

00524
17



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**EVALUACION DE LA PROTEINA P53 COMO
BIOMARCADOR**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ANGELICA BIZARRO ARTEAGA

MEXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES 2003
FACULTAD DE QUIMICA

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

PROFESORES

Presidente	Alicia Cervantes Peredo
Vocal	Carlos Pérez Muñoz
Secretario	Ana María Salazar Martínez
1er suplente	Raquel Ortega Muñoz
2do suplente	María de Lourdes Mayet Cruz

Este trabajo fue realizado en Departamento Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Asesor del tema Dra. Ana María Salazar Martínez.



Sustentante Angélica Bizarro Arteaga



AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al jurado por las valiosas aportaciones a este trabajo

Dra. Alicia Cervantes Peredo

Dr. Carlos Pérez Muñoz

Dra. Raquel Ortega Muñoz

Dra. María de Lourdes Mayet Cruz

A la Dra. Patricia Ostrosky por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, brindarme su apoyo y sugerencias a este trabajo.

A la Dra. Ana María Salazar Martínez por ayudarme en todo momento, confiar en mí y por toda tu paciencia ya que sin tu ayuda no hubiera podido realizar este trabajo.

Un agradecimiento especial a los doctores Emma Calderón Aranda y Mariano E. Cebrián, de la Sección Externa de Toxicología, del Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por su valiosa participación en este trabajo.

Agradezco de manera especial a la Q.F.B. Monserrat Sordo por su apoyo en las técnicas experimentales.

A la Dra. Ana María Mejía Domínguez del Departamento de Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" por su asesoría en la selección de la población de los donadores sanos.

**Este trabajo estuvo apoyado por donativos del PAPIIT-DGAPA IN211599 y del CONACYT J31085-M.
El sustentante fue becario del CONACYT.**

C

Esta tesis esta dedicada a:

A mi esposo

Narciso

Gracias por comprenderme en todo momento, por el amor que me has
dado y siempre he contado contigo.
Por ser la brújula de mi camino y ser mi todo.
Te amo

A mis hijos

Gabriel, Héctor e Irving

Con todo mi amor, ya que ustedes son los que iluminan mi camino, y
han llenado mi vida de esperanza.
Espero que siempre luchen por lograr sus metas.

D

Agradecimientos

A Dios:

Por su amor y por darme todo lo que tengo.

A mis Papas:

Alicia Arteaga y Jesús Bizarro por darme la vida y quererme incondicionalmente. Porque todo lo que soy se los debo a ustedes. Los amo.

A mis hermanos:

Arturo, Tere, Coco, Blanca, Adri por darme apoyo y ánimos para seguir siempre adelante.

Coco: gracias por cuidarme y darme tu tiempo de chica; Blanca: gracias por ayudarme en los momentos difíciles y saber que contaba contigo.

A mis suegros:

Teresa Aldama y Carlos Martínez por todo su apoyo en todo momento, cuidando de mis niños. Los quiero mucho.

A mis amigas:

Bárbara Ascención, Blanca Olivera siempre dispuestas a ayudarme y apoyarme en todo. Gracias por su amistad.

A todos los compañeros de Laboratorio:

Dorys, Elias, Miriam, Nathyelli, Hortensia, Yair, Andrés, Andrea, Fatima, Ani, Monse, Martha por brindarme su amistad y hacer las horas de trabajo mas amenas.

A mis compañeros de la carrera:

Almita, Lylían, Pepe, Nar

A Monse

Por todo tu cariño, apoyo y consejos, ya que eres un ejemplo a seguir. Eres la persona más maravillosa que conozco. Te quiero muchísimo.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
BIOMARCADORES	
Indicadores Biológicos o Biomarcadores	2
Marcadores de exposición	3
Marcadores de efecto	5
Marcadores de susceptibilidad	6
EL CICLO CELULAR	8
Regulación y puntos de restricción del ciclo celular	8
Proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular	9
p53, UN REGULADOR DE LA MAQUINARIA CELULAR	12
Estructura del gen <i>TP53</i> y la proteína p53	12
Activación de p53 por el daño	14
Genes activados por p53	15
Apoptosis inducida por la proteína p53	15
Las mutaciones en el gen <i>TP53</i> y la exposición a carcinógenos	19
ARSÉNICO, UN CARCINÓGENO HUMANO	21
Fisicoquímica del arsénico	21
Distribución en el ambiente y vías de exposición al arsénico	22
Metabolismo del arsénico	24
Efectos del arsénico	24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	44
REFERENCIAS	45

f

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Relación entre biomarcadores de susceptibilidad exposición y efecto.	3
Figura 2. Diagrama del ciclo celular.	11
Figura 3. Dominios funcionales de la proteína p53.	13
Figura 4. Cascada de activación y señalización de p53.	18
Figura 5. Diagrama de vías de exposición al arsénico.	23
Figura 6. Diferentes patrones de expresión de la proteína p53 en linfocitos humanos	33
Figura 7. Porcentajes de los diferentes modelos de expresión de la proteína p53 en linfocitos de individuos sanos	34
Figura 8. Porcentajes de los diferentes modelos de expresión de la proteína p53 en linfocitos de individuos con hidroarsenicismo	36
Figura 9. Detección de la proteína p53 en linfocitos humanos de donadores de la región con hidroarsenicismo	37
Figura 10. Análisis de la expresión de la proteína p53 en linfocitos de Individuos de la región con hidroarsenicismo	38
Figura 11. Expresión de la proteína p53 en linfocitos circulantes (Go) en individuos que viven en la región endémica con hidroarsenicismo	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplo de biomarcadores de dosis interna y de dosis biológicamente efectiva	4
Tabla 2. Ejemplo de biomarcadores de efecto biológico temprano	6
Tabla 3. Ejemplo de biomarcadores de susceptibilidad	7
Tabla 4. Análisis del porcentaje de patrones de una población de individuos sanos	34
Tabla 5. Características de los individuos expuestos al arsénico	35
Tabla 6. Análisis del porcentaje de patrones de una población de individuos de la región endémica con hidroarsenicismo	36

Terminología

AC:	aberraciones cromosómicas
AcD:	actinomicina D
aductos:	especies químicas electrofílicas unidas de manera covalente, ya sea a bases del DNA o a proteínas
Alelo:	una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus determinado en un cromosoma.
As:	arsénico
Cdk:	cinasa dependiente de ciclina
CPC:	cinética de proliferación celular
DNA:	ácido desoxirribonucleico
Dominio de una proteína:	parte de la secuencia de aminoácidos de una proteína con una función particular.
Factor de transcripción nuclear:	proteína encargada de regular la transcripción de diversos genes.
Heterotetrámero:	complejo proteico constituido por cuatro subunidades diferentes (codificadas por genes diferentes).
HMDM2:	human murine doble diminute 2
Homotetrámero:	complejo proteico constituido por cuatro subunidades idénticas.
ICH:	intercambio de cromátidas hermanas
IL-2:	interleucina 2
MN:	micronúcleos
Mutación:	cualquier cambio en la secuencia del DNA genómico.
ng:	nanogramo
p53:	proteína p53.
pb:	par de bases
PHA:	fitohemaglutinina
ppb:	partes por billón

Proteosoma: complejo multiproteico no lisosomal encargado de degradar proteínas que han incorporado previamente moléculas de ubiquitina.

rpm: revoluciones por minuto

SV40: (simian virus 40): virus simiano 40.

TP53: proteína tumoral p53.

Transcripción: proceso por el que se sintetizan las moléculas de RNA sobre un molde de DNA.

UV: ultravioleta

µg: microgramo

µl: microlitro

µM: micromolar

RESUMEN

Existen evidencias de que diversos xenobióticos producen daño al DNA y modificaciones en la expresión de genes reguladores del ciclo celular, observándose una variación en la respuesta de los individuos ante la exposición a estos agentes tóxicos. Se ha planteado que en la determinación de la sensibilidad de los individuos, pueden estar interactuando genes de reparación del DNA, así como algunos oncogenes y genes supresores de tumor, siendo el gen supresor tumoral p53 uno de los genes con potencial de ser utilizado como biomarcador.

Dado que los linfocitos humanos son las células más empleadas en el monitoreo de individuos expuestos a sustancias tóxicas, este trabajo ha sido enfocado a buscar indicadores tempranos de exposición y susceptibilidad a agentes tóxicos. Para llevar a cabo este estudio se evaluó la expresión de la proteína p53 en los linfocitos de individuos que viven en la zona endémica con hidroarsenicismo (presencia de arsénico en el agua) y se comparó con una población de individuos sanos residentes de la ciudad de México.

De 19 individuos de la zona endémica para arsénico, 10 muestras sobreexpresaron p53 en los linfocitos circulantes; 12 de estos individuos presentaban cáncer de piel, tipo no melanoma, de los cuales 9 expresaron p53, mientras que sólo en uno de los 7 pacientes que no presentaban cáncer de piel se detectó p53. El análisis de p53 en linfocitos circulantes en un grupo de 44 individuos sanos indicó que sólo un individuo expresó la proteína p53. Estos resultados muestran una relación entre la presencia de la proteína p53 en los linfocitos circulantes y el cáncer de piel de tipo no melanoma, en los individuos que residen en la zona con hidroarsenicismo. Asimismo, se encontró que la exposición crónica a arsénico altera el patrón de expresión de p53.

Por lo anterior se propone que la proteína p53 podría utilizarse como un biomarcador de susceptibilidad o de efectos adversos a la salud, ante una exposición tóxica.

INTRODUCCION

INDICADORES BIOLÓGICOS O BIOMARCADORES

CONCEPTOS Y DEFINICIONES

Se ha descrito que al ocurrir una exposición tóxica (este indicio puede encontrarse a nivel molecular o celular), o de efectos adversos en la salud, o bien un indicador de susceptibilidad, por lo tanto, representan cambios en el organismo o en la célula que pueden ser medidos en los sistemas biológicos (Wogan et al, 1992; Mortimer et al, 1995). Es útil definir tres categorías de marcadores biológicos: de exposición a agentes químicos o físicos, de efectos de la exposición y de susceptibilidad (Figura 1).

Un **marcador biológico de exposición** señala la presencia de una sustancia exógena o sus metabolitos, o el producto de una interacción entre un xenobiótico y alguna molécula blanco o célula, que puede ser medida en los fluidos o tejidos en el organismo (Mortimer et al, 1995).

Un **marcador biológico de efecto** es un indicador de una alteración bioquímica, fisiológica o genética, resultado de la exposición a un xenobiótico y que dependiendo de su magnitud es reconocida como un daño o como una enfermedad potencial o ya establecida (Mortimer et al, 1995). Se plantea que si se logra identificar la alteración cuando su magnitud es aún menor, estos marcadores sirven como señales de advertencia e indicadores tempranos de enfermedad.

Un **marcador biológico de susceptibilidad** es un indicador de una limitación adquirida o inherente de un organismo para responder a la exposición de una sustancia tóxica (Mortimer et al, 1995). Se propone a los biomarcadores de susceptibilidad como indicadores del incremento (o decremento) del riesgo en cualquier etapa de la progresión hacia la enfermedad. Son modificados por factores genéticos, inmunológicos

o por otras características fisiopatológicas del huésped que reflejan una susceptibilidad para la ocurrencia.

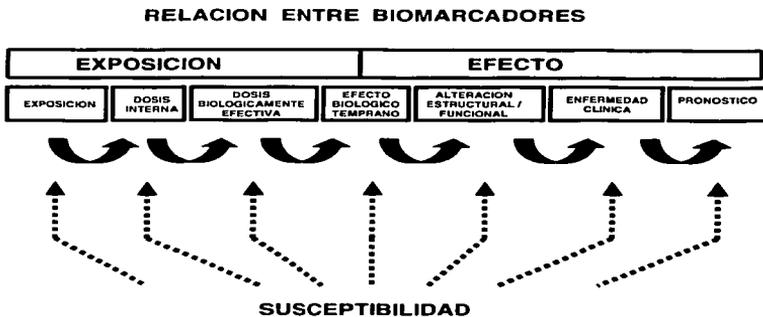


Figura 1. Relación entre biomarcadores de susceptibilidad, exposición y efecto.
Adaptada de Mortimer (1995).

MARCADORES DE EXPOSICIÓN.

Se basan en mediciones farmacocinéticas, por lo que están influenciados por factores que afectan la absorción y distribución de un agente químico y sus metabolitos. Son marcadores biológicos de exposición, la unión específica a moléculas biológicas como en el caso de los aductos de DNA, los aductos de hemoglobina, y otras proteínas alteradas, que directamente señalan la presencia de la sustancia xenobiótica y su interacción con una molécula crítica (Perera et al, 1992; Wogan et al, 1992).

