arsénico (0.001 μ M) mostraron un aumento en el índice mitótico y que en linfocitos de individuos crónicamente expuestos al arsénico a través del agua de bebida (aproximadamente 0.4 mg/l) mostraron un aumento en número del total de linfocitos y en su índice mitótico, mientras que se observó una disminución en la cinética de proliferación celular a 72 horas de cultivo (Gonsebatt et al, 1994). Esto podría estar indicando el arsénico está modulando la activación o inactivación de *p53* o otros proto-oncogenes y supresores que controlan la proliferación de la célula.

Este trabajo mostró que el arsenito de sodio modula la expresión del supresor *p53* lo que altera la proliferación celular. Estas investigaciones abren un nuevo campo dentro de la Toxicogenética que permitiría entender de manera integral los posibles mecanismos involucrados en la carcinogenesis inducida por agentes químicos.

Capítulo 7

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

- El arsénico es citotóxico y las curvas obtenidas muestran un comportamiento directamente proporcional a la dosis. La pendiente de la curva es dependiente del tipo de células.
- La cantidad de la proteína P53 se incrementa en respuesta a la exposición al arsénico; estos efectos son dependientes del estatus de *p53* en las células.
- El arsenito de sodio altera el ciclo, produciendo un arresto en la fase M, este arresto puede indicar que el arsénico induce daño al ADN en la fase S y/o que las células son detenidas en el punto de chequeo G_2/M por la inhibición de algún(s) mecanismo(s) de reparación. Sin embargo, el arresto celular también puede ser debido a que el arsénico esta induciendo daño a nivel del huso mitótico.
- Los resultados de este estudio relacionan los efectos del arsénico en la división celular con la participación de *p53* en el punto de control M.
- Un posible mecanismo de la carcinogenesis inducida por el arsénico podría involucrar alteraciones en la expresión de *p53*

PERSPECTIVAS

Deben realizarse más estudios evaluar la relación entre la expresión de p53 y la apoptosis a diferentes concentraciones de arsénico y encaminados a investigar la participación este metaloide en la inducción de la apoptosis a través de la vía de p53.

Estudiar la funcionalidad en las líneas celulares estudiadas mediante el análisis de otros genes que son activados por P53. Así como estudiar la relación de P53 con otros genes que participan en la reparación y en la muerte celular.

Es importante analizar más muestras de linfocitos y realizar un seguimiento clínico del individuo que presentó un comportamiento diferente en la expresión de P53 y en lo sucesivo de las personas que presenten un patrón de expresión de p53 diferente al encontrado. Una opción interesante sería estudios de polimorfismos en el gen p53 o estudios de metilación.

Un hallazgo importante es la inducción de la expresión de P53 en linfocitos humanos de sangre periférica tratados con arsénico y la aparente respuesta diferencial entre individuos. Puesto que hasta ahora no había sido reportada en este tejido la expresión de P53 por medio de la técnica de Western blot. Estos resultados abren una nueva posibilidad en el monitoreo de personas expuestas a diversos agentes tóxicos para el ser humano.

Capítulo 8

REFERENCIAS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts Keith, Watson J (1989) *Molecular Biology of the Cell*. Second Edition. Ed Garland Publishing, Inc.
- Allday MJ, Sinclair A, Parker G, Crawford DH, Farrell PJ (1995) Epstein-Barr virus efficiently immortalizes human B cells without neutralizing the function of p53. *EMBO J*, 14: 1382-1391.
- Aposhian HV (1997) Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 37: 397-419.
- Apostoli P, Alessio L, Romeo L, Buchet JP, Leone R (1997) Metabolism of arsenic after acute occupational arsine intoxication. *J Toxicol Environ Health*, 52: 331-342.
- Astolfi E, Maccagno A, Garcia-Fernandez JC, Vaccaro R, Stimola R (1981) Relation between arsenic in drinking water and skin cancer. *Biol Trace Elements Res*, 3: 134-143.
- Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K (1995) Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci*, 92: 8348-8352.
- Attardi L, Lowe S, Brugarolas J, Jacks T (1996) Transcriptional activation by p53, but not induction of p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO J*, 15: 3693-3701.
- Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J. Pathol*, 172(1): 5-12.
- Baker, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C (1990) p53 mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 50: 7717-7722.
- Bishop JM (1985) Viral oncogenes. *Cell*, 42: 23-38.
- Bishop JM (1995) Cancer: the rise of the genetic paradigm. *Genes Development*, 9: 1309-1315.
- Bishop JM (1991) Molecular themes in oncogenes. *Cell*, 64: 235-248.
- Blagosklonny M, Prabhu N, Ei-Deiry W (1997) Defects in p21(WAF1/CIP1), Rb and c-myc signaling in phorbol ester-resistant cancer cells. *Cancer Res*, 57: 320-325.
- Blattener CH, Knebel A, Radler-Pohl A, Sachsenmaier CH, Herrlich P, Rahmsdorf J (1994) DNA damaging agents and growth factors induce changes in the program of expressed gene products through common routes. *Environ Mol Mutagen*, 24: 3-10.
- Bojjan W, Rbert TCh, Sookup SW (1982) Studies of cytogenetic effects of sodium arsenicals on mammalian cells in vitro. *Environ Mutagen*, 4: 493-498.
- Borgoño Jm, Vicent P, Venturino H, Infante A (1977) Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: epidemiological and clinical study before and after the installation of a treatment plants. *Environ Health Perspec*, 19: 103-105.

- Boulikas T (1995) Phosphorylation of transcription factors and control of the cell cycle. *Crit Rev Eukar Gene Expression*, 5: 1-77.
- Bourdon JC, Deguin-Chambon V., Lelong JC, Dessen P (1997) Further characterisation of the p53 responsive element- Identification of new candidate genes for transactivation by p53. *Oncogene*, 14: 85-94.
- Braman JL, Foreback CC (1973) Methylated forms of arsenic in the environmental. *Science*, 182: 1247-1249.
- Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Ponten J (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 10124-10128.
- Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M (1991) Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350: 429-431.
- Brown MA (1997) Tumor suppressor genes and human cancer. *Adv Genet*, 36:45-134.
- Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N (1995) Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature*, 377: 646-649.
- Buchet JP, Lauwerys R (1985) Study of inorganic arsenic methylation by rat liver in vitro: Relevance for the interpretation of observations in man. *Arch Toxicol*, 57: 125-129.
- Buchet JP, Lauwerys R, Roels H (1981) Comparison of the urinary excretion metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsinate in man. *Int Arch Occup Env Health*, 48: 71-79.
- Buffler PA, Crane M, Key MM (1985) Possibilities of detectig health effects by studies of population exposed to chemicals from waste disposal sites. *Environ Health Perspectives*, 62: 423-456.
- Butz K, Shahabeddin L, Geisen C, Spitkovsky D, Ullmann A, Hoppe-Seyler F (1995) Funtional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene*, 927-936.
- Campisi J, Medrano EE, Morreo G, Pardee B (1982) Restriction point control of cell growth by a labile protein: evidence for increased stability in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci*, 79: 436-440.
- Campo E, De La Calle-Martin O, Miquel R, Palacin A (1991) Loss of heterozygosity of p53 gene and p53 protein expression in human colorectal carcinomas. *Cancer Res*, 51: 4436-4442.
- Cavigelli M, Li WW, Lin A, Su B, Yoshioka K, Karin M (1996) The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J*, 15: 6269-6279.
- Cebrián ME, Albores A, García-Vargas G, Del Razo LM (1994) Chronic arsenic poisoning in humans: The case of Mexico. In: Nriagu JO (eds) *Arsenic in the Environment, Part II*. John Wiley & Son, New York , pp 93-10.
- Cebrián ME, Albores A, Aguilar M, Blakely E (1983) Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum Toxicol*, 2: 121-133.
- Cervera ML, Navarro A, Montoro R, Gómez J (1993) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometric determination of arsenic in mussel products. Interference study. *Fresenius J. Anal. Chem.* 347: 58-62

