



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**
Instituto de Investigaciones Biomédicas

*“Caracterización de fragmentos de DNA
entrecruzadas con proteínas (DPC) inducidos
por NaAsO₂ en células hepáticas humanas”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTALES)**

P R E S E N T A

**BIOL. WENDY ARGELIA GARCÍA SUASTEGUI.
DIRECTORA DE TESIS: DRA MARIA EUGENIA GONSEBATT
BONAPARTE**

MÉXICO, D.F.

ENERO 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Este proyecto fue apoyado con una beca de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **CONACyT** numero 182425 y con una beca complemento otorgada por la **DGEP**.

La tesis se realizó en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección de la **Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte**. Y el comité tutorial integrado por:

Dr. Rafael Camacho Carranza
Dr. Víctor Manuel Valdés López.

“Tout ce qui est dans la limite du possible doit être et sera accompli”

Jules Verne

Agradecimientos

*A la UNAM, nuestra máxima casa de estudios porque me has dado las bases para desarrollarme como profesionista y como ser humano, por tu cálida hospitalidad, por el regalo de tus bastos espacios, por la oportunidad que me otorgaste de conocer a tanta gente maravillosa, por los idiomas, los deportes, los jardines, las salas de conciertos y cine; pero sobre todo **por permitirme ser parte de tu espíritu.***

*A la **Dra. Gonsebatt** : Por creer en mi, por todas sus enseñanzas, por el apoyo y confianza incondicional que siempre me ha brindado, por el esfuerzo y dedicación para la realización de este proyecto ... I found an incredible human being full of love and patience, your teachings will be with me for the rest of my life, thanks.*

*Al **Dr. Rafael Camacho**: a quien interrumpí y cuestioné varias veces a lo largo de esta investigación y de quien siempre recibí un trato amable y la solución a un gran número de dificultades. Gracias por su disposición y por haber aceptado ser parte de la dirección de este proyecto.*

*Al **Dr. Víctor Valdés**: Porque siempre da lo mejor en todas sus clases y porque a través de su pasión por descifrar los misterios de la vida, me motivó a caminar por el terreno de la investigación. Gracias por haber aceptado ser parte de la dirección de este proyecto.*

*Al **Dr. David Kershenovich** y la **Dra. Victoria Chagoya** por el apoyo que tan amablemente me brindaron y por sus valiosos comentarios que mejoraron este trabajo.*

*Al postgrado en ciencias Biológicas, a la dirección general de estudios de posgrado **DGEP** y al **CONACYT** por los apoyos que me otorgaron para realizar este proyecto.*

*Al programa de movilidad estudiantil que me otorgó un beca para realizar una estancia de investigación en la Universidad Autónoma de Granada. España. Al Doctor **José Luis Oliver** de la UGR, por sus enseñanzas y sobre todo por su cálida hospitalidad durante mi estancia en su laboratorio al igual que a **Michael** y **Christopher** colegas de Genética evolutiva.*

Quiero agradecer eternamente a todos los seres que estuvieron conmigo en esta aventura:

*A **mamá**, por ser más que eso; ya sabes que sin tu amor y consejos esto no sería, te amo y admiro como a nadie. A **papá**; me entusiasma mucho que cada día demuestras mas cuanto me quieres, eres mi inspiración. Los llevo en mi corazón y les agradeceré eternamente que hayan dedicado sus vidas para que yo accediera a una mejor. A mi hermana **Minerva**; por compartir cada momento, por tu entusiasmo, tolerancia y cariño....*

*Con todo mi corazón para mis abuelitas **Amparo** y **Margarita** que siempre tienen para mi más que una sonrisa, su gran fortaleza, paciencia, sabiduría y ternura me acompañan a cada paso. A mis abuelitos **Enrique** y **Samuel**, por su cariño y apoyo. A mis tío(a)s; Martín, Sandra, Alejandra, Sara, Vero, Rosa, Ivonne, Paty, Maru, Aurelio, Jesús, Oscar, Francisco, Alejandro... Juan, Ernesto, Jaime (donde estés..., te extraño), Paty G. Luis, Berta, Yolanda, Sergio, Lupe, Gloria y Lupe M.... a mis primo(a)s; Monse, Vanesa, Belén, Mauro, Nancy, Oscar, Karina, David, Danny, Yasmín, Dalía, Miguel, Saúl, Katia, Karla, Karen, Mónica, Iván, Jessie, Ursula, Luis Rene, Edna, Gina, Brandon, Alan, Ivan, Jessica, Omar, Liz,, Israel, Marisol, Nacho, Adriana, Toño, Evelin... a mis pequeños sobrinos; Andrea, Britney, Matzu, Brenda, Emiliano, Frida y Luisito*

*A la familia **Contreras Bautistista**, por su cariño y su cálida hospitalidad. A **Gonzalo**, mi ángel y el numero uno en mi corazón, por ser parte esencial de mi vida, por aguantarme y siempre estar... gracias por tolerar mi ausencia y hacerme entender de lo que soy capaz. Por los intensos viajes musicales, el volumen alto y la distorsión. Ahora se que la música es un lenguaje que nos conecta como seres humanos. Por tu increíble visión, sensibilidad y congruencia, por tantas sonrisas en ese inolvidable viaje. **Ah!** y también por hacer que brille siempre el sol I love you...*

*A **Olivia**, y **Juan Diego** por guiarme en su hermosa ciudad Andaluza y por llevarme al mundo mágico de los interminables juegos de rol. Conocerlos fue maravilloso y saben que espero su visita en México. A los vecinos de la residencia Emperador Carlos V donde disfrute una inolvidable estancia; Ana, Bego, Tatiana, Galya, Miguel, Mustapha, José María, Olga, Ursula, Sonia, y Wendoline. Que suerte conocerlos! ojalá podamos reencontrarnos...*

*A mis colegas y **amigos** por compartir el sueño de explorar los misterios de la vida: Tzutzuy, Lilia, Emilia, Luciana, Ana Lilia, Rodrigo, Abraham, Ericka, Pedro, Vero, Itzel, Carmen Leonor, Paty M., Leonides, Julieta, Silvia, Marypaz, Mónica, Pablo, Kenia, Juanita, Carlos, Edgar, Lupita y Ana Lilia T... To my partner Alberto, because without you my English class shouldn't be the same.*

*A mis **amigos** en el laboratorio: Valeria, Danny, Roxana, Jazmín, Paty, Elsa, Jorge, Gerardo, Blanca, Victor, Toño, Javier, Luis, Alan, Juan Carlos, Rebeca, Alicia, Sandra, Giovanna, Claudia, Isabel, Mariana, Cesar, Manuel, la Dra. Julieta, y mi querida maestra la Dra. Ma. Eugenia, por la fortuna de formar parte de este maravilloso equipo...*

INDICE

Resumen	7
Capitulo 1. Introducción	8
1.1 Entrecruzamientos DNA-Proteína (DPC)	8
1.2 Detección de DPC	9
1.3 Formación de DPCs	10
1.4 Agentes inductores de DPC	12
1.4.1 Formaldehído	12
1.4.2 Metales	12
1.4.3 Radiación ionizante	16
1.4.4 Especies reactivas de Oxigeno	16
1.5 Proteínas involucradas en los DPC	20
1.5.1 Entrecruzamientos de DNA con proteínas de reparación y replicación	24
1.5.2 Entrecruzamientos de DNA con la matriz nuclear	25
1.6 Reparación enzimática de DPC	26
1.6.1 Como se censan los DPC a nivel celular	28
1.6.2 Como se reparan los entrecruzamientos covalentes	28
1.6.3 Como se reparan los DPC inducidos por IR	33
1.7 Posibles implicaciones de los DPCs	35
1.8 Planteamiento del problema	36
1.9 Objetivos	36

Capitulo 2. Metodología y técnicas empleadas.

2.1 Cultivos de células	37
2.2 Tratamiento a las células Hep G2 con NaAsO ₂	37
2.3 Viabilidad celular	38
2.4 Aislamiento de complejos DNA-Proteína DPCs	38
2.5 Determinación de DNA por fluorescencia	39
2.6 Amplificación por PCR del DNA extraído de los DPC	39
2.7 Purificación de DNA amplificado mediante columnas	40
2.8 Secuenciación automática de DNA	41
2.9 Digestión de DNA con endonucleasas	
2.10 Búsqueda de secuencias repetidas (centroméricas, teloméricas y ribosomales) en el DNA de los DPC	42
2.12 Búsqueda de secuencias MARs en el DNA de los DPC	42

Capitulo 3. Resultados

3.1 Porcentajes de DNA entrecruzados con proteínas	44
3.2 secuencias de DNA identificadas en los DPC	44
3.2.1 Secuencia caracterizada mediante Random primers	45
3.2.2 Secuencias repetidas identificadas con primers específicos	
i. Secuencias α -satelite de centrómero.	47
ii. Secuencias de DNA ribosomal.	50
iii. Secuencias teloméricas	56
3.2.3 Secuencias MARs identificadas por Dot Blot	57

Capitulo 4. Discusión y conclusiones

Resumen.

Los entrecruzamientos DNA-Proteína (DPC) son resultado de uniones covalentes entre estas dos macromoléculas. Las proteínas presentes en los DPC, pueden unirse covalentemente al DNA directa o indirectamente. Directamente mediante mecanismos oxidativos mediados por radicales libres o indirectamente a través de un compuesto enlazante o mediante coordinación con un átomo metálico. Este fenómeno ocurre cuando las células se exponen a una amplia variedad de agentes citotóxicos, mutagénicos y carcinógenos entre los que se encuentra el Arsénico. Varias poblaciones humanas se encuentran expuestas a este metal, en el agua de bebida o por exposición ocupacional.

En el presente trabajo, con la finalidad de identificar las secuencias de DNA presentes en los DPC indujimos la formación de DPC en una línea celular hepática mediante tratamientos con Arsenito de Sodio (NaAsO_2), después del tratamiento las células mostraron una viabilidad de 84%. El NaAsO_2 a concentración de $1 \times 10^{-5}\text{M}$ indujo una proporción significativa de DPC *in vitro*, alcanzando un valor de 5.05% de DNA entrecruzado. El DNA entrecruzado con proteínas se aisló por precipitación selectiva empleando SDS-KCl según la técnica propuesta por Zhitcovich y Costa en 1993, posteriormente se degradaron las proteínas asociadas con el DNA con tratamientos de Proteinasa K, para recuperar el DNA e identificar las secuencias que forman parte de estos complejos.

Mediante amplificaciones por PCR, secuenciación automática y dot blot se identificaron secuencias repetidas (centrómeros, telómeros y genes ribosomales), así como secuencias de unión a Matriz nuclear (MARs) y una secuencia adyacente a los genes activadores de Guanilato Ciclasa en el cromosoma uno humano, entre las secuencias de DNA involucradas en los DPC inducidos por Arsénico. Se han propuesto mecanismos de reparación por escisión para eliminar DPC, sin embargo los DPC no reparados pueden bloquear funciones de la matriz nuclear, así como la replicación y la transcripción del DNA.

Abstract.

The DNA-Protein Crosslinks (DPC) are the result of covalent unions between these two macromolecules. The proteins can become cross linked to DNA directly or indirectly. Directly through oxidative free radical mechanisms or they can be cross linked indirectly through a chemical linker or through coordination with a metal atom. Such events occur following exposure of cells to a variety of cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic agents, including the arsenic. The effects of these lesions in the cells are not very well understood, although it is feasible that one DNA-Protein cross-links could interrupt the DNA metabolic machinery (transcription, repair and replication).

The objective of this work was the identification of specific sequences of DNA cross-linked with proteins. We induced the formation of DPC in a human liver cell line, by treatment with Sodium Arsenite (NaAsO_2) $10\mu\text{M}$ Arsenite induced a 5.05% of DNA-Protein crosslinks and the cell viability after to the treatments was 84%. The DNA crosslinked with proteins was isolated by selective precipitation with dodecyl sulfate/potassium SDS-KCl and proteinasa K according to the proposed technique by Zhitcovich and Costa in 1993. Finally the DNA was recovered by precipitation with ethanol.

DNA was amplified by PCR and identified by automatic sequencing and dot blotting with radioactive ^{32}P probes. Repeated genome sequences such as centromeric, telomeric and ribosomal were clearly identified. Also, we found Matrix attachment regions (MARs) and one adjacent sequence to the activator genes of Guanilato Ciclasa present in human chromosome one. These observations are interesting because they give us idea of the susceptible places to form DPC by exposure to arsenic. Besides, the presence of MARs sequences in DPC permits us to think that the expression of genes modulated by their attachment to the nuclear matrix can be affected by the agents that induce DPC.

Introducción.

Entrecruzamientos DNA-Proteína (DPC).

Los entrecruzamientos DNA-Proteína (DPC) son resultado de uniones covalentes entre estas dos macromoléculas. Este fenómeno ocurre cuando las células se exponen a una amplia variedad de agentes citotóxicos, mutagénicos y carcinógenos, entre los que se encuentran la luz UV y la radiación ionizante (IR), metales y metaloides como el cromo, el níquel y el **arsénico**; varios aldehídos (incluidos los metabolitos producidos en la peroxidación lipídica) y algunas drogas quimioterapéuticas incluido el cisplatino, el melfalan y la mitomicina C.

Los seres humanos estamos continuamente expuestos a agentes inductores de DPC presentes en el ambiente urbano, como el humo del cigarro y de los escapes de los automóviles, así como a los compuestos químicos industriales.

Las proteínas presentes en los DPC, pueden unirse covalentemente al DNA directa o indirectamente. Directamente mediante mecanismos oxidativos mediados por radicales libres o indirectamente a través de un compuesto enlazante o mediante coordinación con un átomo metálico formando complejos de tipo DNA-Metal-Proteína, como en el caso de los DPCs inducidos por cromo (Orlando V. *et al* 1997 y Olinski R. 1992).

Existen numerosos tipos de DPC químicamente distintos cuya formación esta influenciada además por el metabolismo y la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula, así como la temperatura. Además los distintos tipos de DPC pueden ser susceptibles en mayor o menor grado de diversos mecanismos de reversión y reparación y suelen tener distintas consecuencias celulares.

La formación de DPC se reduce en presencia de atrapadores de radicales hidroxilo (radical scavengers), en presencia de Oxígeno y con medios hipertónicos y su formación se incrementa en medios hipotónicos y cuando se remueve el glutatión intracelular. Se han propuesto mecanismos de reparación por escisión para eliminar DPC. Los DPC no reparados pueden bloquear funciones de la matriz nuclear, así como la replicación y la transcripción del DNA.

Detección de DPC.

Se han desarrollado diversas técnicas para la cuantificación de los DPC que difieren en su sensibilidad de detección. La inducción de DPC puede medirse empleando el ensayo cometa, puesto que el entrecruzamiento de proteínas al DNA retarda la migración de fragmentos de DNA, lo que resulta en una reducción en el tamaño del cometa (Roberts MJ. *et al* 2003). Sin embargo este método no permite aislar a los DPC y tampoco se puede diferenciar el retardo en la migración debido a uniones DNA-Proteína de las uniones DNA-DNA.

Los métodos de separación por gradiente por ejemplo CsCl o sacarosa (Tolstonog GV. 2001) se basan en la separación de DPC por densidad, de manera que los DPC se colocan entre las fracciones de DNA y de Proteínas. El método desarrollado por Zitkovich y Costa (1992) mide la inducción de DPC como la cantidad de DNA asociado a proteínas después de precipitar proteínas empleando dodecil sulfato de Sodio/Potasio (SDS/K⁺). Sin embargo empleando este método se precipitan proteínas que pueden no estar unidas covalentemente al DNA dado que el SDS se une selectivamente a las proteínas y después el K⁺ las precipita (con el DNA unido a ellas).

Un método alternativo para cuantificar DPC es aislando el DNA y midiendo las proteínas asociadas. La elusión alcalina consiste en atrapar moléculas de DNA de alto peso molecular (con las proteínas asociadas) en un filtro de policarbonato, mientras que las proteínas que no están unidas al DNA se eliminan mediante lavados (Ducore JM. 1988). Desafortunadamente recuperar los DPC de los filtros es difícil y poco reproducible. DNA geonómico total puede ser aislado empleando una mezcla de detergentes caotrópicos y precipitación con etanol. Este método puede combinarse con pasos adicionales de astringencia para eliminar las proteínas no unidas covalentemente y aislar exclusivamente las proteínas fuertemente unidas a DNA. Se han utilizado algunas variantes de este método para aislar y caracterizar proteínas de matriz nuclear entrecruzadas con el DNA por cisplatino (Samuel VA. *et al* 1998).

Parte de las dificultades para entender la relevancia biológica de los DPC, se debe a la falta de astringencia al momento de aislar DPC. Se sabe que las proteínas de matriz nuclear se encuentran asociadas a DNA; su disociación completa es crucial para la identificación de aquellas proteínas que se entrecruzan covalentemente con el DNA por efecto de exposición a determinados agentes. Algunas de estas proteínas son entrecruzadas en bajo número. Esto dificulta aislarlas en cantidad suficiente para secuenciarlas e identificarlas.

Adicionalmente los límites de detección de los distintos métodos empleados ha contribuido a la variación en los resultados. Diversos estudios han empleado la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE) para la identificación de proteínas entrecruzadas con el DNA en muestras de DPC o en fracciones de matriz nuclear. Adicionalmente el surgimiento de la proteómica que combina la capacidad de análisis de 2-D PAGE con las tecnologías de secuenciación de proteínas puede facilitar la identificación de dichas proteínas.

Formación de DPCs.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por exposición a radiación ionizante (IR) pueden generar la formación de radicales libres en los aminoácidos de las proteínas y en las bases del DNA. Uno de los mecanismos de formación de DPC inicia con la creación de un radical libre proteico que se forma por la sustracción de un átomo de H de un aminoácido por un radical OH, seguido de la adición de este radical aminoácido a la posición 6 de la timina y la oxidación del aducto resultante. Los DPC pueden formarse por la adición del radical proteína al DNA o viceversa, o por una combinación de dos radicales.

La exposición de las proteínas a ROS puede generar hidroperóxidos proteicos y otras especies proteicas reactivas. En estudios *in vitro* usando proteínas purificadas (insulina, α -caseína, apotransferrina y albúmina de suero bovino BSA) irradiadas en solución acuosa en presencia de oxígeno u óxido nítrico, se generan hidroxiperóxidos proteicos que se pusieron en contacto con plásmidos de DNA para inducir la formación de DPC que fueron detectados por retardamiento en la migración de los plásmidos en geles de agarosa.

En otros trabajos, se ha examinado el papel de especies reactivas proteicas generadas en presencia de ácido hipoclorico HOCl (un oxidante que se produce metabólicamente cuando hay actividad fagocítica), en la formación de DPCs. El HOCl puede reaccionar con los grupos amino de las proteínas, generando cloraminas que actúan como radicales proteínicos que pueden reaccionar con el DNA. El HOCl también puede interaccionar con el DNA y formar cloraminas (Hawkins *et al.* 2002).

Mediante estudios de espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica Hawkins y sus colaboradores investigaron la formación de DPCs inducidos por HOCl en nucleosomas de células eucariontes y observaron que la reacción de radicales proteínicos con nucleósidos pirimídicos resulta en la formación de un enlace covalente DNA-proteína. Estos autores señalan que HOCl, reacciona predominantemente con proteínas y no con DNA y entre 50 y 80% de las reacciones ocurren con residuos de histidina o lisina. La formación de aductos disminuyó en presencia de atrapadores de radicales libres (radical scavengers), lo que sugiere que los radicales libres están involucrados en dicha reacción.

Se han revelado pasos similares en la formación de DPC inducidos *in vitro* por malondialdehído (un metabolito de la peroxidación lipídica). Poniendo primero a reaccionar malondialdehído con uno de los componentes de los DPCs (DNA ó proteínas) en solución acuosa, después eliminando el material no reactante y agregando el segundo componente no modificado (DNA ó Proteínas) Voitkun V. y Zhitkovich A. en 1999, demostraron que aparentemente el malondialdehído reacciona primeramente con las proteínas haciéndolas reactivas y estas a su vez reaccionan con el DNA formándose una unión covalente entre ambas moléculas. Estos resultados sugieren la formación de un radical de DNA o proteína como el primer paso en la formación de DPCs *in vitro*. Aun queda averiguar cual es el mecanismo que predomina *in vivo*.

Agentes inductores de DPC

Formaldehído

El formaldehído es un agente inductor de DPC ampliamente estudiado. El formaldehído puede reaccionar con grupos amino, grupos tiol, grupos hidroxilo y amido para formar distintos tipos de aductos pero el principal tipo de lesión en el DNA por este compuesto son los DPCs (Ma TH. 1988). La inducción de DPC por formaldehído involucra la reacción del formaldehído con grupos amino e imino de las proteínas (por ejemplo con lisinas y argininas) o de ácidos nucleicos (por ejemplo citosina) generándose bases reactivas que reaccionaran con otros grupos amino (figura 1).