En esta clase de marcadores, se considera que la cantidad de material xenobiótico al que se somete un organismo, constituye un indicador o un marcador del nivel de exposición externa, mientras que la cantidad absorbida del xenobiótico en el organismo es un marcador de dosis interna y la cantidad que interactúa con el tejido blanco, es marcador de dosis biológicamente efectiva (Mortimer et al, 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La absorción es una fase importante para estimar la interacción de una sustancia tóxica ambiental con el organismo, por lo cual se consideran algunos factores que modifican la absorción de un agente tóxico, tales como la concentración, la duración de la exposición y la naturaleza fisicoquímica del tóxico; otros factores que afectan significativamente la absorción o distribución del agente químico y sus metabolitos son las diferencias entre especies, las variaciones individuales en cuanto a sexo, edad y el estado de salud; además la dieta o el estado hormonal modifican la dosis absorbida, ya que alteran la motilidad intestinal, lo cual influye en la absorción (Mortimer et al, 1995) (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplo de biomarcadores de dosis interna y de dosis biológicamente efectiva

BIOMARCADOR	EJEMPLOS
<p align="center">MARCADOR DE DOSIS INTERNA</p>	<p>Medición directa de compuestos tóxicos o sus metabolitos en células, tejidos ó fluidos biológicos (por ejemplo, sangre, orina, heces, leche materna, líquido amniótico, sudor, pelo, uñas, saliva)</p> <p>Aire exhalado: agentes químicos orgánicos volátiles.</p> <p>Sangre: estireno, plomo, cadmio, arsénico.</p> <p>Metabolitos en orina: aflatoxina, benceno, arsénico.</p> <p>Mutágenos en orina: drogas quimioterapéuticas</p> <p>Muestras de pelo: arsénico</p> <p>Carboxihemoglobina: monóxido de carbono</p> <p>Metahemoglobina: nitratos orgánicos</p>
<p align="center">MARCADOR DE DOSIS BIOLÓGICA EFECTIVA</p>	<p>Aductos de DNA</p> <p>DNA celular: benzo[a]pireno en trabajadores mineros; Cisplatino en pacientes con quimioterapia</p> <p>Orina: aflatoxina-N-guanina de individuos que consumen aflatoxina B1; bases oxidadas por radiación y otras formas de estrés oxidante</p> <p>Aductos de proteínas</p> <p>Hemoglobina: óxido de etileno, aminas aromáticas, nitrosaminas específicas de tabaco, cisplatino</p> <p>Albúmina: aflatoxina B1</p>

MARCADORES DE EFECTO.

Se considera que un marcador de efecto biológico temprano, representa un evento que puede correlacionarse con el daño a la salud y tiene una posibilidad predictiva; mientras que un marcador de alteración estructural y/o funcional representa cambios biológicos más estrechamente relacionados con el desarrollo de la enfermedad. También la enfermedad clínica y el significado del pronóstico se representan por los biomarcadores (Mortimer et al, 1995).

La interacción directa del agente tóxico o su metabolito con la célula blanco es capaz de ocasionar daño biológico antes de que aparezca la enfermedad, estos cambios o alteraciones biológicas se identifican a través de los marcadores de efectos tempranos, ya sea a nivel genético, bioquímico o fisiológico (Mortimer et al, 1995).

Los marcadores de efectos tempranos que caracterizan el daño genético, tienen relevancia particular dentro de la epidemiología, ya que permiten establecer el riesgo potencial de una exposición. Incluyen, aberraciones cromosómicas (AC), intercambios de cromátidas hermanas (ICH), micronúcleos (MN), mutaciones genéticas a nivel de los loci *HPRT*, *HLA*, glicoforina A, Hemoglobina A, así como la medición de la reparación no programada de DNA, fragmentos polimórficos de restricción o RFLPs (del las siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphisms) una de las formas más comunes es el empleo de enzimas de restricción, que reconocen y cortan en sitios específicos al DNA, produciendo fragmentos de longitud variable (Carrano et al, 1988; Wogan et al, 1992; Ashby et al, 1998) (Tabla 2).

Se han identificado algunos cambios genéticos específicos como eventos moleculares críticos en la iniciación y desarrollo de muchos tipos de cáncer (Muir et al, 1990; Wogan et al, 1992; Eccles et al, 1995); los biomarcadores más importantes en estos eventos son la activación de oncogenes, especialmente de la familia *ras*, y la inactivación de genes supresores de tumores (por ejemplo, *TP53*) por mutaciones puntuales y/o deleciones cromosómicas (Semenza et al, 1997; Wogan GN, et al, 2000). Sin embargo, se plantea que este tipo de marcadores de daño genético pueden ser útiles para detectar las respuestas biológicas tempranas durante las etapas iniciales de los procesos de carcinogénesis (Tabla 2).

La cinética de proliferación celular (CPC) en cultivos de linfocitos se ha propuesto como un marcador de citotoxicidad, que puede emplearse como un indicador temprano

de daño celular y cuya sensibilidad ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro* en la exposición al As (Ostrosky-Wegman et al, 1991; Gensebatt et al, 1992, Ostrosky-Wegman y Gensebatt 1996) (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplo de biomarcadores de efecto biológico temprano.

BIOMARCADOR	EJEMPLOS
<p style="text-align: center;">MARCADOR DE EFECTO BIOLÓGICO TEMPRANO</p>	<p>Mutaciones que se observan <i>in vivo</i> después de exposiciones a compuestos genotóxicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> Locus <i>HPRT</i> en linfocitos Locus <i>HLA-A</i> en linfocitos Locus Glicoforina en eritrocitos <p>Mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores en cánceres con sospecha de una etiología ambiental.</p> <ul style="list-style-type: none"> Mutaciones en <i>ras</i> Mutaciones en p53 <p>Citogenética tradicional.</p> <ul style="list-style-type: none"> Aberraciones cromosómicas Intercambio de cromátidas hermanas Micronúcleos

MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD

Algunos marcadores biológicos pueden indicar diferencias individuales o poblacionales, por ejemplo, las variaciones en los niveles de inmunoglobulinas, en la absorción o en el metabolismo, ya sea determinada genéticamente o inducida por factores ambientales. La susceptibilidad individual puede ser modificada por el estado de nutrición del individuo, el papel del sitio blanco en la función del organismo y la condición del tejido blanco (por ejemplo la presencia de enfermedad actual o anterior) (Doull et al, 1980).

En la última década se ha incrementado la atención hacia las diferencias individuales en la capacidad de metabolizar xenobióticos como un factor clave en la predisposición o susceptibilidad del riesgo de cáncer. Los marcadores que tienen interés particular en esta área son los polimorfismos metabólicos de origen genético y ambiental (Harris et al, 1989) como son la medición de la actividad de varias enzimas

de la familia de los citocromos p450 y de enzimas como glutatión-transferasas, acetil-transferasas, sulfo-transferasas, glucoronil-transferasas y peroxidasas (Wogan et al, 1992). La capacidad para metabolizar debrisoquinona (locus *CYP2D6*) y la activación transcripcional por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (locus *CYP1A1*) son genes propuestos como indicadores de susceptibilidad a desarrollar cáncer (Hirvonen et al, 1993).

En la última década se ha reportado la existencia de genes que confieren sensibilidad a agentes físicos como la radiación (Artuso et al, 1995; Yang y Lippman, 1999), sustentada en los estudios hechos a pacientes que tienen mutaciones en ellos y que por lo tanto tienen un mayor riesgo de padecer cáncer. Entre estos genes los estudiados son *BRCA1* y *BRCA2*, *ATM* y *P53*, que están implicados en la reparación del daño al DNA (Artuso et al, 1995; Khanna et al, 1998; Yang y Lippman, 1999) (Tabla 3).

Tabla 3. Ejemplo de biomarcadores de susceptibilidad.

BIOMARCADOR DE SUSCEPTIBILIDAD	EJEMPLOS
<p>Factores que modifican:</p> <ul style="list-style-type: none"> Absorción Metabolismo Desintoxicación 	<p>Citocromos P450 Glutation transferasa Acetil-transferasa Sulfotransferasa Glucoroniltransferasa Peroxidasa</p>
<p>Factores que intervienen en la reparación y regulación</p>	<p>Genes de reparación y genes supresores de tumores (<i>BRCA 1 y 2</i>, <i>ATM</i> y <i>TP53</i>)</p>

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

EL CICLO CELULAR

El ciclo celular en mamíferos está dividido en cuatro fases: la **fase M** en la cual se llevan a cabo dos de los procesos más espectaculares de la célula, la mitosis o división del núcleo y la citocinesis es decir la escisión de la célula en dos. El período comprendido entre la fase M y la siguiente se denomina **interfase** durante la cual la célula no se divide, sin embargo, su actividad intracelular es constante, ésta comprende las otras tres fases del ciclo celular: la **fase G₁** (de gap = intervalo) es el tiempo que transcurre entre la terminación de la fase M y el inicio de la siguiente, al final de esta fase existe un punto llamado **punto R** (restricción) donde la célula decide si debe o no cerrar el ciclo e iniciar la **fase S** en la cual ocurre la síntesis (de ahí su nombre) del material nuclear o DNA, después continua un nuevo intervalo, la **fase G₂** que es el período entre el final de la fase S y el inicio de la fase M. Existe además un estado de "latencia" o **G₀** en el que las células no se encuentran en proliferación y el metabolismo se encuentra disminuido (Cerutti y Simanis, 2000) (Figura 2).

REGULACIÓN Y PUNTOS DE RESTRICCIÓN DEL CICLO CELULAR.

El control del ciclo celular es responsable de revisar que una fase del ciclo haya terminado antes de que la siguiente sea iniciada, este proceso se realiza mediante la detención molecular. Cuando las condiciones no son favorables las células se detienen en un punto crítico llamado **punto de restricción (R)** o de no retorno. Los puntos de monitoreo proporcionan una manera de controlar diversas situaciones en la célula y evitar la actividad prematura que dañaría a la célula si pasara mas allá de dicho punto (Evan y Voudsen 2001).

A finales de los 80's, el investigador Lee Hartwell descubrió la existencia de estos mecanismos de vigilancia en cada división celular a los que llamó "checkpoint" (puntos de revisión). Hartwell, utilizó como modelos de experimentación a oocitos de sapo *Xenopus* y a oocitos de erizos de mar y propuso que estos puntos de control, permiten reconocer errores durante la división celular y proceder a su corrección (Hartwell y Weinert, 1989). Los puntos de monitoreo son regulados por señales procedentes de

otras células, como factores de crecimiento y otras señales extracelulares las cuales pueden estimular o inhibir la proliferación celular.

PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

Proteínas cinasas y fosfatasa. La fosforilación o desfosforilación es una vía muy utilizada por las células para modificar la actividad de una proteína. Las reacciones de fosforilación que controlan el ciclo celular se llevan a cabo por una serie de proteínas cinasas que son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la proteína que se va a modular. Los efectos de la fosforilación se pueden eliminar rápidamente quitando al grupo fosfato (desfosforilación), esta reacción se lleva a cabo por otro grupo de proteínas denominadas fosfatasa. El ciclo celular es regulado a través de la fosforilación de proteínas claves que inician o modulan los procesos del ciclo celular (Bartek y Lukas, 2001).

Proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk). Las proteínas cinasas se encuentran durante todo el ciclo celular y solo se activan en el momento apropiado después del cual se vuelven a desactivar, esto es posible a través de un segundo conjunto de proteínas denominadas ciclinas (proteínas que varían a lo largo de todo el ciclo). Las ciclinas son enzimáticamente activas hasta que se unen a las cinasas, de esta forma ejercen su función de regular el ciclo celular y se les conoce como proteínas cinasas dependientes de ciclinas o Cdk (por las siglas en inglés)(Sielecki et al 2000).

Ciclinas. La regulación de la aparición de las ciclinas está en coordinación con los procesos del ciclo celular, así la síntesis del componente ciclina del MPF (factor promotor de la fase M) se inicia inmediatamente después de la división celular y continúa durante la interfase. La ciclina B se acumula gradualmente y facilita el comienzo de la mitosis, la súbita degradación de la ciclina B durante la mitosis indica la terminación de esta fase. La oscilación entre la aparición y la pronta desaparición se logra por un sistema proteolítico dependiente de la ubiquitina, la cual se une covalentemente a las ciclinas marcándolas para su degradación en el aparato proteosomal (Johnson y Waller, 1999).

Existen muchos tipos de ciclinas y en las células de los mamíferos se han descubierto cerca de 10 tipos. La concentración de cada ciclina tiene su pico en una fase diferente del ciclo celular y se han clasificado en ciclinas de la fase G1, de la fase

S y mitóticas. La **ciclina D** se encuentra al principio de la fase G₁. La **ciclina E** en la transición G₁/S, conforme suben los niveles de ciclinas D y E se unen a las cinasas dependiente de ciclina y estos complejos son activados, así las cinasas activadas quitan grupos fosfato de las moléculas de ATP y los transfieren a la proteína Rb que cuando no esta fosforilada detiene el ciclo celular, pero al fosforilarse libera factores de transcripción que quedan libres para actuar sobre los genes y producir las proteínas requeridas y así poder continuar con el ciclo celular. La **ciclina A** comienza a elevarse durante la fase S y la **ciclina B** durante la transición G₂/M (Morgan et al, 1997; Johnson y Waller, 1999).

Proteínas inhibidoras de Cdk (ICDK). En los puntos de control actúan las proteínas inhibidoras de las Cdk, estas proteínas bloquean el ensamblaje o la actividad de uno o varios complejos ciclina-Cdk. Un punto de control que ha sido estudiado, es el que detiene el ciclo celular en G₁ y con ello se asegurarse de no replicar el DNA dañado. El daño al DNA causa un incremento tanto en la concentración como en la actividad de la proteína p53, que al ser activada estimula la transcripción de un gen que codifica una proteína inhibidora de Cdk llamada p21 (WAF1/CIP1), así aumenta la concentración de la proteína p21 la cual se une a los complejos ciclina-Cdk de la fase S bloqueando su acción (ver capítulo siguiente) (Sieleki et al, 2000; Hardcastle et al, 2002).

Proteínas de genes activadores y supresores.