- Crecelius EA (1977) Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environ Health Perspect*, 19:147-150.
- Crecelius E, Yager J (1997) Intercomparison of analytical methods for arsenic speciation in human urine. *Environ Health Perspect*, 105: 650-653.
- Cross SM, Sánchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Reskind WH, Reid BJ (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*, 267: 1353-1356.
- Cullen WR, McBride BC, Reglinski J (1984) Reduction of trimethylarsine by thiols: A mechanistic model for the biological reduction of arsenicals. *J Inorg Biochem*, 21: 45-60.
- Challenger F (1945) Biological methylation. *Chem Rev*, 36:315-361.
- Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, Han ZG, Ni JH, Shi GY, Jia PM, Liu MM, He KL, Niu C, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Paul P, Naoe T, Kitamura K, Miller W, Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C (1996) p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev*, 10: 2438-2451.
- Cheng J, Haas M (1990) Frequent mutations in p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol Cell Biol*, 10: 5502-5509.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey P, Pavletich NP (1994) Crystal structure of p53 tumor suppressor-DNA complex: a framework for understanding how mutations inactivate p53. *Science*, 265: 246-355.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, 265: 1582-1584.
- Das D, Chatterjee A, Samanta G, Mandal B, Chowraborty TR, Sa Chodhury PP, Chanda c, Basu G, Lodh D, Nandi S, Chakraborty T, Mandal S, Bhattacharya SM Chakraborty D (1994) Arsenic contamination in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. *Analyst*, 119:168-170.
- Das D, Chatterjee A, Mandal B, Samanta G, Chakraborty D, Chanda B (1995) Arsenic contamination in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part 2. Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine. Skin scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst*, 120:917-924.
- De Vivo M, Chen J, Codina J, Iyengar R (1992) Enhanced phospholipase C stimulation and transformation in NIH-3T3 cells expressing Q209LGq- α -subunits. *J Biol Chem*, 267: 18263-18266.
- Decaudin D, Geley S, Hirsch T, Castedo M et al (1997) Bcl2 and Bcl-xL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res*, 57: 62-67.
- DeFrank J, Tang W, Powell SN (1996) p53-null cells are more sensitive to ultraviolet light only in the presence of caffeine. *Cancer Res*, 56: 5365-5368.
- Delnomdedieu M, Basti MM, Otvos JD, Thomas DJ (1993) Transfer of arsenite from glutathione to dithiols; a model of interactions. *Chem Res Toxicol*, 6:598-602.
- Del Sal G, Ruaro E, Philipson L, Schneider C (1992) The growth arrest-specific gene gas1, is involved in growth suppression. *Cell*, 70 : 595-607 .
- Di Leonardo A, Hussain S, Linke SP, Greco V, et al. (1997) DNA replication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblast lacking either p53 or pRB function. *Cancer Res*, 57: 1013-1019.

- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, Levine AJ (1993) Gain of function mutations in p53. *Nature Genet*, 4: 42-46.
- Donehower LA, Bradley A (1993) The tumor suppressor p53. *Biochimica Biophysica Acta*, 1155:181-205.
- Dou QP, Levin AH, Zhao S, Pardee AB (1993) Cyclin E and cyclin a as candidates for the restriction point protein. *Cancer Res*, 53 :1493-1497.
- Dou QP, Markell PJ, Pardee AB (1992) Thymidine kinase transcription is regulated at G1/s phase by a complex that contains retinoblastoma-like protein and a cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci*, 89 :3256-3260.
- Duffus JH (1983) *Toxicologia Ambiental*. Ed Omega pp 91
- Duke R, Ojcius D (1997) Suicidio celular, en la salud y en la enfermedad. *Investigación y Ciencia*, 44-52, Febrero.
- Dutta A, Ruppert JM, Aster JC, Winchester E (1993) Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature*, 365: 79-82.
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M (1984) Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature*, 312: 646-649.
- Farnham PJ, Schimke RT (1985) Transcriptional regulation of mouse dihydrofolate reductase in the cell cycle. *J Biol Chem*, 260: 7675-7680.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1995) Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/ice cysteine protease gene family. *Cancer Res*, 55: 2737-2742.
- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ (1989) The p53 proto-oncogen can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57: 1083-1093.
- Fletcher C, Heintz N, Roeder RG (1987) Purification and characterization of OTF-1, a transcriptional factor regulating the cell cycle expression of a human histone H2b gene. *Cell* 51: 773-781.
- Friedberg E (1992) Xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome, helicases, and DNA repair: what's the relationship? *Cell*, 71: 887-889.
- Fritsche M, Haessler C, Brandner G (1993) Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene*, 8(2):307-318.
- Fukasawa F, Choi T, , Kuriyama, Rulong S, Vande Woude GF (1996) Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, 271: 1744-1747.
- Germolac DR, Spalding J, Boorman GA, Wilmer JL, Yoshida T, Simeonova PP, Bruccoleri A, Kayama F, Gaido K, Tennant R, Burlison F, Dong W, Lang RW, Luster MI (1997) Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors. *Mutation Res*, 386: 209-218.
- Gilman AG (1984) G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, 36: 577- 579.
- Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M, Oren M (1991) Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoter. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 9979-9983.
- Giovannuci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ (1995) Alcohol, low methionine-low folate diets, and risk of colon cancer in men. *J National Cancer Institute*, 87: 265-273.

- Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJC (1991) Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67: 1169-1179
- Göhde W, Shumann J, Buchner T, Otto F, Barlogie B (1979) Pulse cytometry. Application in tumor cell biology and clinical oncology. Flow cytometry and sorting, in: MR Melamed, PF Mullaney and ML Mendelson (Eds), John Wiley and Sons Inc New York.
- Gonsebatt ME, Montero R, Vega L, Barba H, Espinosa J, García-Vargas G, Del Razo L, Cebrián ME, Ostrosky-Wegman P (1992a) Genotoxic and "nongenotoxic" effects in arsenic human exposure. International Seminar. Proceeding, Arsenic in the Environment and its incidence on health, Santiago Chile, 15-19.
- Gonsebatt ME, Vega L, Herrera LA, Montero R, Rojas E, Cebrián ME, Ostrosky-Wegman P (1992b) Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutation Res* 283: 91-95.
- Gonsebatt ME, Ostrosky-Wegman P, Vega L, Salazar AM, Montero R, Guzmán P, Blas J, Del Razo, LM, García-Vargas G, Albores A, Cebrián ME, Kelsh M (1997) Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutation Res*, 386: 219-228.
- Gonsebatt ME, Vega L, Montero R, García-Vargas G, Del Razo LM, Albores A, Cebrián ME, Ostrosky-Wegman P (1994) Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutation Res*, 313: 293-299.
- Goodrich DW, Wang NP, Qian Y-W, Lee Y-HP, Lee W-H (1991) The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, 67: 293-302.
- Gottlieb T, Oren M (1996) p53 in growth control and neoplasia. *Biochimica Biophysica Acta*, 1287: 77-102.
- Gou HW, Chen CJ, Greene HL (1994) Arsenic in drinking water and cancers: a brief descriptive review of Taiwan studies. In: Chappell WR Abernathy CO and Cothorn CR (eds) Arsenic. Exposure and Health, Science Reviews Ltd. 40, Norwood, England, pp 129-138.
- Goul KL, Nurse P (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, 342:39-45.
- Graña X, 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.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 53: 5377-5381.
- Griffith J, Ducan RC, Riggan WB, Pellon AC (1989) Cancer mortality in U.S. countries with hazardous waste sites and ground water pollution. *Arch Environ Health*, 44: 69-74.
- Gutman A, Wasylyk B (1991) Nuclear targets for transcription regulation by oncogenes. *Trends Genet*, 7: 19-54.
- Haffner R, Oren M (1995) Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Gen Dev*, 5: 84-90.
- Haldar S, Basu A, Croce C (1997) Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res*, 57: 229-233.
- Hansen R, Oren M (1997) p53: from inductive signal to cellular effects. *Curr Opin Gen Dev*, 7: 46-51.

- Hansen RS, Braithwaite AW (1996) The growth-inhibitory function of p53 is separable from transactivation, apoptosis, and suppression of transformation by E1a and Ras. *Oncogene*, 13: 995-1007.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75: 805-816.
- Harris CC (1991) Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives. *Cancer Res*, 51:5023-5044.
- Harris CC (1993) The p53 tumor suppressor gene: at crossroad of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and cancer risk assessment. *Science*, 262: 1980-1981.
- Harris CC (1995) p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment, in *Activities Chemical Industry Institute of Toxicology*, 5:1-6.
- Harris CC, Hollstein M (1993) Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*, 329: 1318-1327.
- Hartmann A, Speit G (1996) Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ Mutagen*, 27: 98-104.
- Hartwig A, Groblinghoff UD, Beyersmann D, Natarajan AT, Filon R, Mullenders LH (1997) Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 18: 399-405.
- Havre PA, Yuan J, Hedrick L, Cho KR, Glazer PM (1995) p53 Inactivation by HPV16 E6 Results in Increased Mutagenesis in Human Cells. *Cancer Res*, 55: 4420-4424.
- Hesketh R (1997) *The oncogene and tumor suppressor gene. Facts book. Second edition.* Academic Press.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, 253: 49-53.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hoving E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acid Res*, 22: 3551-3555.
- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T (1991) Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 350: 427-428.
- Huebner RJ, Todaro GJ (1969) Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 64:1087-1090.
- Hung DT, Jamison TF, Schreiber SL (1996) Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chem Biol*, 3: 623- 639.
- Hunter T (1991) Cooperation between oncogenes. *Cell*, 64:249-270.
- IARC (International Agency for Research) (1980) Some metals and metallic compounds, in: *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to humans*. IARC, Lyon, 23:39-141.
- IARC (International Agency for Research) (1987) Overall evaluations of carcinogenicity, in: *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans*. IARC, Lyon. Suppl. 7, 100-106.

