



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL ARSÉNICO SOBRE LA  
ACTIVIDAD PROTEOSOMAL EN CULTIVOS  
ORGANOTÍPICOS DE HIGADO DE RATÓN

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACÁDEMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. VERÓNICA CASTRO BEAR

**DIRECTORA DE TESIS:** Dra. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

MÉXICO, D.F.

Enero, 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Este trabajo se realizó en el laboratorio de Toxicología Celular en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.**

**La alumna Verónica Castro Bear fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de becario 189835 desde agosto del 2004 a junio del 2006, y por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) promoción 2006, con No folio 0162.**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A LA Dra. PATRICIA RAMIREZ NOGUERA;**

Por ser mi mejor ejemplo de que uno puede hacer lo que se proponga, gracias por todo su apoyo, por sus consejos, por su amistad.

### **A LOS MIEMBROS DE MI COMITÉ TUTORAL;**

La Dra. Elia Roldán y la Dra. María Eugenia Gonsebatt, gracias por sus consejos y su apoyo en la realización de este trabajo.

### **A LOS MIEMBROS DE MI JURADO,**

La Dra. Regina Montero, Dra. Maria de la Luz del Razo, Dr. Carlos Gerardo García, por sus comentarios y correcciones para el mejoramiento de este trabajo.

## **DEDICATORIAS**

### ***A DIOS;***

Por todas las bendiciones que ha mandado a mi vida, por otorgarme con cada respiración una nueva oportunidad.

### ***A OSCAR;***

Es difícil explicar todo lo que siento por ti, por eso yo creo que existe una sola palabra AMOR. Gracias por iluminar mi vida con tu presencia.

### ***A AMEYALLI;***

Eres la personita más maravillosa que Dios me pudo enviar, gracias por permitirme ser tu mamá, y por traer a mi vida tanta felicidad.

### ***A MI MAMÁ;***

Por ser un ejemplo de fortaleza y perseverancia, gracias por ser mi mamá, por que sin ti no seria lo que soy hoy. Te quiero mucho.

### ***A MI HERMANA;***

Juanita, por ser más que mi hermana mi mejor amiga. Gracias por apoyarme y escucharme, gracias por ser tú.

### ***A MIS HERMANOS;***

Ignacio y Marco Antonio, por que los quiero, sin condiciones.

### ***A MIS SOBRINOS;***

Luis, Claudia, Leslie, Pamela, Israel, Juan, Giovanna, Marcos, por que para mi cada uno es único y especial, por que de cada uno aprendo cosas nuevas y me enseñan a ver la vida de otra manera.

***A MIS CUÑADAS Y CUÑADO;***

Luis, Claudia y Laura, por ser como mis hermanos, por que crecí junto a ustedes y son parte de mi familia.

***A MIS SUEGROS***

Por ser siempre tan amables conmigo, por ayudarme y permitirme pertenecer a su familia.

***AL Dr. ROBERTO***

Por ser una persona inteligente en todos los sentidos de la palabra y en todos los aspectos, gracias por permitirme aprender de usted.

***A MIS AMIGAS DE LA COORDINACIÓN;***

Martita, Ana Luisa, Claudia y Ale, gracias por aparecer en mi vida en un momento en que yo necesitaba creer en la amistad, gracias por demostrarme que si existe.

Edison trabajó durante casi tres años en un determinado experimento y fracasó setecientas veces. Todos sus colegas y estudiantes se sentían absolutamente fracasados. El llegaba cada mañana feliz y a rebosar de júbilo, listo para empezar otra vez. Era demasiado: ¡setecientas veces y tres años desperdiciados! Todo el mundo estaba prácticamente seguro de que no se iba a conseguir nada. Todo parecía inútil.... Sólo un capricho.

Se reunieron y le dijeron “hemos fallado setecientas veces. Ya es un fracaso absoluto. No hemos logrado nada. Tenemos que parar”.

Edison soltó una carcajada y dijo “¿de qué están hablando? ¿Fracasado? Hemos tenido éxito en descubrir que setecientos métodos no serán de ninguna ayuda. ¡Cada día que pasa nos acercamos cada vez más a la verdad! Si no hubiéramos llamado a esas setecientas puertas, no habríamos podido saberlo. Pero ahora estamos seguros de que hay setecientas puertas falsas. ¡Es un gran logro!”.