Existe una clase especial de genes involucrados en la regulación del ciclo celular: genes activadores de la proliferación, los cuales codifican proteínas que normalmente estimulan la división celular y los genes de antiproliferación, los cuales codifican para proteínas que frenan o detienen el ciclo celular (genes supresores).

Una mutación de un gen de proliferación hace que la proteína producida se sobreexpresen dando como resultado una proliferación celular excesiva, entonces el gen mutante se denomina oncogen mientras que el gen en su forma normal se conoce como **proto-oncogen**. Por el contrario, una mutación que inactiva un gen de antiproliferación libera a la célula de los impedimentos normales para la proliferación excesiva, por ella estos genes en su forma normal se les conoce como **genes supresores de tumores** (Bale et al, 2002).

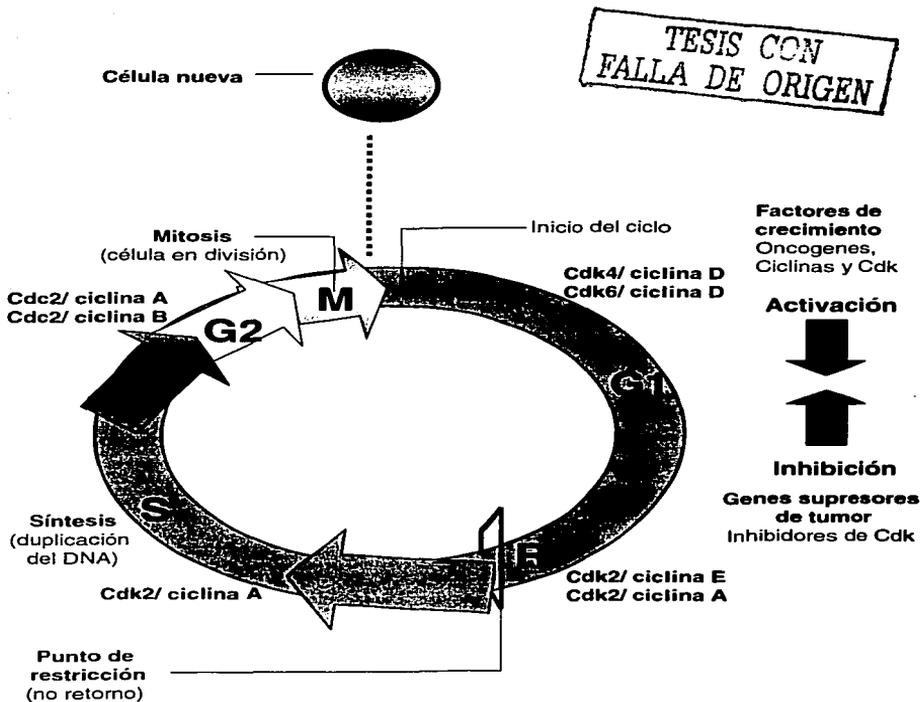


Figura 2 Diagrama del ciclo celular. Se muestran las cuatro fases de ciclo: G₁, S, G₂ y M. La progresión de una fase a otra está regulada por la interacción de los complejos ciclinas-Cdk; las ciclinas D están implicadas en G₁, las ciclinas E en la transición de G₁ a S, las ciclinas A con la fase S y en el paso de G₂ a M, finalmente las ciclinas B están involucradas en la transición de G₂ a M. Se indican los puntos de control del ciclo (Tomado y modificado de Cerutti y Simanis, 2000).

p53, UN REGULADOR DE LA MAQUINARIA CELULAR.

Los puntos de vigilancia en células de mamífero están conformados a diferentes niveles por un gran número de proteínas reguladoras; uno de los elementos más importantes en el control de la regulación del ciclo celular es la proteína supresora de tumores p53.

De hecho, numerosos estudios publicados desde hace más de una década muestran la importancia del producto proteico del gen *TP53* en diversos procesos celulares. Entre ellos se encuentran la detención del ciclo celular en puntos específicos, la activación de genes de reparación del DNA, la inducción de la muerte celular programada (apoptosis), la diferenciación celular, el mantenimiento de la integridad del genoma y la inhibición de la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos) (Levine et al, 1997; Bale et al, 2002).

ESTRUCTURA DEL GEN *TP53* Y LA PROTEINA p53.

En humanos el gen *TP53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17, específicamente en la región p13. El gen comprende cerca de 20 kb de DNA y se compone de 11 exones, de los cuales el primero no participa en la secuencia codificante de la proteína (Oren et al, 1985; Reisman y Loging, 1998). Durante la evolución este gen ha sido conservado, en particular en 5 regiones (dominios del I al V) (Soussi et al, 1990), las cuales son esenciales para las funciones de p53 (Soussi y May, 1996).

El gen *TP53* humano codifica para una proteína de 393 aminoácidos. La proteína se ha dividido funcionalmente y estructuralmente en tres diferentes regiones funcionales (Wang et al, 1994) (Figura 3). En el extremo amino terminal (aminoácidos 1 al 99) está contenido el dominio de activación de la transcripción, el cual interactúa con la maquinaria basal de transcripción (Wang et al, 1994). Esta función está regulada negativamente por la proteína E1B del adenovirus y la proteína hMDM₂ (Stewart y Pietenpol, 2001). El extremo amino terminal contiene una región rica en prolina (aminoácidos 64 al 92) y es necesario para que p53 realice su función como supresor de crecimiento (Walker y Levine, 1996); también se ha propuesto que interviene en la especificidad de los genes que van a ser activados transcripcionalmente por p53 (Venot

et al, 1998). El extremo amino terminal de la proteína p53 presenta numerosos residuos de serinas y treoninas; aminoácidos que son fosforilados como parte de la regulación de la funcionalidad de p53 (Meek et al, 1999).

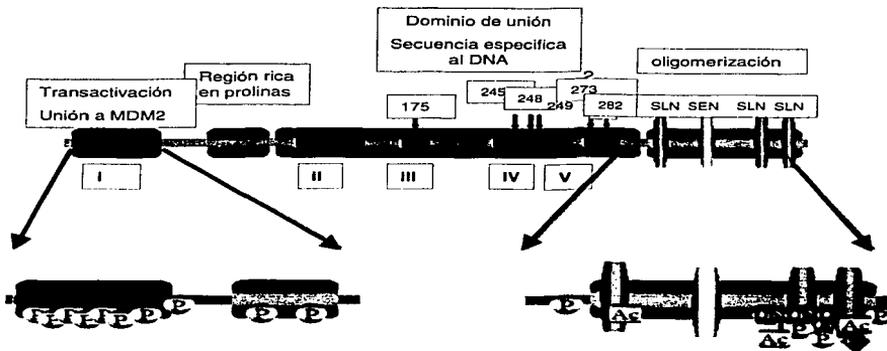


Figura 3. Dominios funcionales de la proteína p53. Se muestran los principales dominios y modificaciones en la proteína. P = fosforilación; Ac = acetilación; Ub = ubiquitinación S = sumolización. En números romanos se indican las regiones conservadas, con las flechas se indican los principales puntos calientes o hot spots de las mutaciones. SLN = señal de localización nuclear; SEN = señal de exportación nuclear. Tomada y modificada de Ryan (2001).

El dominio de unión específica al DNA ocupa casi 1/2 de la proteína y se encuentra ubicado entre los residuos 100 y 293 (Bargonetti et al,1993). La importancia de esta región está dada por el hecho de que más del 90% de las mutaciones que inhabilitan la función de p53, se encuentran dentro de este dominio (Nigro et al,1989; Kern et al,1991).

El extremo carboxilo (aminoácidos 294-393) presenta un dominio subdividido funcionalmente: en un dominio de localización nuclear (residuos 315-386), un dominio de oligomerización (residuos 337-355) y uno de exportación nuclear (residuos 340-351). Los dominios de localización y exportación nuclear regulan la localización celular de p53 entre el núcleo y el citoplasma (Shauly et al, 1991). El dominio de oligomerización juega un papel muy importante en la activación biológica de p53 y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

modificaciones covalentes como fosforilaciones y acetilaciones sobre esta región permiten que p53 pase de una conformación inactiva a una conformación activa formando homodímeros u homotetrámeros y pueda funcionar como factor de transcripción (Waterman et al, 1995; Sturzbecher et al, 1992). Finalmente la tetramerización de p53 enmascara la señal de exportación nuclear, lo que se traduce a que p53 sea retenido en el núcleo y previene que sea exportado hacia el citoplasma donde es degradado (Stommel et al, 1999). Recientemente se ha encontrado que el extremo carboxilo terminal es necesario para el detención de la fase G2 (Nakamura et al, 2002).

ACTIVACION DE p53 POR EL DAÑO

Los reportes indican que p53 participa "per se" en el proceso y reconocimiento del daño al DNA de manera específica y no específica. Se ha propuesto que la interacción no específica se presenta cuando la proteína p53 reconoce el daño al DNA (El-Deiry et al, 1998), dado que presenta actividad exonucleasa 3' → 5', la capacidad de unirse a moléculas de cadena sencilla de DNA, y a bases del DNA no apareadas (Reed et al, 1995). En cuanto a la interacción específica, la proteína p53 trabaja como factor de transcripción al unirse con el DNA a través de secuencias específicas del dominio de unión a DNA, estas secuencias son conocidas como sitios consenso para la unión de p53 y están compuestas por dos copias de 10 pb con la secuencia 5'-PuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' separadas por 0-13 pb; dicha secuencia está degenerada en 8 de las 10 bases, lo cual pudiera influir en la actividad selectiva de los genes activados transcripcionalmente por p53 después de diferentes estímulos (El-Deiry, et al, 1992; Chumakov et al, 2000).

En células normales y bajo condiciones sin estrés, el gen *TP53* continuamente se está transcribiendo y traduciendo, sin embargo el producto proteico está sujeto a una rápida degradación vía ubiquitinación por proteosomas (Chowdary et al, 1994; Maki et al, 1996), razón por la cual los niveles de p53 en las células de la mayoría de los tejidos son muy bajos o casi al límite de la detección. La activación de p53 en respuesta a varios tipos de estrés y daño se establece principalmente a través de modificaciones post-traduccionales lo que permite disminuir su degradación y cambiar su conformación para incrementar su actividad funcional.

GENES ACTIVADOS POR p53

La principal función de p53 es su acción como factor de transcripción (Raycroft et al, 1990; Kern et al, 1991). Desde su descubrimiento como factor de transcripción numerosos genes y vías de señalización han sido descritos. Se ha propuesto que dentro del genoma humano habría entre 200 y 300 sitios consenso potenciales para p53 (Tokino et al, 1994). Con el avance tecnológico y la aparición de los microarreglos de DNA, la cascada transcripcional regulada por *TP53* ha sido estudiada más a fondo. Zhao y cols. (2000) utilizando líneas celulares de cáncer de colon humano EB-1, que portan una versión silvestre del gene *TP53* bajo el control de un promotor inducible, observaron que de 6000 genes estudiados 107 fueron inducidos mientras que 54 fueron reprimidos en su expresión. Además de genes involucrados en la regulación de los procesos de apoptosis, ciclo celular e inhibición de la angiogénesis, se encontraron genes relacionados con aspectos de la función celular; como son genes que participan en funciones de citoesqueleto, factores de crecimiento y sus inhibidores, genes de matriz extracelular y de adhesión y genes de reparación del DNA y señalización.

APOPTOSIS INDUCIDA POR LA PROTEINA p53

Cuando se produce un daño en el genoma, se activa el gen p53 (que normalmente está inactivado). La proteína p53 puede actuar deteniendo el ciclo celular, para permitir la reparación del daño, o induciendo la entrada en apoptosis, según las "circunstancias" celulares (Ryan et al, 2001).

El nombre de apoptosis fue propuesto por Kerr y Searle (1972), utilizando un concepto griego de Apo (apo), desde, y Ptosis (ptosis), caída o prolapso de un órgano o parte de él. La apoptosis o muerte celular programada, está referida a una forma específica de muerte celular, proceso que ocurre en los tejidos en condiciones fisiológicas normales durante el cual las células dañadas se eliminan. Diversos procesos son regulados por la apoptosis, tales como: la morfogénesis en el embrión de mamífero, la eliminación de células inmunológicamente reactivas contra el mismo organismo, la eliminación de células infectadas en un proceso de enfermedad o genéticamente dañadas, la regresión de la glándula mamaria tras el destete, la atresia

folicular ovárica durante la menopausia y la pérdida celular por envejecimiento. Esto muestra la importancia de la apoptosis para un organismo, además de ser un proceso evolutivamente conservado (Roseto y Brenner 1999).