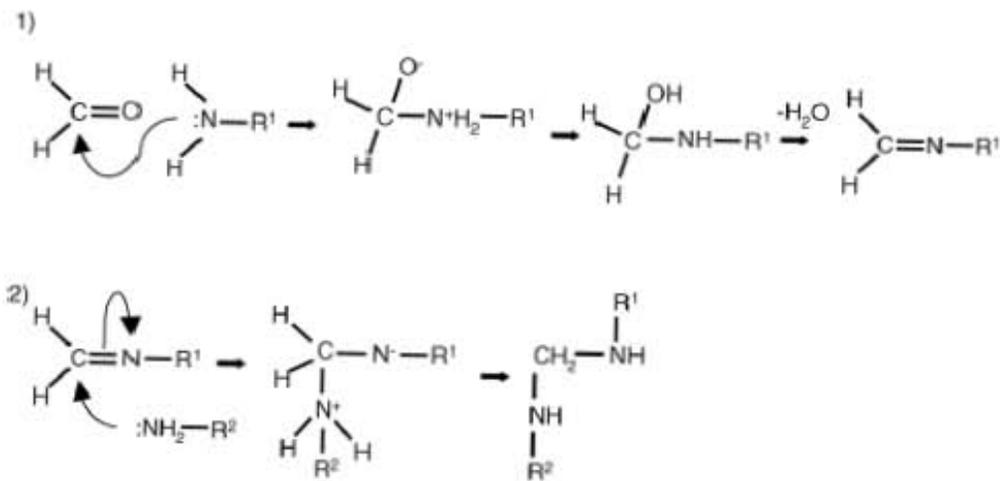


Figura 1. Mecanismo entrecruzador del formaldehído. En esta figura se observan los pasos de la reacción entre el formaldehído y con un grupo amino formándose una base reactiva (paso 1), que posteriormente puede reaccionar con otro grupo amino o con una base del DNA y formar un aducto (McGhee J.D y Von Hippel P.H. 1975).

Metales.

Entre los agentes inductores de DPC se encuentran contaminantes ambientales y ocupacionales que tienen un gran número de componentes metálicos entre ellos el níquel, el cromo y el arsénico. Estos elementos son capaces de formar distintos tipos de entrecruzamientos entre DNA y Proteínas.

El análisis de los DPC inducidos por iones metálicos, demostró que no todos los supuestos DPC se deben a enlaces covalentes (Mattagajasingh SN. 1999) y que un agente puede inducir más de un tipo químico de entrecruzamientos. Algunas proteínas entrecruzadas se liberaron mediante tratamientos con EDTA, lo que indica que no estaban unidas covalentemente al DNA. Algunas proteínas se liberaron mediante tratamientos con tiourea, lo que indica que estaban unidas al DNA mediante enlaces sulfhidrilo. La mayoría de los DPC inducidos por RI no fueron reversibles con EDTA o tiourea y se liberaron exclusivamente mediante digestión con DNasa I lo que sugiere que se trataba de entrecruzamientos de tipo covalente formados a través de mecanismos oxidativos. Algunos DPC inducidos por cromato también fueron resistentes a tratamientos con EDTA y Tiourea y fueron de igual manera considerados uniones covalentes que se formaron vía ROS.

El ión **níquel** tiene una alta afinidad por las proteínas, especialmente por residuos de histidina, cisteína y ácido aspártico (Chakrabarti SK. *et al* 1999 y 2001). En el estudio de Chakrabarti los DPC se aislaron por precipitación selectiva empleando SDS/K⁺ de linfocitos de rata tratados con distintos compuestos de níquel. La co-incubación de linfocitos con los compuestos de níquel y cualquier quelante de metales, aminoácidos libres o atrapadores (scavengers) de especies reactivas de oxígeno disminuyó la producción de DPC.

Zhitkovich y sus colaboradores reportaron en 1996 que una proporción considerable (el 50% a dosis biológicamente relevantes) de los DPC inducidos por **chromo** fueron complejos de tipo DNA-Metal-Proteína. Los aminoácidos más frecuentemente involucrados en estos complejos fueron cisteína, histidina y ácido glutámico. Analizaron las reacciones de cisteína e histidina con cromo trivalente Cr(III) o hexavalente Cr(VI) y demostraron que el Cr(VI) puede ser reducido a Cr(III) y puede asociarse primero a un aminoácido antes de reaccionar con el DNA para formar un entrecruzamiento. No se formaron entrecruzamientos entre el DNA y los aminoácidos cuando se incubó el DNA con Cr(III) y posteriormente se eliminó el Cr(III) que no había reaccionado para agregar finalmente a las proteínas.

Adicionalmente estos investigadores hicieron reaccionar el complejo Cr(III)-Histidina con nucleósidos y nucleótidos monofosfatados y demostraron que los nucleótidos pueden formar entrecruzamientos mientras que los nucleósidos no, lo que demuestra que el grupo fosfato es esencial para la reacción de entrecruzamiento. Sin embargo estos entrecruzamientos inducidos entre aminoácidos y nucleótidos aislados, pueden no ser iguales a aquellos que se forman *in vivo*. Los diferentes tipos de DPC inducidos mediante tratamientos con cromo (enlaces sulfhidrilo, complejos DNA-Metal-Proteína y enlaces generadas por ROS) plantea una cuestión interesante sobre si otros agentes inductores de DPC pueden generar más de un tipo de entrecruzamiento y acerca de los factores que pueden influir en la producción de los varios tipos de entrecruzamientos que pueden ser producidos por un determinado agente.

En el presente trabajo, empleamos Arsenito de Sodio **NaAsO₂** como agente inductor de entrecruzamientos, puesto que se ha demostrado que es capaz de inducir DPC en líneas celulares hepáticas (Ramírez P *et al* 2000) considerando además que existen diversas poblaciones humanas expuestas ambiental u ocupacionalmente a Arsénico y la identificación de secuencias de DNA entrecruzadas con proteínas por exposición a Arsénico nos daría una idea de los mecanismos de daño de este carcinógeno.

El Arsénico puede ser liberado al ambiente por actividad volcánica y erosión de depósitos minerales. Además de su ocurrencia natural, existen actividades humanas que emiten Arsénico al medio ambiente, tal es el caso de combustibles fósiles (carbón, madera), estaciones generadoras de energía eléctrica, procesos de fundición y refinación de metales no ferrosos (Plomo, Zinc, Cobre), el uso de preservadores para la madera, la manufactura de semiconductores para la industria electrónica elaborados a base de arseniuro de Galio (GaAs) e indio (InAs) y los depósitos de desechos químicos con grandes cantidades de Arsénico almacenadas inadecuadamente. Se ha utilizado de una forma u otra como pesticida y herbicida; en la manufactura de vidrio, pigmentos, pinturas y aleaciones. El mortal gas Arsina (AsH₃) es usado en la manufactura de microchips en la industria de semiconductores.

Las concentraciones de Arsénico en el aire en sitios alejados de actividades antropogénicas son de 1 a 3 ng/m³ mientras que, en áreas industriales emisoras de Arsénico, los niveles de este elemento pueden ser de 100 hasta 300ng/m³. Las concentraciones de As en el agua son usualmente menores a 10 µg/L, mientras que, en sitios cercanos a minas o contaminados con minerales arsenicales, fluctúan entre 200 y 1000 µg/L. Las concentraciones de Arsénico en el suelo varían de 1 a 40 mg/Kg y, en áreas agrícolas, pueden ser aun más altas por la presencia de residuos de plaguicidas arsenicales.

La ingestión de Arsénico en el agua de bebida (principalmente Arsénico inorgánico) es una fuente de exposición muy importante para algunas poblaciones, por lo que puede ser un problema grave de salud pública. Este problema ha sido descrito en Taiwán, Chile, Argentina, México e India; en todas las regiones afectadas por la presencia de As en el agua de bebida se rebasa varias veces el límite máximo permisible para el agua de bebida (50 µg As/L).

El **arsénico**, induce varios tipos de cánceres en humanos, entre ellos, cáncer de piel, pulmón, vejiga e hígado (IARC 1980, Chen CJ. *et al.* 1992, Gonshebbatt ME. *et al.* 1997). El elemento es reducido y metilado principalmente en células hepáticas a través de reacciones que requieren glutatión celular reducido (GSH), generándose formas reactivas intermediarias (Stybło M. *et al.* 1995, Clewel 1999) que pueden conducir a la formación de DPCs.

El Arsénico trivalente (+3) se une con fuerza a los grupos sulfhídricos de las proteínas, y puede acumularse en tejidos con alto contenido de queratinas. Esto explica su persistencia en cabello y uñas como consecuencia de su unión a los grupos sulfhidrico de la queratina (Squibbo y Fowler1983) este metaloide también interfiere con numerosos sistemas enzimáticos, incluso en los relacionados con la respiración celular, el metabolismo del GSH y la reparación del DNA (Albores *et al.*, 1997).

Ramírez y colaboradores en 2000 investigaron la inducción de DPCs por arsenito (As trivalente) en la línea celular WRL-68, de hepatocitos humanos y encontraron que las citoqueratinas (debido a su alto contenido de grupos SH) se encuentran presentes en los DPCs. En este estudio se identificaron varias citoqueratinas por inmunoblot entre ellas, la citoqueratina 18, un filamento intermedio propio de hígado. Además reportaron que la formación de DPCs inducidos por arsenito es dosis dependiente y estos entrecruzamientos fueron sensibles a digestión por nucleasas y a altas concentraciones de sales, o que indica que la naturaleza química de las uniones puede ser de tipo covalente (las sensibles a digestión por nucleasas) o electrostáticas (las que se revierten con altas concentraciones de sales).

En diversos estudios se ha demostrado que compuestos inorgánicos de Arsénico son capaces de inducir efectos dependientes de la síntesis de DNA, como aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas por intervenir en procesos de ligación, en linfocitos humanos y en células embrionarias de hámster de manera dosis dependiente. Los arsenicales son capaces de inducir entrecruzamientos DNA-proteínas y rupturas en el DNA de células de mamífero (Wedrychowski *et al.* 1986; Dong y Luo, 1993, Ramírez P. *et al.* 2000).

Radiación Ionizante (IR) y especies reactivas del Oxígeno (ROS).

La exposición de células a IR promueve la generación de ROS próximos entre sí y con el DNA (figura 2). Muchas de estas ROS incluido el extremadamente reactivo radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), se generan en altas proporciones en regiones discretas conocidas como "spurs". Cuando esas regiones o nubes de ionización densa sobrelapan a la molécula de DNA pueden generar múltiples sitios de lesiones o daño al DNA como son rompimientos en una de las cadenas (SSBs por sus siglas en ingles single strand breaks), rompimientos en las dos cadenas (DSBs por sus siglas en ingles double strand breaks), pérdida de algunas bases, entrecruzamientos DNA-DNA o DPCs que se generan a corta distancia unos de otros en el DNA. Midiendo las proporciones de los distintos tipos de daño a DNA en células expuestas a IR, se observó que la producción de DPC fue de ~150/célula por Gy y fue la proporción más alta en comparación con DSBs que fue de 20-40/célula por Gy y la de entrecruzamientos DNA-DNA ~30/célula por Gy (Woudstra EC. 1999).

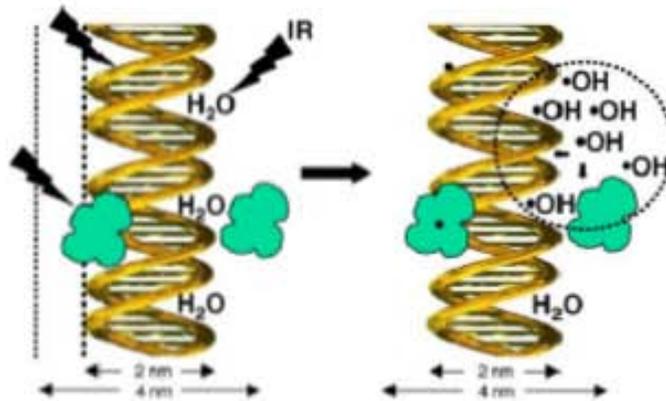


Figura 2. Generación de ROS por IR.- La radiación Ionizante directamente puede ionizar DNA o proteínas generando radicales de estas macromoléculas. Indirectamente puede ionizar moléculas de agua generando radicales hidroxilo que pueden reaccionar con el DNA o proteínas volviéndolos reactivos. El círculo punteado representa un "spur" y los glóbulos representan proteínas. Tomado de (Mozumder A. 1985).

Estudios de Fornace y Little (Fornace AJ y Little JB. 1979) empleando elusión alcalina demostraron la inducción de DPC en altas dosis de radiación X en células humanas aireadas. Ellos también demostraron un incremento en la inducción de DPC bajo condiciones de hipoxia. Meyn y sus colaboradores (1987) observaron algo parecido en células de ovario de Hámster chino (CHO) y Radford usando células L de ratón (Radford IR. 1986). Zhang y sus colaboradores (1995) han sugerido que los niveles de formación de DPC que se forman en concentraciones de oxígeno por encima de 1% son mínimos en comparación con los niveles que se forman en concentraciones de oxígeno menores a 0.1% y que las células oxigenadas son 10-100 veces menos susceptibles a formar DPCs que las células hipóxicas. De la misma forma, se ha examinado la correlación entre oxigenación e inducción de DPC en células CHO expuestas a radiación gamma y encontraron que la producción de DPCs disminuye conforme los niveles de oxígeno aumentan (figura 3). Posiblemente se deba a que sin oxígeno se altera el metabolismo de reparación de lesiones en el DNA, es bien conocido que los niveles de defensa contra radicales libres se abaten en presiones parciales bajas de O_2 . La producción de DPC en las células irradiadas disminuye considerablemente con la introducción del oxígeno, en cambio la muerte celular aumenta al disminuir los niveles de oxígeno bajo estas condiciones (Sharon B. *et al.* 2005).

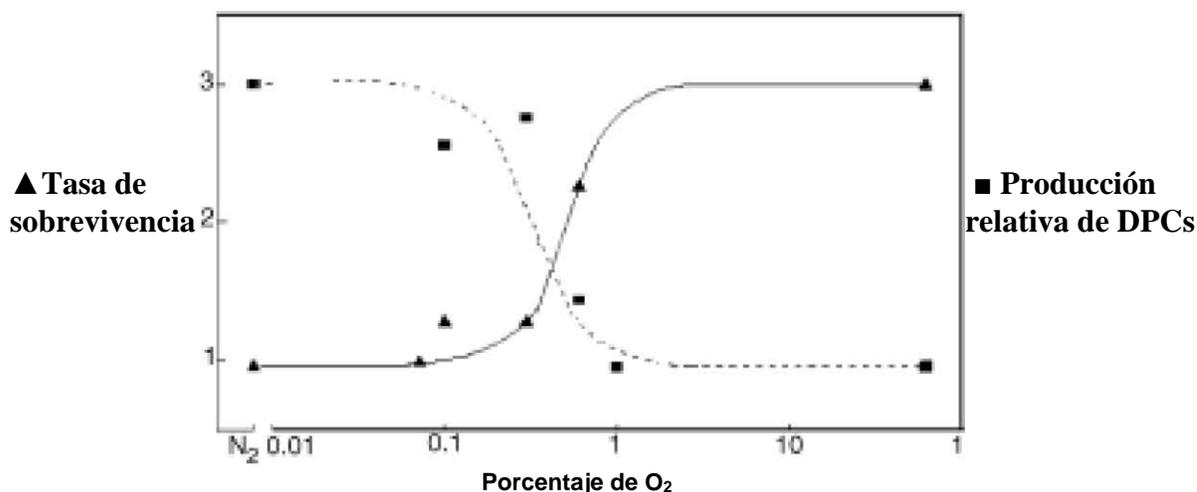


figura 3. Dependencia del Oxígeno en la formación de DPC (cuadros) y sobre vivencia de las células (triángulos) en células AA8 CHO irradiadas con radiación gamma. Los DPC fueron medidos con el ensayo de elusión alcalina y la supervivencia con el ensayo de formación de colonias. El eje X representa el porcentaje de oxígeno en la mezcla de gases. La suspensión celular se realizó a 4° C , mientras que las células se mantuvieron en una mezcla con 5% CO₂ variando las concentraciones de O₂ balanceando con N₂ tres horas antes de la irradiación (Sharon B. *et al.* 2005)

Para entender las consecuencias celulares de los DPCs y averiguar sus posibles vías de reparación es importante estudiar la química de estos aductos. Diversos trabajos en modelos libres de células, han demostrado la naturaleza covalente de los DPC inducidos por radiación y la estructura química de algunos DPC se ha determinado empleando cromatografía de gases y análisis de espectroscopía de masas (GC/MS) (Gajewski E. *et al.* 1988, Dizdaroglu M. *et al.* 1989). En estos trabajos se examinan mezclas acuosas de timina y algunos aminoácidos (lisina, glicina, alanina, valina, leucina, Isoleucina, tirosina y treonina) sometidas a radiación gamma y demuestran que algunos aminoácidos (lisina-tirosina) se involucran con mayor frecuencia en los DPCs. La presencia de estos aminoácidos en los DPC también se demostró *in vitro* en mezclas irradiadas de nucleohistonas de timo de ternera.

Se ha analizado la formación de DPC *in vivo* mediante GC/MS empleando cultivos de células de mamífero (Altman SA. *et al.* 1995) y tejido renal de rata (Toyokuni S. *et al.* 1995), detectándose entrecruzamientos timina-tirosina en ambos trabajos (figura 4). Tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* la inducción de DPCs incrementa linealmente con la dosis de radiación. La inducción de DPCs mediante tratamientos con peróxido de hidrógeno en cultivos celulares también resultó dosis dependiente (Olinsky R. *et al.* 1992) de la misma forma que los DPCs inducidos por arsenito en hepatocitos humanos (Ramírez P. *et al.* 2000).

Dizdaroglu y colaboradores en 1989 propusieron que el radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$ esta involucrado en la formación de DPCs inducidos por iones ferrosos, peróxido de hidrógeno o radiación ionizante. Los radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS) se generan por reacciones biológicas redox y bajo condiciones que provocan estrés oxidativo como la malnutrición, numerosas enfermedades, la exposición a determinadas drogas y la contaminación ambiental.

El mecanismo de entrecruzamiento involucra la extracción de un átomo de H del grupo metilo de la timina por el radical $\cdot\text{OH}$ y la adición del radical timina resultante al carbono de la posición 3 del anillo de tirosina y la oxidación del aducto resultante (Dizdaroglu M. *et al.* 1989) como se muestra en la figura 4. Entrecruzamientos entre timinas y tirosinas fueron detectados por IR en dosis menores a 0.1Gy y la producción de DPCs mostró ser lineal hasta 100Gy.

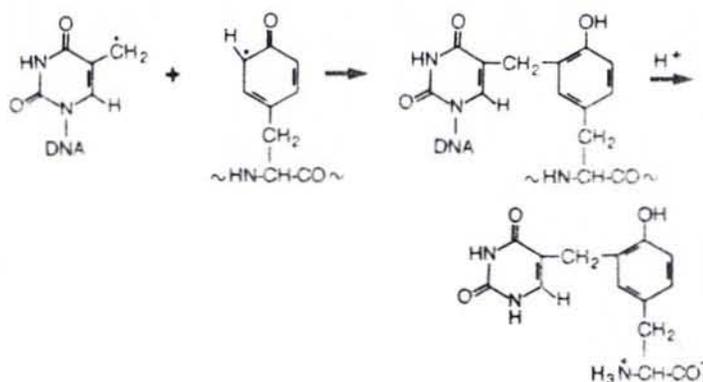


Figura 4 . Los radicales hidroxilo inducen entrecruzamientos DNA- Proteína involucrando una timina y una tirosina. La formación de este aducto ocurre como resultado de la extracción de un átomo de H por un radical OH, del grupo metilo de la timina, seguido por la adición del radical timina resultante al carbono 3 de la tirosina y finalmente la oxidación del aducto resultante (Dizdaroglu M. *et al.*, 1989)

La reacción del radical OH con timina, ocurre principalmente en el doble enlace entre los carbonos 5 y 6 (~ 60% y ~30% respectivamente en las posiciones 5 y 6) y la abstracción del H del grupo metilo de la tirosina solo ocurre en el 10% de las veces.

Se tiene gran interés en identificar las proteínas que se entrecruzan con el DNA in vivo. El hecho de que se hayan identificado los principales aminoácidos involucrados en los DPCs puede ayudar a determinar la identidad de las proteínas presentes en los DPCs analizando su composición y si establecen contacto con el DNA.

Proteínas involucradas en los DPC.