Esta es la actitud científica básica: si podemos decir que algo es falso, nos estamos acercando a la verdad. La verdad no se encuentra disponible en el mercado para que se pueda ir a encargarla directamente. No se encuentra disponible a nuestro antojo. Tenemos que experimentar.

Por eso les sugiero que siempre estén dispuestos a experimentar. Nunca se sientan complacidos. Jamás piensen que lo que están haciendo está perfecto. Nunca lo es. Siempre es posible mejorarlo; siempre es posible hacerlo más perfecto.

OSHO  
“Día a día”

# ÍNDICE

## **CAPÍTULO I** **ARSÉNICO**

<b>1.1 FUENTES DE EXPOSICIÓN</b>	1
1.1.1 CONTAMINACIÓN NATURAL DEL AGUA CON ARSENICO	1
1.1.2 CONTAMINACIÓN DE ARSÉNICO POR FUENTES INDUSTRIALES	2
<b>1.2 EFECTOS TÓXICOS</b>	4
1.2.1 HEPATOTOXICIDAD	4
<b>1.3 MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO</b>	5
1.3.1 MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO PENTAVALENTE	5
1.3.2 MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO TRIVALENTE	7
<b>1.4 METABOLISMO DEL ARSÉNICO</b>	8

## **CAPÍTULO II** **LA UBIQUITINA EN EL SISTEMA DE DEGRADACIÓN** **NO LISOSOMAL**

<b>2.1 INTRODUCCIÓN</b>	13
<b>2.2 UBIQUITINA</b>	13
2.2.1 PROTEÍNAS SIMILARES A UBIQUITINA TIPO I	14
2.2.2 PROTEÍNAS SIMILARES A UBIQUITINA TIPO II	15
<b>2.3 ENZIMAS UBIQUITINIZANTES</b>	16
<b>2.4 SUSTRATOS DE UBIQUITINACIÓN</b>	19
<b>2.5 ENZIMAS DESUBIQUITINIZANTES</b>	20
<b>2.6 DESENSAMBLE DE OLIGÓMEROS DE UBIQUITINA</b>	21
<b>2.7 DESUBIQUITINACIÓN Y PROTEÍNAS DE TRÁFICO DE MEMBRANA</b>	22

## **CAPÍTULO III**

### **EL PROTEOSOMA**

<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b>	23
<b>3.2 ESTRUCTURA DEL PROTEOSOMA</b>	23
<b>3.3 BIOGÉNESIS DEL PROTEOSOMA</b>	26
<b>3.4 LOCALIZACIÓN DEL PROTEOSOMA</b>	27
<b>3.5 RESIDUOS CON SITIOS ACTIVOS PROTEOLÍTICOS</b>	29
<b>3.6 FUNCIÓN CATALÍTICA Y ESPECIFICIDAD DE LAS SUBUNIDADES DEL PROTEOSOMA</b>	30
<b>3.7 INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA 20S</b>	31
3.7.1 INHIBIDORES DE UNIÓN COVALENTE	31
3.7.2 INHIBIDORES NO COVALENTES	33
3.7.3 INHIBICIÓN DEL PROTEOSOMA POR INSULINA	33
3.7.4 INHIBICIÓN DEL PROTEOSOMA POR POLIFENOLES	34
3.7.5 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA	35

## **CAPÍTULO IV**

### **DISEÑO EXPERIMENTAL**

<b>4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	37
<b>4.2 HIPÓTESIS</b>	38
<b>4.3 OBJETIVOS</b>	38
<b>4.4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	39
4.4.1 PREPARACIÓN Y CULTIVO DE REBANADAS DE HÍGADO	39
4.4.2 VIABILIDAD CELULAR	40
4.4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOSOMAL	40
4.4.4 AISLAMIENTO DEL PROTEOSOMA	40
4.4.5 INMUNOTRANSFERENCIA PARA LAS SUBUNIDADES ALFA DEL PROTEOSOMA	41
4.4.6 UBIQUITINACIÓN	41
<b>4.5 RESULTADOS</b>	42
<b>4.6 DISCUSIÓN</b>	54
<b>4.7 CONCLUSIONES</b>	60
<b>4.8 PERSPECTIVAS</b>	60
<b>4.9 REFERENCIAS</b>	61