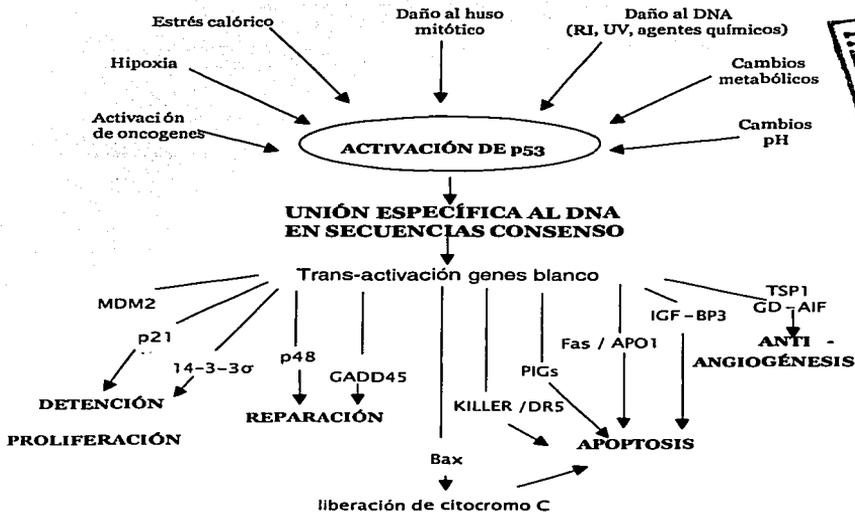
En el proceso de la apoptosis la célula se autodestruye sin dañar a células circunvecinas; la célula se encoge, el citoplasma se vuelve denso, los organelos se encuentran más apretados, la cromatina se agrega periféricamente debajo de la membrana nuclear en una masa densa de diferente forma y tamaño, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se rompe y el DNA nuclear se fragmenta, formándose los llamados cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos están compuestos por citoplasma y organelos empacados, lo más importante es que la superficie celular se altera presentando propiedades que hacen que el organismo ya no la reconozca y sea fagocitada inmediatamente por los macrófagos (Gerschenson y Rotello 1992).

Actualmente se admite que existen una serie de elementos que pueden ser comunes en la muerte celular apoptótica. Estos elementos se suelen dividir en tres grandes grupos: inductores, reguladores y efectores.

- Los inductores constituyen toda la serie de señales que inducen a la célula a entrar en el proceso de apoptosis. Estas señales pueden ser externas a la célula o producidas por la misma célula. Algunos inductores actúan uniéndose a receptores de membrana (como la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, TNF- α o Fas). Otros, como las hormonas esteroides, se unen a receptores citosólicos. La unión de ligando y receptor puede activar directa o indirectamente alguno de los efectores de la apoptosis. La proteína p53, es otro inductor de la apoptosis cuando hay daño en el DNA. El ión calcio desempeña importantes papeles como señalizador intracelular, de manera que su concentración está muy regulada. Un incremento del calcio citosólico, proveniente del medio extracelular o de depósitos intracelulares, puede conducir a la muerte celular por activación de diferentes enzimas (por ejemplo, endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} , proteasas o transglutaminasas). También la presencia de radicales libres oxidantes (también denominados especies reactivas de oxígeno), puede actuar como inductor de apoptosis (Nagata y Goldstein, 1995).

- Dentro de los reguladores de la apoptosis, los genes de la familia de Bcl-2 son los que están mejor estudiados. Bcl-2 es el prototipo de una gran familia de genes que codifica para una serie de proteínas que pueden inhibir (como las proteínas mitocondriales Bcl-2, Bcl-xL) o promover (Bax, Bak) la apoptosis. La proporción en que se expresen unas proteínas con respecto a las otras puede determinar que la célula sufra apoptosis o no (Chao y Korsmeyer, 1998)

- Los efectores de la apoptosis son los responsables, en última instancia, de los cambios estructurales que se observan en las células y que llevan a la muerte celular. Estos cambios son bastante parecidos en los distintos tipos de células, lo que sugiere que los mecanismos de muerte están bien conservados. Los efectores son fundamentalmente enzimas que, una vez activadas, inician el programa de destrucción irremediablemente. Entre ellos tenemos las endonucleasas y las proteasas. Se cree que la activación de endonucleasas dependientes de calcio y magnesio es la responsable de la fragmentación del DNA y de los cambios que ocurren en el núcleo de la célula. Las proteasas apoptóticas son específicas de sustrato (no son enzimas lisosómicas) y se caracterizan por presentar en su centro activo los aminoácidos cisteína y serina. Entre las proteasas más estudiadas se encuentran las denominadas caspasas, una familia de enzimas que tienen en común la presencia de cisteína en su centro activo y que efectúan el corte en el aminoácido aspartato (Cisteinil-ASPartato específico-proteASAS). Las caspasas son, probablemente, las moléculas efectoras más importantes de la apoptosis. Son sintetizadas como precursores inactivos que son activados por escisión autocatalítica o por otras proteasas. En muchas ocasiones, la activación de un tipo de caspasa produce la activación de otras, produciendo una "cascada" de caspasas que amplifica enormemente la señal. Algunas de las células blanco de las caspasas activadas incluyen la poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP), implicada en la reparación del DNA, las láminas nucleares y otras proteínas del citoesqueleto de la célula. La acción proteolítica de las caspasas sobre estas moléculas provoca su inactivación o destrucción (Nicholson y Thornberry, 1997).



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Figura 4. Cascada de activación y señalización de p53. La proteína p53 es estabilizada y activada después de la exposición de diferentes tipos de estrés incluido el daño al DNA. La activación de p53 permite que la proteína actúe como factor de transcripción de diferentes genes, lo cual dependerá del tipo de estrés inducido, las modificaciones a las cuales esté sujeta la proteína (fosforilaciones, acetilaciones) así como del tipo celular. El significado biológico de esta cascada será la detención de la proliferación celular, la inducción de la muerte celular o bien un efecto antiangiogénico. Tomado y modificado de Stewart y Pietsenpol (2001).

En la figura 4 se muestran los eventos mediados por p53 ante la presencia de daño o estrés celular en las células eucariotes. Las principales señales que inducen a la activación de p53 son: los rompimientos al DNA provocados por agentes físicos (radiación ionizante, radiación UV) o agentes químicos, hipoxia, señales de crecimiento no controladas por activación de oncogenes, cambios metabólicos como la falta de nutrientes o ribonucleótidos, y daño al huso mitótico, entre otras (Stewart y Pietsenpol, 2001; Ryan et al, 2001). La proteína p53 regula genes que contienen elementos de

respuesta a p53 en sus regiones y que son responsables, en gran medida, de las funciones asociadas a p53. Así, los genes regulados transcripcionalmente por p53 pueden agruparse dependiendo de las funciones que realizan, p53 regula genes implicados en la inhibición del ciclo celular, en la reparación del daño en el DNA, en la inhibición de la angiogénesis y en la inducción de la apoptosis. Además, p53 regula la transcripción de MDM2, que a su vez regula los niveles de p53, lo que genera un sistema autoregurable. Mdm2 es un gen importante en la regulación de p53, debido a que los niveles de la proteína p53 dependen principalmente de la velocidad de su degradación, más que de la velocidad a la que se generan nuevas moléculas de p53 (Figura 4).

LAS MUTACIONES EN EL GEN *TP53* Y LA EXPOSICIÓN A CARCINOGENOS

El gen *TP53* se encuentra mutado en el 50% de los tumores en los pacientes con cáncer. Esta alta prevalencia en mutaciones significa que es probable encontrar mutaciones del gen en diferentes tipos de cáncer, estableciendo asociaciones estadísticamente significativas entre exposiciones ambientales y la mutación de *TP53*. Así, el gen *TP53* ha sido aislado y secuenciado en gran variedad de cánceres y se ha descrito la presencia de mutaciones en varios tipos de cáncer por exposiciones inducidas a agentes carcinogénicos. Se ha planteado que el espectro mutacional de *TP53* está relacionado con exposiciones específicas. Tipos específicos de cáncer están asociados con patrones característicos en *TP53*, así, ha sido demostrado que el espectro mutacional, el patrón de localización y el tipo de mutación en *TP53* difieren entre cáncer de pulmón, colon hígado, mama, cerebro, esófago, tejido retículo endotelial y hematopoyético, permitiendo la investigación en la etiología de los diferentes procesos carcinogénicos en los tejidos. En este contexto, los ejemplos mejor documentados son las exposiciones a aflatoxina B₁, radiación UV, humo de tabaco y cloruro de vinilo. La aflatoxina B₁ es una micotoxina producida por el *Aspergillus flavus*, es un contaminante común en granos, cacahuates y nueces en ciertas regiones geográficas. En áreas donde la exposición es endémica como el sur de China, la contaminación de alimentos con aflatoxina es considerada un factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular y se ha encontrado que en pacientes residentes de Qidong, en China hay una prevalencia de mutaciones de *TP53* de tipo puntual en la posición del

codon 249, muchas de estas mutaciones son transversiones G→T o G→C. Por otro lado, la exposición a radiación ultravioleta ha sido implicada en la etiología de muchos tipos de cáncer de piel; de ahí que se ha observado incremento en el riesgo de desarrollar carcinomas de células escamosas y células basales, así como de melanomas, el análisis de mutaciones en *TP53* ha mostrado que la exposición a luz ultravioleta conduce principalmente a sustituciones de bases C→T en sitios de dipirimidínicos (Semenza y Weasel,1997). La exposición a tabaco ha sido asociada con varios tipos de cáncer, particularmente en el cáncer de pulmón varios estudios han determinado que existen transversiones G:C a T:A particularmente en los codones 157, 248, 273; en cambio en el cáncer de vejiga se han encontrado transversiones G:C a C:G en el gen *TP53*. Por otro lado, la exposición ocupacional a cloruro de vinilo durante la manufactura de los plásticos ha sido relacionada con el angiosarcoma de hígado, encontrándose preferentemente transversiones A:T a T:A (Semenza y Weasel,1997).

Por otra parte, se ha propuesto que es posible identificar carcinógenos sobre la base del efecto mutacional de *TP53* y determinar la dosis mediante el uso de la frecuencia de mutaciones como dosímetro molecular. Para tal propósito se plantea que la localización preferencial de aductos en el DNA en posiciones particulares para el gen *TP53*, permitiría correlacionar los sitios de alta incidencia mutacional encontrados en ciertos tipos de cáncer. (Semenza y Weasel,1997).

Finalmente, el análisis del producto (proteína) del gen *TP53* puede ser un indicador de mutaciones en el gen, actualmente la detección de la proteína p53 en su forma mutada o alterada es una herramienta utilizada para el pronóstico clínico del paciente, ya que por lo general se predice un mal y pobre pronóstico en tumores que presentan p53 mutado o inactivado (Levine, 1997).

ARSÉNICO, UN CARCINÓGENO HUMANO

Históricamente las propiedades de este elemento eran conocidas por los griegos, utilizado desde los tiempos de Hipócrates, quien recomendaba su administración para el tratamiento de úlceras. Se ha usado en preparaciones medicinales para combatir padecimientos como anemia, el asma bronquial, la psoriasis, la sífilis, la disentería amibiana e infecciones parasitarias como la tripanosomiasis. Sin embargo, en estos tratamientos clínicos se observaron efectos adversos, lo cual llevó a su prohibición para el uso terapéutico (IARC; 2002). El arsénico (As) fue también utilizado en la elaboración de pigmentos para pinturas, pero su empleo quedó cancelado, cuando se descubrió que en condiciones húmedas los mohos convierten el As en gases totalmente tóxicos como la arsina y la trimetilarsina (Duffus et al, 1983).

FISICOQUÍMICA DEL ARSÉNICO.

El As es un elemento ubicuo, se sitúa en la Tabla Periódica de los Elementos en el grupo 15 antiguamente llamado V bajo el nitrógeno y el fósforo, su número atómico es 33 y su peso atómico 74.9. Está clasificado como elemento de transición o metaloide debido a que comparte diversas propiedades físicas y químicas con elementos metálicos.

Es un elemento que se encuentra usualmente en la naturaleza combinado con otros elementos como oxígeno, cloro y azufre formando arsénico inorgánico o con carbón (de manera covalente) o hidrógeno constituyendo compuestos orgánicos. La mayoría de éstos son polvos blancos o incoloros, inodoros, insípidos y no suelen evaporarse, debido a lo cual es difícil determinar su presencia en el ambiente.

El estado de oxidación de los compuestos arsenicales encontrados en el ambiente es trivalente (III) o pentavalente (V), mucha de la química de estos compuestos resulta de la fácil conversión entre estos dos estados. Dentro de los compuestos pentavalentes se encuentran los arseniatos, los cuales son las sales de ácido arsénico H_3AsO_4 . Los arsenitos y las sales del ácido arsenioso contienen As trivalente. El As (III) existe en la mayoría de las fuentes naturales de agua como $As(OH)_3$ y es más móvil que el As (V) debido a que es menos absorbido en la mayoría de las superficies minerales (EPA, 2000).

DISTRIBUCIÓN EN EL AMBIENTE Y VÍAS DE EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO.

El As está ampliamente distribuido en la corteza terrestre, ya que forma parte de la materia mineral y puede ser liberado al ambiente a través de las emisiones volcánicas y la erosión de depósitos minerales, así como por las actividades humanas (EPA 2000; ATSDR 2003). Se encuentra en el suelo, el agua y el aire como un contaminante ambiental común (Abernathy et al, 1999) (Figura 5).

La mayoría de los compuestos arsenicales pueden disolverse en el agua, la lluvia, la nieve o los desechos industriales y de esta forma llegar a lagos, ríos o mantos acuíferos (ATSDR 2003), además, bajo altas temperaturas generadas durante la combustión en la industria, es obtenido como un subproducto de la fundición del cobre, el plomo, el zinc y otros metales, en forma de polvo. Este polvo puede ser colectado, purificado, y utilizado como preservador de madera o en la fabricación de pesticidas (insecticidas y herbicidas), lo que ha incrementado su dispersión. También puede ser liberado al ambiente a partir de las rocas y minerales en las aguas termales y las plantas de energía geotérmica o a través de la combustión del carbón (EPA 2000; IARC 2002).