Identificar a las proteínas que se entrecruzan con el DNA por exposición a agentes genotóxicos nos permitirá entender las consecuencias biológicas de los DPCs y probablemente inducir sus mecanismos de reparación. Un gran número de investigadores han intentado identificar dichas proteínas utilizando sistemas *in vitro* con proteínas y DNA purificados o aislando DPCs de células expuestas a genotóxicos. Varias proteínas han demostrado ser capaces de entrecruzarse con DNA *in vitro*, pero la relevancia de esta información en una situación *in vivo* es incierta. Algunos reportes sugieren que *in vivo* solo las proteínas con dominios de unión a DNA se pueden entrecruzar con este, mientras que otros sugieren que casi cualquier proteína puede potencialmente entrecruzarse con el DNA.

Entre las proteínas biológicamente relevantes que se han encontrado formando parte de los DPC *in vivo*, se encuentran: actina, lectina, aminoglucósido nucleotidil transferasa, histonas, proteínas de choque térmico (GRP-78), citoqueratinas, vimentina, proteína disulfido isomerasa, factores y cofactores de transcripción como el receptor de estrógeno, desacetilasas de histona 1, hnRNPK, HET/SAF-B (tabla 1).

Se identificaron las proteínas entrecruzadas con el DNA en células tratadas con cromo o IR, aislando DPCs por el método de precipitación selectiva con SDS/K+, Urea. Posteriormente el DNA se digirió con DNasa 1 y las proteínas aisladas se analizaron por 2D-SDS-PAGE (que permite una identificación de proteínas en base a su peso molecular y PI y se confirma usando métodos inmunológicos). En este estudio se identificaron 20 proteínas, entre las más abundantes está la actina (20% del total de proteína), la aminoglucósido nucleotidil transferasa y la lectina (Mattagajasingh S. N y Masra H. P 1996).

De igual forma Miller y colaboradores en 1991 demostraron el entrecruzamiento de actina al DNA en células de Hámster expuestas a cromo o cisplatino. La actina también se encontró entrecruzada con el DNA en células de riñón bovino y células humanas de carcinoma mamario expuestas a alcaloides (Coulombe RAJ. *et al.* 1999). Fue también una de las principales proteínas entrecruzadas con el DNA en células tratadas con cisplatino y mitomicina C. En el estudio de Vander Waal y colaboradores (2002), se demostró mediante métodos inmunológicos que el cisplatino induce el entrecruzamiento de al menos 4 proteínas con el DNA en células humanas entre ellas la disulfuro isomerasa.

Proteína	Agente entrecruzador	Referencia
Actina.	Cromo	Miller C.A. (1991) Mattagajasingh S.N. (1999)
	Cisplatino Mitomicina C Pirrolicidina Alcaloides	Coulombe R.A. (1999)
Lectina.	Cromo	Miller C.A. (1991)
Aminoglicosido Nucleotidil transferasa.	Cromo	Miller C.A. (1991)
Histonas H1, H2A H2B, H4.	Formaldehído	O'Connor P.M. (1989)
Histona H3	Formaldehído Gilvocarcina V	O'Connor P.M. (1989) Matsumoto A. (2000)
Proteína 78 regulada por glucosa	Gilvocarcina V	Matsumoto A. (2000)
Citokeratinas	Arsénico	Ramirez P. (2000)
Vimentina	Formaldehído Bioproductos metabólicos	Tolstonog G.V. (2001) Tolstonog G.V. (2001)
Proteína disulfido-isomerasa	Cisplatino	Valder Waal R.P. (2002) Samuel S.K. (1998)
Deacetilasa de Histona 1	Cisplatino	

Tabla 1. Proteínas entrecruzadas con DNA por distintos agentes genotóxicos.

Se han reportado diversas proteínas entrecruzadas con el DNA por tratamientos con arsénico. Aislado DPC de células hepáticas humanas bajo tratamientos con NaAsO₂ por el método de precipitación selectiva de segmentos de DNA unidos fuertemente a proteínas empleando SDS/KCl y separando las proteínas por SDS-PAGE se verificó la presencia de citoqueratinas mediante anticuerpos (Ramírez P. *et al.* 2000). Sin embargo con las concentraciones de NaAsO₂ empleadas en ese estudio, los DPC pueden revertirse con concentraciones altas de sales, lo que sugiere que se trata de asociaciones no covalentes entre las 2 macromoléculas.

La proteína estructural vimentina que forma parte del 'andamiaje' nuclear se ha encontrado en DPC inducidos por formaldehído. Sin embargo la vimentina puede desprenderse del DNA por calor, lo que indica que no se trata de una asociación

covalente debido a su naturaleza termolábil. La vimentina también se encontró entrecruzada con DNA en células sometidas a estrés oxidativo y células senescentes, lo que sugiere que otros subproductos del metabolismo también inducen el entrecruzamiento de esta proteína con el DNA.

La histona H3 y la proteína de choque térmico GRP-78 se han identificado por inmunoblotting en DPCs en fibroblastos humanos inducidos por gilyvorarcinas (antibióticos antitumorales naturales). No hay consenso entre los reportes donde se detectan proteínas histonas involucradas en los DPC. Miller y colaboradores en 1991 trataron una mezcla de actina e histonas con un bacteriófago de DNA y compuestos de cromo *in vitro* y encontraron que las histonas no se entrecruzan con el DNA con la misma eficiencia que la actina. Probablemente su resultado se deba al hecho de que el cromo tiene una gran afinidad por los grupos sulfhidrilo por lo que induce entrecruzamientos a través de estos grupos, pero hay muy pocos grupos sulfhidrilo en las proteínas histonas (Mattagajasingh SN. y Misra HP. 1996).

Sin embargo las histonas se han encontrado abundantemente en los DPC inducidos por formaldehído, estas proteínas se entrecruzan con el DNA mediante enlaces entre grupos aminos (O' Connor PM y Fox BW 1989; Singer B. y Grunberger D. 1983; Millar CA. y Costa M 1989). Las histonas de mamífero se entrecruzan fuertemente con el DNA en presencia de aldehídos tanto en células como en sistemas libres de células (Quievryn G. y Zhitkovich A. 2000; Voitkun V. y Zhitkovich A. 1999; Kuykendall JR. y Bogdanffy MS. 1992, Kuykendall JR. y Bogdanffy MS. 1994).

La elección del agente inductor de DPC puede explicar porque en algunos trabajos se reportan histonas fuertemente entrecruzadas con el DNA mientras que en otros no. La inducción de entrecruzamientos DNA-histonas por IR es controversial. Algunos trabajos (Gajewski E. *et al.* 1988 y Dizdaroglu M. *et al.* 1989) han demostrado que la IR promueve entrecruzamientos DNA-histonas *in vitro* de manera dosis dependiente.

Mee y Adelstein (1981) examinaron la inducción de DPC por radiación empleando fibroblastos de pulmón de hámster y mostraron que el núcleo de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) son las proteínas más abundantemente involucradas en los DPCs. La falta de consenso entre los trabajos de inducción de entrecruzamientos DNA-histonas se debe al

hecho de que en cada estudio se utilizan distintos métodos de inducción, aislamiento y cuantificación de DPCs. Considerando que los agentes inductores de DPCs tienen distintos mecanismos de acción, es posible que las histonas solo sean sustrato para algunos tipos de reacciones.

Distintos métodos de aislamiento y análisis pueden fracasar en la detección de proteínas poco abundantes entrecruzadas con el DNA y la detección también puede ser afectada por la solubilidad de dichas proteínas. Las proteínas HMG son sumamente móviles (Agresti A y Bianchi ME. 2003) y abundantes, frecuentemente se asocian al DNA de manera transitoria y ocasionalmente pueden quedar “atrapadas” en una reacción de entrecruzamiento. Estas proteínas desempeñan importantes funciones modificando la compactación de la cromatina para promover el acceso a nucleosomas además de estimular la replicación y la transcripción (Bustin M. 2003). La alta afinidad de las proteínas HMG por el DNA dañado incrementa la probabilidad de eventos de entrecruzamiento durante tratamientos prolongados con sustancias genotóxicas. Las proteínas HMG se han identificado entrecruzadas *in vitro* con un sustrato sintético de DNA dañado con Oxido Nítrico (Nakano T. *et al.* 2003).

Rajski SR. y colaboradores en 1998 y 2000 aislaron complejos HMG-DNA de células tratadas con las drogas antitumorales FR-66979 y FR-900482 (y no en las células sin tratamiento) empleando un anticuerpo contra HMG. En este estudio, las proteínas entrecruzadas se liberaron del DNA por digestión con proteinasa K, lo que dificulta determinar si la unión entre las dos macromoléculas es o no de naturaleza covalente. Se ha demostrado que la afinidad de la proteína HMG-B1 por el DNA no dañado es muy débil, mientras que su afinidad por estructuras inusuales del DNA es muy fuerte (Agresti A. y Bianchi ME. 2003). Las proteínas se unen fuertemente al DNA dañado por cromo y forman complejos HMG-Cr-DNA muy estables en 0.5M de NaCl (Wang JF. *et al.* 1997) y la afinidad de HMG-B2 por DNA modificado por cisplatino es 10 veces más estable (Billings PC. *et al.* 1992).

Entrecruzamientos de enzimas de replicación y reparación con el DNA.

Se han demostrado experimentalmente, entrecruzamientos entre proteínas de reparación y replicación del DNA con su sustrato. El ácido hipoclorito HOCl es capaz de entrecruzar DNA purificado monocatenario con proteínas con dominios de unión a DNA *in vitro* (Kulcharic PA. y Heinecke JW, 2001). El metilglioxal induce entrecruzamientos entre el fragmento Klenow purificado y un sustrato sintético de DNA (Murata-Kamiya N. y Kamilla H. 2001).

La lesión 2 deoxiribonolactona, es un sitio abásico producido por una variedad de agentes que dañan el DNA incluida la IR. Sustratos de DNA con esta lesión se incubaron en reacciones separadas con distintas proteínas: Endonucleasa III de *Escherichia coli*, endonucleasa VIII, FPG (formamidopirimidina glicoxilasa) o NEIL 1 una glicosilasa de DNA de mamífero (Rosenquist TA. *et al.* 2003), dando como resultado el entrecruzamiento de cada una de dichas proteínas con el sitio de lesión del sustrato (Hashimoto M *et al.* 2001). Otro estudio demostró que la lesión 2 deoxiribonolactona se puede entrecruzar con la DNA polimerasa β (DeMott MS. *et al.* 2002).

El óxido nítrico NO es un producto de la inflamación y un conocido factor de riesgo para muchos tipos de cáncer. El NO induce daño genético incluyendo DPCs (Suzuki T. *et al.* 2000). Un tipo de daño a DNA inducido por la nitrosación de la guanina por NO es la formación de oxanina (Oxa). Cuando se incubó un duplex sintético de DNA que contenía sitios Oxa con proteínas de reparación, se observaron entrecruzamientos covalentes entre los sitios Oxa y las proteínas de reparación del DNA (Nakano T. 2003). Las proteínas de reparación de *E. coli*: Endo VIII, Fpg, Alka y la de mamífero hOGG1 (Que reconoce y se une a las bases dañadas), forman DPC rápidamente, mientras que histonas y proteínas HMG forman DPCs más lentamente en *E. coli*. La proteína Endo III de *E. coli* y hNTH1 y mMPG de mamífero, no formaron DPCs en *E. coli*.

La inactivación por calor de enzimas glicosilasas previa a su incubación con su sustrato con sitios Oxa inhibió la formación de DPC, lo que indicó que se requiere de la forma activa de dicha enzima para la formación de DPC. Sin embargo, en el caso de las

histonas, su inactivación con calor previa a la incubación con el DNA no influyó en la formación de DPC. La formación de DPC fue detectada por retardamiento en la migración de DNA en geles de electroforesis (estos estudios *in vitro* emplean grandes concentraciones de proteínas purificadas y pueden no reflejar lo que sucede en los sistemas biológicos).

Dichos resultados sugieren que algunos tipos de daño al DNA son sustratos reactivos para las enzimas de reparación y al entrar en contacto ambas moléculas se genera un daño adicional, los DPCs, que previenen su propia reparación. Sin embargo no es claro si las proteínas HMG se unen al DNA dañado para reclutar factores de reparación como en el caso de HMG de unión a desoxiguanosina en el DNA (Krynetski E.Y. *et al.* 2003), o se unen al DNA dañado inespecíficamente porque reconocen un sitio de unión, convirtiéndose en un escudo para la reparación del DNA como en el caso de la unión de HMG al DNA alterado por cisplatino (Nagatani G. *et al.* 2001).

Es importante determinar cuales son las proteínas responsables de reconocer los distintos tipos de DPC y activar su reparación. Claramente el entrecruzamiento de las enzimas de reparación con su sustrato, interfiere negativamente con los procesos de reparación. Es muy probable que el reparosoma que se desplaza a lo largo del DNA buscando lesiones en su sustrato, quede atrapado al unirse covalentemente a este.

Entrecruzamiento del DNA con la matriz nuclear.

La matriz nuclear es una red tridimensional necesaria para la organización del DNA y la estructura y función nuclear. Esta estructura está constituida por la membrana nuclear, la lámina nuclear, las proteínas del poro nuclear, una red interna de proteínas ribonucleares y proteínas nucleolares (Leman E.S y Betzenberg R.H 2002). La matriz nuclear contiene sitios de anclaje para DNA conocidos como regiones de unión a matriz (MARs por sus siglas en ingles matrix attachment regions) y el DNA se organiza en "loops" (vueltas) de 50-200Kpb entre esos sitios de anclaje.

Las proteínas de la matriz nuclear se han asociado con procesos tales como la replicación del DNA, la transcripción y reparación (Leman E.S y Betzenberg R.H 2002).

Algunas proteínas aisladas de DCPs como la actina están asociadas con la matriz nuclear y están asociadas con dichos procesos (Miller CA. *et al* 1991). Otras proteínas como la de los filamentos intermedios de vimentina, se han encontrado entrecruzadas con el DNA y asociada con matriz nuclear (Tolstonog GV. *et al.* 2001; Tolstonog GV. *et al.* 2002). Dado que la vimentina puede unirse a DNA y entrecruzarse particularmente en secuencias MARs y también se une a histonas, se ha propuesto que esta proteína esta involucrada en la remodelación de la cromatina (Tolstonog GV. *et al.* 2002).

Se ha demostrado que el cisplatino induce entrecruzamientos entre DNA y Proteínas de matriz nuclear (Samuel S.K. *et al* 1998; Spencer V.A. 2001). Los DPCs se aislaron de células cancerosas de mama y los perfiles proteicos fueron comparados por 2D-SDS-PAGE (Samuel S.K. *et al* 1998; Spencer V.A. 2001). La mayoría de las proteínas entrecruzadas con el DNA por el cisplatino fueron proteínas de matriz nuclear. El cisplatino también entrecruzó factores de transcripción con el DNA, lo que sugiere un mecanismo de inhibición de la transcripción por agentes entrecruzadores (Samuel S.K. *et al* 1998). Adicionalmente los perfiles de proteínas de matriz nuclear entrecruzadas con el DNA cambiaron en las células de cáncer de mama en los diferentes estados de la enfermedad (Spencer V.A. 2001).

Balasubramaniam y Olenick (1995) demostraron que la radiación ionizante induce entrecruzamientos entre las regiones MARs del DNA y las proteínas de matriz nuclear. La unión covalente del DNA a la matriz nuclear puede resultar en una seria desregulación de los procesos metabólicos del DNA. Diversos estudios indican que las proteínas de matriz nuclear se encuentren ciertamente involucradas en los DPCs (Rajski S.R. & Williams R.M. 2000; Xue L.Y. *et al* 1994; Balasubramaniam U. & Oleinick N.L 1995; Oleinick N.L. 1986, entre otros).

Los DPCs podrían alterar el superenrollamiento del DNA al modificar las interacciones temporales del DNA con la matriz nuclear, pueden influir en la reparación del DNA y otros procesos al alterar su conformación, habilidades de remodelación y/o accesibilidad. Los efectos de los DPCs en el control dinámico de los procesos metabólicos requieren estudios adicionales.

Reparación enzimática de los DPCs.

Algunos tipos de DPCs tienen una vida media larga en comparación con otros tipos de daño celular y persisten a lo largo de varios ciclos de replicación del DNA (Tsapakos M.J. *et al* 1983; Cupo D.Y y Wetterhahn K.E 1985) o son solo parcialmente reparados (Sugiyama M. *et al.* 1986), lo cual puede resultar en alteraciones permanentes en el DNA teniendo serias consecuencias para los procesos de replicación transcripción y reparación (Oleinick N.L. *et al* 1987).

Se ha reportado un nivel basal significativo de DPCs en algunos tipos de células de mamífero (Olinski R. *et al.* 1992; Voitkun V. y Zhitkovich A. 1999), y en ratones la frecuencia de DPCs se incrementa con la edad (Izzotti A. *et al* 1999; Zahn R.K. *et al* 1999). En células de mamífero el proceso de envejecimiento y otros tipos de estrés celular (enfermedades, exposición a drogas, radiación ionizante, contaminación, etc.) dan como resultado la acumulación de distintos tipos de lesiones en el DNA incluyendo los DPCs debido a la oxidación (Izzotti A. *et al* 1999; Zahn R.K. *et al.* 1999). Sin embargo, gran parte de los DPCs inducidos por agentes exógenos son removidos del genoma con el tiempo (los estudios de remoción de los DPCs son complejos, debido a la inestabilidad química de los distintos tipos de DPCs).

Se han detectado DPCs en células de riñón de rata después de 18 horas de tratamiento con compuestos de níquel (Chakrabarti S. K. *et al.* 2001). El nitroacetato férrico induce entrecruzamientos entre timinas y tirosinas en las células de riñón de rata Wistar en tratamientos de 24 horas (tiempo aproximado que dura la mitosis), pero los niveles de DPCs disminuyeron a nivel de los controles el día 19 después del tratamiento, lo que sugiere una activa reparación de estas lesiones (Toyokuni S. *et al* 1995).

Quieveryn y Zhitkovich (2000) reportaron una vida media de los DPCs inducidos por formaldehído de entre 11.6 y 13 horas en tres líneas celulares humanas (de piel, pulmón y riñón). La vida media reportada de los DPCs inducidos por formaldehído en linfocitos humanos de sangre periférica fue mayor (~ 18 horas) probablemente se deba a la baja eficiencia en la reparación en linfocitos (Barret J.M *et al* 1995). Los entrecruzamiento inducidos por cromo también se reportan de vida media larga en linfocitos humanos (Zhitkovich A. *et al.* 1998).

Muchos de los agentes inductores de DPCs, tales como la radiación ionizante, metilglioxal y cisplatino, también inducen entrecruzamientos inter, o intra catenarios en el DNA, del mismo modo que DPCs.

¿Cómo se censan los DPCs a nivel celular?

La asociación de proteínas con el DNA ocurre comúnmente en los procesos celulares. Los mecanismos por los que la célula distingue entre una proteína asociada con el DNA apropiadamente y una que esta unida covalentemente, se desconocen. Se propone que los DPCs pueden ser reconocidos debido al “abultamiento” y/o distorsión que forman en la doble hélice, o tal vez son reconocidos porque bloquean el paso de la maquinaria de remodelación de la cromatina, replicación, transcripción, o incluso la maquinaria de reparación de otros tipos de lesiones de DNA.

¿Cómo se reparan los DPCs?

Dependiendo de la química del entrecruzamiento y del tamaño y la orientación de la proteína involucrada, estas lesiones pueden ser sustrato de distintas vías de reparación. La reversión por quelación puede tener lugar cuando la proteína se une al DNA mediante conjugación con un metal como se observa en la figura 5. La reversión por hidrólisis (figura 5B) fue demostrada en los DPCs inducidos por formaldehído.

Algunos DPCs forman distorsiones tipo “bulto” (bulkys) en la doble hélice y son presumiblemente sustrato para la vía de reparación por escisión de nucleótidos NER que se observa en la figura 5C. Es posible que el entrecruzamiento de una proteína con una porción extensa de DNA impida el acceso de las enzimas de reparación y estas lesiones requieren en principio ser “desabultadas” (de-bulqued) por proteasas antes de ser procesadas por la maquinaria de reparación por escisión de nucleótidos (NER) o alguna otra vía de reparación, como se observa en la figura 5D. Alternativamente, se puede requerir una combinación de diversas vías de reparación como se observa en la figura 5E. Varias evidencias sugieren que los entrecruzamientos de DNA en procariontes se reparan mediante un mecanismo de incisión recombinante que involucra componentes de NER y reparación por recombinación homóloga (HRR) (Thompson L.H. 1996; Legersky R.J. y Richie C. 2002). Este mecanismo se ha sugerido en bacterias como el responsable de establecer “nuevas horquillas de replicación” (Cox M. 2002).