- Iguchi-Arigo SMM, Okazaki T, Yamaguchi M, Itani T, Ogata Y Sato Y, Ariga H (1988) An initiation site of DNA replication with transcriptional enhancer activity present upstream of the c-myc gene. *EMBO J.* 7:3135-3142.
- Izume T, Maller JL (1991) Phosphorylation of xenopus cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transition. *Mol Cell Biol*, 11: 3860-3867.
- Jacobson-Kram D, Montalbano D (1985) The reproductive effects assessment groups report on the mutagenicity of inorganic arsenic. *Environ Mutagen*, 7: 778-804.
- Jenkins JR, Rudge K, Currie GA (1984) Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*, 312: 651-654.
- Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr (1997) p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 339:191-194.
- Kachinskas DJ, Qin Q, Phillips MA, Rice RH (1997) Arsenate suppression of human keratinocyte programming. *Mutation Res*, 386: 253-261.
- Kaelin WG Jr (1998) Another p53 doppelganger?. *Science*, 281: 57-58.
- Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr (1991) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell*, 71: 587-597.
- Kawasaki ES, Wang A M (1989) Detection of gene expression. In *PCR Technology, principles, and applications for DNA amplification* (ed. H.A. Erlich), pp. 89-97. Stockton Press, New York.
- Kinzler K, Vogelstein B (1997) Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386:761-763.
- Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L (1993) Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci*, 90: 3988-3992.
- Knudson AG Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci*, 68: 820-823.
- Ko L, Prives C (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Development*, 10: 1054-1072.
- Koff A, Giordana A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto A, Morgan DO, Franza BR, Roberts MJ (1992) Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*, 257: 1689-1694.
- Koshland D (1993) (p53) Molecule of the Year. *Science*, 262: 1953.
- Kung AL, Sherwood SW, Schimke RT (1990) Cell line-specific differences in the control of cell cycle progression in the absence of mitosis. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 9553-9557.
- Land H, Parada LF, Weinberg RA (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, 304 :596-602.
- Lane DP, Benichou S (1990) p53: oncogene or anti-oncogene. *Genes Dev*, 4: 1-13
- Lane DP, Crawford CV (1979) T-Antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278:261-263.

- Lau L, Nathans D (1985) Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cell. *EMBO*, 4 :3145-3151.
- Lechner MS, Mack DH, Finicle Ab, Crook T (1992) Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J*, 11: 3045-3052.
- Lee TC, Haung RY, Jan KY (1985) Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res*, 148: 83-89.
- Lee TC, Lee KC, Tzeng YJ, Huang RY, Jan K.Y (1986) Sodium arsenite potentiates the clastogenicity and mutagenicity of DNA crosslinking agents. *Environ Mutagen*, 8: 119-128.
- Lee TC, Tanaka N, Lamb PW, Gilmer TM, Barrett JC (1988) Induction of gene amplification by arsenic. *Science*, 241: 79-81.
- Levine AJ (1993) The tumor suppressor genes. *Ann Rev Biochem*, 62: 623-651.
- Levine AJ (1995) Tumor suppressor genes. *Sci Am Science Med*, 1: 28-35.
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323-331.
- Levine AJ, Momand J, Finlay C (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351: 453-456.
- Lew JD, Marini JN, Reed IS (1992) Different G1 cyclin control the timing of cell cycle commitment in mother and daughter cells of the budding yeast *S.cerevisiae*. *Cell*, 69 :317-327.
- Li JH, Rossman TG (1989a) Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol Toxicol*, 2: 1-9.
- Li JH, Rossman TG (1989b) Mechanism of carcinogenesis of sodium arsenite with N-methyl-N-nitrosourea. *Biol Trace Elem*, 21: 373-381.
- Liu YC, Huang H (1997) Involvement of calcium-dependent protein kinase C in arsenite-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biochem*, 64: 423-433.
- Livingston D (1996) Meeting Report: 1995 Annual Cancer Research Symposium of the Pezcoller Foundation. *Biochimica Biophysica Acta*, 1242: 21-216.
- Lopes NM, Adams, EG, Pitts TW, Bhuyan BK (1993) Cell kill kinetics and cell cycle effects of taxol on human and hamster ovarian cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, 32: 235-242.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Houseman DE (1993a) p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 74: 957-968.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T (1993b) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362: 847-849.
- Lynn S, Lai HT, Gurr JR, Jan KY (1997) Arsenite retards DNA break rejoining by inhibiting DNA ligation. *Mutagenesis*, 12: 353-358.
- Manfioletti G, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson I, Schneider B (1990) A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol*, 10: 2924-2930.

- Mass M, Wang L (1997) Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutation Res*, 386: 263-277.
- Means AR, Rasmussen CD (1988) Calcium, calmodulin and cell proliferation. *Cell calcium*, 9: 313-319.
- Meek DW (1994) Post-transcriptional modifications of p53. *Seminars Cancer Biol*, 5: 203-210.
- Meek DW, Eckhart W (1990) The p53 tumour suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II. *J Virol*, 64: 1734-1744.
- Meek DW, Simon S, Kikkawa U, Eckhart W (1990) The p53 tumor suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II. *EMBO J*, 9:3253-3260.
- Menéndez D (1997) Efecto del arsenito de sodio sobre el gen supresor de tumores p53. Tesis de Licenciatura, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- Michiels FM, Caillou B, Talbot M, Dessarps-Freichy F, Maunoury MT, Schlumberger M, Mercken L, Monier R, Feunteun J (1994) Oncogenesis potencial of guanine nucleotide stimulatory factor α subunit in thyroid glands of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 10 488- 10 492.
- Milner J (1991) The role of p53 in normal control of cell proliferation, *Curr Opin Cell Biol*, 3: 282-286.
- Milner J, Cook A, Mason J (1990) p53 is associated with p34cdc2 in transformed cells. *EMBO J*, 9:2885-2889.
- Minn AJ, Boise LH, Thompson CB (1996) Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle check point induced by mitotic spindle amage. *Genes Dev*, 10: 2621-2631.
- Minshull J, Blow JJ, Hunt (1989) Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell*, 56: 947-956.
- Moses HL, Yang YE, Pietsenpol AJ (1990) TGF-B stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*, 63:245-247.
- Muca C, Vallar L (1994) Expression of mutationally activated G α s stimulates growth and differentiation of thyroid FRTL 5 cells. *Oncogene*, 9: 3647-3653.
- Mudryj M, Devoto SH, Hiebert SW, Hunter T, Pines J, Nevins JR (1991) Cell cycle regulation of E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell*, 65: 1243-1253
- Mullis K B, Fallona F (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol*, 155: 335-350.
- Murray AW (1992) Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, 359: 599-604.
- Murray AW, Hunt T (1993) *The cell cycle: an introduction*. New York: Oxford University Press.
- Murray AW, Solomon MJ, Kirschner MW (1989) The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature*, 339: 280-289.
- Mushak P and AF Crocetti (1995) Risk and revision in arsenic cancer risk assessment. *Environ Health Perspect*, 103: 684-689.

- Naeim A, Repinski C, Huo Y, Hong J, Chessa L, Naeim F, Gatti R (1994) Ataxia--telangiectasia: flow cytometric cell-cycle analysis of lymphoblastoid cell lines in G2/M before and after gamma-irradiation. *Modern Pathol*, 7: 587-592.
- Nagarajan M, Johnson FL (1989) Regulation of thymidylate synthase gene expression in mouse fibroblasts synchronized by mitotic selection. *Exp Cell Res*, 181: 289-297.
- Najem GR, Louria DB, Lavenhar MA, Feuerman M (1985) Clusters of cancer mortality in New Jersey municipalities; with special reference to chemical toxic waste disposal sites and per capita income. *Intl J Epid*, 14: 528-537.
- Norbury C, Nurse P (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*, 61: 441-470.
- Nuñez G, Clarke M (1994) The Bcl2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biology*, 4: 399-404.
- Nurse P (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344: 503-508.
- Oliner DJ (1993) The role of p53 in cancer development. *Scientific American Sci Med*, September/October, :16-25.
- Oren M, Prives C (1996) Meeting Report. p53: upstream, downstream and offstream (review of the 8th p53 workshop). *Biochimica Biophysica Acta*, 1288: 13-19.
- Ostrosky-Wegman P, Gonsebatt ME, Montero R, Vega L, Barba H, Espinosa J, Palao A, Cortinas C, García-Vargas G, Del Razo LM, Cebrian M (1991) Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res*, 250: 477-482.
- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G (1992) Cyclin A is required at two point in the human cell cycle. *EMBO J*, 11:961-971.
- Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V (1984) Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature*, 312: 649-651.
- Pardee AB (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci*, 71: 1286-1290.
- Pardee AB (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, 246: 603-608.
- Pepper RG, Tina WZ, Mickelson MN (1968) Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. *J Lab Clin Med*, 72: 842-846.
- Persons DA, Wilkinson WO, Bell RM (1988) Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity with protein kinase C-1 cDNA. *52: 447-458.*
- Piattak M, Saag MS, Yang L C (1993) High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*, 259: 1749-1754.
- Pietenpol JA, Tokino T, Thiagalingam S, El-Deiry W, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 1988-2002.
- Pines J (1997) Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Ariv Cancer Res*, 66: 181-219.
- Price BD, Calderwood SK (1993) Increased sequence-specific p53-DNA binding activity after DNA damage is attenuated by phorbol esters. *Oncogene*, 8(11): 3055-3062