El As está usualmente en bajas cantidades en el suelo (5000 ppb), el agua (2 ppb), el aire ($0.02-0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y la comida principalmente de tipo marino como peces y crustáceos (20-140 ppb). De tal manera que la cantidad de arsénico a la que estamos expuestos es aproximadamente $50 \mu\text{g}/\text{día}$, cantidad que en zonas industriales y/o contaminadas se encuentra 100 veces más elevada (ATSDR, 2003). De hecho el agua en algunos lugares como Argentina (Astolfi et al,1981) Chile (Borgoño et al,1977), China, Taiwan (Gou et al,1994), India (Chowdhury et al, 2000) y Bangladesh (Frisbie et al, 2002) y México (Cebrián et al, 1994) rebasa el límite máximo permisible ($50 \mu\text{g}/\text{L}$ para el agua de bebida), lo que ha resultado en varios casos de hiperqueratosis, hiperpigmentación y cáncer de piel (Tondel et al, 1999). Problema que en lugares dentro de la República Mexicana como Puebla, Chihuahua, Hidalgo, Morelos, Nuevo León, Coahuila y Durango, es preocupante.

Las principales vías por las que el As puede entrar al cuerpo son oralmente (>90%), aéreas (70-80%) y cutánea (1-2%). Cabe señalar que los niños están expuestos al arsénico a través de las mismas vías que los adultos, además de que este puede cruzar la barrera placentaria y también encontrarse en la leche materna, por lo

cual los fetos y los lactantes pueden estar expuestos a este metaloide por vías únicas durante su desarrollo (ATSDR 2003).

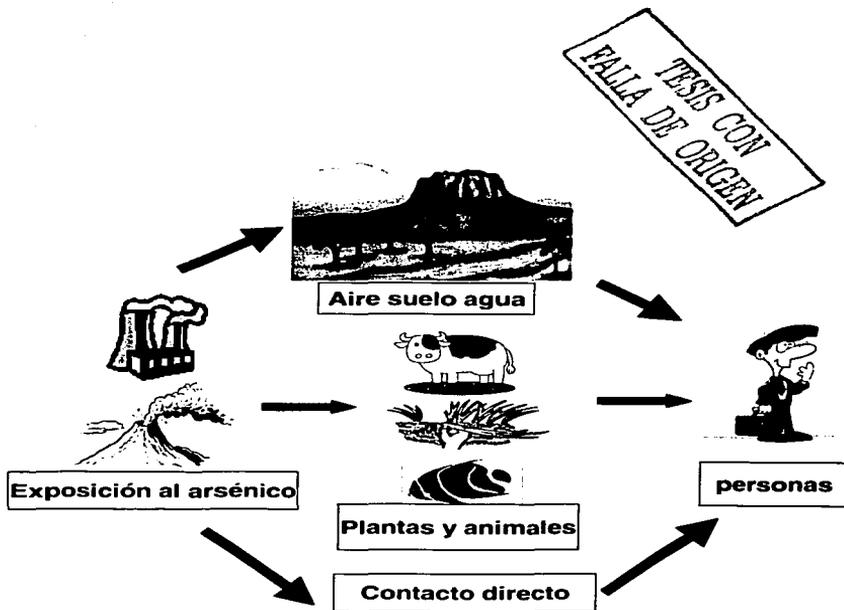


Figura 5. Vías de exposición al arsénico.

Tomado y modificado de Fishbein (1987).

METABOLISMO DEL ARSÉNICO.

La distribución del As en el cuerpo humano depende de la duración de la exposición y del compuesto involucrado. El As usualmente se acumula en hígado, riñón, pulmón y corazón, aunque se pueden encontrar pequeñas cantidades en tejido muscular y nervioso, uñas y cabello. Debido a su parecido con el fósforo se deposita en los huesos y los dientes y es retenido en ellos por largo tiempo (Goodman et al, 1992).

En cuanto a la biotransformación del As en el humano, algunos compuestos pentavalentes son reducidos *in vivo* a la forma trivalente y al parecer, ambas formas son metiladas en el hombre, porque el ácido dimetilarsténico es la forma más común excretada en la orina (Goodman et al, 1992). Sin embargo, la eliminación del As ocurre por diferentes vías: heces, orina, sudor, leche materna, pelo, uñas y pulmones. Algunas de las formas del arsénico permanecen en el cuerpo por días mientras que otras lo hacen por meses o más. La vida media de la excreción por vía urinaria del arsénico es de tres a cinco días (Goodman et al, 1992).

EFFECTOS DEL ARSÉNICO

Efectos agudos. En tracto gastrointestinal, causa hiperemia esplénica, vesículas bajo la mucosa intestinal, diarrea y una disminución en la proliferación normal celular. En riñón, genera proteinuria, diversos grados de necrosis tubular y degeneración. También puede existir oliguria y hematuria. En hígado, los compuestos arsenicales producen una infiltración grasa, necrosis central, cirrosis y oclusión del conducto biliar, además de hepatomegalia y fibrosis portal (Santra et al, 1999). En piel: a corto plazo puede producirse necrosis. En sistema nervioso, se producen encefalopatías, debilidad muscular en las extremidades seguida de atrofia muscular, lesiones cerebrales, sobretodo vasculares y necrosis hemorrágica (Donofrio et al, 1987). En sistema cardiovascular, pequeñas dosis producen vasodilatación y edemas, pero dosis elevadas provocan dilatación y permeabilidad capilar, transudado de plasma y disminución en el volumen intra vascular. En tejido hemático, los compuestos inorgánicos producen anemia, leucopenia, eosinofilia y un incremento en la vascularización de la médula e impiden la absorción del ácido fólico.

Efectos crónicos. Los signos más comunes de la exposición crónica al arsénico son la debilidad y el dolor muscular, la hiperpigmentación de la piel, la hiperqueratosis y

los edemas. Una exposición a largo plazo provoca gangrena en las extremidades, especialmente en los pies, daño al miocardio e hipertensión. Algunos síntomas que pueden crear sospecha acerca de este tipo de exposición son el aliento y la transpiración con olor a ajo, estomatitis, dermatitis y vitiligo. Eventualmente ocurre cirrosis debida a la hepatotoxicidad, una disfunción renal, parálisis en las extremidades y alteraciones hematológicas (anemia y leucopenia). El efecto más característico de una larga exposición por vía oral es el cambio a nivel de piel, el cual incluye el ennegrecimiento, la aparición de verrugas en las manos y la planta de los pies y el cáncer de piel. También se ha reportado que el As predispone a carcinoma de tipo basal-superficial y escamoso e incrementa el riesgo de cáncer de hígado, vejiga, riñón y pulmón, por lo cual el Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS), la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), la Agencia de Protección Ambiental (EPA), Programa Nacional de Toxicología (NTP), lo han declarado un carcinógeno humano (ATSDR, 2003).

Efectos genotóxicos. A diferencia de muchos carcinógenos, los compuestos arsenicales no inducen mutaciones en bacterias y son inactivos o resultan débiles en la inducción de mutaciones génicas en una variedad de células de mamíferos (Li et al, 1991). La exposición al As causa amplificación génica (Lee-Chen et al, 1992) y daño cromosómico a bajas dosis además de incrementar la mutagénesis de otros agentes, aparentemente al impedir la reparación del DNA (Rossman et al, 1998).

Diversos estudios han mostrado que el arsenito de sodio produce micronúcleos (Ostrosky et al, 1991; Gonsebatt et al, 1992) en los linfocitos humanos tanto tratados *in vitro* como de personas expuestas ambientalmente. También se ha demostrado que el As induce la formación de células aneuploides en linfocitos tratados *in vitro* (Ramírez et al, 1997) y que tiene un efecto parecido a la colcemida (Vega et al, 1995).

El As produce rompimientos en las cadenas de DNA y enlaces cruzados DNA-proteína en células humanas en cultivo, de manera dosis dependiente (Dong et al, 1993; Schaumloffel et al, 1998; Ramírez et al, 2000) y en células de hamster chino (Gabel et al, 1998). Estas interacciones podrían explicar la formación de aberraciones cromosómicas provocadas por el As, además de jugar un papel importante en el mecanismo de carcinogenicidad de este metaloide.

Además de los efectos cromosómicos, también se ha visto que el As altera la proliferación celular de individuos expuestos a este metaloide en el agua de bebida así como de linfocitos tratados *in vitro* (Ostrosky-Wegman et al, 1991; Gonsebatt et al, 1992 y 1994). Estudios posteriores relacionados con la proliferación celular y su control a través de genes supresores de tumores, mostraron que el gen *TP53*, es inducido por el As y que dependiendo del estado funcional en que se encuentre este gen (normal o mutado) será la respuesta ante el daño causado por este metaloide. En este estudio se observó que las líneas celulares con el gen *TP53* funcional responden mejor ante el daño con respecto a las células con el gen *TP53* mutado (Salazar et al, 1997).

Efectos benéficos. A pesar de lo antes mencionado existen reportes acerca de los efectos benéficos del As si se ingieren pequeñas cantidades (10-50 ppb) en la dieta normal. Estudios recientes muestran que las anomalías en el balance de los metales traza pueden influenciar la salud humana. En los animales algunos signos de la falta de As incluyen la mortalidad perinatal, la fragilidad osmótica de los eritrocitos, la reducción de los niveles de S-adenosilmetionina (SAM), la alteración en la producción de poliaminas y cambios en los patrones de metilación del DNA que modifican la expresión de los genes (Zhao et al, 1997). Además se ha reportado que el As también se ha usado de manera terapéutica en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (APL) como un inductor de la diferenciación de los promielocitos *in vivo*, obteniéndose una remisión del 88% de los pacientes tratados con dosis de 0.06-0.17 mg/kg diarios de trióxido de arsénico (Camacho et al, 2000).

HIPÓTESIS

El análisis del patrón de expresión de la proteína p53 en modelo de linfocitos humanos podrá ser utilizado como biomarcador para detectar daño en individuos expuestos a agentes ambientales.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar si el patrón de expresión de la proteína p53 en el modelo de cultivo de linfocitos humanos puede aplicarse como biomarcador de daño en el monitoreo de individuos expuestos al arsénico.

Objetivos particulares

- 1.- Evaluar la expresión de la proteína p53 en los linfocitos de donadores sanos retados *in vitro* con As.
- 2.- Evaluar la expresión de la proteína p53 en los linfocitos de donadores que residen en un área endémica con hidroarsenicismo.
- 3.- Determinar si hay diferencias en el patrón de expresión de p53 en los linfocitos retados *in vitro* de los donadores sanos y los expuestos a arsénico.
- 4.- Evaluar si la exposición crónica a arsénico altera los niveles de p53 en los linfocitos circulantes (G₀).

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de donadores sanos.

Se obtuvieron las células mononucleadas de 15 ml de sangre periférica de donadores sanos (16 hombres de 18-46 años y 28 mujeres de 23-51 años).

Características de individuos de una zona endémica con hidroarsenicismo.

En colaboración con la Dra. Emma Calderón y el Dr. Mariano Cebrián del CINVESTAV, se realizó un estudio piloto con 19 individuos que viven en un área endémica con hidroarsenicismo: 12 pacientes con cáncer de piel no melanoma (9 hombres y 3 mujeres de 51-73 años) y 7 pacientes sin cáncer (7 mujeres de 31-67 años) constituyeron el grupo de estudio. Las muestras de sangre heparinizada fueron enviadas vía aérea a la ciudad de México, donde se procesaron.

Características de la población de la zona con hidroarsenicismo: Los individuos que participaron en el estudio fueron pacientes provenientes de las ciudades de Torreón, Coahuila y Gómez Palacio, Durango, ambas localidades de la Región Lagunera (Rosales-Castillo et al, 2003). Se obtuvo el consentimiento por escrito de los individuos seleccionados para participar en el estudio. La investigación fue aprobada por el Comité de ética de la Escuela de Medicina de la Universidad de Juárez, Durango.

Se valoró la exposición histórica y actual al arsénico, a través de la historia detallada de los residentes de la zona contaminada. La información fue obtenida por un cuestionario sobre el estilo de vida de los habitantes, historia ocupacional, toma de agua diaria, exposición a compuestos orgánicos tales como pesticidas y exposición al sol. Se midieron los niveles de As en el agua de bebida y en la orina de los individuos. Las concentraciones de arsénico en orina fueron usadas como unidad de medida de exposición actual. La exposición histórica fue estimada como una suma de productos de concentración de As en el agua de bebida en cada ciudad de residencia por el tiempo de vida de cada individuo en dicha ciudad. La creatinina en orina fue medida y los valores totales obtenidos en orina fueron corregidos por la excreción de creatinina (Rosales-Castillo et al, 2003).

Cultivo de linfocitos.

Las células mononucleadas fueron separadas por un gradiente de densidad de Fycoll-Hypaque (Sigma) 1:1 sangre-Fycoll-Hypaque (Boyum et al, 1968). Se observan 3 fases, la inferior corresponde a los eritrocitos, la media al Fycoll-Hypaque y la superior al suero. Entre el suero y el Fycoll-Hypaque se observa un anillo blanco que corresponde a los linfocitos. El anillo de células blancas se recuperó y se contó el número de células.

Se sembraron 4×10^6 células en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 15% de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales (10 mM, Gibco), L-glutamina (2 mM, Sigma). Se agregaron 200 μ l de fitohemaglutinina (PHA, Gibco) y se incubaron a 37° C durante 24 horas para posteriormente tratar por 24 h más con 1 μ M de arsenito de sodio (Salazar et al, 1997) o 3 ng/ml de actinomicina-D (AcD; Sigma), un potente inductor de p53 (Fritsche et al, 1993).