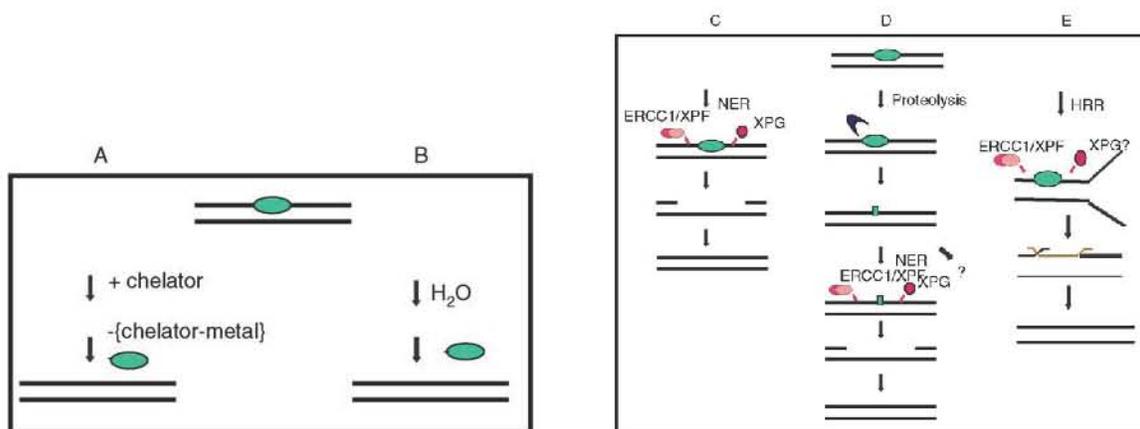


Figura 5. Rutas potenciales de reparación de DPC: Estos aductos pueden ser reparados por **A)** Reversión por quelación, **B)** Reversión por hidrólisis, **C)** Reparación por escisión de nucleótidos NER, **D)** Degradación parcial proteolítica seguida de NER u otro mecanismo de reparación **E)** Reparación por incisión y recombinación homóloga. (Barker S. *et al.* 2005).

Estudios previos sugieren que ciertamente hay reparación activa de DPCs en células de mamífero pudiendo estar involucradas más de una vía de reparación. Sin embargo el papel de NER o HRR en la reparación de DPCs no son del todo claros. La participación de la vía de reparación NER en la remoción de DPC inducidos por formaldehído se ha examinado en diversos tipos de células humanas e *in vitro* con Histona H1, empleando el método de precipitación con SDS (Quiervryn G. y Zhitckovich A. 2000), y se encontró que los DPC inducidos por formaldehído *in vitro* fueron removidos por hidrólisis.

Los DPC en células de pulmón, riñón y fibroblastos humanos tienen una vida media menor en comparación con los DPC inducidos por formaldehído estudiados *in vitro* (es decir en sistemas libres de células), lo que sugiere que hay un activo sistema de reparación celular involucrado en la remoción de DPC. En linfocitos humanos donde se sabe que tienen una eficiencia de reparación por NER menor debido a su estatus de diferenciación terminal, han demostrado tener un nivel más bajo de eliminación de DPC en comparación con otros tipos celulares analizados. Sin embargo líneas celulares con deficiencia en la reparación NER, XPA y XPF presentaron una vida media de DPC similar a las células normales, lo que sugiere que la reparación NER podría no estar involucrada en la remoción de DPC.

Interesantemente las células XPA y más marcadamente XPF son sensibles a muerte celular por exposición a formaldehído. Aunque el formaldehído induce otros tipos de daño al DNA que son sustrato para NER, la sensibilidad diferencial de las células XPA y XPF puede deberse a la participación de la proteína XPF en la reparación de daño a DNA por otra vía.

También se ha observado una sensibilidad diferencial a los agentes entrecruzadores en células XPF, en comparación con XPA (Murray D. *et al.* 2002), y otros estudios han sugerido la participación de la proteína XPF pero no la XPA en una vía de reparación de entrecruzamientos dependiente de la recombinación (Li. L. *et al.* 1999).

Puede notarse sin embargo que la inestabilidad química de muchos DPC, que nos da idea directamente de la reparación diferencial de entrecruzamientos en distintos tipos celulares, no nos da información para identificar las proteínas involucradas en la reparación de DPC, en cambio los estudios de sensibilidad en células mutantes a morir por exposición a agentes inductores de DPC pueden ser más relevantes en este sentido.

Los cálculos de inducción y remoción de DPC son afectados por limitaciones en los métodos empleados para su aislamiento y cuantificación. Cuando se analizaron células V79 de Hamster inducidos por cromo, los DPC se detectaron mediante un ensayo cometa observándose una reducción en la longitud del cometa dosis dependiente (Merk O. *et al.* 2000).

La remoción de DPC inducidos en células normales y deficientes de reparación NER como XPA o deficientes en reparación de entrecruzamientos intracadena como las células humanas FA-A se analizó mediante ensayo cometa alcalino (Speit G. *et al.* 2000). Tanto las células XPA como las FA-A mostraron una longitud similar a la de células normales en el ensayo cometa después de los tratamientos con formaldehído, lo que indicó que no hubo diferencias en los niveles de inducción de DPC. De igual forma, no se encontraron diferencias en longitud del cometa en los tres tipos celulares tratados con formaldehído después de pasar varios periodos de reparación, lo que indica que no hubo diferencias en la remoción de DPC entre células normales y líneas celulares con deficiencias en sus vías de reparación. Sin embargo se encontró correlación dosis dependiente entre las concentraciones de formaldehído y la inducción de micronúcleos en estas líneas celulares

humanas. La inducción de micronúcleos puede deberse a una reducción en la reparación de DPC y fue significativamente mayor en las líneas deficientes en la reparación, particularmente en la línea XPA, lo cual propone un papel para NER en la reparación de DPC.

Alternativamente puede ser que los tipos químicamente distintos de entrecruzamientos son reparados por distintos mecanismos y que la reparación NER solo está involucrada en la reparación de algunos tipos de DPC, pero no en otros. Los DPC inducidos por transplatino se han reportado más persistentes en células XPA (Fornace AJ. y Little JB. 1979).

Un estudio más reciente (Novakova O. *et al.* 2003) examinó la efectividad de NER en la remoción de DPC inducidos por un análogo de transplatino, el trans-[PtCl₂(Eminoeter)₂] (trans-EE). Los DPC sintéticos fueron generados por la reacción de trans-EE con un oligonucleótido para inducir un monoadducto, el cual fue después combinado con la Histona H1 para generar DPC. Un entrecruzamiento de doble cadena fue el sustrato empleado en una reacción *in vitro* para calcular la eficiencia de incisión de estas lesiones por extractos de células de roedores o humanos.

La incubación del sustrato control para NER contenía un monoadducto inducido por trans-EE o un entrecruzamiento intracadena inducido por cisplatino, los productos de incisión generados por la maquinaria de NER fueron dos oligonucleótidos de 24 y 30 nucleótidos cada uno, mientras que los sustratos de DPC inducidos por trans-EE no mostraron incisión, lo que indicó que NER es incapaz de reconocer y/o escindir este tipo de lesiones *in vitro*. Estos ensayos de reparación fueron realizados *in vitro* y los entrecruzamientos DNA-proteína empleados, fueron de cadena sencilla, sería interesante ver si los DPC son el tipo de reacción inducida por el análogo de transplatino predominante *in vivo* cuando está presente la cadena complementaria del DNA y si estas lesiones inducidas por trans-EE también son refractarias para NER.

Recientemente se demostró que el sistema NER es efectivo en la reparación de daño a DNA inducido por cromo. Esto se determinó midiendo las cantidades iniciales y remanentes de cromo unido a DNA en células humanas XPA, XPC y XPF (Reynolds M. *et al.* 2004). Dado que el cromo induce un gran número de formas de daño a DNA, este

estudio intentó discernir la influencia de NER específicamente en la reparación de entrecruzamientos inducidos por cromo. Se entrecruzaron cisteínas con un plásmido mediante tratamientos con cromo y esos plásmidos se transfectaron en células XPA y células XPA+ (como controles). Las células XPA exhibieron efectos mutagénicos y genotóxicos significativamente mayores después de la replicación del plásmido que contenía el entrecruzamiento, lo que sugiere la importancia de la vía de reparación NER en el caso de DPC inducidos por cromo. Sin embargo este análisis involucra solo un aminoácido entrecruzado al DNA, y el efecto de una proteína completa entrecruzada con el DNA puede ser distinto.

Usando un sustrato sintético entrecruzado con una enzima (T4 pirimidina dimer-DNA glicosilasa), se demostró que el complejo UvrABC de *E. Coli* fue capaz de hacer una incisión en el DNA en el sitio de DPC. Se observaron dos cortes en la misma hebra del DNA, una en el enlace fosfodiéster ocho a partir del extremo 5' terminal y la otra en el enlace fosfodiéster cinco a partir del extremo 3'. Estos procesos de incisión *in vitro* fueron más eficientes que cortes en sustratos con sitios apúricos o apirimidínicos, pero fueron solo la mitad de eficientes en comparación con aductos de benzo(a)piredo diol epóxidos. No se han hecho estudios de reparación *in vivo* por escisión con el sistema UvrABC.

Los mecanismos de reparación de complejos DNA-topoisomerasa pueden proporcionarnos ideas para vislumbrar los mecanismos de reparación de otros tipos de DPC. La tirosil-DNA-fosfodiesterasa I (Tdp1) es una enzima capaz de remover complejos DNA-topoisomerasa 1 terminales. Su actividad consiste en catalizar la reacción de hidrólisis de enlaces fosfodiéster 3' terminales, pudiendo remover proteínas distintas a topoisomerasa 1 del extremo 3' del DNA (Connelly J.C. y Leach D.R. 2004). Tdp1 actúa tanto en la reparación de rompimientos sencillos de cadena como en la reparación de DPC, mediante cortes de cadena sencilla o doble cuando se encuentra con estas lesiones durante la replicación o transcripción (Connelly J.C. y Leach D.R. 2004).

En levaduras se ha demostrado mediante el uso de mutantes para NER y HRR que los cortes de doble cadena en el DNA producidos por Tdp1 son sustrato de las vías de reparación de dobles rompimientos de cadena DSB.

¿Cómo se reparan los DPC inducidos por radiación?

Se ha investigado el papel de NER en la reparación de DPC inducidos por radiación, calculando la tasa de remoción de dichos DPC en células de hámster deficientes en el mecanismo NER bajo condiciones de hipoxia mediante elusión alcalina (Meyn R.E. *et al.* 1987). Las células del tipo silvestre AA8 removieron 80% de sus DPC en 24 horas, mientras que las células deficientes en NER UV41 (XPF⁻) removieron únicamente 20% de sus DPC en el mismo periodo.

Como se mencionó anteriormente, las células UV41 son significativamente más sensibles a morir por radiación ionizante en condiciones de hipoxia que las células de tipo silvestre AA8, lo que sugiere que una deficiencia en la reparación de DPC (formados preferentemente en condiciones de hipoxia) incrementa la radiosensibilidad celular. Se reportaron datos similares de sobrevivencia para las células de hámster de la línea UV20 (ERCC1⁻) deficientes en NER en comparación con células del tipo silvestre (Murray D. *et al.* 1996). Sorprendentemente, la tasa de reparación de DPC inducidos por radiación ionizante en células UV41 bajo condiciones aerobias parece normal (Chiu S.M. *et al.* 1995). Al parecer los DPC inducidos bajo condiciones de hipoxia parecen ser distintos de aquellos inducidos en condiciones aireadas, lo cual influye en su reparación.

Otras líneas celulares de hámster deficientes en NER, sobretodo aquellas con defectos en los genes XPB y XPD no exhiben este fenotipo de radiosensibilidad bajo condiciones de hipoxia (Murray D. y Rosenberg E. 1996), lo que sugiere que estos DPC no son reparados por NER propiamente. El fenómeno de radio sensibilización hipoxia específico, parece estar restringido a defectos genéticos que influyen tanto en NER como en HRR (Murray D. y Rosenberg E. 1996; Murray D. *et al.* 2002). Lo que sugiere que esta vía es la responsable de la reparación de DPC inducidos por radiación ionizante IR en hipoxia. La IR también promueve la formación de entrecruzamientos entre ambas cadenas del DNA.

La actividad de proteasa podría estar involucrada en la reparación de DPC.

Quiervyn y Zhitkovich (2000) demostraron que los DPC inducidos por formaldehído fueron removidos en parte por degradación proteolítica porque la pérdida de DPC fue inhibida parcialmente cuando las células fueron incubadas con lactacistina, un inhibidor específico de proteosoma. Sin embargo las proteínas reguladoras del ciclo celular, factores de transcripción y moléculas de señalización también son sustrato para degradación proteolítica; adicionalmente, inhibir la proteólisis puede afectar la inducción, remoción y reparación de DPC por mecanismos adicionales a la simple degradación proteolítica de las proteínas entrecruzadas.

Estudios tempranos demostraron que los complejos covalentes entre DNA y topoisomerasa 1 inducidos por camptotecina fueron ubiquitinados y posteriormente sometidos a degradación proteolítica (Desai S.D. *et al.* 1997) y este mecanismo podría estar actuando en la remoción de otros tipos de DPC. La degradación proteolítica podría no remover la proteína completa y dejar un péptido pequeño o un solo aminoácido aductado con el DNA que sería sustrato para otra vía de reparación como NER (figura 5c).

Estudiando la actividad enzimática de Tdp1 se ha observado que es más efectiva en sustratos que contienen una proteína desnaturalizada o digerida proteolíticamente en comparación con sustratos que contienen proteínas nativas (Connelly J.C. y Leach D.R. 2004). Aunque no se ha demostrado la participación de la enzima Tdp1 en la reparación de otros tipos de complejos covalentes (distintos a los que se forman entre el DNA y la Topoisomerasa1), es posible que esta enzima u otra con actividad catalítica similar pudiera estar involucrada en algún paso de las vías de reparación de DPC posterior a la digestión proteolítica.

Posibles implicaciones de los DPCs.

Con la finalidad de identificar secuencias de DNA entrecruzadas con proteínas, indujimos DPCs mediante tratamientos con NaAsO₂, puesto que se ha demostrado que el Arsénico además de provocar el desarrollo de cáncer de piel, hígado, pulmón y vejiga, de igual forma es un elemento capaz de inducir entrecruzamientos entre DNA y proteínas en líneas celulares hepáticas

El conocimiento de las secuencias de DNA entrecruzadas por Arsénico es interesante considerando de que diversas poblaciones humanas (entre ellas algunas poblaciones en México), se encuentran expuestas a este metal ambiental u ocupacionalmente. El identificar secuencias codificantes o regulatorias dentro de los DPC nos daría información sobre los efectos que estas lesiones producen en el DNA, podrían estar inhibiendo la transcripción de genes, puesto que la unión covalente de proteínas con dichas secuencias impediría el reconocimiento y transito de la maquinaria de transcripción.

El identificar secuencias α -satelite centromericas en los DPCs nos dará evidencia de efectos de estos aductos en el ciclo celular, dado que las secuencias centromericas juegan un papel preponderante durante la segregación cromosomica dado que dichas secuencias son reconocidas por proteínas del huso mitotico para conducir a los cromosomas a los polos nucleares, de tal suerte que si hay proteínas enmascarando estas secuencias de reconocimiento, se estarían promoviendo alteraciones en la segregación cromosomica.

Las secuencias ribosomales son reiteradas en los genomas, estas secuencias codifican para los distintos RNAs necesarios para el metabolismo de síntesis de proteínas. Es sabido que dichas secuencias interactúan dinámicamente con proteínas de matriz nuclear para su ordenamiento y regulación. De tal suerte que si las interacciones entre secuencias ribosomales y proteínas de matriz nuclear se tornan irreversibles, se provocaría desregulación en la expresión de dichos genes, así como alteraciones en los patrones de ordenamiento nucleares y nucleolares.

La Matriz nuclear es una red tridimensional necesaria para la organización del DNA y la estructura y función nuclear. La matriz nuclear contiene sitios de anclaje para DNA conocidos como regiones de unión a matriz nuclear (MARs por sus siglas en inglés matrix attachment regions) y el DNA se organiza en “loops” (vueltas) de 50-200 Kpb entre estos sitios de anclaje. Se ha documentado que estas estructuras desempeñan un papel importante en mecanismos de regulación de la transcripción en la inducción o silenciamiento de genes, y si se altera la dinámica de dichas secuencias, se afectaría la remodelación de la cromatina y con ello el metabolismo de transcripción.

Planteamiento del problema.

Se han identificado algunas de las proteínas que se entrecruzan con el DNA formando DPC (proteínas cromosomales, proteínas de matriz nuclear, citoqueratinas, factores de transcripción, polimerasas, etc.). Sin embargo no se han descrito secuencias de DNA presentes en los DPC. Su conocimiento podría explicar más detalladamente el impacto que estas formaciones tiene sobre la biología de la célula.

Objetivos.

- Aislar, amplificar y secuenciar los segmentos de DNA entrecruzados con proteínas inducidos por NaAsO₂ en células hepáticas humanas.
- Identificar secuencias de los genes de RNA ribosomal (5.8s, 18s y 28s), secuencias teloméricas y secuencias α -satelite de centrómero en el DNA entrecruzado con proteínas por inducción de NaAsO₂
- Estimar mediante Dot Blot si entre las secuencias de DNA obtenidas de los DPC se encuentran secuencias de unión a matriz nuclear MARs. Utilizando para ello las secuencias MARs bien caracterizadas en 1 Kb en el cromosoma 19.

Métodos.

Cultivo de células.

Células de la línea Hep G-2 se sembraron en cajas de Petri de plástico con 10 mililitros de Medio Dulbecco Eagle Modificado (DMEM) de Sigma suplementado con 8% de suero fetal bovino (Gibco BRL 16000-044), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL 11140-050) 100 U/ml de Penicilina y 100µg/ml de estreptomicina (Gibco BRL 15070-089), a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂ hasta confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado cada dos días. Al transcurrir 5 días, las células alcanzaron la fase de confluencia y fueron subcultivadas, para lo cual después de retirar el medio de cultivo y lavar con PBS, se añaden 3ml de tripsina al 0.5% en PBS, incubando las células a 37°C durante 3 minutos para activar a la enzima (para liberar las uniones entre las células y con la caja), posteriormente golpeando suavemente las cajas se consigue el desprendimiento de las células, a las que se adicionan 3ml de medio de cultivo para inactivar a la tripsina y se centrifugan a 3000rpm durante 3 minutos para recuperar en la pastilla las células que fueron sembradas repartidas en tres cajas de Petri.

Tratamiento a las células Hep G-2 con NaAsO₂.

Cuando las células alcanzaron la fase de confluencia, fueron lavadas dos veces con PBS, para posteriormente adicionarles el medio de cultivo DMEM suplementado con NaAsO₂ en una concentración 1×10^{-5} M. El tratamiento para inducir la formación de DPC, fue de 16 horas (las células fueron tratadas en fase de confluencia para evitar la formación de DPC en fase S, ya que los DPC interfieren en la replicación del DNA). Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron cosechadas retirando el medio de cultivo lavando las células dos veces con PBS y finalmente se desprendieron de la pared de la caja con la ayuda de un cepillo.

Viabilidad celular.

Se determinó la viabilidad de las células después del tratamiento con NaAsO₂ utilizando el colorante azul tripan (Sigma) que da información sobre el estado fisiológico de la membrana celular. Se tomó una alícuota de 10 microlitros de la suspensión celular adicionando 10µl de colorante. Las células se observaron en una cámara de Neubauer bajo el microscopio. Para determinar el porcentaje de viabilidad, se contaron las células claras (vivas) y oscuras (muertas).

Aislamiento de los complejos DNA-Proteínas (DPC).

La precipitación de los DPC se llevó a cabo empleando el método descrito por Zhitkovich, A. y col. (1992). En breve; después de la determinación de viabilidad, las células fueron lisadas utilizando 0.5 ml de solución A (SDS 2%, PMSF 1mM, Tris-HCl 20mM, pH 7.4) y se congelaron a -20°C por al menos 24h. Las células se descongelaron en un baño de agua a 37°C y el DNA se fragmentó pasando la solución por una aguja de acero calibre 21 en cuatro ocasiones, lo cual garantiza una fragmentación relativamente uniforme de segmentos de 20 Kb aproximadamente (Zhitkovich, A. *et al.* 1992). Los lisados se vaciaron a un tubo Eppendorf ejerciendo cierta presión y evitando al máximo la formación de burbujas. Se adicionaron 0.5ml de solución B (KCl 100mM, Tris-HCl 20mM, pH 7.5) y se mezcló en el vortex. Las muestras se incubaron a 65°C por 10 min., luego cada tubo tapado se invirtió 3 veces y se colocó en hielo durante 5 min., para permitir la formación del precipitado KCl-SDS-Proteínas-DNA. Los precipitados se colectaron por centrifugación a 6000 x g por 5min a 4°C. Los sobrenadantes se decantaron y las pastillas se resuspendieron en 1ml de solución C (100mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.5). Las muestras se calentaron y se lavaron 3 veces como se describió anteriormente. Después del último lavado se resuspendió la pastilla en 250µl de solución D (100mM KCl, 10mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 7.5).