- Prives C (1994) How loops, beta-sheets and alfa-helices help us to understand p53. *Cell*, 70: 543-546.
- Ramirez P, Eastmond DA, Laclette JP, Ostrosky-Wegman P (1997) Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cell by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Res*, 386: 291-298.
- Rappolee DA, Mark D, Baanda MJ, Werb Z (1988) Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping. *Science*, 241: 708-710
- Rashchian A (1994) Amplification of RNA. In *PCR methods and applications*. 4 pp S83-S91. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Reddy P (1994) Cell cycle: regulatory events in G1 - S transition of mammalian cells. *J Cellular Biochemistry*, 54: 379-386.
- Rollins BJ, Stiles CD (1989) Serum-inducible genes. *Adv Cancer Res*, 53:1-32.
- Rosenbaltt J, Gu Y, Morgan DO (1992) Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 2824-2828.
- Rossman TG (1981) Enhancement of UV-mutagenesis by low concentrations of arsenite in E.Coli. *Mutat Res*, 91: 207-211.
- Rudner AD, Murray AW (1996) The spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, 8: 773-780.
- Ruley HE (1990) Transforming collaborations between ras and nuclear oncogenes. *Cancer Cell*, 2: 258-268.
- Sabbatini P, Lin J, Levine AJ, White E (1995) Essential role for p53-mediated transcription in E1A-induced apoptosis. *Genes Development*, 9: 2184-2192.
- Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K.B, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N A (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnostics of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Salamanca F, Luengas F, Antillón F (1984) Genetic and cytogenetic studies in patients with retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 13: 129-131.
- Salazar AM (1994) Monitoreo de daño genotóxico en trabajadores de una estación de transferencia de desechos industriales peligrosos. Tesis de Maestría UNAM.
- Salazar AM, Ostrosky-Wegman P, Menéndez D, Miranda E, García-Carancá A, Rojas E (1997) Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutation Res*, 381: 259-265.
- Sancar A (1994) Mechanisms of DNA excision repair. *Science* 266: 1954-1956.
- Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM (1991) The state of p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 5523-5527.
- Schiller CM, Fowler BA, Woods JS (1977) Effects of arsenic on pyruvate dehydrogenase activation. *Environ Health Perspect*, 19:205-207.
- Schimke RT, Kung AL, Rush DF, Sherwood SW (1991) Differences in mitotic control among mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 56, 417-425.

- Schnapf JL, Baylor DA (1987) How photoreceptor cells respond to light. *Sci Am*, 256: 40-47.
- Schneider C, King RM, Philipson L (1988) Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cell. *Cell*, 54: 787-793.
- Schneider-Gädicke A, Schwarz E (1986) Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J*, 5: 2285-2292.
- Selivanova G, Wilman KG (1995) p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv Cancer Res*, 66: 143-179.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366: 704-707.
- Seto M, Yamamoto K, Lida S, Akao Y, Utsuimi R, Kubonishi I, Miyoshi I, Ohtsuki T, Yawata Y, Namba M, Motokura T, Arnold A, Takahashi T, Ueda R (1992) Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)q(13;q32) translocation. *Oncogene*, 72: 515-525.
- Seto E, Ushava A, Zambetti GP, Morrand J, Horikoshi N, Weinmann R, Levine AJ, Shenk T (1992) Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci*, 89:12028-12032.
- Slingerland JM, Hengst L, Pan CH, Alexander D, Stampfer MS, Reed SI (1994) A novel inhibition of cyclin-cdk activity detected in transforming growth factor β -arrested epithelial cell. *Mol Cell Biol*, 14 :3683-364.
- Sheffner M, Werness B, Hutbregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papilloma virus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63: 1129-1136.
- Scheffner M, Münger JC, Byrne PM Howley (1991) The state of p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 5523-5527.
- Smith M, Fornace A (1996) Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutation Res*, 340: 109-124.
- Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB (1992) Regulation of histone gene expression. *Curr Opin Cell Biol*, 4 :166-173.
- Styblo M, Thomas DJ (1995) In vitro inhibition of glutathione reductase by arsenotriglutathione. *Bioch Pharm*, 49:971-977.
- Subrahmanyam G, Bertics PJ Anderson RA (1991) Phosphorylation of protein 4.1 on tyrosine-418 modulates its function in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 5222-5226.
- Sukhatme V, Cao X, Chang L, Tsai-Morris C, Stamenovich D, Ferreira P, Cohen D, Edwards S, Shows T, Curran T, LeBeau M, Adamson E (1988) A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation and after cellular depolarization. *Cell*, 53: 37-43.
- Tack LC, Wright JH (1992) Altered phosphorylation of free and bound forms of monkey p53 and simian virus 40 large T antigen during lytic infection. *J Virol*, 66: 1312-1320.
- Takeshima Y, Seyama T, Bennett WP, Akiyama M, Tokuoka S, Inai K, Mabuchi K, Land CE, Harris CC (1993) p53 mutations in lung cancers from no-smoking atomic-bomb survivors. *Lancet*, 342: 1520-1521.
- Thishler RB, Lamppu DM, Park S, Price BD (1995) Microtubule-active drugs taxol, vinblastine, and nocodazole increase the levels of transcriptionally active p53. *Cancer Res*, 55: 6021-6025

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

-Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, Kawasaki ES. et al, (1991) Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *Journal Nat Cancer Institute*, 84: 845-844.

-Treisman R (1987) Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *EMBO J*, 6:2711-2717.

-Tsai L, Lees E, Faha B, Harlow E, Riabowol K (1993) The cdk2 kinase is required for the G1 to S transition in mammalian cells. *Oncogene*, 8: 1593-1602.

-Tseng WP, Chu AM, How SW, Fong JM, Lin CS, Yen S (1968) Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J Natl Cancer Inst*, 40: 453-463

-Ullrich S, Anderson W, Mercer E, Appella E (1992) The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J Biol Chem*, 267: 15259-15262.

-Vahter M (1994) What are the chemical forms of arsenic in the urine, and what can they tell us about exposure?. *Clin Chem*, 40: 679-680.

-Varmus HE (1984) The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu Rev Genet*, 18: 553-612.

-Vega L, Gonsebatt ME, Ostrosky-Wegman P (1995) Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutation Res*, 334: 365-373.

-Vega L, Ostrosky-Wegman P, V. Madrid, Montes de Oca P, Fortoul TI, Saavedra R (1998) The immunosuppressant effect of sodium arsenite on human lymphocyte in vitro. I. Alteration on interleukin-2. *Enviado*.

-Vianna NJ, Polan AK (1984) Incidence of low birth weight among Love Canal residents. *Science*, 226: 1217-1219.

-Vogelstein B, Kinzler K (1992) p53 function and dysfunction. *Cell*, 70: 523-526

-Wang TS, Shu YF, Liu YC, Jan KY, Huang H (1997) Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. *Toxicology*, 121(3): 229-237.

-Wang Y, Eckhart W (1992) Phosphorylation sites in the amino terminal region of mouse p53. *Proc natl Acad Sci*, 89: 4231-4235.

-Weinberg RA (1996) How cancer arises. *Scientific American Special Issue*, September 32-40.

-Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323-330.

-Weinberg RA (1991) Tumor suppressor genes. *Science*, 245: 1138-1146.

-Weinberg RA (1989) Oncogenes, antioncogenes, and the molecular base of multistep carcinogenesis. *Cancer Res*, 49: 3713-3721.

-Weinberg RA (1985) The action of oncogenes in the cytoplasm and the nucleus. *Science*, 230 :770-776.

-Weinstein IB, Zhou P (1997) Cell cycle control gene defects and human cancer. In: *Encyclopedia of Cancer*. Academic Press Inc. USA, 1:256-267.