Los cultivos celulares y la determinación de la proteína se realizaron por triplicado para confirmar el patrón de expresión de cada individuo.

Determinación de p53 en linfocitos en G₀.

Las células mononucleadas fueron separadas por un gradiente de densidad de Fycoll-Hypaque (Sigma) 1:1 sangre-Fycoll-Hypaque (Boyum et al, 1968). Se utilizó el anillo blanco que corresponde a los linfocitos. Se tomaron y se guardaron en congelación para su posterior inmunodetección.

Inmunodetección de la proteína p53

Las células fueron cosechadas por centrifugación y preparadas para su lisis como lo describe Salazar y cols (1997). Los linfocitos en G₀ (sin estimular) y las células cultivadas fueron lisadas en hielo en una solución salina amortiguadora de fosfatos con inhibidores de proteasas y fosfatasa. La concentración total de proteína de los extractos celulares se determinó por el ensayo de Bradford.

Se usaron 40 μ g del lisado de proteínas que fueron calentados durante 5 min. a 80° C en una solución amortiguadora para corrimiento (2% SDS, 80 mM Tris pH 6.8, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol). Las proteínas fueron separadas en geles al 10% de SDS-poliacrilamida y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham). La membrana fue bloqueada con leche en

polvo baja en grasas. Los niveles de la proteína p53 fueron detectados usando los anticuerpos monoclonales anti-p53 D0-1 [1 μg / ml] (Santa Cruz Biotechnology). La misma membrana fue incubado con anticuerpo contra la proteína β -actina (anti-actina I-19 (0.5 μg / ml) la cual se utilizó como control interno de cargado del gel. Las bandas inmunorreactivas fueron visualizadas en placas de autoradiografía utilizando el sistema de peroxidasa-ECL-quimioluminiscencia (Amersham). La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría óptica usando el programa Quantity One (BioRad).

Análisis Estadístico

Para los individuos con hidroarsenicismo se utilizó la prueba de Mann-Whitney, se eligió esta prueba no paramétrica porque los datos no presentan una distribución normal y puede ser aplicada a muestras pequeñas.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA p53 EN INDIVIDUOS SANOS

Para evaluar los efectos del As sobre la expresión de p53, se realizaron cultivos de linfocitos de 44 individuos sanos, bajo tres diferentes condiciones: (1) linfocitos estimulados con PHA durante 48 horas, (2) linfocitos estimulados con PHA 24 horas y tratados con As o (3) con AcD durante las últimas 24 horas. Se encontraron tres patrones diferentes de expresión de p53 (figura 6). Cuando se analizó la frecuencia de estos tres patrones se encontró que 41 (93.1%) de los individuos tratados presentaron banda con el tratamiento con As ó AcD pero no en los linfocitos en G₀ (Patrón I), el 2.3% de los individuos presentaron una banda en G₀ (Patrón II), y el 4.5% de los individuos no presentaron banda con p53 (Patrón III) (figura 7 y tabla 4).

EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA p53 EN INDIVIDUOS QUE RESIDEN EN UNA ZONA ENDÉMICA DE HIDROARSENICISMO

Para determinar si la exposición crónica a agentes carcinógenos, altera la frecuencia de los patrones de expresión de p53 encontrados en los individuos sanos, se realizó un estudio piloto en una población que reside en un lugar con hidroarsenicismo. Los individuos de este estudio fueron clasificados en dos grupos, pacientes con cáncer de piel de tipo no melanoma (un efecto conocido de la exposición a As a través del agua de bebida) y en individuos sin cáncer.

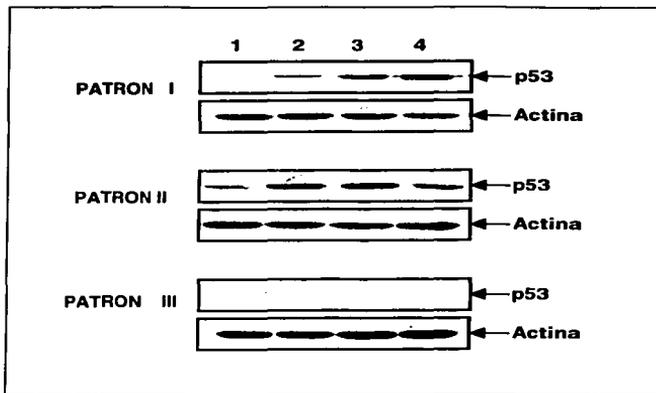
Las características generales de los individuos de la región endémica con As fueron las siguientes: de los 19 individuos, 12 pacientes presentaron cáncer de piel de tipo no melanoma y 7 individuos sin cáncer (tabla 5). Ninguna de las variables analizadas mostraron diferencias significativas cuando se comparó el grupo de individuos con cáncer con el grupo sin cáncer (prueba estadística Mann-Whitney). Sin embargo, se observó que en promedio, los pacientes con cáncer de piel estuvieron más expuestos a la luz solar que individuos sin cáncer (4.28 vs 2.40 h / día; p=0.07).

En 8 (50%) de los individuos con hidroarsenicismo se detectó la banda de p53 en los cultivos con As y en los tratados con AcD, pero no en linfocitos circulantes (G₀) (Patrón I); en 7 (43.75%) de los individuos se detectó p53 en los linfocitos en G₀ (Patrón

II) y en 1 (6.25%) individuo no se detectó ninguna respuesta a p53 (Patrón III) (figura 8 y tabla 6). Tres individuos no fueron incluidos en el estudio *in vitro* debido a la falta de muestra. La inmunodetección y las densitometrías de la población expuesta a arsénico se presentan en las figuras 9 y 10.

Cuando se evaluó la expresión de p53 en los linfocitos en G_0 de los 19 individuos de la región con hidroarsenicismo se observó que 10 de los 19 individuos expresaron p53 en los linfocitos circulantes (G_0); de manera interesante de los 12 individuos con cáncer de piel, 9 expresaron la proteína p53, mientras que solo en uno de los 7 pacientes sin cáncer se detectó p53 (figura 11).

Se realizó un análisis estadístico para determinar la relación de la presencia de p53 en los linfocitos en G_0 en el grupo que estuvo expuesto al As con la presencia de cáncer de piel. Los resultados indicaron una alta correlación entre la presencia de p53 en G_0 y el cáncer de piel ($p= 0.0083$, Mann-Whitney). El análisis estadístico no fue significativo con algunos factores asociados con el cáncer de piel de tipo no melanoma como la edad ($p= 0.052$), la exposición a sol ($p= 0.90$) y la exposición crónica al As ($p= 0.74$).



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Diferentes patrones de expresión de la proteína p53 en linfocitos humanos. La proteína p53 se determinó por la técnica de inmunodetección (Western). Linfocitos en G_0 (línea 1); linfocitos estimulados por 48 h (línea 2); linfocitos estimulados y tratados con As (línea 3) o con AcD durante las últimas 24 horas (línea 4). Tipo I, la proteína se expresó en linfocitos estimulados y retados con As o AcD, pero no en G_0 . Tipo II, la proteína p53 se expresó en todos los casos incluyendo en G_0 . Tipo III, la proteína no se detectó en ninguna condición.

Tabla 4. Análisis del porcentaje de patrones en una población de individuos sanos

PATRON	No. DONADORES	%
TIPO I	41	93.2
TIPO II	1	2.3
TIPO III	2	4.5

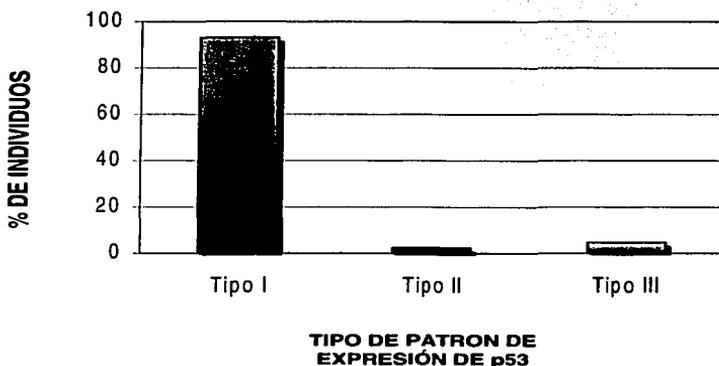


Figura 7. Porcentaje de los diferentes modelos de expresión de la proteína p53 en linfocitos de individuos sanos. Tipo I, la proteína se expresó en linfocitos estimulados y retados con As y AcD, pero no en G_0 . Tipo II, la proteína p53 se expresó en todos los casos incluyendo en G_0 . Tipo III, la proteína no se detectó en ninguna condición.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 5. Características de los individuos expuestos al arsénico.

Características		Pacientes con cáncer (n=12)	Pacientes sin cáncer (n=7)
Edad	Media	62.8 ± 6.7	53.1 ± 14.1
	Rango	51 – 73	31 – 67
Sexo	Hombres (%)	33	0
	Mujeres (%)	67	100
Arsénico en orina (µg / L)	Media	44.5 ± 70.6	27.3 ± 18.6
	Rango	6.2 – 263.5	16.9 – 69
Creatinina/ arsénico (µg / L)	Media	26.13 ± 21.39	21.96 ± 11.01
	Rango	8.44 – 88.82	7.79 – 36.7
Exposición acumulada a arsénico (µg)	Media	80.5 ± 111.8	39.7 ± 65.6
	Rango	7.2 – 340.6	5.3 – 188
Exposición al sol (horas de exposición por día)	Media	4.28 ± 2.29	2.40 ± 2.48
	Rango	0 – 8.0	0.57 – 7.83

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 6. Análisis del porcentaje de patrones en una población de individuos de la región endémica con hidroarsenicismo

PATRON	No. DONADORES	%
TIPO I	8	50
TIPO II	7	43.75
TIPO III	1	6.25

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

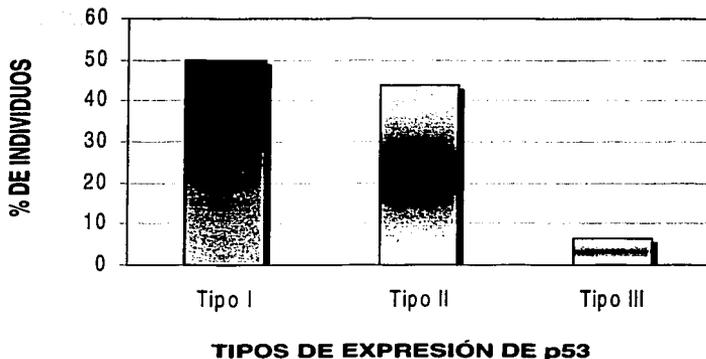


Figura 8. Porcentaje de los diferentes modelos de expresión de la proteína p53 en linfocitos de individuos con hidroarsenicismo. Tipo I, la proteína se expresó en linfocitos estimulados y retados con As y AcD, pero no en G_0 . Tipo II, la proteína p53 se expresó en todos los casos incluyendo en G_0 . Tipo III, la proteína no se detectó en ninguna condición.

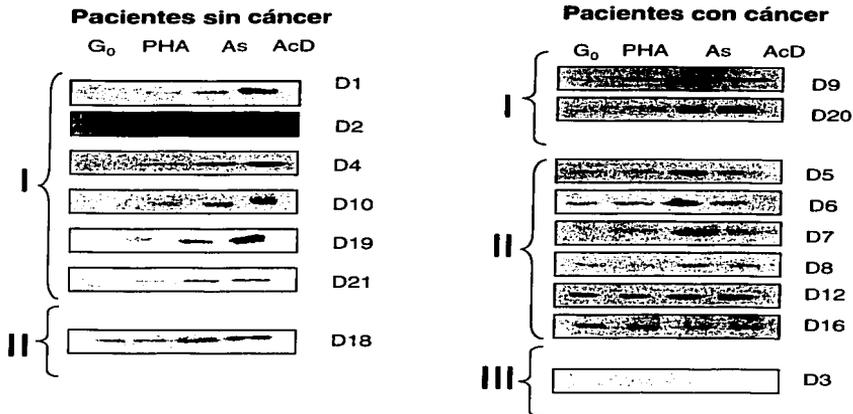


Figura 9. Detección de la proteína p53 en linfocitos humanos de donadores de la región con hidroarsenicismo. La proteína p53 se determinó por la técnica de inmunodetección (Western blot). Linfocitos en G₀ (línea 1); linfocitos estimulados por 48 h (línea 2); linfocitos estimulados y tratados con As (línea 3) o con AcD durante las últimas 24 horas (línea 4). Tipo I la proteína no se expresó en G₀ pero sí en linfocitos estimulados y retados con As y AcD. Tipo II, la proteína p53 se expresó en todos los casos incluyendo en G₀. Tipo III, la proteína no se detectó en ninguna condición. Tres individuos no fueron incluidos en este análisis debido a la falta de muestra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

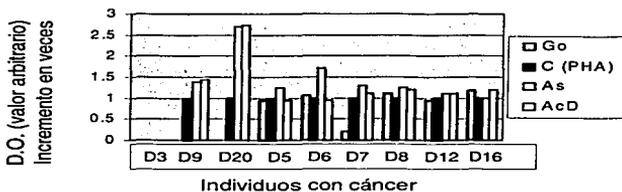
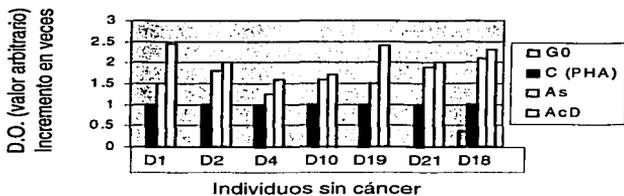


Figura 10. Análisis de la expresión de la proteína p53 en linfocitos de individuos de la región con hidroarsenicismo. La proteína p53 se determinó por la técnica de inmunodetección (Western blot). La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría óptica usando el programa Quantity One (BioRad). Se reporta el incremento en veces a partir del control estimulado con PHA. Tres individuos no fueron incluidos en este análisis debido a la falta de muestra.