Con el fin de caracterizar los fragmentos de DNA presentes en los DPC, se degradaron las proteínas entrecruzadas al DNA con una solución de Proteinasa K (Sigma, USA) a razón de 0.2 mg/ml incubando a 50°C durante 3h para degradar la mayor cantidad de proteínas entrecruzadas con el DNA. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 50µl de BSA (Sigma, USA) a razón de 4mg/ml, las muestras se colocaron 5 min. en hielo. Se obtuvo el DNA entrecruzado con proteínas mediante centrifugación a 12 000g durante 10min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante con el DNA que había formado parte de los DPC. Este DNA fue precipitado empleando 2 volúmenes de etanol y 0.5 volumen de Acetato de Amonio 7.5M, centrifugando a 12 000g durante 10 minutos.

Determinación de DNA por fluorescencia.

Para estimar el porcentaje de DNA entrecruzado con proteínas, se determinó la cantidad de DNA total y DNA de los DPC, utilizando el tinte fluorescente Hoechst (bis-benzimida) que se intercala en las regiones A-T del DNA y cuya fluorescencia indica la cantidad de DNA presente en cada muestra de una manera indirecta. La fluorescencia fue calculada por excitación a 365nm y la luz emitida se midió a 450-460nm. Para tomar las lecturas en el fluorómetro, se tomó una alícuota de 10µl de cada muestra, se agregaron 978µl de solución C(100mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.5) y 12.5µl de tinte Hoechst (0.002mg/ml). Se elaboró una curva con concentraciones conocidas de DNA para interpolar los valores de fluorescencia obtenidos en cada lectura (tabla 2).

Amplificación de DNA extraído de los DPCs.

El DNA que se obtuvo de los DPC, se amplificó por el método de PCR, empleando los siguientes oligonucleótidos como primers:

5' ACT TCT CAA CAA CTC AGG ACG AAC ANNNNNNNNNNAC AGC 3'

Estos oligonucleótidos tienen una “cola” en el extremo 5' con secuencia específica, que será útil para posibles reamplificaciones así como para elaborar los primers de secuenciación, posteriormente hay 10 nucleótidos degenerados que se pretende se unirán de manera aleatoria al DNA extraído de DPC y finalmente cinco nucleótidos en su extremo 3' cuya probabilidad de encontrar una secuencia complementaria aleatoriamente es 5^4 para que comience la amplificación por PCR de dichos fragmentos. Pero estos cuatro oligonucleótidos únicamente varían en la posición cinco en dirección 3'→5' por lo que cada uno encontrara su secuencia complementaria aleatoriamente cada $4^4 = 1/264$

Reamplificación específica.

Una vez amplificado el DNA que se obtuvo de los DPC, se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar la amplificación y se tomaron bandas de los carriles a diferentes niveles para obtener amplicones de tamaños diferentes para aislar su DNA y reamplificarlo con los primers **ORC 10 (5' ACT TCT CAA CAA CTC AGG ACG AAC A 3')** cuya secuencia corresponde a la secuencia del extremo 5' de los oligonucleótidos con bases degeneradas.

Purificación de DNA mediante columnas.

Para purificar DNA de gel de agarosa, se empleo un kit de Promega (Wizard sv Gel and PCR Clean Up System cat. A9281). Este sistema se basa en la habilidad del DNA para unirse a membranas de silica en presencia de iones caotrópicos. Después de la electroforesis de los productos de la segunda amplificación, se extrajo la banda de DNA del gel y se colocó en un tubo Eppendorf con 200µl de buffer de unión (binding buffer isotiocinato de guanidina 4.5M acetato de potasio 0.5M pH 5)

Se incubó dicha mezcla a 60°C para fundir la agarosa. Transcurrido ese tiempo, se colocó en la columna y se centrifugó 2 minutos a 13 000rpm para promover la unión del DNA a la membrana de silica y desechar la agarosa, el agua y sales. Se hicieron dos lavados a la membrana con el buffer de lavado (Mem wash solution acetato de Potasio 10mM pH 5, etanol 80%, EDTA 16.7µM pH 8.0), colocando 500µl de buffer y centrifugando a 13 000rpm durante 5 minutos. Después de los lavados, se dejó secar la membrana centrifugando a 13000rpm durante 2 minutos más. Una vez que se secó por completo la membrana, se eluyó el DNA adicionando 30µl de agua y centrifugando a 13000rpm durante 5 minutos. Se verificó la purificación del DNA corriendo 2µl del DNA en agua, en un gel de agarosa al 1%.

Secuenciación Automática de DNA.

Una vez aislado y amplificado el DNA que se obtuvo de los DPCs, se secuenció por el método automático de terminación de cadena empleando didesoxinucleótidos trifosfatados marcados con fluorocromos. El secuenciador empleado fue un 310 Genetic Analyzer ABI prism.

Digestión de DNA con endonucleasas.

Puesto que se utilizó el mismo primer para amplificar ambas cadenas de DNA obtenido de los DPC, fue necesario cortar este DNA para eliminar una de las secuencias complementarias al primer de secuenciación. Para ello se hicieron pruebas con distintas enzimas de restricción de corte frecuente hasta obtener una que reconociera su secuencia de corte dentro de esta secuencia.

Búsqueda de secuencias repetidas.

Se ha reportado que secuencias repetidas como secuencias α -satélite de centrómeros, secuencias teloméricas y genes ribosomales pueden asociarse a la matriz nuclear en distintas etapas del ciclo celular (Weipoltshammer K. *et al.* 1999) y dado que las proteínas de matriz nuclear son algunas de las proteínas que forman entrecruzamientos con el DNA, se intentó identificar secuencias repetidas en el DNA obtenido de los DPCs mediante amplificaciones por PCR empleando primers específicos para dichas secuencias. Para el diseño de los primers se emplearon secuencias disponibles en el Genbank y secuencias reportadas en otros trabajos.

En el caso de las secuencias α -satélite centroméricas, se emplearon las reportadas por Masumoto, H. *et al.* (1989); **Cenp** TCC CGT TTC CAA CGA AG, Mayne J. *et al.* 1989 **So all** GTT TTG AAA CAC TCT TTT TGT AGA ATC TGC. **Y-A** TGA AAA CTA CAC AGA AGC TG, **Y-B** ACA CAT ACA AAA GAA CTA TG, Las secuencias de genes ribosomales se consultaron en el trabajo de González I. y Silvestre J.E. (1995), donde se reporta una secuencia de 43Kb que contiene las secuencias de los tres genes ribosomales humanos con el número de acceso en Genbank U13369. Y para la identificación de secuencias teloméricas, se utilizaron hexanucleótidos con la secuencia **ACT TCT CAA CAA CTC AGG ACG AAC ATT AGGG**, los 6 nucleótidos de su extremo 3' corresponden al hexámero que se repite para formar telómeros y los 25 nucleótidos del extremo 5' servirán para posibles reamplificaciones o para el diseño de un primer de secuenciación (Weipoltshammer K. *et al.* 1999). Una vez amplificadas dichas secuencias empleando como template el DNA obtenido de los DPC, se secuenciaron por el método automático y se alinearon en las bases de datos del Genbank para verificar si correspondían a las secuencias esperadas.

Identificación de Secuencias MARs en los DPC.

Mediante un ensayo de Dot Blot, se buscó identificar secuencias MARs en el DNA que se obtuvo de los DPC. Se desnaturalizó el DNA en una solución 0.4M NaOH, 10mM EDTA y calentando a punto de ebullición durante 10 minutos para asegurar su completa

desnaturalización. Una vez desnaturalizadas dichas muestras se colocaron en volúmenes de aproximadamente 200µl sobre las membranas de nylon previamente humedecidas en 2x SSC y montadas en el aparato microfiltrador de Bio-Dot SF de Bio Rad. Las muestras se fijaron aplicando vacío y después de la filtración se aplicaron 500µl de 2x SSC en cada pozo. Una vez secos los pozos, se desensambló el Bio-Dot, se removió la membrana y se lavó con 2x SSC, se dejó secar al aire y al estar completamente seca se expuso a 1200 joules en un CL-1000 Ultraviolet Crosslinker UVP para entrecruzar el DNA con la membrana.

Para pre-hibridizar la membrana, se mantuvo durante al menos 2 horas en el horno de hibridación (Hybridization oven/shaker de Amersham, Biosciences) a 42°C con 15 mililitros de solución de hibridación (formamida 50%, SSC 5x, Tris 50mM pH 7.4, Denhard's 5x*, SDS 1%). Una vez transcurrido el tiempo, se cambió la solución de hibridación y se agregó la sonda compuesta de un pool de secuencias MARs marcadas con ³²P dCTP por random primers. La membrana con la sonda fueron incubadas toda la noche en el horno de hibridación a 42° C.

Para preparar la sonda, se diluyó la mezcla de DNA de secuencias MARs en una concentración de 25ng en 20µl de agua destilada en un tupo Ependorf de 100µl, se puso a hervir en un baño de agua durante 5 minutos para desnaturalizar e inmediatamente se colocó en hielo. Una vez en el hielo se agregaron 2µl de dATP, 2µl de dGTP, 2µdTTP, 15µl de buffer de random primers, 5µl de (α-³² P) d CTP 3000 Ci/µl y se llevó la mezcla a un volumen de 49µl, se mezcló brevemente y se adicionó 1µl de fragmento Klenow. Dicha reacción se incubó durante una hora a 25° C y pasado el tiempo se detuvo la reacción con 0.5M de EDTA.

*Reactivo Denhart's 50x= 100ml de agua bi-destilada, 1g de albúmina sérica bovina, 1gr. De ficoll, 1g. de polivinil pirrolidona.

Resultados.

Después del tratamiento con NaAsO₂ (Arsenito de sodio) las células Hep G-2 mostraron una viabilidad de un 84%. El NaAsO₂ a concentración de 1 x 10⁻⁵M indujo una proporción significativa de DPC *in vitro*. Los valores basales de DPC obtenidos en este trabajo fueron de 1.95% de DNA entrecruzado con proteínas. En las células tratadas con NaAsO₂ la cantidad de entrecruzamientos se incrementó considerablemente hasta alcanzar un valor de 5.05% de DNA entrecruzado (tabla 2).

<u>Muestra</u>	<u>Fluorescencia del DNA total.</u>	<u>DNA total</u> <u>µg/ml.</u>	<u>Fluorescencia del DNA entrecruzado</u> <u>o</u>	<u>DNA entrecruzado</u> <u>o</u> <u>µg/ml.</u>	<u>Porcentaje de DNA entrecruzado</u>
Control	1 602±24	541.2	63±18	10.6	1.95%
Tratamiento con NaAsO ₂ 1x 10 ⁻⁵ M	1 628±12	550	159±15	26.7	5.05%

Tabla 2. Se estimaron las cantidades de DNA mediante fluorescencia empleando el tinte Hoechst 33258 (que se intercala en las regiones A-T del DNA). Los valores de DNA se interpolaron en una recta establecida con valores de fluorescencia del tinte Hoechst en función de la concentración de DNA.

Secuencias de DNA identificadas en los DPCs inducidos por NaAsO₂ 1x10⁻⁵ M en células hepáticas humanas de la línea Hep G-2.

El DNA entrecruzado con proteínas se aisló por precipitación selectiva empleando SDS-KCl según la técnica propuesta por Zhitcovich y Costa en 1993, posteriormente se degradaron las proteínas asociadas con el DNA con tratamientos de Proteinasa K, para recuperar el DNA e identificar las secuencias que forman parte de estos complejos.

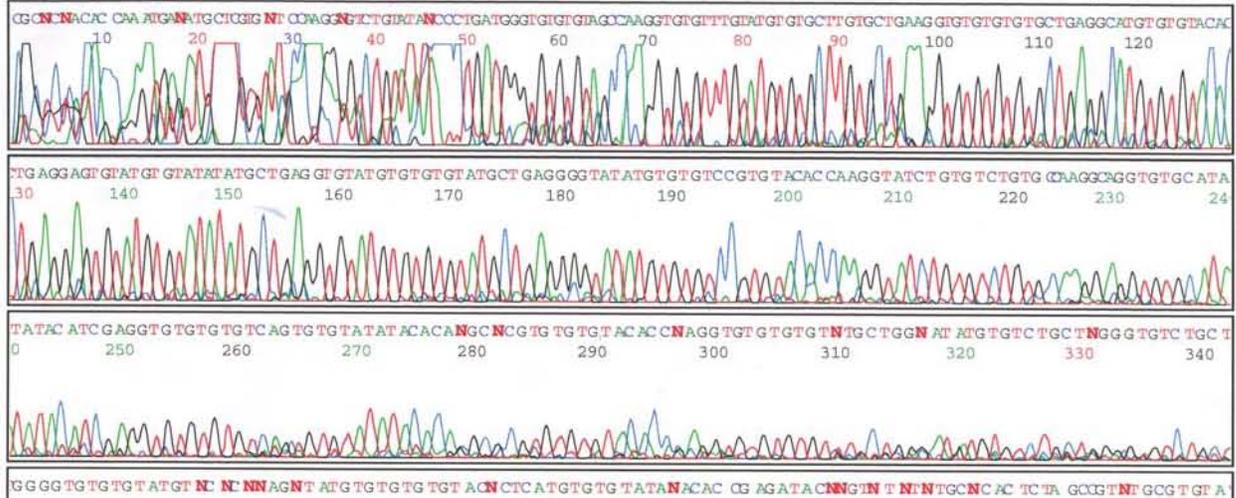


Figura 6 Electroferograma de la secuencia de DNA que se obtuvo de los DPC y se amplificó con primers con bases degeneradas (5' ACT TCT CAA CAA CTC AGG ACG AAC ANNNNNNNNNNACAGC 3')

1	CGCNCNACAC	CAAATGANAT	GCTCGTGNTC	CAAGNGTCT
41	GTATANCCCT	GATGGGTGTG	TGTAGCCAAG	GTGTGTTTGT
81	ATGTGTGCTT	GTGCTGAAGG	TGTGTGTGTG	CTGAGGCATG
121	TGTGTACACT	GAGGAGTGTA	TGTGTATATA	TGCTGAGGTG
161	TATGTGTGTG	TATGCTGAGG	GGTATATGTG	TGTCCGTGTA
201	CACCAAGGTA	TCTGTGTCTG	TGCCAAGGCA	GGTGTGCATA
241	TATACATCGA	GGTGTGTGTG	TCAGTGTGTA	TATACACANG
281	CNCGTGTGTG	TACACCNAGG	TGTGTGTGTN	TGCTGGNATA
321	TGTGTCTGCT	NGGGTGTCTG	CTGGGGTGTG	TGTATGTNCN

Secuencia de DNA entrecruzado con proteínas en la línea celular Hep G-2 mediante tratamientos con NaAsO₂

EM_HUM TGGCTACACACACCCATCAGGGTATATACAGACACCTTGGCATAACACAGACATAACACATC
880 890 900 910 920 930

Figura 8. Alineamiento de la secuencia obtenida a partir de DPC en las bases de datos de NCBI. Esta secuencia presentó 99.1% de identidad en el brazo p del cromosoma 1, cerca de el gen activador de Guanilato ciclasa (guanylin).

Por otro lado se identificaron secuencias por PCR, empleando cebadores para secuencias repetidas en el genoma. Entre las secuencias presentes en los DPC, se encontraron secuencias α -satélite de centrómero, secuencias teloméricas y genes de RNA ribosomal.

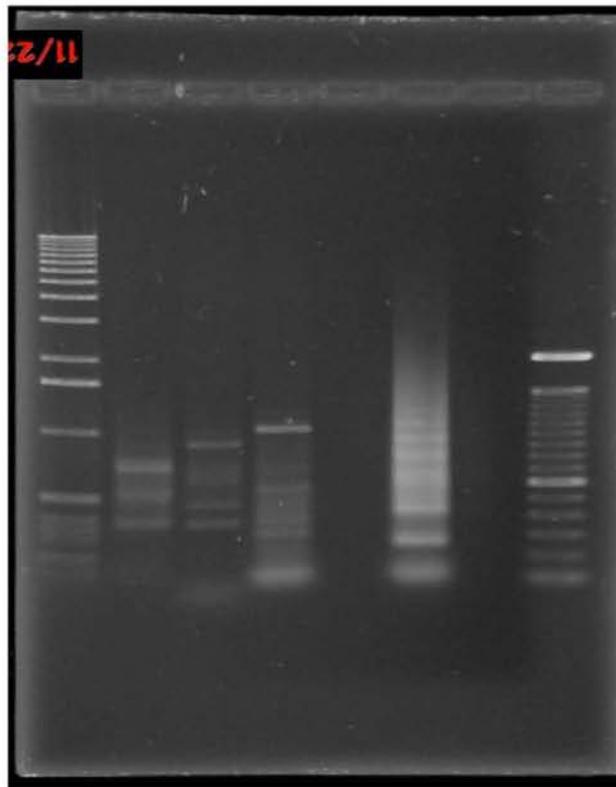
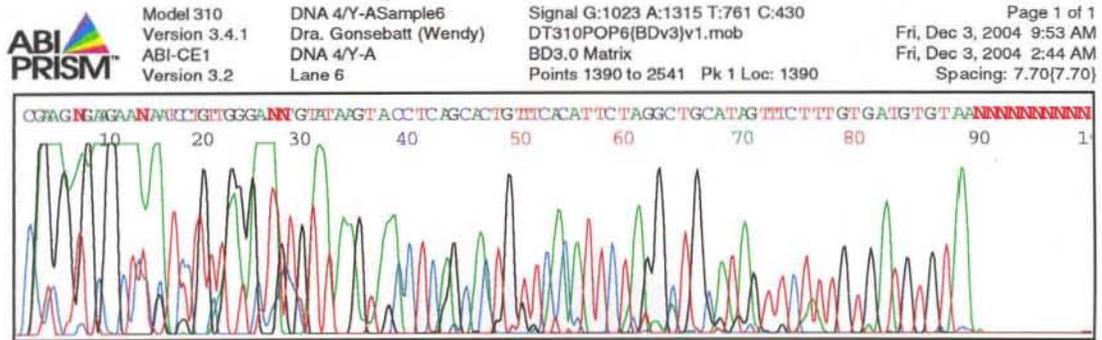
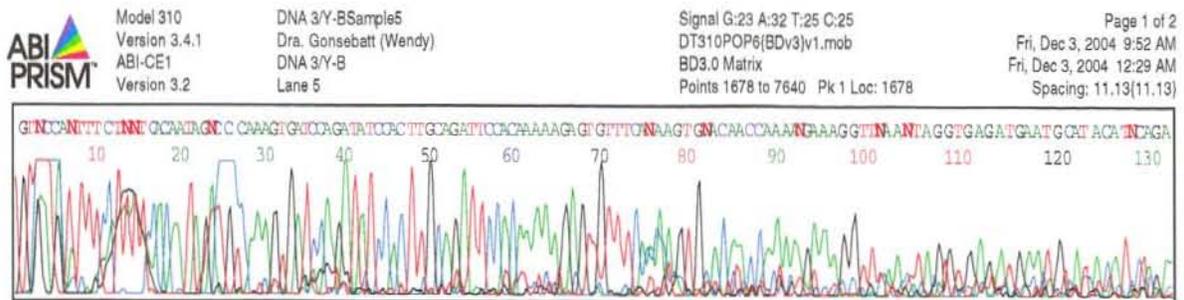


Figura 9. Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, seguido de fluorescencia con bromuro de Etidio para la identificación de secuencias α -satélite en DPCs inducidos por NaAsO₂ de la línea celular Hep G-2 mediante amplificación por PCR con primers de secuencias α -satélite. Carriles: 1) Marcador de peso molecular 1Kb plus, 2)Amplificación con primer **so all** (GTT TTG AAA CAC TCT TTT TGT AGA ATC TGC) 3)Amplificación con primer **cenp** (TCC CGT TTC CAA CGA AG), 4)Amplificación con **Y-A** (TGA AAA CTA CAC AGA AGC TG) **Y-B** (ACA CAT CAC AAA GAA CTA TG), 6)Amplificación con todos los primers mencionados en los carriles 2-4 8)Marcador de 100pb.

Se cortaron algunas bandas del gel de agarosa y se purifico el DNA para secuenciarlo y alinear las secuencias obtenidas en las bases de datos y así corroborar si se trataba de secuencias α -satélite de centrómero.



acctcagcac tgttcacatt ctaggctgca tagtttcttt gtgatgtgta a



caaagtgatc cagatatcca cttgcagatt ccacaaaaag agtgtttcan aagtgnacaa ccaaaangaa aggt

Figura 10. Electroferograma de secuencias α satélite amplificadas con primers Y-A e Y-B.

Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a alinearlas en las bases de datos del genoma humano, obteniéndose los siguientes resultados:

```
>>EM_HUM:AF522078 AF522078.1 Homo sapiens alphoid repeat(5785
nt)  initn: 318  initl: 318  opt: 340  Z-score: 363.8  bits:
77.6  E(): 1.3e-12  banded Smith-Waterman score: 340;  96.00%
identity (100.000% ungapped) in 75 nt overlap (1-75:1713-
1786)
```

10 20

30

Sequen

CAAAGTGATCCAGATATCCACTTGCAGATT

.....

EM_HUM

TGAAGATATTTCTTTTCCACAATAGACGTCAAAGTGATCCAGATATCCACTTGCAGATT

1690 1700 1710 1720 1730

1740

40 50 60 70

Sequen CCACAAAAGAGTGTTTCANAAGTGNACAACCAAAAANGAAAGGTT

.....

EM_HUM CCACAAAAGAGTGTTTCAAAGTGCACAACCAAAA-
GAAAGGTTCAACTAGGTGAGATG

1750 1760 1770 1780 1790

1800

```
>>EM_HUM:HSSATA01 M29723.1 Human Y chromosome centromere
(2399 nt)
rev-comp  initn: 318  initl: 318  opt: 340  Z-score: 368.6
bits: 77.2
E(): 1.7e-12
banded Smith-Waterman score: 340;  96.000% identity (100.000%
ungapped)
in 75 nt overlap (75-1:1505-1578)
```

70 60

50

EM_HUM

ACACTCTTTTTGTGGAATCTGCAAGTGGATATCTGGATCACTTTGACGTCTATTGTGGAA

1200

1210

1220

1230

1240

1250

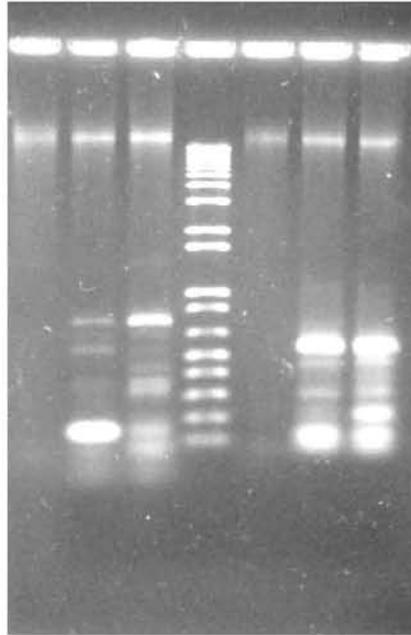
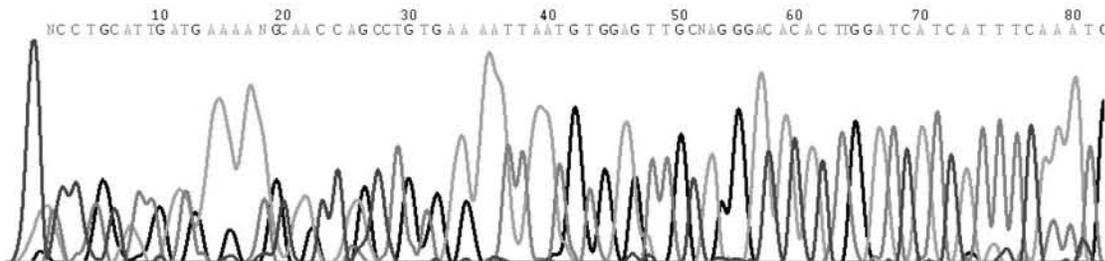
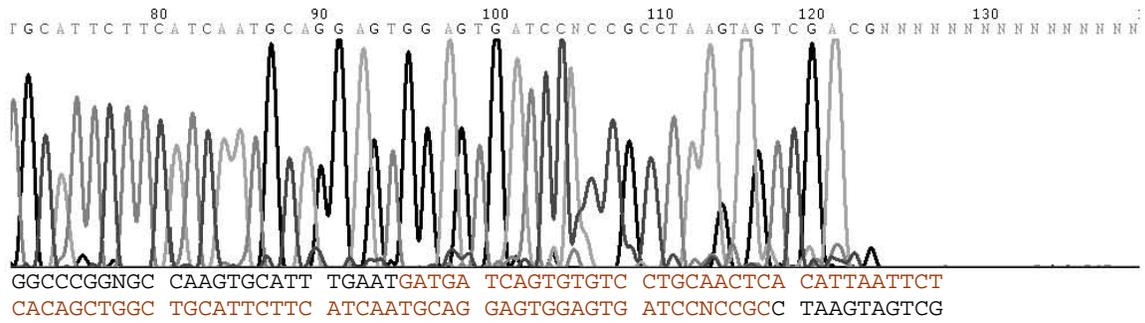


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar la presencia de los genes ribosomales 5.8s y 28s en el DNA obtenido de DPCs. Carriles: 1-3 gen ribosomal 5.8s con 1mM, 2mM y 3mM de $MgCl_2$ respectivamente, 4-Marcador de 1kb plus, 5-7 gen ribosomal 28s con 1mM, 2mM y 3mM de $MgCl_2$ respectivamente.

Se cortaron algunas bandas del gel de agarosa y se purificó el DNA para secuenciarlo y alinear las secuencias en las bases de datos y así corroborar si se trataba de genes de RNA ribosomal.





1 cgactcttag cggtgatca ctcggctcgt gcgtcgatga agaacgcagc gctagctgcg
61 agaattaatg tgaattgcag gacacattga tcatcgacac ttogaacgca cttgcgccc
121 cgggttctc ccggggctac gcctgtctga gcgtcgctt

Figura 13. Electroferograma de la secuencia obtenida con el primer de gen ribosomal 5.8S antisentido.

Alineamiento en las bases de datos de genoma humano.

```
>>EM_HUM:HSU13369 U13369.1 Human ribosomal DNA complete
(42999 nt)
rev-comp initn: 305 init1: 305 opt: 363 Z-score: 363.8
bits: 81.2
E(): 1.8e-13 banded Smith-Waterman score: 363; 81.452%
identity (88.596% ungapped) in 124 nt overlap (120-3:6623-
6744)
```

```

                                     120          110          100
Seque-
CGTCGACTACTTAGGCGGNGGATCACTCCACTC
                                     .....  ....  ....
.....  ...
EM_HUM CGGGAGCGCCCTCGCCAAATCGACCTCGTACGACT-CTTA-
GCGGTGGATCACTCGGCTC
                                     6600          6610          6620          6630          6640
6650
```

```

          90          80          70          60          50          40
Seque-
CTGCATTGATGAAGAATGCAGCCAGCTGTGAGAATTAATGTGAGTTGCAGGACACACTGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_HUM
GTGCGTCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGAGAATTAATGTGAATTGCAGGACACATTGA
          6660          6670          6680          6690          6700
6710

```

```

          30          20          10
Seque- TCATC----ATTCAAATGCACTT--GGCNCCGGGCC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_HUM TCATCGACTTTCGAACGCCTTGC GGCCCCGGGTT
          6720          6730          6740

```

```

>>EM_HUM:HSB J01866.1 Human 5.8S ribosomal RNA.
(159 nt)
rev-comp initn: 245 init1: 162 opt: 341 Z-score: 371.6
bits: 74.6
E(): 1.8e-11
banded Smith-Waterman score: 341; 80.159% identity (88.596%
ungapped)
in 126 nt overlap (120-3:1-124)

```

```

          120          110          100          90          80
70
Seque- CGTCGACTACTTAGGCGGNGGATCACTCCACTCCTGCATTGATGAAGAATGCA-
-GCCAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
: : : :
EM_HUM   CGACT-CTTA-
GCGGTGATCACTCGGCTCGTGCATGATGAAGAACGCAGCGCTAG

```

```

                    10         20         30         40
50
                    60         50         40         30         20
Seque- CTGTGAGAATTAATGTGAGTTGCAGGACACACTGATCATC----
ATTCAAATGCACTT--
          ::: :::::::::::::::::::: ::::::::::::::: :::::::::::   ::: ::
          :::::::
EM_HUM
CTGCGAGAATTAATGTGAATTGCAGGACACATTGATCATCGACACTTCGAACGCACTTGC
                    60         70         80         90         100
110
          10
Seque- GGCNCCGGGCC
          ::: ::::::
EM_HUM GGCCCCGGGTT
          120   130   140

```

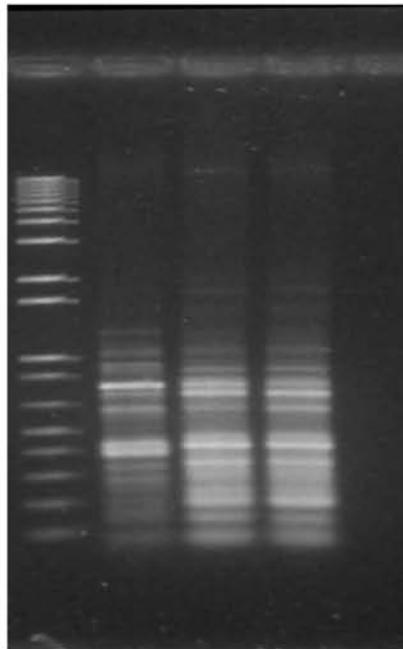


Figura 14 .Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar amplificación del gen ribosomal **18s**. Carriles: 1 Marcador de 1kb plus, 2) amplificación con 1mM MgCl₂, 3)amplificación con 2mM MgCl₂ 4)amplificación con 3mM MgCl₂

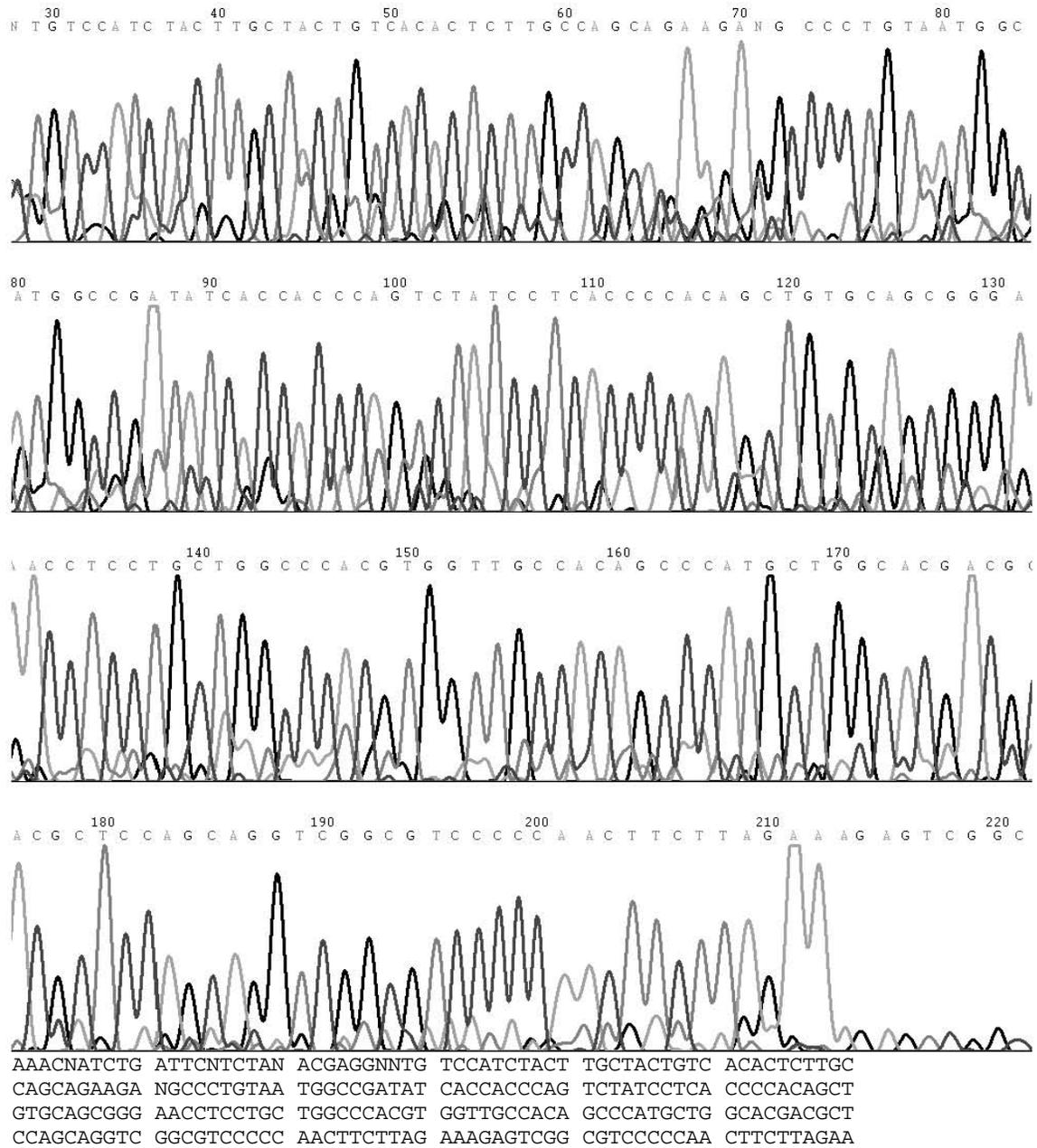


Figura 15. Electroferograma de la secuencia obtenida con primers para gen ribosomal 18S sentido.

Alineamiento con las bases de datos de genoma humano.

```
>>EM_HUM:HSU13369 U13369.1 Human ribosomal DNA complete
(42999 nt)
  initn: 153  init1: 125  opt: 143  Z-score: 121.1  bits: 37.6
E(): 5.9
banded Smith-Waterman score: 143; 84.091% identity (86.047%
ungapped)
in 44 nt overlap (172-215:5066-5108)
```

```

                150          160          170          180          190
200
Sequen
GGCCCACGTGGTTGCCACAGCCCATGCTGGCACGACGCTCCAGCAGGTCGGCGTCCCCCA
                                :  ::  :  :  ::
: :: :: :: :: :: :: :: ::
EM_HUM CGAACGAGACTCTGGCATGCTAACTAGTTACGCGACCCCCGAGC-
GGTCGGCGTCCCCCA
                5040          5050          5060          5070          5080
5090

                210          220          230          240
Sequen ACTTCTTAGAAAGAGTCGGCGTCCCCCAACTTCTTAGAAN
        : :: :: :: :: :: :: ::
EM_HUM ACTTCTTAGAGGGACAAGTGGCGTTCAGCCACCCGAGATT
        5100   5110   5120   5130   5140   5150
```

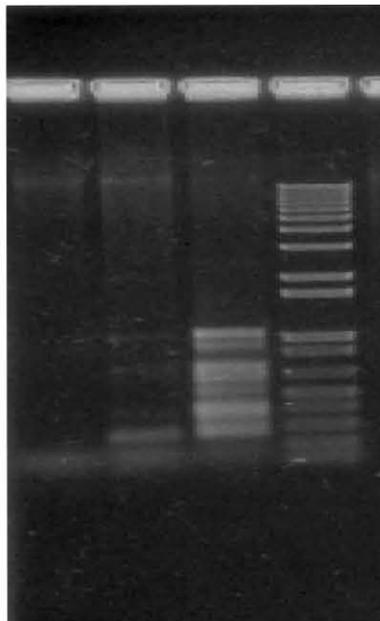


Figura 16. Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, seguido de fluorescencia con bromuro de Etidio para la identificación de secuencias teloméricas en DPCs inducidos por NaAsO₂ de la línea celular Hep G-2 mediante amplificación por PCR con primers de secuencias teloméricas PCR. Carriles: 1, 2 y 3) Amplificación con primer ACTTCTCAACAACCTCAGGACGAACATTAGGG con 1Mm, 2mM y 3mM de MgCl₂ respectivamente, 4) Marcador de peso molecular 1Kb plus.

Por otro lado se estimó mediante Dot blot si entre las secuencias de DNA obtenidas de los DPC hay secuencias de unión a matriz nuclear MARs. Utilizando para ello las secuencias MARs bien caracterizadas en una Mb en el cromosoma 19.

S/ MARs	No. De acceso en el GenBank	Posición de la S/MARs en la secuencia del GenBank	G+C %	A+G %	Eficacia de unión a la Matriz Nuclear % *.
1	AC002128	28543-28841	40	59	40
2	AC002132	9575-10020	50	46	50
3	AC002132	14934-15333	51	41	75
4	AC002997	23799-22822	41	61	20
5	AC002997	30367-31030	39	39	20
6	AC002115	6361-7037	45	43	30
7	U95090	3681-3352	44	59	10
8	AC002133	18499-18938	46	34	120
9	AC002133	31379-31559	54	48	70
10	AD000864	11263-10625	50	35	90
11	AF038458	24698-24511	57	30	80
12	AF038458	29101-29468	41	68	40
13	AF038458	71228-71670	50	36	45
14	AC002116	2683-2239	46	39	60
15	AC004144	27978-28345	49	41	40
16	AD001527	22629-22125	51	51	50

*Comparando con un control positivo, el inserto del plasmido pUCMAR10.

Tabla 3. Propiedades de las secuencias MARs del locus de una megabase del cromosoma 19q13.12 humano. Tomado de Chernov I.P. *et al* 2002.

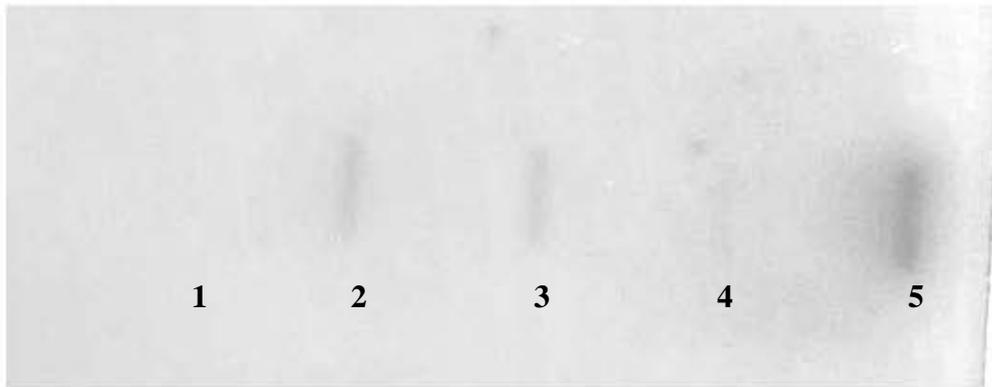


Figura 17. Dot Blot . Los dot corresponden a: **1)** DNA obtenido de los DPC basales de la línea celular Hep G2. **2)** DNA obtenido de los DPCs inducidos por NaAsO_2 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ en células de la línea Hep G2. **3)** Repetición del 2. **4)** Control negativo de secuencias no MARs. **5)**Control positivo de secuencias MARs.