- White R (1997) Regulation of RNA polymerases I and III by the retinoblastoma protein: a mechanism for growth control. *Trends Biochem Sciences*, 22: 77-80.
- WHO (1993) Revision of the WHO guidelines for drinking water quality. World Health Organization. *Environ Health Criteria*, 46, Ginebra.
- Williams JG, Penman S (1975) The messenger RNA sequences in growing and resting mouse fibroblasts. *Cell*, 6: 197-206.
- Xiong Y, Zhang H, Beach D (1993) Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev*, 7: 1572-1583.
- Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D (1991) Human D-type cyclin. *Cell*, 65: 691-699.
- Yager JW, Wiencke JK (1997) Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mutat Res*, 386(3): 345-351.
- Yamaguchi H, Fowler B (1994) Toxicity and metabolism of inorganic and methylated arsenicals. In: arsenic in the Environment Part II. Human health and ecosystem effects. John Wiley & Sons, Inc.
- Yamanaka K, Tezuka M, Kato K, Hasegawa A, Okada S (1993) Crosslink formation dimethylarsinic acid. *Biochem Bioph Res Comm*, 1991: 1184-1191.
- Yamanaka K, Hasegawa A, Sawamura, R. Okada S (1989) Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 43-50
- Yamanaka K, and Okada S (1994) Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environ Health Perspect*, 102: 37-40
- Yamamoto K, Yamamoto M, Hirano, Y, 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, Oren M (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352: 345-347.
- Yonish-Rouach E, Grunwald D, Wilder S, Kimchi A, May E, Lawrence JJ, May P, Oren M (1993) p53-mediated cell death; relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol*, 13(3): 1415-1423
- Zetterberg A, Larson O (1985) Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci*, 82:5365-5369.

CAPITULO 9

Apéndice

Tabla 3. Viabilidad con azul tripano de linfocitos humanos de sangre periférica tratados con arsenito de sodio durante 24 y 48 horas.

		24 horas		48 horas	
		X	D.E.	X	D.E.
0	μM	100.00	0.0000	100.00	0.0000
0.001	μM	97.84	2.1935	96.44	2.5349
0.01	μM	94.24	4.2191	93.57*	3.5778
0.1	μM	95.48	4.2132	97.17	2.5845
1	μM	87.28*	3.5396	88.88*	3.2648
10	μM	80.99*	3.1257	82.21*	3.5582
20	μM	77.84*	4.7150	78.77*	5.3495

* Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.001$ (ANOVA)
Cuatro experimentos independientes por triplicado.

Tabla 4. Viabilidad con azul tripano de linfocitos humanos de sangre periférica y las líneas celulares Jurkat y LCL-EBV tratados con arsenito de sodio durante 24 horas.

		Jurkat		Linfocitos		LCL-EBV	
		X	D.E.	X	D.E.	X	D.E.
0	μM	100.00	0.0000	100.00	0.0000	100.00	0.0000
0.1	μM	77.68*	6.1449	95.48	4.2191	91.00	4.6881
1	μM	72.86*	6.1197	87.28*	3.5396	94.37	2.6587
10	μM	69.11*	9.6754	80.77*	3.1257	80.58**	6.2154
25	μM	60.72*	8.2036	77.84*	4.7150	62.35*	7.4882
50	μM	54.47*	6.2598			52.37*	9.9984

* Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.001$ (ANOVA)

** Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.01$ (ANOVA)

Cuatro experimentos independientes por triplicado.

Tabla 5. Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células HeLa tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas.

		Exclusión azul tripano		FDA/BrE	
		X	D.E.	X	D.E.
0	μM	100.00	0.0000	100.00	0.0000
0.1	μM	97.49	3.0550	95.56	1.7885
1	μM	91.57	1.5275	91.79	4.1472
10	μM	88.47**	2.0816	79.60*	6.9785
25	μM	82.98*	0.5773	65.85*	4.7222
50	μM	70.65*	0.5773	46.11*	5.6833

* Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.001$ (ANOVA)

** Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.05$ (ANOVA)

Tres experimentos independientes por cuadruplicado.

Tabla 6. Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células HeLa tratadas con arsenito de sodio durante 48 horas.

		Exclusión azul tripano		FDA	
		X	D.E.	X	D.E.
0	μM	100.00	0.0000	100.00	0.0000
0.1	μM	98.75	4.3588	94.79	4.6151
1	μM	97.19	6.3500	90.83**	2.3874
10	μM	76.68*	1.7320	52.29*	2.0493
25	μM	45.53*	0.5000	22.08*	4.0865
50	μM	30.44*	0.9574	02.91*	2.1679

* Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.001$ (ANOVA)

** Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.05$ (ANOVA)

Dos experimentos independientes por triplicado.

Tabla 7. Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células C-33A tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas.

		Exclusión azul tripano		FDA	
		X	D.E.	X	D.E.
0	μM	100.00	0.0000	100.00	0.0000
0.1	μM	95.78	0.3107	76.88**	6.1400
1	μM	94.19	3.3938	72.98*	9.2897
10	μM	78.30**	1.8382	61.00*	1.6431
25	μM	61.16*	6.6326	51.25*	8.8430
50	μM	49.53*	4.8222	46.23*	3.8987

* Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.001$ (ANOVA)

** Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.01$ (ANOVA)

Dos experimentos independientes por triplicado.

Tabla 8. Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células C-33A tratadas con arsenito de sodio durante 48 horas.

		Exclusión azul tripano		FDA/BrE	
		X	D.E.	X	D.E.
0	μM	100.00	0.0000	100.00	0.0000
0.1	μM	84.43*	1.4424	79.61*	3.0956
1	μM	82.91*	2.2765	77.69*	5.8022
10	μM	60.47*	1.3575	20.38*	2.2173
25	μM	52.28*	1.5981	00.00*	0.0000
50	μM	20.18*	4.0729	00.00*	0.0000

* Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.001$ (ANOVA)

Tres experimentos independientes por duplicado.

Tabla 9. Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células LCL-EBV tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas.

		Exclusión azul tripano		FDA	
		X	D.E.	X	D.E.
0	μM	100.00	0.0000	100.00	0.0000
0.1	μM	90.75***	3.3481	91.25**	5.1339
1	μM	96.16	3.6408	87.48*	2.1561
10	μM	84.04*	7.4481	79.67*	5.4398
25	μM	66.07*	8.3331	38.14*	7.5807
50	μM	56.38*	9.9148	29.31*	6.8905

* Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo <math>p<0.001</math> (ANOVA)

** Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo <math>p<0.01</math> (ANOVA)

*** Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo <math>p<0.05</math> (ANOVA)

Cuatro experimentos independientes por triplicado (azul tripano). Dos experimentos independientes por quintuplicado (FDA/BrE).

Tabla 10. Comparación entre los ensayos de exclusión azul tripano y FDA en las células Jurkat tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas.

		Exclusión azul tripano		FDA/BrE	
		X	D.E.	X	D.E.
0	μM	100.00	0.0000	100.00	0.0000
0.1	μM	77.68*	6.1449	82.37*	3.0072
1	μM	72.86*	6.1197	75.24*	2.5820
10	μM	69.11*	9.6754	67.88*	2.5251
25	μM	60.72*	8.2036	60.50*	7.3788
50	μM	54.47*	6.2598	37.98*	4.5841

* Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo <math>p<0.001</math> (ANOVA)

Cuatro experimentos independientes por triplicado (azul tripano). Dos experimentos independientes por triplicado (FDA/BrE).

Tabla 11. Viabilidad con el ensayo de FDA/BrE en las células RKO tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas.

		RKO+		RKO-	
		X	+ / -	X	+ / -
0	μM	100.00	0.0000	100.00	0.0000
0.1	μM	97.36	3.6151	83.45 *	5.6987
1	μM	95.00	2.1679	75.89*	4.3286
10	μM	83.72*	4.7222	65.47*	2.7861
25	μM	70.00*	2.1516	53.36*	3.4591
50	μM	45.33*	6.5100	39.45*	5.6348

* Significativamente diferente con respecto a los cultivos testigo $p < 0.001$ (ANOVA)
Tres experimentos independientes, duplicado.

CAPITULO 10

Artículos

Reprinted from

MUTATION RESEARCH

Fundamental and Molecular
Mechanisms of Mutagenesis

Mutation Research 381 (1997) 259–265

Induction of p53 protein expression by sodium arsenite

A.M. Salazar ^a, P. Ostrosky-Wegman ^{a,*}, D. Menéndez ^{a,b}, E. Miranda ^c,
A. García-Carrancá ^b, E. Rojas ^a

^a *Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México, Mexico*

^b *Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México, Mexico*

^c *Departamento de Hematología, Hospital General de México, México, Mexico*

Received 27 February 1997; revised 15 August 1997; accepted 25 August 1997



proficient human cells, arsenic was able to induce mutations [13]. Arsenic action at the chromosomal level is supported by data obtained by our group which has shown that arsenic induces damage in vitro and in vivo. Structural and numerical chromosomal aberrations, and micronuclei were found [14–16]. We also showed that the aneugenic effect of arsenite is due to the alteration of cytoskeletal structures in human lymphocytes in vitro [17]. Besides chromosomal effects, we also found proliferation of lymphocytes was impaired in individuals who consumed arsenic in drinking water. A similar result was observed with human lymphocytes treated in vitro [18–20]. Recent data show that trivalent arsenic is a stimulator of AP-1 transcriptional activity and an inducer of *c-fos* and *c-jun* gene expression in HeLa cells [21].