TRIPS CON
 FALTA DE ORIGEN

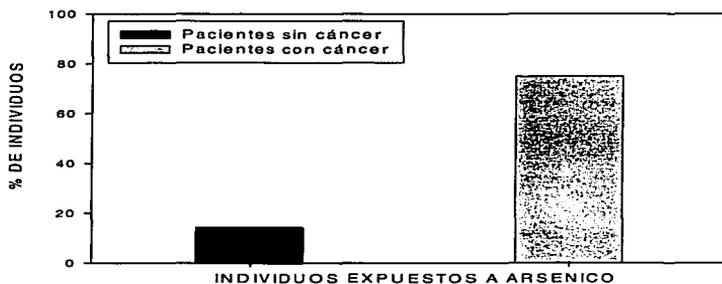
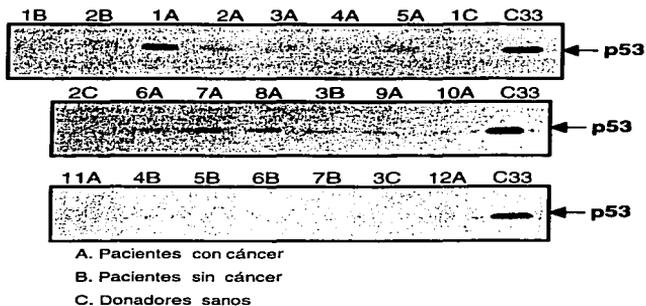


Figura 11. Expresión de la proteína p53 en linfocitos circulantes (Go) de individuos que viven en una región endémica con hidroarsenicismo. Se utilizó como control interno células C33 que sobreexpresan la proteína p53 (10 μ g de lisado total).

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que en la mayoría de los linfocitos circulantes (G_0) de los donadores sanos no se expresa la proteína p53, pero se detecta cuando *in vitro* los linfocitos son estimulados y tratados con As o AcD.

Cabe señalar que los linfocitos que no se trataron con As o AcD y se cultivaron durante 48 horas (cultivos control) expresaron bajos niveles de p53. Pocos trabajos se han enfocado al estudio de la expresión de p53 en el modelo de linfocitos humanos, sin embargo, se sustentan nuestros hallazgos. De ahí que dichos estudios muestran que la proteína p53 no se detectó en los linfocitos no estimulados (G_0) pero fue inducida cuando estas células son activadas por mitógenos (Terada et al, 1991; Fukao et al, 1999; Suzuki 1999). Ha sido reportado que cuando los linfocitos son aislados de sangre entera fresca, se encuentran en la fase G_0 y cuando estos son estimulados con mitógenos como la PHA, los linfocitos T entran a la fase G_1 del ciclo celular y se expresan genes como *MYC*, *FOS*, *RAS*, *MYB*, *ABL* y *TP53* entre otros (Kaczmarek et al, 1985; Reed et al, 1986). De hecho, actualmente se propone que la proteína p53 se acumula en los puntos de control G_1/S y G_2/M como una forma de revisar el daño en la célula antes de que se sintetice el DNA y se lleve a cabo la mitosis (Li et al, 1994; Waga et al, 1994; Mercer et al, 1998). Por lo que proponemos que los bajos niveles de p53 encontrados en los linfocitos estimulados podrían representar los niveles basales requeridos para que p53 ejerza dicha función. Pero no podemos descartar la posibilidad de que la presencia de bajos niveles de p53 en las células estimuladas se deban a una muerte linfocitaria normal inducida por la activación mitogénica (Mercer y Baserga 1985).

Se utilizó As o AcD para retar a los linfocitos en cultivo; la AcD es un agente químico que inhibe la transcripción génica pues se conoce su acción sobre la RNA polimerasa, por lo que en nuestros resultados encontramos una mayor expresión p53 cuando tratamos a los linfocitos con este agente tóxico. Cuando los linfocitos fueron tratados 24 horas con As, también se encontró un aumento en los niveles de p53. La sobreexpresión de p53 podría ser consecuencia de que el As produce daño a nivel de

ensamble de microtúbulos (Ramírez et al 1997); y/o que altera algunos sistemas de reparación (Yager Wiencke 1997; Lynn et al, 1998). Otra posibilidad es que el As al producir alteraciones cromosómicas (Vega et al 1995), este daño a nivel de DNA podría ser detectado por p53 y enviar a la célula a apoptosis (Livingston 1996).

En relación a los efectos del arsénico sobre p53 en los individuos residentes en un área endémica de hidroarsenicismo crónico, es de interés que en 9 de los 12 individuos expuestos al As y que tienen cáncer de piel, se detectó p53 en los linfocitos circulantes (G₀). Cabe señalar que solo uno de los 44 individuos sanos (no expuestos a hidroarsenicismo) expresó p53 en linfocitos circulantes (G₀).

Es difícil explicar por qué y cómo es que p53 se incrementa en linfocitos en G₀ de los individuos con cáncer de piel, pero una posibilidad es que la expresión de p53 en estos individuos esté relacionada con la sensibilidad genética intrínseca de las células expuestas a xenobióticos. Algunos estudios sugieren que la sobreexpresión de p53 analizada por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con cáncer de piel expuestos a arsénico, es debida a mutaciones en el gen (Kuo et al, 1997; Chang et al, 1998; Hsu et al, 1999; Boonchai et al, 2000). Sin embargo, en nuestro estudio no se pudo discernir si el incremento de p53 es debido a un incremento en la proteína tipo silvestre o mutada, ya que el anticuerpo que utilizamos reconoce a ambas proteínas (unión al epítipo de p53 humano localizado en la región amino-terminal ente los residuos 11-25).

Otra posibilidad es que el incremento de la expresión de p53 en linfocitos en circulación de pacientes con cáncer de piel pueda ser debida a la inducción de daño genotóxico producido por exposición al As, el cual ha sido ampliamente documentado (Jager et al, 1997; Gonsebatt et al, 1994). Basándonos en estas evidencias, es probable que la expresión de p53 en linfocitos en circulación de pacientes con cáncer de piel se deba a la inducción del daño al DNA. El incremento de la expresión de p53 en linfocitos en circulación nos proporciona una explicación de la disminución en el crecimiento observado en cultivo de linfocitos de sujetos expuestos. Además, se ha mostrado que el As retrasa la proliferación de linfocitos por la disminución en la secreción de IL-2, debido a la activación retardada de los linfocitos por la PHA (R. Saavedra, comunicación personal). La disminución en la respuesta en los linfocitos T estimulados también se ha observado en los individuos inmunosuprimidos quienes son

propensos a desarrollar neoplasias tal como el cáncer de piel (Penn et al, 1988; Dunn et al, 2002). Por lo tanto, proponemos que la expresión de p53 en los linfocitos circulantes, podría restringir su proliferación (Gonsebatt et al, 1992) dañando la respuesta inmunológica celular de individuos expuestos al As y así incrementando el cáncer en regiones endémicas.

Cabe mencionar que el análisis de la concentración de As en orina es un parámetro ampliamente utilizado para medir una exposición actual al As (Farmer et al, 1990; Del Razo et al, 1997). Los resultados de este estudio muestran que la exposición al As en nuestro grupo de estudio fue menor, comparada con estudios previos realizados por este grupo de trabajo (Gonsebatt et al, 1997), esto es debido a que se implementaron filtros en los pozos de suministro de agua, para reducir la concentración de As en agua de bebida. Aunque la exposición histórica y actual al As no tuvo una asociación significativa con la expresión de p53, es probable que el aumento de los niveles de p53 se deban al daño genotóxico, causado por la exposición crónica al As.

Posiblemente los pacientes con cáncer de piel que expresan p53 en linfocitos circulantes sean más susceptibles a los efectos genotóxicos del As y por consiguiente presenten dos de las manifestaciones de la exposición al As, como son el daño al DNA en linfocitos y cáncer de piel. Estos hallazgos pueden ser en un futuro confirmados al estudiar un grupo de individuos con cáncer de piel pero no expuestos al As.

El principal factor etiológico del cáncer de piel es la exposición al sol y se ha tratado de establecer la contribución del As en el desarrollo de cáncer de piel inducido por la luz UV (Rossman et al, 2001). En nuestro estudio, los pacientes con cáncer de piel estuvieron más tiempo expuesto a la luz solar, no obstante, no hubo diferencias estadísticamente significativas.

De ahí que el objetivo de los estudios de la epidemiología molecular sea la prevención de enfermedades, la expresión de p53 en linfocitos circulantes puede ser evaluada como un biomarcador potencial en el monitoreo humano. De manera interesante, si el incremento de los niveles de p53 en los linfocitos circulantes es debido al daño en el DNA inducido por el As podría ser útil como biomarcador de efectos tempranos o quizá de susceptibilidad, pero si p53 se incrementa por la presencia de cáncer quizá podría emplearse como un biomarcador diagnóstico.

Estudios futuros son necesarios para evaluar el significado de la relación entre el incremento en los niveles de p53 en linfocitos circulantes, el cáncer de piel y la exposición al As.

CONCLUSIONES

- La respuesta de p53 *in vitro* se clasificó en tres patrones de expresión: (I) la proteína se expresó en linfocitos estimulados y retados con As, pero no en G₀; (II) la proteína p53 se expresó en todos los casos incluyendo en G₀; (III) la proteína no se detectó en ninguna condición. La exposición crónica al arsénico altera la proporción de los patrones de expresión de p53 en los linfocitos cuando fueron retados *in vitro* con As.
- Cerca del 80 % de los individuos expuestos a hidroarsenicismo y que presentaron cáncer de piel de tipo no melanoma, sobreexpresaron la proteína, p53 en los linfocitos circulantes (G₀).

PERSPECTIVAS

Se estudiará la etiología de las diferencias individuales en la expresión de la proteína p53 en los linfocitos de sangre periférica de los donadores tratados *in vitro*, determinando si existen variaciones en la vida media de la proteína por modificaciones post-traduccionales o mutaciones del gen p53

Se analizará un grupo de pacientes con cáncer de piel, pero no expuestos a As para establecer si la sobreexpresión de p53 en los linfocitos en G₀ es debida a la presencia del cáncer o a la exposición crónica al As.

Se continuará evaluando la expresión de p53 en linfocitos de individuos expuestos a diversos xenóbioticos para validar la utilización de este modelo como un biomarcador.

REFERENCIAS

- Abernathy Ch, Liu Y, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C, Waalkes M. Arsenic: Health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ Health Perspect*, 107:593-597 (1999).
- Artuso M, Esteve A, Brésil H, Vuillaume M, Hall J. The role of the Ataxia-telangiectasia gene in the p53, WAF1/Cip1(p21)- and GADD45 mediated response to DNA damage produced by ionising radiation. *Oncogene*, 11:1427-1435 (1995).
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) Arsenic toxicity. *Public Health Service USA*, pp 5-39 (2003).
- Ashby J. Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals. *Mutat Res*, 204:542-551 (1998).
- Astolfi E, Maccagno A, Garcia-Fernandez JC, Vaccaro R, Stimola R. Relation between arsenic in drinking water and skin cancer. *Biol Trace Elements Res*, 3:134-143 (1981).
- Bale A. Hedgehog signaling and human disease. *Ann Rev Genom Hum Gen*, 3:47-65 (2002).
- Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR, Prives C. Proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA binding activity when generated from wild-type but non from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev*, 7:2565-2574 (1993).
- Bartek J, Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Letters*, 490:117-122 (2001).
- Boonchai W, Walsh M, Chenevix-Trench G. Expression of p53 in arsenic-related and sporadic basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*, 136:195-198 (2000).
- Borgoño JM, Vicent P, Venturino H, Infante A. Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: epidemiological and clinical study before and after the installation of a treatment plant. *Environ Health Perspect*, 19:103-105 (1977).
- Camacho LH, Soignet SL, Chanel S, Ho R, Heller G, Scheinberg DA, Ellison R, Warrell RP. Leucocytosis and the retinolic acid syndrome in patients with Acute Promyelocytic Leukemia treated with arsenic trioxide. *J Clin Oncol*, 18:2620-2625 (2000).
- Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res*, 204:379-406 (1988).
- Cebrián ML, Alboreo A, García Vargas G, Del Razo LM. Chronic arsenic poisoning in humans: the case of Mexico. *Arsenic in the Environment, Part II*. John Wiley & Son USA, pp 93-100 (1994).
- Cerutti L, Simanis V. Controlling the end of the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev*, 10:65-69 (2000).
- Chang CH, Tsal RK, Chen GS, Yu HS, Chai CY. Expression of bcl-2, p53 and Ki-67 in arsenical skin cancers. *J Cutan Pathol*, 25:457-462 (1998).

- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Ann Rev Immun*, 16: 395(1998).
- Chowdary DR, Dermody JJ, Jha KK, Ozer JL. Accumulation of p53 in mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol Cell Biol*, 14:1997-2003 (1994).
- Chowdhury UK, Biswas BK, Chowdhury TR, Samanta G, Mandal BK, Basu GC, Chanda CR, Lodh D, Saha KC, Mukherjee SK, Roy S, Kabir S, Quamruzzaman Q, Chakraborti D. Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India. *Environ Health Perspect*, 108:393-397 (2000).
- Chumakov PV. Function of the p53 gene: choice between life and death. *Biochemistry (Moscow)* 65:28-40 (2000).
- Del Razo LM, García-Vargas G, Vargas H, Albores A, Gonsebatt ME, Montero R, Ostrosky-Wegman P, Kalsb M, Cebrián M. Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. *Arch Toxicol*, 71:211-217 (1997).
- Dong JT, Luo XM. Arsenic-induced DNA-strand breaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. *Mutat Res*, 302:97-102 (1993).
- Donofrio PD, Wilbourn AJ, Albers JW, Rogers L, Salanga V, Greenberg HS. Acute arsenic intoxication presenting as Guillain-Barre-like syndrome. *Muscle Nerve*, 10:114-120 (1987).
- Doull J. Factors influencing toxicology. En: Casarett and Doull's toxicology: The basic Science of Poisons, 2nd ed. Eds. Doull J, Klaassen CD, Amdur MO. Macmillan, New York, pp 70-83 (1980).
- Duffus JH. *Toxicologia Ambiental* Ed Omega pp91 (1983).
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD: Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature*, 3:991-998 (2002).
- Eccles DM, Bunyan DJ, Needell J, Thompson M. Colon cancer in a 16 year old girl. *Lancet*, 345:1643 (1995).
- El-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Sem Cancer Biol*, 8:345-357 (1998).
- El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genet*, 1:45-49 (1992).
- EPA (Environmental Protection Agency). Arsenic occurrence in public in drinking water supplies. National Academy Press USA (2000).
- Evan GI, Voudsen KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis. *Nature*, 411:342-348 (2001).
- Farmer JG, Johnson LR. Assessment of occupational exposure to inorganic arsenic based on urinary concentrations and speciation of arsenic. *Br J Ind Med*, 47:342-348 (1990).
- Fishbein L, Furst A, Mehlman MA. Genotoxic and carcinogenic metals: environmental and occupational occurrence and exposure. Princeton Scientific Publishing Co. Inc. USA, pp 109-200 (1987).
- Frisbie SH, Ortega R, Maynard DM, Sarkar B. The Concentrations of Arsenic and Other Toxic Elements in Bangladesh's Drinking Water. *Environ Health Perspect*, 110:1147-1153 (2002).

Fritsche M, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene*, 8:307-318 (1993).

Fukao T, Kaneko H, Birrell G, Gatei M, Tashita H, Yoshida T, Cross S, Kedar P, Watters D, Khana KK, Misko I, Kondo N, Lavin M: ATM is upregulated during the mitogenic response in peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 6:1998-2006 (1999).

Gabel T, Birkenkamp P, Luthin S, Dunkelberg H. Arsenic (III), but not antimony, induces DNA-protein crosslinks. *Anticancer Res*, 18:4253-4257 (1998).

Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J*, 6: 2450-2455 (1992).

Gonsebatt ME, Montero R, Vega L, García-Vargas G, Del Razo LM, Albores A, Cebrián M, Ostrosky-Wegman P. Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutat Res*, 313:293-299 (1994).

Gonsebatt ME, Vega L, Herrera LA, Montero R Rojas E Cebrián ME, Ostrosky-Wegman P. Inorganic arsenic affects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutat Res*, 283:91-95 (1992).

Gonsebatt ME, Vega L, Salazar AM, Montero R, Guzmán P, Blas J, Del Razo LM, García-Vargas G, Albores A, Cebrián ME, Kelsh M, Ostrosky-Wegman P. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat Res*, 386:219-228 (1997).

Goodman A. Arsenic. In: *The pharmacological basic of therapeutics*. McGraw Hill. Singapore, pp 1602-1605 (1992).

Gou HW, Chen JC, Greene HL. Arsenic in drinking water and cancers: a brief descriptive review of Taiwan studies. *Arsenic Exposure and Health*. Science Review Ltd. 40 UK, pp 129-138 (1994).

Harris CC. Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism; DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis*, 10:1563-1566 (1989).

Hardcastle I, Golding B, Griffin R. Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 42:325-348 (2002).

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: control that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246:629-634 (1989).

Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio Harri. Polymorphism in CYP1A1 and CYP2D6 genes: possible association with susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect*, 101:109-112 (1993).

Howes K, Rannsom N, Papermaster DS. Apoptosis or retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes Dev*, 8:1300-1310 (1994).

Hsu CH, Yang SA, Wang JY, Yu HS, Lin SR. Mutational spectrum of p53 gene in arsenic-related skin cancers from the blackfoot disease endemic area of Taiwan. *Br J Can*, 80:1080-1086 (1999).

IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to human. Some drinking water disinfectants and contaminants, including arsenic. Vol. 84 pp 15-22 (2002).

Jager JW, Ostrosky-Wegman P. Arsenic: a paradoxical human carcinogen. *Mutat Res*, 386:181-184 (1997).

Jonson D, Walker C. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 39:295-312 (1999).

Kaczmarek L, Calabretta B, Baserga R: Expression of cell-cycle-dependent genes in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 82: 5375-5379 (1985).

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA binding-protein. *Science*, 252:1708-1710 (1991).

Kerr JFR, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. *J Pathol*, 107:41-44 (1972).

Khanna KK, Keating K, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller S, Lavin M. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet*, 20:398-400 (1998).

Kuo TT, Hu S, Lo SK, Chan HL. p53 expression and proliferative activity in Bowen's disease with or without chronic arsenic exposure. *Human Pathol*, 28:786-790 (1997).

Lee-Chen SF, Yu CT, Jan KY. Effect of arsenic on the DNA repair of UV-irradiated Chinese Hamster ovary cells. *Mutagenesis*, 7:51-55 (1992).

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88:323-331 (1997).

Li JH, Rossman TG. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol Toxicol*, 2:1-9 (1989).

Li JH, Rossman TG. Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in chinese hamster V79 cells. *Biol Metals*, 4:197-200 (1991).

Li R, Waga S, Hannon GJ. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371:534-537 (1994).

Livingston D. Meeting report 1995 annual cancer research symposium of the pezcoler foundation. *Biochem Biophys Acta*, 1242:216 (1996).

Lynn S, Shiung JN, Gurr JR. Arsenite stimulates poly (ADP-ribosylation) by generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, 24:442-449 (1998).

Maki CG, Huijbregtse JM, Howley PM. In vitro ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53 *Cancer Res*, 56:2649-2654 (1996).

Meek DW. Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene*, 18: 4668-4679 (1999).

Mercer E, Baserga R. Expresión of the p53 protein during the cell cycle of human peripheral blood lymphocytes. *Exp Cell Res*, 160:31-46 (1985).

Mercer WE. Checking on the cell cycle. *J Cell Biochem Anniversary suppl* 30/31:50-54 (1998).

Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:261-291 (1997).

Mortimer L, Mendelsohn MD, Peeters JP, Normandy MJ. Biomarkers and Occupational Health: Progress and Perspectives. Editors A Joseph Henry Press book, National Academies Press (1995).

Muir CS. Epidemiology, basic science, and the prevention of cancer: implications for the future. *Cancer Res*, 50:6441-6448 (1990).

Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science*, 267: 1449-1455 (1995).

Nakamura S, Gomyo Y, Roth JA. C terminus of p53 is required for G2 arrest. *Oncogene*, 21:2102-2107 (2002).

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Bioch Sci*, 22:299-306 (1997).

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Binger SH, Davidson N, Baylín S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature*, 342:705-708 (1989).

Oren M. The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties *Biochim Biophys Acta*, 823: 67-78 (1985).

Ostrosky-Wegman P, Gonsebatt ME, Montero R, Vega L, Barba H, Espinosa J, Palao A, Cortinas C, García Vargas G, del Razo LM, Cebrián M. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in México. *Mutat Res*, 250:477-488 (1991).

Ostrosky-Wegman P, Gonsebatt ME. Environmental toxicants in developing countries. *Environ Health Perspect*, 104: 599-602 (1996).

Penn I. Tumors of the immunocompromised patient. *Annu Rev Med*, 39:63-73 (1988).

Ramírez P, del Razo LM, Gutierrez-Ruiz MC, Gonsebatt ME. Arsenic induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis*, 21:701-706 (2000).

Ramírez P, Eastmond DA, Laclette JP, Ostrosky-Wegman P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res*, 386:291-298 (1997).

Raycroft L, Wu Y, Lozano G. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science*, 249: 1049-1051 (1990).

Reed J, Alpers J, Nowell P, Hoover R. Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 83:3982-3986 (1986).

Reed M, Woelker B, Wang P, Wang Y, Anderson ME, Tegtmeier P. The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. Was done in duplicates. *Proc Natl Acad Sci*, 92:9455-9459 (1995).

Reisman D, Loging WT. Transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Sem Cancer Biol*, 8:317-324 (1998).

Rosales-Castillo JA, Acosta-Saavedra L, Torres R, Ochoa F, Borja A, López Castillo L, García V, Gurrola G, Cebrian M, Calderon A. Arsenic exposure and human papillomavirus response in non melanoma skin cancer mexican patients. A pilot study. *Acceptado en Int Arch Occupational Environ Health* (2003).

Roseto A, Brenner Catherine. Apoptosis o la muerte celular programada. *Arch Argent Pediatr*, 97:253-275 (1999).

Rossmann TG. Molecular and genetic toxicology of arsenic. En: *Environmental Toxicology: Current developments*. Gordon and Breach Publishers. Netherlands pp 171-187 (1998).

Rossmann TG, Uddin AN, Burns FJ, Bosland MC. Arsenite is a cocarcinogen with solar ultraviolet radiation for mouse skin: an animal model for arsenic carcinogenesis. *Toxicol Applied Pharmacol*, 176:64-71 (2001).

Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*, 13:332-337 (2001).

Salazar AM, Ostrosky-Wegman P, Menéndez D, Miranda E, García-Carrancá A, Rojas E. Induction of p53 expression by sodium arsenite. *Mutat Res*, 381:259-265 (1997).

Santra A, Das Gupta J, De BK, Roy B, Guha Mazumder DN. Hepatic manifestation in chronic arsenic toxicity. *Indian J Gastroenterol*, 18:152-155 (1999).

Schaumloffel N, Gebel T. Heterogeneity of the DNA damage provokes by antimony and arsenic. *Mutagenesis*, 13:281-286 (1998).

Semenza JC, Weasel LH. Molecular epidemiology in environmental health: The potential of tumor suppressor gene p53 as a biomaker *Environ Health Perspect*, 105:155-163 (1997).

Shaulsky G, Goldfinger N, Tosky MS, Levine AJ, Rotter V. Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene*, 6:2055-2065 (1991).

Sielecki TM, Boylan JF, Benfield PA, Trainor GL. Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation. *J Med Chem*, 43:1-18 (2000).

Soussi T, Caron de Fromental C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*, 5:945-952 (1990).

Soussi T, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol*, 260:623-637 (1996).

Stewart ZA, Pietsenpol JA. p53 signaling and cell cycle checkpoints. *Chem Res Toxicol*, 14:243-263 (2001).

Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope T, Wahl GM. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J*, 18:1660-1672 (1999).

Sturzbecher HW, Bral R, Addison C, Rudge K, Remm M, Grimaldi M, Keenan E, Jenkins JR. A C-terminal alpha helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene*, 7:1513-1523 (1992).

Suzuki N, Wakisaka S, Takeba Y, Mihara S, Sakane T. Effects of cigarette smoking on Fas/Fas ligand expression of human lymphocytes. *Cellular Immunol* 192: 48-53 (1999).

Terada N, Lucas JJ, Gelfand WE. Differential regulation of the tumor suppressor molecules, retinoblastoma susceptibility gene product (Rb) and p53 during cell cycle progression of normal human T cells. *J Immunol*, 147:698-704 (1991).

Tokino T, Thiagalangam S, El-deiry WS, Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum Mol Genet*, 3:1537-1542 (1994).

Tondel M, Rahman M, Magnuson A, Choudhury IA, Faruque MH, Ahmad SA. The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh. *Environ Health Perspect*, 107:727-729 (1999).

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

Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J*, 17:4668-4679 (1998).

Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 93:15335-15340 (1996).

Waga S, Hannon GJ, Beach D. The p21 inhibitor of cyclin dependent of kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 369:574-578 (1994).

Wang P, Reed M, Wang Y, Mayr G, Stenger JE, Anderson ME, Schwedes JF, Tegtmeyer P. P53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol Cell Biol*, 13:5182-5191 (1994).

Waterman JL, Shenk JI, Halazonetis TD. The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *EMBO J*, 14:512-519 (1995).

Wogan GN. Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: Recent progress and avenues for future research. *Environ Health Perspect*, 98:167-178 (1992).

Wogan GN. Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Semin Can Biol*, 10:201-210 (2000).

Yager JW, Wiencke JK. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mutat Res*, 386:345-351 (1997).

Yang X, Lippman ME. BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *BR C Res Treatment*, 54:1-10 (1999).

Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coognan TP, Waalkes MP. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci*, 94:10907-10912 (1997).

Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mark DH, Levine AJ. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Gene Dev*, 14:981-993 (2000).

Zhou, BBS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408:433-439 (2000).