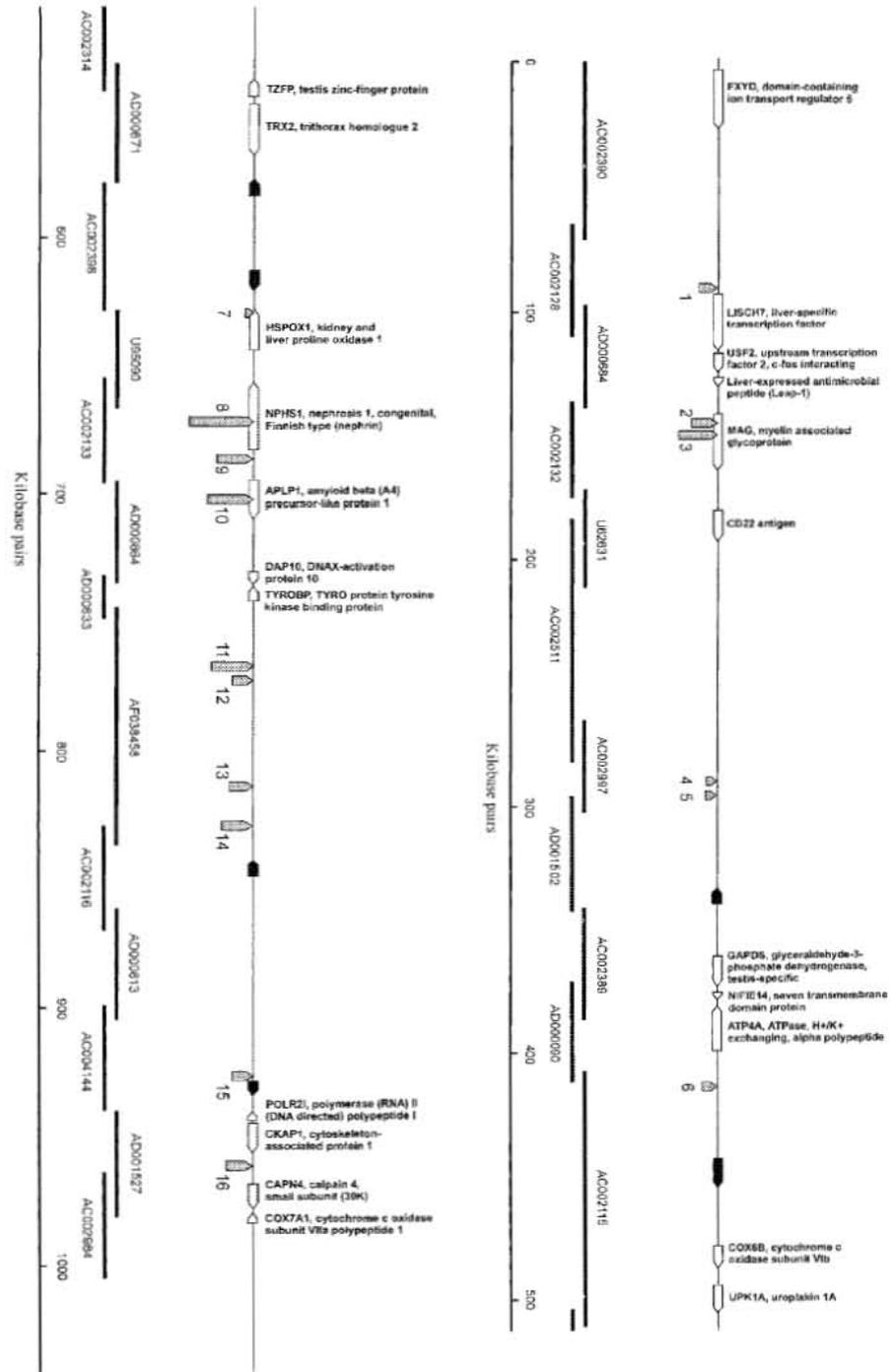


Figura 19. Mapa de las secuencias de unión a matriz nuclear (MARs) en un locus de una megabase del cromosoma 19q13.12 humano (Tomado de Chernov I.P. et al/2002).

Discusión y Conclusiones.

Dado que los DPC han recibido menos atención que otros tipos de daño al DNA, sus mecanismos de reparación y consecuencias biológicas aun no están bien entendidos. En parte debido a que los agentes inductores de DPC inevitablemente inducen otros tipos de daño al DNA y a proteínas.

Los DPC alteran el superenrollamiento del DNA al modificar las interacciones temporales del DNA con la matriz nuclear, por lo que pueden influir en la reparación del DNA y en otros procesos al alterar su conformación, las posibilidades de remodelación y/o accesibilidad. Aunque las consecuencias bioquímicas más evidentes de los DPC son el bloqueo de la replicación, la transcripción y la recombinación.

Las evidencias experimentales sugieren que los DPC contribuyen a los efectos citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos de un gran número de agentes. El esclarecimiento de las secuencias de DNA involucradas en los DPC, nos permitirá delinear la relevancia biológica de este tipo de lesiones además de proporcionar ideas de cómo ocurren los procesos celulares tales como las interacciones entre matriz nuclear y el DNA. La participación de proteínas y secuencias de DNA particulares en los DPC inducidos por diversos agentes ambientales y ocupacionales es de utilidad en el análisis de mutagénesis y carcinogénesis.

En este trabajo se destacan los avances en el análisis de los DPC y al mismo tiempo se subraya la necesidad de identificación de las secuencias de DNA y proteínas involucradas en estas lesiones para el entendimiento de sus consecuencias biológicas y mecanismos de reparación.

Una de las secuencias identificadas en los DPC inducidos por NaAsO₂ en hepatocitos alineó muy próxima a los genes Guanilin y Uroguanilin, como se observa en el mapa genético de la figura 7. Los péptidos **Guanilin** (GCAP.1, péptido activador de Guanilato ciclasa 1) y **Uroguanilin** (GCAP 2 , péptido activador de guanilato ciclasa 2), son péptidos involucrados en la regulación del balance intestinal Cloro/Agua. Ambos tienen significativa homología estructural con la enterotoxina STa de *E. coli* que se une a la partícula de guanilato ciclasa C causando diarrea en mamíferos. En el presente trabajo al tratarse de una línea celular hepática, posiblemente estos genes no se expresan de igual manera que en las células intestinales, sin embargo el hecho de encontrar DPC tan próximos a secuencias codificantes nos sugiere que la presencia de este tipo de lesiones podría inhibir la expresión de algunos genes, al impedir el paso de la maquinaria de transcripción o bloqueando los sitios de unión a activadores o potenciadores de la transcripción en caso de que secuencias regulatorias que estén formando parte de los DPC, alterando así el metabolismo celular.

Por otro lado, en este trabajo encontramos que las secuencias repetidas de DNA se entrecruzan con proteínas en células Hep G2 expuestas a NaAsO₂. Las secuencias repetidas de DNA en el genoma humano son numerosas y diversas en su composición de bases. Varias de ellas están agrupadas y poseen claramente posiciones definidas en los cromosomas. Las más abundantes son las agrupaciones de genes ribosomales, las repeticiones α -satelite de centrómeros y las repeticiones teloméricas.

Los genes ribosomales humanos (rDNA) son repeticiones en tandem en los brazos P de los cinco pares de cromosomas acrocéntricos. Cada unidad incluye una región que se transcribe de 13Kb y una región de espacio inter génico (IGS) de unas 30Kb.

Al analizar los IGS del rDNA se han identificado potenciadores de la transcripción (enhancers), orígenes de replicación y secuencias de unión a matriz nuclear. También se ha visto a través de microscopía confocal láser que las secuencias IGS participan en la organización y empaquetamiento del nucleolo interfásico.

El genoma diploide hay alrededor de 400 copias de rDNA con pequeñas variaciones entre cada una. Recientes estudios tanto en la región transcribible como en la IGS han demostrado variabilidad en dos niveles: a) En la cantidad de bloques de repeticiones de la secuencia (LaVolpe *et al* 1984; Erickson y Schmickel 1985; Silvestre *et al* 1986, 1989), las variaciones en longitud surgen de intercambios homólogos desiguales y b) Variaciones en forma de microsatélite (González *et al* 1985; 1990; Maden *et al* 1987; Sasaki *et al* 1987), estas variaciones surgen por apareamiento de bases erróneas durante la replicación (Tautz *et al* 1986; Levinston y Gutman 1987).

En las figuras (12-15) se observan las secuencias de rDNA presentes en los DPC inducidos por NaAsO₂ en células de la línea Hep G-2. Se ha descrito que los genes ribosomales muestran patrones de unión a matriz nuclear dependientes de transcripción, células transcripcionalmente inactivas (con sus genes ribosomales apagados), tienen los genes ribosomales localizados fuera del nucleolo sin interactuar con proteínas del nucleoesqueleto, mientras que en células transcripcionalmente activas los genes ribosomales se organizan en el nucleolo y se asocian con proteínas nucleolares.

El establecimiento de uniones covalentes permanentes entre secuencias de rDNA y proteínas nucleares o nucleolares impediría la expresión de los genes ribosomales que se reflejaría en alteraciones en la producción de maquinaria de traducción de proteínas en la célula.

De igual forma, los tratamientos con NaAsO₂ promovieron entrecruzamientos entre secuencias centroméricas y proteínas. Es sabido que el centrómero es un dominio cromosómico requerido para la segregación apropiada durante la división celular mitótica o meiótica. Un centrómero humano típico, aparece como una constricción primaria en cromosomas metafásicos y contiene principalmente DNA alpha satélite. El DNA alfoide, tiene unidades repetidas de 171pb de longitud organizadas en tandem. La longitud del arreglo alfoide entero del centrómero varia de 0.2 a 5Mb. La secuencia de nucleótidos del DNA alfoide y su organización varia en los distintos cromosomas humanos. Estas variantes se clasifican en 12 distintos tipos de monómeros y cinco familias.

Las regiones pericentroméricas de los cromosomas humanos también contienen secuencias satélites clásicas de tipo I, II y III así como secuencias beta y gamma-satélites. La organización de los centrómeros humanos se ha estudiado ampliamente debido a su importancia biológica y también porque el entendimiento de la estructura y función del centrómero es requerida para la producción de cromosomas humanos artificiales (HAC) que funcionan como vectores de inserción de genes con potenciales aplicaciones terapéuticas (Kouprina N. *et al*, 2003).

Se han identificado dos repeticiones alfoides ancestrales: El tipo B que contiene sitios de unión para proteínas de centrómero CENP-B y el tipo A que carece de este sitio de unión a proteínas CENP-B (Romanova, LY *et al*. 1996). En este estudio, como se observa en la figura 9, se identificaron secuencias CENP-B en el DNA que se obtuvo de los DPC mediante ensayos de PCR empleando los primers específicos para dichas secuencias reportados por RomanovaL *et al* en 1996.

Dado que el centrómero es un dominio cromosómico requerido para la segregación apropiada durante la división celular mitótica y meiotica, el establecimiento de uniones covalentes entre secuencias centroméricas y las proteínas del huso mitótico, traería como consecuencia la pérdida o ganancia de cromosomas en las células hijas al momento de la división celular, generando células aneuploides o poliploides.

Adicionalmente encontramos secuencias teloméricas en el DNA obtenido de los DPC mediante ensayos por PCR con primers de secuencia específica para estas regiones con el hexámero TTAGGG.

Los telómeros consisten en hexanucleótidos altamente repetitivos de la secuencia TTAGGG. La longitud de estas repeticiones es especie específica y tipo celular específica (Lejnine *et al* 1995). Regiones de DNA telomérico se pierden en cada ronda de replicación del DNA, por lo que la longitud de los telómeros es un indicativo del número de ciclos celulares en células somáticas normales. Los telómeros se asocian con un gran número de proteínas específicas (Zakian 1995; Cockell *et al* 1998).

El establecimiento de uniones covalentes entre secuencias teloméricas y proteínas nucleares, provocaría disturbios en el complejo telomérico que pueden resultar en aberraciones cromosómicas por la fusión de los extremos de dos cromosomas, o la fusión de extremos del mismo cromosoma.

Se requieren estudios adicionales para entender la naturaleza de los mecanismos de unión entre secuencias repetidas y proteínas del nucleoesqueleto y su significado funcional.

Puesto que se han reportado proteínas de matriz nuclear como citoqueratinas (Ramírez P. *et al.* 2000) y vimentina (Tolstonog G.V. 2001) formando parte de los DPC inducidos por arsénico y formaldehído respectivamente, en este trabajo decidimos buscar mediante un ensayo de Dot Blot si las secuencias con dominios de unión a matriz nuclear bien caracterizadas en un locus de una megabase del cromosoma 19 formaban parte de los DPC inducidos por NaAsO₂ en hepatocitos humanos.

Dichas secuencias se encontraron presentes en el DNA de los DPC como se observa en la figura 17. Lo que probablemente se debe a que las interacciones entre proteínas de matriz nuclear como las citoqueratinas con el DNA se vuelven irreversibles en presencia de arsénico (Ramírez P. *et al* 2000).

Por otro lado, Balasubramaniam U. Y Oleinck N.L. en 1995 demostraron que el microambiente que resulta de la unión de secuencias MARs a la red dinámica de RNA y proteínas que constituyen la matriz nuclear es hipersensible a la formación de DPC en células expuestas a IR.

Adicionalmente, existen evidencias de alteraciones en las proteínas de Matriz nuclear unidas a DNA, en células de cáncer de mama. Lo que sugiere que la progresión del cáncer de mama esta acompañada por una reorganización de dominios cromosómicos que pueden promover alteraciones en la expresión génica (Spencer V. *et al*, 2001).

Referencias.

- Agresti, A y Bianchi, ME. **HMGB proteins and gene expression**, Curr. Opin. Genet. Dev. 13 (2003) 170–178.
- Al-Nabulsi I. y Wheeler K.T. **Temperature dependence of radiation-induced DNA-protein crosslink's formed under hypoxic conditions**, Radiat. Res. 148 (1997) 568-574
- Altman S.A., Zastawny T.H., Randers-Eichhorn L., Cacciuttolo M.A. Akman S.A., Dizdaroglu M., Rao G. **Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions**, Free Radic. Biol. Med. 19(1995) 897–902.
- Arnheim, N; Krystal, M; Schmickel, R; Wilson, G; Ryder, O; and Zimmer, E. **Molecular evidence for exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(1980)7323-7327.
- Balasubramaniam, U; Oleinick, N.L. **Preferential cross-linking of matrix-attachment region (MAR) containing DNA fragments to the isolated nuclear matrix by ionizing radiation**, Biochemistry 34 (1995) 12790–12802.
- Barret, J.M; Calsou, P; Salles, B. **Deficient nucleotide excision repair activity in protein extracts from normal human lymphocytes**, Carcinogenesis 16 (1995) 1611–1616.
- Billings, P.C; Davis, R.J Engelsberg, B.N; Skov, K.A; Hughes E.N. **Characterization of high mobility group protein binding to cisplatin-damaged DNA**, Biochem. Biophys. Res. Commun. 188 (1992) 1286–1294.
- Bohr V. and P.E. Nielsen, **DNA crosslinks repair in human lymphocytes. Comparison of a alkaline elution whit electron microscopy**, Biochem. Biophys. Acta. 783(1984) 183-186.
- Bradley, M. and G. Disart, **DNA single- strand breaks, double-strand breaks, and crosslinks in rat testicular germ cells: measurements of their formation and repair by alkaline and neutral filter elution**, Cell Biol. Toxicol.1(1985) 181-195.
- Bustin, M. **HMGN dynamics and chromatin function**, Biochem. Cell Biol. 81 (2003) 113–122.

- Casanova, M., Conolly, R. and Heck H. ***DNA-Protein Cross-Links (DPX) and Cell Proliferation in B6C3F1 Mice but Not Syrian Golden Hamsters Exposed to Dichloromethane: Pharmacokinetics and Risk Assessment with DPX as Dosimeter.*** *Fundamental and Applied Toxicology.* 31(1996)103-116.
- Chakrabarti SK., Bai C., Subramanian KS., ***DNA-protein Crosslinks induced by nickel compounds in isolated rat renal cortical cells and its antagonism by specific amino acids and magnesium ion.*** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154 (1999) 245-255.
- Chakrabarti SK., Bai C., Subramanian KS., ***DNA-protein crosslinks induced by nickel compounds in isolated rat lymphocytes: role of reactive oxygen species and specific amino acids,*** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170 (2001)153-165.
- Chen, C. J., Chen, C. W., Wu, M. M. and Kuo T. L. ***Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water,*** *Br. J. Cancer* 66(1992)888-892.
- Chernov, I.P. Akopov S.B., Nikolaev N.G. and Sverdlov E.D. ***Identification and Mapping of Nuclear Matrix- Attachment Regions in a One Megabase Locus of Human Chromosome 19q13.12: Long-Range Correlations of s/MARs and Gene Positions.*** *Journal of cellular Biochemistry* 84(2002) 590-600.
- Chiu, S.M; Xue, L. Y; Friedman, L.R; Oleinick, N.L. ***DNA-protein crosslinks: formation and repair in irradiated cells,*** in: U. Hagen, H. Jung, C. Streffer (Eds.), *Radiation Research 1895–1995, Congress Proceedings, vol. 2: Congress Lectures, ICR Society, 1995, pp. 400–403.*
- Clewell, H. J., Gentry, P. R., Barton, H. A., Shipp A. M., Yager, J.W. and Andersen, M. E. ***Requirements for a biologically realistic cancer risk assessment for inorganic arsenic.*** *Int. J. Toxicol.* 18(1999)131-147.
- Cohen M. Catherine B. Klein and Max Costa. ***Forward mutations and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in cultured mammalian cells.*** *Mutation Research,* 269 (1992) 141-148.
- Cockell, M; Renauld H; Watt P; and Gasser ***Sif2p interacts with Sir4p amino-terminal domain and antagonizes telomeric silencing in yeast.*** *Curr. Biol.* 8(1998)787-790.

- Connaway, C.J., Whysner, L.K. and Verna, G.M. **Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adducts formation**, Pharmacol. Ther. 71(1996) 29-55.
- Connelly John C. and Leach D. **Repair of DNA covalently linked to protein**. Molecular cell, 13(2004)307-316
- Costa, M., Zhitkovich, A. and Toniolo, P. **DNA-Protein Cross-Links in welders: molecular implications**. Cancer Res. 53(1993) 460-463.
- Costa, M., et al **Interlaboratory validation of a new assay for DNA-protein crosslinks**. Mutation Research 369 (1996) 13-21.
- Coulombe RAJ., Drew GL., Stermitz FR., **Pyrrolizidine alkaloids crosslink DNA with actin**, Toxicol. Appl. Pharmacol. 15 (1999) 198–202.
- Cox, M.M. **The nonmutagenic repair of broken replication forks via recombination**, Mutat. Res. 510 (2002) 107–120.
- Cupo, D.Y and Wetterhahn, K.E **Binding of chromium to chromatin and DNA from liver and kidney of rats treated with sodium dichromate and chromium(III) chloride in vivo**, Cancer Res. 45 (1985) 1146–1151.
- DeMott, M.S; Beyret, E; Wong, D; Bales, B.C; Hwang, J.T; Greenberg, M.M; Demple, B. **Covalent trapping of human DNA polymerase beta by the oxidative DNA lesion 2-deoxyribonolactone**, J. Biol. Chem. 277 (2002) 7637–7640.
- Desai, S.D; Liu, D.L; Vazquez-Abad, D; D'Arpa, P **Ubiquitindependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin**, J. Biol. Chem. 272 (1997)24159–24164.
- Dizdaroglu, M., Gajewsky, E., Reddy, P. and Margolis, S. **Structure of a hydroxyl radical induced DNA-Protein cross-link involving thymine and tyrosine in nucleohistone**, Biochemistry 28(1989) 3625-3628.
- Dizdaroglu M. and Gajewski E. **Structure and mechanism of hydroxyl radical-induced formation of a DNA–protein crosslink involving thymine and lysine in nucleohistone**, Cancer Res. 49 (1989) 3463–3467.
- Dong, J. And Luo, M.X. **Arsenic induced DNA-strand breaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts**, Mutation Res., 302(1993) 97-102.

- Ducore JM. **EDTA alkaline elution characteristics and measurement of DNA damage in unlabeled DNA using Hoechst 33258 fluorescence.** Environ Mol Mutagen. 11-4(1988)449-460.
- Erickson J.M. and Schmickel R.D. **A molecular basis for discrete size variation in human ribosomal DNA.** Am. J. Hum. Genet. 37(1985)311-325
- Esterbauer, H. **Aldehydic products of lipid peroxidation**, in: Voitkun, A. and Zhitkovich, A. **Analysis of DNA-Protein crosslinking activity of Malondialdehyde in vitro**, Mutat. Res. 424(1999) 97-106.
- Fornace A.J and Little JB. **DNA crosslinking induced by X-rays and chemical agents.** Biochim. Biophys. Acta 477(1977) 343-355.
- Fornace A.J and Little JB. **DNA-protein cross-linking by chemical carcinogens in mammalian cells.** Cancer Res. 39(1979) 704-710
- Freshney , R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques;** 4th ed. Wiley- Liss. Printed in the United States of América. 577pp.
- Fuqiang Ban et al. **Theoretical studies of the Cross-Linking Mechanisms between Cytosine and Tyrosine.** J. Am. Chem. Soc. Vol. 124 No. 11(2002) 2753-2761.
- Gajewski, E. and Dizdaroglu, M. **Hydroxyl radical induced cross-linking of cytosine and tyrosine in nucleohistone**, Biochemistry 29(1990) 977-980.
- Gajewski, E., Fuciarelli AF., Dizdaroglu M. **Structure of hydroxyl radical-induced DNA–protein crosslinks in calf thymus nucleohistone in vitro**, Int. J. Radiat. Biol. 54 (1988) 445–459.
- Gantt, R. **A cell cycle-associated pathway for repair of DNA-Protein crosslinks in mammalian cells**, Mutat. Res. 183(1987) 75-78.
- Germolec, D. R., Yoshida, T., Gaido, K. J., Wilmer, J. L., Simeonova, P. P., Kayama, F., Burleson, F., Dong, W., Lange, R. W. and Luster, M. I. **Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes**, Toxicol. Appl. Pharmacol. 141(1996) 308-318.
- Gonsebatt ME.,Vega L.,Salazar AM., Montero R., Gazman P., Blas J., Del Razo LM., García Vargas G., Albores A., Cebrian ME., Kelsh M and Ostrosky Wegman P. **Cytogenetic effects in human exposure to Arsenic.** Mutat Res. 386(1997)2199-228.