Critical DNA damage associated with regulation of tumor suppressor genes has been implicated in changes in normal cellular growth. Tumor suppressor genes can participate as physiological barriers against clonal expansion or genomic mutability and are able to hinder growth and metastasis of cells driven to uncontrolled proliferation by oncogenes [22]. The *p53* tumor suppressor gene is the most striking example of a gene that can control normal cell proliferation [23,24], and other cellular functions such as DNA repair, differentiation, genomic plasticity, and programmed cell death [25,26]; *p53* is part of a pathway invoked upon DNA damage in mammalian cells through the induction of G_1 and mitotic arrest [27,28]. It is known that the *p53* protein acts as a transcription factor that modulates expression of genes containing sequences with a *p53* binding site in their 5'-control regions [29]. Mutation in *p53* gene has been reported in different tumors including bladder, liver, lung and skin, which are arsenic target tissues [26]; changes in the methylation of DNA in the *p53* gene promoter induced by arsenic treatment have been shown in cultured human lung cells [30]. Thus, *p53* is one important component in the biochemical pathway affected by human carcinogenesis and could be a target of arsenic.

Our laboratory has been attempting to determine the mechanisms underlying the proliferative impairment of lymphocytes exposed to arsenic. We reasoned that this uncoupled response could be mediated by alterations in *p53* tumor suppressor gene

expression, and may represent a mechanism of arsenic-induced carcinogenesis. To test this hypothesis, the effects of arsenic on *p53* protein expression were evaluated in cell lines with wild-type and mutated *p53* gene. In addition, we analyzed the effect of introducing a mutant *p53* gene by electroporation into human lymphocytes and into a lymphoblast cell line.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The HeLa cell line, a transformed human epithelioid carcinoma cell line (CCL-2) and C-33A, a transformed human non-differentiated carcinoma cell line (ATCC) were grown in DMEM medium (Sigma) contained 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% penicillin–streptomycin (Gibco). Jurkat cells, a transformed human T-lymphocyte cell line (ATCC) and LCL-EBV cells, obtained from healthy donors and mononuclear cells were transformed by Epstein–Barr virus were grown in RPMI-1640 medium (Sigma) with 10% (v/v) FBS, 1% penicillin–streptomycin, 10 mM of non-essential amino acids (Gibco) and 2 mM L-glutamine (Gibco). In addition, 10 mM sodium pyruvate (Gibco) was added to Jurkat cell culture medium. All cells lines were incubated in a 5% CO_2 atmosphere at 37°C and grown to 90% confluence.

Human lymphocytes were stimulated with phytohemagglutinin (Gibco) 50 μ l/5 \times 10⁵ cells and cultured under the same condition as the other lymphoid cell lines.

2.2. Arsenic treatments and cytotoxicity assessment

An aqueous sterile stock solution of sodium arsenite (10 mg/ml) was prepared and appropriate volumes were diluted to obtain the desired final concentrations. After growth for 24 h, one million cells were incubated in media containing 10% FBS with various concentrations of arsenic (0.1, 1, 10, 25 and 50 μ M) for an additional 24 h and viability of cells was determined by Trypan blue exclusion.

C-33A and HeLa cells were trypsinized, suspended in supplemented medium, and cell viability

evaluated. Human lymphocytes, Jurkat and LCL-EBV cells, were centrifuged, suspended in complete medium and viability was measured.

2.3. Transfection of wild-type and mutant *p53* genes

A Gene Pulser Apparatus (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA) was used to electroporate human lymphocytes and Jurkat cells. Cells from exponentially growing cultures were collected by centrifugation and resuspended in ice-cold calcium and magnesium-free phosphate-buffered saline solution (PBS) $1\times$. The cells were centrifuged for 5 min, and the pellet resuspended on ice cold PBS $1\times$ to final concentration of 1.5×10^7 cells/ml. The cells were chilled on ice for 10 min, 10 μ l DNA (1 mg/ml) was added, and aliquots of 0.8 ml of the cell suspension were transferred into electroporation chambers [31–33].

Normal (pcDNA-53) and mutated (pcDNA-273) *p53* expression plasmids a generous gift from Dr. Carl Miller, were linearized with restriction enzyme *NheI* and then used to transfect human lymphocytes and Jurkat cells by electroporation with a single pulse of 1250 V and 600 V (25 μ Fd), respectively, as previously described [34].

2.4. Western blotting

Cells were harvested after arsenic treatment and nuclei were prepared as described by Blattenner et al. [27], with modifications. Briefly, nuclei were lysed in PBS containing 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 3 mM PMSF, 20 μ g/ml aprotinin, and 10 μ g/ml sodium orthovanadate. Fifty micrograms of protein were boiled for 5 min in sample buffer (2% SDS, 80 mM Tris (pH 6.8), 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol and 0.01% Bromophenol blue), they were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. After blocking with 5% dry milk in TBS the membrane was incubated with 1 μ g/ml anti-*p53* antibody (Santa Cruz Biotechnology) for 2 h. The blot was washed 3×10 min with 0.1% tween in TBS, the membranes were incubated with a horseradish peroxidase-coupled anti-mouse antibody (Amersham) diluted 1:2000 for 1 h. After washing 3×10 min the blot was developed by the

ECL method (Amersham) and exposed to an X-ray film.

3. Results and discussion

To determine the effect of sodium arsenite on cell viability, a dose-response curve was made for in HeLa, C-33A, Jurkat and LCL-EBV cells. Exposure of these cells to arsenic for 24 h induced different cytotoxic responses; C-33A cells were very sensitive to arsenic treatment, since less than 40% of cells were viable when 50 μ M of arsenite were used. In comparison, HeLa cells, although sensitive to doses higher than 10 μ M, were significantly less sensitive than C-33A, at 50 μ M arsenite HeLa cell viability was approximately 75% (Fig. 1A). It has been reported that C-33A cells possess mutations in exons 6 and 7 of the *p53* gene [35]. Although HeLa cells do not exhibit mutations in the *p53* gene, they continuously express the E6 protein from human papillomavirus type 18 [36]. HeLa, Jurkat and LCL-EBV cells showed similar cellular viability after arsenic treatment (Fig. 1B). LCL-EBV is a human lymphocytes cell line obtained from healthy donors and transformed by Epstein-Barr virus and presents a normal function of *p53* protein [37]. Jurkat is a human acute T-lymphoblastic leukemia cell line containing heterozygous *p53* mutations at four different codons: 196, 256, 259 and 260 [38], and where expression of *p53* protein is debated [39,40]. The basal expression of *p53* protein in different cell lines was determined by immunoblot analysis. Although similar levels were found in HeLa, Jurkat and LCL-EBV cells, nevertheless a stronger signal was observed in C-33A cells (Fig. 2). The stabilization of *p53* protein varies and is dependent on the cell line. A well-established characteristic of wild-type *p53* is its remarkably short half-life, whereas mutants of *p53* are generally stable [41]. C-33A cells containing a mutated *p53* gene exhibited a basal protein level higher than the other cell lines used.

To evaluate the dose-related effects of arsenic on *p53* expression, cultured cells in the presence of increasing concentrations of sodium arsenite were analyzed by Western blot. Exposure of HeLa cells to 1, 10, 25 or 50 μ M of arsenic for 24 h resulted in an increased level of *p53* protein showing a dose-re-

sponse behavior. Maximal induction of p53 was observed at 25 μM arsenite; the intensity of the signal decreased in cells treated with 50 μM . Changes in p53 protein expression were not observed in C-33A cells treated with arsenic (Fig. 3A,B); however, a decreased signal was observed at 25 and 50 μM , possibly suggesting cell death at those doses. This is supported by viability data. Immunoblot signals from LCL-EBV cells were similar to HeLa cells. In Jurkat cells, a major induction in the level of p53 protein with 1 μM arsenic for 24 h was observed (Fig. 3C,D), the immunoblot signal was decreased with higher concentrations of arsenite. Signals were quantified with an image analyzer and Collage™ Version 2.0 Software, a 2.17-fold en-

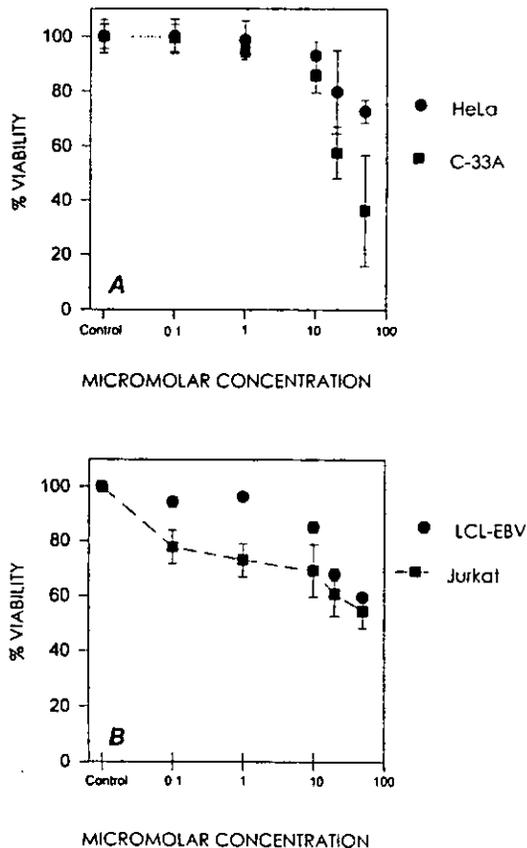


Fig. 1. A: cytotoxicity of sodium arsenite in HeLa and C-33A cells. B: Jurkat and LCL-EBV cells. The cells were cultured in the presence of sodium arsenite at the indicated concentrations during 24 h. Cellular viability was determined by Trypan blue exclusion. The values shown represent the mean of 5 separate experiments.

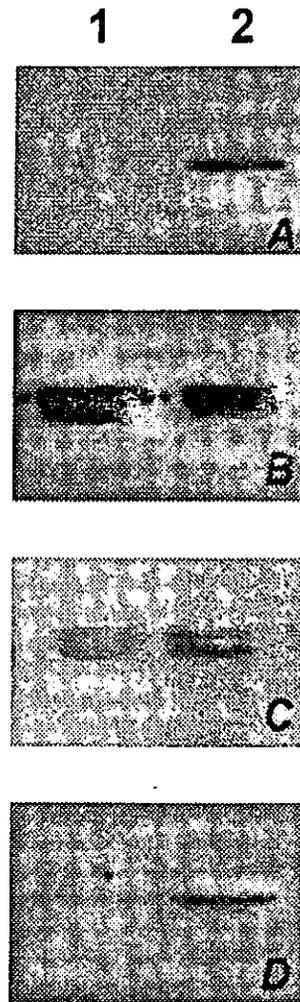


Fig. 2. Immunoblot analysis showing basal levels of p53 protein expression. A: HeLa cells. B: C-33A cells. C: Jurkat cells. D: LCL-EBV cells. Control, lane 1; 10 μM sodium arsenite, lane 2.

hancement in the intensity of the band relative to controls was observed in HeLa cells with 25 μM arsenite, 4.09-fold in LCL-EBV with 25 μM arsenite and 0.39-fold in Jurkat with 1 μM arsenite. These data suggest that p53 induction by arsenic is greater if the cell line possesses a normal status of the gene.

In order to understand the role of p53 on cell viability after arsenite treatment, we transfected human lymphocytes and Jurkat cells with wild-type and mutated p53 genes. Jurkat cells transfected with wild-type p53 gene had increased viability after

arsenic treatment with respect to the non-transfected cells this effect was not observed in the normal lymphocytes. Meanwhile, the viability in both types of cells electroporated with a mutant p53 (pcDNA-273) after exposure to arsenite was statistically significantly lower than both p53 wild-type and non-transfected cells (Figs. 4 and 5). Transfection of human lymphocytes and Jurkat cells with the mutant p53 increases the sensitivity to arsenic cytotoxic effects.

These data indicate that sodium arsenite induces an increase in p53 protein levels which might be activated in response to DNA damage, replicative defects or might be due to the inhibition of DNA ligase activity. It should be pointed out that DNA ligase inhibition by arsenic has been shown in CHO cells [10], which are less sensitive to arsenic effects than human cells with doses in the range of 6–10 μM . These concentrations are 100% higher than

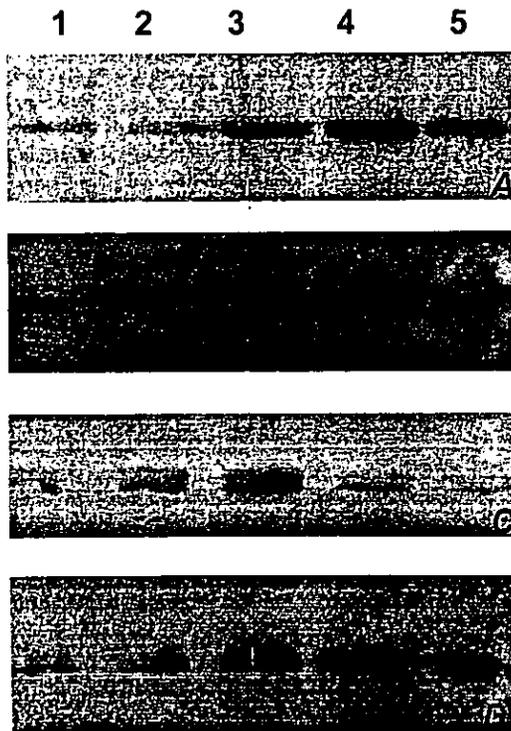


Fig. 3. Dose-response expression of p53 protein in arsenic-treated cells. After cell culture in the presence of sodium arsenite at 0, 1, 10, 25 and 50 μM (lanes 1–5, respectively), p53 protein expression was analyzed by Western blot. A: HeLa cells. B: C-33A cells. C: Jurkat cells. D: LCL-EBV cells.

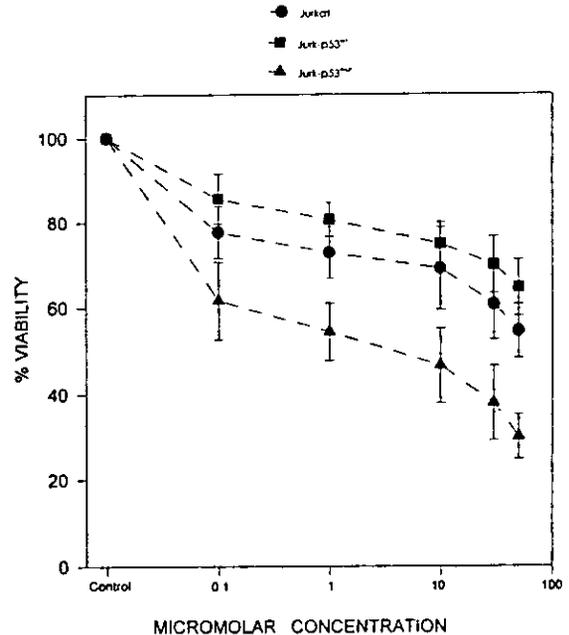


Fig. 4. Viability of Jurkat cells transfected with wild-type and mutant p53 genes. Cells were electroporated as described in Section 2 (Materials and methods) and cultured in the presence of sodium arsenite at the indicated concentrations during 24 h. Cellular viability was determined by Trypan blue exclusion. The values shown represent the mean of 5 separate experiments.

those at which human cells are sensitive. Another possible explanation is that p53 is also activated by disruption of mitotic spindle during mitosis [28], since arsenic inhibits polymerization and depolymerization of microtubules [17].

Furthermore, 10 μM arsenic seems to be a key dose for HeLa and LCL-EBV cells and 1 μM for Jurkat cells; since with these doses, we observed induction in the level of p53 protein. Perhaps 1 and 10 μM constitute a threshold concentration that induces p53 expression and subsequent induction of repair systems or lack of microtubule polymerization [17].

It is interesting to note that data obtained with lymphocytes treated in vitro with 10^{-9} M arsenic had shown an increased mitotic index, and that lymphocytes from individuals chronically exposed to arsenic in their drinking water (approximately 0.4 mg/l) showed an increase in total number of lymphocytes, and in their mitotic index, while a decrease in the cell proliferation kinetics compared to controls

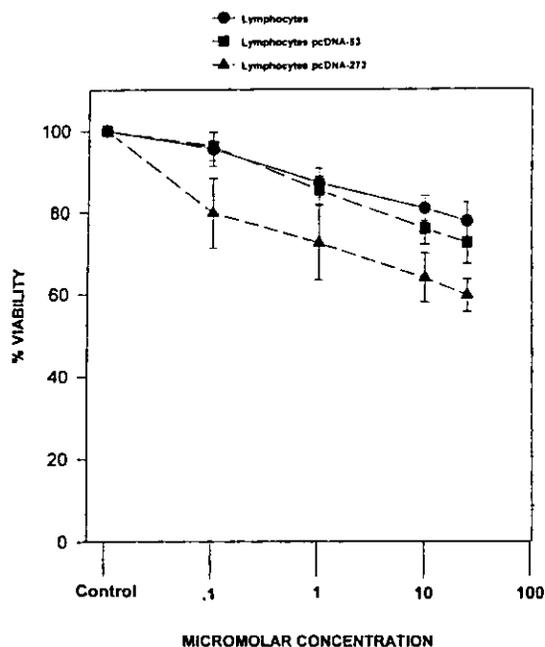


Fig. 5. Viability of human lymphocytes transfected with wild-type and mutant *p53* genes. Lymphocytes were electroporated as described in Section 2 (Materials and methods) and cultured in the presence of sodium arsenite at the indicated concentrations during 24 h. Cellular viability was determined by Trypan blue exclusion. The values shown represent the mean of 5 separate experiments.

at 72 h of culture was observed [20]. This might indicate that arsenic is modulating the activation or inactivation of *p53* or other oncogenes that control cell proliferation. Further studies on the modulation of oncogene activity by low xenobiotic concentration should be encouraged.