- Gonzalez I.L; Gorski, J.L; Campen T.J. Dorney, D.J. Ericson J.M; Sylvester J.E; and Schmickel R.D. **Variation among human 28s ribosomal RNA genes**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(1985)7666-7670
- Gonzalez I and Sylvester J E. **Complete sequence of the 43Kb Human Ribosomal DNA Repeat: Analysis of the intergenic spacer**. Genomics 27(1995) 320-328
- Gutiérrez-Ruiz, M. L., Bucio, V., Souza, J. J., Gómez, C., and A. Cárabez. **Éxpression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture**, In vitro cell Dev. Biol., 30^a(1994) 366-371.
- Hashimoto, M; Greenberg, M.M; Kow, Y.W; Hwang, J.T; Cunningham, R.P. **The 2-deoxyribonolactone lesion produced in DNA by neocarzinostatin and other damaging agents forms cross-links with the base-excision repair enzyme endonuclease III**, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 3161–3162.
- Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J., **Reaction of protein chloramines with DNA and nucleosides: evidence for the formation of radicals, protein–DNA cross-links and DNA fragmentation**, Biochem. J. 365 (2002) 605–615.
- Hofmann, W;Reichart, B; Ewald, A; Muller, E; Schmitt, I Stauber, R.H; Lottspeich, F; Jockusch, B.M; Scheer, U; Hauber, J; Dabauvalle, M.C. **Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin**, J. Cell Biol. 152 (2001) 895–910.
- IARC (1980) **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans**. Vol. 23. Some Metal and Metallic compounds. IARC, Lyon.
- IARC (1987) **Arsenic and arsenic compounds**, in: IARC Monographs, Suppl. Vol.7, IARC, Lyon.
- Izzotti, A; Cartiglia, C; Taningher, M; De Flora, S; Balansky, R. **Age-related increases of 8-hydroxy-20-deoxyguanosine and DNA–protein crosslinks in mouse organs**, Mutat. Res. 446 (1999) 215–223.
- Jha, A.N., Noditi, M., Nilsson, R.and Natarajan, A.T, **Genotoxic effects of sodium arsenite on human cell**. Mutation Res. 284(1992) 215-221.

- Kouprina N., Ebersole T., Koriabine M., Pak E., Rogozin IB., Katoh M., Oshimura M., Ogi K., Peredelchuk M., Solomon G., Brown W., Barret JC., and Larionov V. ***Cloning of human centromeres by transformation-associated recombination in yeast and generation of functional human artificial chromosomes.*** Nucleic Acids Research, vol. 31 No. 3 (2003)922-934.
- Krynetski, E.Y; Krynetskaia, N.F; Bianchi, M.E; Evans, W.E. ***A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues,*** Cancer Res. 63 (2003) 100–106.
- Kulcharyk, P.A; Heinecke, J.W. ***Hypochlorous acid produced by the myeloperoxidase system of human phagocytes induces covalent cross-links between DNA and protein,*** Biochemistry 40 (2001) 3648–3656.
- Kuykendall JR., Bogdanffy MS., ***Reaction kinetics of DNA–histone crosslinking by vinyl acetate and acetaldehyde,*** Carcinogenesis 13 (1992) 2095–2100.
- Kuykendall JR., Bogdanffy MS., ***Efficiency of DNA–histone crosslinking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro,*** Mutat. Res. 283 (1992) 131–136.
- Kuykendall JR., Bogdanffy MS., ***Formation and stability of acetaldehyde-induced crosslinks between poly-lysine and poly-deoxyguanosine,*** Mutat. Res. 311 (1994) 49–56.
- La Volpe, A; Fidanza, V; Da Falco A; Scotto L; Simeone A; and Boncinelli E; ***Molecular organization of the heterogeneity region of human ribosomal genes.*** Bull. Mol. Biol. Med. 9(1984)27-34.
- Lee, T.C., Tzenng, S.F., Chang, W.J., Lin, Y.C. and Jan K. Y. ***Post-treatments with sodium arsenite during G2 enhance the frequency of chromosomal aberrations induced by S-dependent clastogens,*** mutation Res.,163(1986)263-269.
- Legerski, R.J & Richie, C. ***Mechanisms of repair of interstrand crosslinks in DNA,*** Cancer Treat. Res. 112 (2002) 109- 128.

- Lejnine, S; Makarov V.L; and Langmore J.P. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92(1995)2393-2397.
- Leman, E.S & Betzenberg, R.H. **Nuclear matrix proteins as biomarkers in prostate cancer**, J. Cell. Biochem. 86 (2002)213–223.
- Levinson, G; and Gutman G.A. **Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution**. Mol. Biol. Evol. 4(1987)203-221.
- Li, L; Peterson, C.A; Lu, X; Wei, P; Legerski, R.J. **Interstrand cross-links induce DNA synthesis in damaged and undamaged plasmids in mammalian cell extracts**, Mol. Cell. Biol.19 (1999) 5619–5630.
- Luque, José y Angel Hernandez. **Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética**. Ed. Harcourt, Elsevier science imprint. Madrid, España 2000, 469pp.
- Ma T.H. **Review of the genotoxicity of formaldehyde**. Mutat. Res. 196(1988) 37-59
- Maden, B. E. H; Dent, C. L. Farrell, T.E; Garde J. McCallum, F.S; and Wakeman J.A. **Clones of human ribosomal DNA containing the complete 18S rRNA and 28S rRNA genes**. Biochem. J. 246(1987)519-527.
- Marnett L.J. and Burchman P.C. **Endogenous DNA adducts: potential and paradox**, Chem. Res. Tox. 6(1993) 771-785.
- Masumoto H; Masukata H; Muro Y; Nozaki N; and Okazaki T. **A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a Human centromeric satellite**. J. Cell Biol.109(1989)1963-1973.
- Mattagajasingh SN., Misra HP. **Analysis of EDTA-chelatable proteins from DNA-protein crosslinks induced by a carcinogenic chromium (VI) in cultured intact human cells**. Mol. Cell. Biochem. 199 (1999)149-162.
- Mattagajasingh SN., Misra HP., **Mechanisms of the carcinogenic chromium(VI)-induced DNA-protein cross-linking and their characterization in cultured intact human cells**, J. Biol. Chem. 271 (1996) 33550–33560.
- Merk O., Reiser K. and Speit G. **Analysis of chromate-induced DNA-protein cross-links with the comet assay**. Mutat. Res. 471(2000) 71-80.

- Merk O and Speit G. **Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity.** Environ. Mol. Mutagen. 33(1999) 167-172.
- Meyne J; Gayle Littlefield L; and Moyzis R. K. **Labeling of human centromeres using an alphoid DNA consensus sequence: application to the scoring of chromosome aberrations.** Mutat. Res. 226(1989)75-79.
- Meyn RE, Jenkins WT and Murray D. **Radiation damage to DNA in various animal tissues: a comparison of yields and repair in vivo and in vitro.** Basic Life Sci. 38(1986)151-158
- Meyn RE., VanAnkeren SC., Jenkins WT. **The induction of DNA-protein crosslinks in hypoxic cells and their possible contribution to cell lethality,** Radiat Res. 109 (1987)419-429.
- Miller CAI., Cohen MD., Costa M., **Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by cis-diamminedichloroplatinum(II) and chromium compounds,** Carcinogenesis 12(1991) 269–276.
- Miller CA., Costa M., **Analysis of proteins cross-linked to DNA after treatment of cells with formaldehyde, chromate, and cis-diamminedichloroplatinum(II),** Mol. Toxicol. 2(1989) 11–26.
- Murata-Kamiya, N; Kamiya, H. **Methylglyoxal, an endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA,** Nucleic Acids Res. 29 (2001) 3433–3438.
- Murray, D; Macann, A; Hanson, J; Rosenberg, E. **ERCC1/ERCC4 50-endonuclease activity as a determinant of hypoxic cell radiosensitivity,** Int. J. Radiat. Biol. 69 (1996) 319–327.
- Murray, D & Rosenberg, E. **The importance of the ERCC1/ERCC4[XPF] complex for hypoxic-cell radioresistance does not appear to derive from its participation in the nucleotide excision repair pathway,** Mutat. Res. 364 (1996) 217–226.
- Murray, D; Vallee-Lucic, L. Rosenberg, E; Andersson, B **Sensitivity of nucleotide excision repair-deficient human cells to ionizing radiation and cyclophosphamide,** Anticancer Res. 22 (2002) 21–26.
- Nagatani, G; Nomoto, M; Takano, H; Ise, T; Kato, K; Imamura, T; Izumi, H Makishima, K; Kohno, K. **Transcrip- cross-links in mammalian cells,** Br. J. Cancer Suppl. 8 (1987)135–140.

- Nakano, T; Terato, H; Asagoshi, K; Masaoka, A; Mukuta, M; Ohyama, Y; Suzuki, T; Makino, K. ***H. Ide, DNA–protein cross-link formation mediated by oxanine. A novel genotoxic mechanism of nitric oxide-induced DNA damage***, J. Biol. Chem. 278 (2003) 25264–25272.
- Oleinick, N.L; Chiu, S.M; Friedman, L.R; Xue, L.Y; Ramakrishnan, N. ***DNA–protein cross-links: new insights into their formation and repair in irradiated mammalian cells***, Basic Life Sci. 38 (1986) 181–192.
- Oleinick, N.L; Chiu, S.M; Ramakrishnan, N; Xue, L.Y. ***The formation, identification, and significance of DNA–protein cross-links in mammalian cells***, Br. J. Cancer Suppl. 8 (1987)135–140.
- Olinski R., Neckerdien Z. and Dizdaroglu M. ***DNA-protein cross-links between Thymine and Tyrosine in chromatin of gamma-irradiated or H₂O₂ treated cultured human cells***. Arch. Biochem. Biophys. 297(1992) 139-143.
- O'Connor PM., Fox BW., ***Isolation and characterization of proteins cross-linked to DNA by the antitumor agent methylene dimethanesulfonate and its hydrolytic product formaldehyde***, J. Biol. Chem. 264 (1989) 6391–6397.
- Orlando V., Strutt H. and Paro R. ***Analysis of chromatin structure by in vitro formaldehyde cross-ling***. Methods 11(1997) 205-214.
- Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., Garcían-Vargas, G., Del Razo L.M and cebrian, M. ***Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico***. Mutation Res.250 (1991)477-482.
- Petres, J., Baron D. and Hagerdon, M. ***Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation: cytogenetic and biochemical studies***, Environ. Health perspec.,19(1977)223-227.
- Quievryn G., Zhitkovich A., ***Loss of DNA–protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteosome function***, Carcinogenesis 21 (2000) 1573–1580.
- Radford IR. ***Effect of radio modifying agents on the ratios of X-ray-induced lesions in cellular DNA: use in lethal lesion determination***. Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 49 (1986) 621-637.
- Rajski, S.R; Rollins, S.B; Williams, R.M; ***FR-66979 covalently cross-links the binding domain of the high-mobility group I/Y proteins to DNA***, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 2192–2193.

- Rajski, S R; Williams, R.M. **Observations on the covalent cross-linking of the binding domain (BD) of the high mobility group I/Y (HMG I/Y) proteins to DNA by FR66979**, Bio org. Med. Chem. 8 (2000) 1331–1342.
- Ramirez, P., Del Razo, L.M., Gutierrez-Ruíz M.C and Gonsebatt M.Er. **Asenite induces DNA-Protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human cell line**. Carcinogenesis 21(2000)701-706.
- Roberts MJ., Wondrac GT., Leurean DC., Jacobson MK., Jacobson EL. **DNA damage by carbonil stress in human skin cells**, Mutat. Res. 522 (2003) 45-56
- Romanova, L.Y.,Deriagin, G.V.,Mashkova, T.D.,Tumeneva, I.G.,Mushegian, A.R.,Kisselev, L.L. and Alexandrov, I.A. **Evidence for selection in evolution of alpha satellite DNA: the central role of CENP-B/pJ alpha binding region**. J. Mol. Biol.,26 (1996) 334-340
- Rosenquist, T.A; Zaika, E; Fernandes, A.S; Zharkov, D.O; Miller, H; Grollman, A.P. **The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death, DNA Repair (Amst.) 2 (2003) 581–591.**
- Rungger, D; Rungger-Brandle, E; Chaponnier, C; Gabbiani, G. **Intranuclear injection of anti-actin antibodies into Xenopus oocytes blocks chromosome condensation**, Nature 282 (1979) 320–321.
- Samuel SK., Spencer VA., Bajno L., Sun JM., Holt LT., Oesterreich S y Davie JR. **In situ cross-linking by cisplatin of nuclear matrix-bound transcription factors to nuclear DNA of human breast cancer cells**. Cancer res 58(1998) 3004-3008.
- Sasaki,T; Okazaki, T; Muramatsu, M; and Kominami, R; **Variation among mouse ribosomal RNA genes within and between chromosomes**. Mol. Biol. Evol. 4(1987)594-601.
- Spencer, V.A; Samuel, S.K; Davie, J.R. **Altered profiles in nuclear matrix proteins associated with DNA in situ during progression of breast cancer cells**, Cancer Res. 61 (2001)1362–1366.
- Schoen, A., Beck B., Sharma, R and Dubé E. **Arsenic Toxicity at low doses: epidemiological and mode of action considerations**. Toxicology and Applied Pharmacology 198(2004) 253-267.
- Singh N. **Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis**, Mutat. Res. 455(2000) 111-127.

- Singer B., Grunberger D., **Reactions of directly acting agents with nucleic acids**, en: B. Singer, D. Grunberger (Eds.), Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens, Plenum Publishing Corp., New York, 1983, pp. 53–55.
- Snow, E.T. **Metal carcinogenesis: mechanistic implications**, *Pharmacol. Ther.* 532(1992)31-65.
- Spencer, V.A; Samuel, S.K; Davie, J.R. **Altered profiles in nuclear matrix proteins associated with DNA in situ during progression of breast cancer cells**, *Cancer Res.* 61 (2001)1362–1366.
- Squibb, K. S. and Fowler B.A. (1983) **The toxicity of arsenic and its compounds**. In B.A. Fowler (ed.) Biological and Environmental Effects of arsenic. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands, pp.223-263.
- Styblo M and Thomas DJ. **In vitro inhibition of glutathione reductase by arsenotriglutathione**. *Biochem Pharmacol.*, 499(1995)971-977.
- Styblo, M., Del Razo, L.M., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Wang, C., Cullen, W.R. and Thomas D.J. **Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes**, *Chem. Res. Toxicol.* 12(1999)560-565.
- Sugiyama, M; Patierno, S.R; Cantoni, O; Costa, M. **Characterization of DNA lesions induced by CaCrO₄ in synchronous and asynchronous cultured mammalian cells**, *Mol. Pharmacol.* 29 (1986) 606–613.
- Suzuki, T; Yamada, M; Nakamura, T; Ide, H; Kanaori, K; Tajima, K; Morii, T; Makino, K. **Products of the reaction between a diazoate derivative of 20-deoxycytidine and Llysine and its implication for DNA–nucleoprotein crosslinking by NO or HNO(2)**, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 1223–1227.
- Sylvester, J.E; Whiteman, D.A; Podolsky, R; Pozsgay J.M; Respass, J; and Schmickel, R.D. **The human ribosomal RNA genes: Structure and organization of the complete repeating unit**. *Hum. Genet.* 73(1986) 193-198.
- Sylvester, J.E; Petersen, R; and Schmickel, R.D. **Human ribosomal DNA: Novel sequence organization in 4.5 kilobases upstream of the promoter**. *Gene* 84(1989)193-196.
- Tautz, D; Trick, M; and Dover, G.A. **Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation**. *Nature* 322(1986)652-656.
- Thompson, L.H. **Evidence that mammalian cells possess homologous recombinational repair pathways**, *Mutat. Res.* 363 (1996) 77–88.

- Tolstonog G.V. Mothes E., Shoeman R.L., Traub P. **Isolation of SDS-stable complexes of the intermediate filament protein vimentin with repetitive , mobile, nuclear matrix attachment region, and mitochondrial DNA sequences elements from cultured mouse and human fibroblast.** DNA Cell Biol. 20(2001) 531-554.
- Tolstonog, G.V; Sabasch, M; Traub, P. **Cytoplasmic intermediate filaments are stably associated with nuclear matrices and potentially modulate their DNA-binding function,** DNA Cell Biol. 21 (2002) 213–239.
- Toniolo, P., Zhitkovich, A. Costa, M. **Development and utilization of a new simple assay for DNA-protein crosslinks as a biomarker of exposure to welding fumes,** Int. Arch. Occup. Environ. Health 65(1993)s87-s89.
- Toyokuni, S., Mori, T., Hiai M., Dizdaroglu M. **Treatment of Wistar rats with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, causes DNA–protein cross-linking between thymine and tyrosine in their renal chromatin,** Int. J. Cancer 62 (1995)309–313.
- Tsapakos, M.J; Hampton, T.H; Wetterhahn, K.E. **Chromium(VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver, and lung,** Cancer Res. 43 (1983) 5662–5667.
- VanderWaal, RP., Spitz DR., Griffith CL., Higashikubo R., Roti Roti JL., **Evidence that protein disulfide isomerase (PDI) is involved in DNA–nuclear matrix anchoring,** J. Cell. Biochem. 85 (2002) 689–702.
- Voitkun, V. and Zhitkovich A. **Analysis of DNA-Protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro,** Mutat. Res. 424(1999) 97-106.
- Wang, J.F; Bashir, M; Engelsberg, B.N; Witmer, C; Rozmiarek, H; Billings, P.C. **High mobility group proteins 1 and 2 recognize chromium-damaged DNA,** Carcinogenesis 18 (1997) 371–375.
- Wedrychowski, A., Shmidt, W.N. and Hinilica, L.S. **DNA-Protein crosslinking by heavy metals in Novikoff hepatoma,** Arch. Biochem. Biophys. 251(1986) 397-402.
- Weipoltshammer K; Shöfer Ch; Almeder M; Philimonenko V; Frei K; Wachtler F; and Hozák P. **Intranuclear anchoring of repetitive DNA sequences: centromeres, telomeres, and ribosomal DNA.** J. Cell. Biology. 147(1999)1409-1418.

- Weir Lipton M.S, Fuciarelli AF, Springer DL, and Edmonds. **Characterization Of radiation-induced thymine-tyrosine crosslinks by electrospray ionization mass spectrometry.** Radiat. Res. 145 (1996) 681-686.
- Woudstra E.C. **Cromatin Structure, DNA damage, DNA repair and cellular radiosensitivity radiobiology** Thesis, University of Groningen, The Netherlands 1999, 270p.
- Wozniak K. And Blasiak J. **Free radicals-mediated induction of oxidized DNA bases and DNA-protein cross-links by nickel chloride.** Mutat. Res. 514 (2002) 233-243.
- Wu, FA., Lee, YJ., Chen, DR and Kuo, HW. **Association of DNA-protein crosslinks and breast cancer.** Mutat. Res. 501 (2002) 69-78).
- Xue, L.Y; Friedman, L.R; Oleinick, N.L; Chiu, S.M. **Induction of DNA damage in gamma-irradiated nuclei stripped of nuclear protein classes: differential modulation of doublestrand break and DNA-protein crosslink formation,** Int. J. Radiat. Biol. 66 (1994) 11–21.
- Yamauchi, H. and Fowler, B.A.(1994). **Toxicity and metabolism of inorganic and methylated arsenicals.** Citado por Styblo 1999.
- Yong, Ch., Mitchell, D., Snow, E.T. and Costa, M. **Alteration in restriction enzyme digestion patterns detects DNA-protein complexes induced by chromate.** Carcinogenesis 9(1991)1575-1580.
- Zakian V.A. **Telomeres: beginning to understand the end.** Science. 270(1995)1601-1607.
- Zhang H. and Wheeler KT. **Radiation-induced DNA damage in tumors and normal tissues. II Influence of dose, residual DNA damage and physiological factors in oxygenated cells.** Radiat. Res. 140 (1994) 321-326
- Zhang H., Koch CJ.,Wallen CA., Wheeler KT. **Radiation-induced DNA damage in tumors and normal tissues. III. Oxygen dependence of the formation of strand breaks and DNA-protein crosslinks.** Radiat. Res. 142 (1995) 163-168.
- Zahn, R.K; Zahn-Daimler, G; Ax, S; Hosokawa, M; Takeda, T **Assessment of DNA-protein crosslinks in the course of aging in two mouse strains by use of a modified alkaline filter elution applied to whole tissue samples,** Mech. Ageing Dev. 108 (1999) 99–112.

- Zhitkovich, A. and Costa, M. ***A simple sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vitro.*** Carcinogenesis, 13(1992)1485-1489.
- Zhitkovich, A; Voitkun, V; Kluz, T; Costa, M. ***Utilization of DNA-protein cross-links as a biomarker of chromium exposure,*** Environ. Health Perspect. 106 (Suppl. 4) (1998) 969– 974.