The effect of sodium arsenite on *p53* protein levels may be relevant to the development of cancer, since its induction may reflect the presence of alterations in the cell proliferation 'machinery'. Since the expression of *p53* gene and other genes such as *ras* and *myc* is critical to cell cycle progression, this effect may account for the disturbances in proliferative control induced by arsenic.

Acknowledgements

Our appreciation goes to Dr. Marc Mass for the critical review of the manuscript and for his input. We acknowledge Dr. Carl Miller for his generous

gift of *p53* expression plasmids and Dr. Clara Gorodezky for providing the LCL-EBV cells. This work was supported in part by PADEP and PAPIIT UNAM grants and GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit. The technical assistance of Carla Santana and Rocío Hernández is gratefully acknowledged. A.M.S. was the recipient of a fellowship from DGAPA-UNAM.

References

- [1] IARC (International Agency for Research), Some metals and metallic compounds, in: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 23, IARC, Lyon, 1980 pp. 39–141.
- [2] IARC (International Agency for Research), Overall evaluations of carcinogenicity, in: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Suppl. 7, IARC, Lyon, 1987, pp. 100–106.
- [3] P. Mushak, A.F. Crocetti, Risk and revision in arsenic cancer risk assessment, *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 684–689.
- [4] D. Germolec, J. Spalding, G. Boorman, J.L. Wilmer, T. Yoshida, P.P. Simeonova, A. Bruccoleri, F. Kayama, K. Gaido, R. Tennant, F. Bureson, W. Dong, R.W. Lang, M.I. Luster, Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors, *Mutation Res.* 386 (1997) 209–218.
- [5] S. Yamamoto, Y. Konishi, T. Matsuda, T. Murai, M.A. Shibata, I. Matsui-Yuasa, S. Otani, K. Kuroda, G. Endo, S. Fukushima, Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsenic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens, *Cancer Res.* 55 (1995) 273–1276.
- [6] T.G. Rossman, Enhancement of UV-mutagenesis by low concentrations of arsenite in *E. coli*, *Mutation Res.* 91 (1981) 207–211.
- [7] T.C. Lee, R.Y. Haung, K.Y. Jan, Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Res.* 148 (1985) 83–89.
- [8] T.C. Lee, K.C. Lee, Y.J. Tzeng, R.Y. Huang, K.Y. Jan, Sodium arsenite potentiates the clastogenicity and mutagenicity of DNA crosslinking agents, *Environ. Mutagen.* 8 (1986) 119–128.
- [9] J.H. Li, T.G. Rossman, Mechanism of comutagenesis of sodium arsenite with *N*-methyl-*N*-nitrosourea, *Biol. Trace Elem.* 21 (1989) 373–381.
- [10] J.H. Li, T.G. Rossman, Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis, *Mol. Toxicol.* 2 (1989) 1–9.
- [11] D. Jacobson-Kram, D. Montalbano, The reproductive effects assessment group's report on the mutagenicity of inorganic arsenic, *Environ. Mutagen.* 7 (1985) 778–804.

- [12] T.-C. Lee, N. Tanaka, P.W. Lamb, T.M. Gilmer, J.C. Barrett, Induction of gene amplification by arsenic, *Science* 241 (1988) 79-81.
- [13] J.W. Yager, J.K. Wiencke, Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase by arsenite, *Mutation Res.* 386 (1997) 345-351.
- [14] M.E. Gonshebbat, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, G. García-Vargas, L. Del Razo, M.E. Cebrián, P. Ostrosky-Wegman, Genotoxic and 'nongenotoxic' effects in arsenic human exposure. International Semin. Proceeding, Arsenic in the Environment and its Incidence on Health, Santiago Chile, 1992, pp. 15-19.
- [15] L. Vega, M.E. Gonshebbat, P. Ostrosky-Wegman, Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected, *Mutation Res.* 334 (1995) 365-373.
- [16] M.E. Gonshebbat, P. Ostrosky-Wegman, L. Vega, A.M. Salazar, R. Montero, P. Guzmán, J. Blas, L.M. Del Razo, G. García-Vargas, A. Albores, M.E. Cebrián, M. Kelsh, Cytogenetic effects in human exposure to arsenic, *Mutation Res.* 386 (1997) 219-228.
- [17] P. Ramírez, D.A. Eastmond, J.P. Lacleite, P. Ostrosky-Wegman, Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide, *Mutation Res.* 386 (1997) 291-298.
- [18] P. Ostrosky-Wegman, M.E. Gonshebbat, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas, G. García-Vargas, L.M. Del Razo, M. Cebrián, Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico, *Mutation Res.* 250 (1991) 477-482.
- [19] M.E. Gonshebbat, L. Vega, L.A. Herrera, R. Montero, E. Rojas, M.E. Cebrián, P. Ostrosky-Wegman, Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation, *Mutation Res.* 283 (1992) 91-95.
- [20] M.E. Gonshebbat, L. Vega, R. Montero, G. García-Vargas, L.M. Del Razo, A. Albores, M.E. Cebrián, P. Ostrosky-Wegman, Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water, *Mutation Res.* 313 (1994) 293-299.
- [21] M. Cavigelli, W.W. Li, A. Lin, B. Su, K. Yoshioka, M. Karin, The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase, *EMBO J.* 15 (1996) 6269-6279.
- [22] C.C. Harris, M. Hollstein, Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene, *New Engl. J. Med.* 329 (1993) 1318-1327.
- [23] A.J. Levine, The tumor suppressor genes, *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 623-651.
- [24] R.A. Weinberg, Tumor suppressor genes, *Science* 245 (1991) 1138-1146.
- [25] C.C. Harris, The p53 tumor suppressor gene: at crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and cancer risk assessment, *Science* 262 (1993) 1980-1981.
- [26] M.S. Greenblatt, W.P. Bennett, M. Hollstein, C.C. Harris, Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis, *Cancer Res.* 53 (1994) 5377-5381.
- [27] C.H. Blattener, A. Knebel, A. Radler-Pohl, C.H. Sachsenmaier, P. Herrlich, J. Rahmsdorf, DNA damaging agents and growth factors induce changes in the program of expressed gene products through common routes, *Environ. Mol. Mutagen.* 24 (1994) 3-10.
- [28] S.M. Cross, C.A. Sanchez, C.A. Morgan, M.K. Schimke, S. Ramel, R.L. Idzerda, W.H. Raskind, B.J. Reid, A p53-dependent mouse spindle checkpoint, *Science* 267 (1995) 1353-1356.
- [29] R. Haffner, M. Oren, Biochemical properties and biological effects of p53, *Curr. Opin. Gen. Dev.* 5 (1995) 84-90.
- [30] M.J. Mass, L. Wang, Arsenic alters cytosine methylation patterns of the tumor suppressor gene p53 promoter in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis, *Mutation Res.* 386 (1997) 263-277.
- [31] G.L. Andreason, G.A. Evans, Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation, *BioTech.* 6 (1988) 650-670.
- [32] F. Toneguzzo, A.C. Hayday, A. Keating, Electric field-mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells, *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986) 703-706.
- [33] M. Guido, R. Zamorano, E. Garrido-Guerrero, P. Gariglio, A. García-Carrancá, Early promoters of genital and cutaneous human papilloma viruses are differentially regulated by the bovine papilloma virus type 1E2 gene product, *J. Gen. Virol.* 73 (1992) 1395-1400.
- [34] J.E. Dinchuk, K.A. Kelley, G.N. Callahan, Flow cytometric analysis of transport activity in lymphocytes electroporated with a fluorescent organic anion dye, *J. Immunol. Methods* 155 (1992) 257-265.
- [35] M. Scheffner, K. Münger, J.C. Byrne, P.M. Howley, The state of p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 5523-5527.
- [36] A. Schneider-Gädick, E. Schwarz, Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes, *EMBO J.* 5 (1986) 2285-2292.
- [37] M.J. Allday, A. Sinclair, G. Parker, D.H. Crawford, P.J. Farrell, Epstein-Barr virus efficiently immortalizes human B cells without neutralizing the function of p53, *EMBO J.* 14 (1995) 1382-1391.
- [38] J. Cheng, M. Haas, Frequent mutations in p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines, *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 5502-5509.
- [39] S. Hassapoglidou, E.P. Diamandis, D.J.A. Sutherland, Quantification of p53 protein in tumor cell lines, breast tissue extracts and serum with time-resolved immunofluorometry, *Oncogene* 8 (1993) 1501-1509.
- [40] K. Yamato, M. Yamamoto, Y. Hirano, N. Tsuchida, A human temperature-sensitive p53 mutant p53^{Val-118}: Modulation of the cell cycle, viability and expression of p53-responsive genes, *Oncogene* 11 (1995) 1-6.
- [41] J. Milner, The role of p53 in normal control of cell proliferation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 3 (1991) 282-286.