# INDICE DE GRAFICOS Y FIGURAS

GRÁFICO	PÁGINA
<b>Gráfico 1.</b> Determinación de potasio intracelular en los cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con arsenito de sodio.	42
<b>Gráfico 2.</b> Determinación de la actividad proteosomal similar a quimiotripsina con diferentes concentraciones de sustrato LLVY-AMC y tiempos de incubación, con 50µg de proteína.	43
<b>Gráfico 3.</b> Determinación de la actividad proteosomal similar a quimiotripsina en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con diferentes concentraciones de arsénico y lactacistina durante 3hrs.	44
<b>Gráfico 4.</b> Determinación de la actividad proteosomal de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón control negativo.	45
<b>Gráfico 5.</b> Actividad Proteosomal de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 0.01 nM durante 3 hrs.	45
<b>Gráfico 6.</b> Actividad Proteosomal de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 1 nM durante 3 hrs.	46
<b>Gráfico 7.</b> Actividad Proteosomal de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 100 nM durante 3 hrs.	46
<b>Gráfico 8.</b> Actividad Proteosomal de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico durante 3 hrs a distintas concentraciones.	47
<b>Gráfico 9.</b> Porcentaje de la actividad proteosomal de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico durante 3 hrs.	48
<b>Gráfico 10.</b> Western blot y análisis densitométrico de las fracciones correspondientes a los cultivos organotípicos de hígado de ratón control negativo.	49

<b>Gráfico 11.</b> Western Blot y análisis densitométrico de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 0.01 nM durante 3 hrs.	50
<b>Gráfico 12.</b> Western Blot y análisis densitométrico de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 0.01 nM durante 3 hr, fracciones 20 a la 35.	50
<b>Gráfico 13.</b> Western Blot y análisis densitométrico de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 1 nM durante 3 hrs.	51
<b>Gráfico 14.</b> Western Blot y análisis densitométrico de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 100 nM durante 3 hrs.	52
<b>Gráfico 15.</b> Análisis densitométrico de las subunidades alfa de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico durante 3 hrs.	52
<b>Gráfico 16.</b> Análisis densitométrico de ubiquitina con los diferentes tratamientos de arsénico y lactacistina.	53

## FIGURAS

<b>Fig. 1</b> Disposición del arsenato en células de sistemas de mamíferos	6
<b>Fig. 2</b> Disposición del arsenito en células de sistemas de mamíferos.	8
<b>Fig. 3</b> Reducción del NO mediada por arsénico, cascadas de transducción de señales y alteración en factores de transcripción.	11
<b>Fig. 4</b> Representación esquemática de la unión del As (III) a un péptido helicoidal que contiene dos residuos de cisteína.	12
<b>Fig. 5</b> Estructura de la ubiquitina.	14
<b>Fig. 6</b> Comparación de la estructura secundaria de miembros de la familia de ubiquitina revelando un plegamiento altamente conservado.	16
<b>Fig. 7</b> Funciones de las DUB's en la ruta de la ubiquitina.	20
<b>Fig. 8</b> Estructura del proteosoma 26S.	24
<b>Fig. 9</b> Modelo del ensamble del proteosoma en ratón.	26

<b>Fig. 10</b> Regulación transcripcional del proteosoma nivelado por Rpn4. Rpn4 regula la transcripción de genes 26S.	27
<b>Fig. 11</b> Representación de la superficie del proteosoma 20S de levadura, señalándose los principales sitios de actividad catalítica.	31
<b>Fig. 12</b> Representación del proteosoma 20S acomplejado con inhibidores sintéticos de unión covalente.	36
<b>Fig. 13</b> Ensamble del proteosoma.	56

## ABREVIATURAS

iAs	Arsénico inorgánico
As <sup>5-</sup>	Arsénico pentavalente
As <sup>3-</sup>	Arsénico trivalente
DMA <sup>V</sup>	Ácido dimetilarsínico
MMA <sup>III</sup>	Ácido monometilarsenoso
CK 18	Citoqueratina 18
ATP	Adenosin-5'- trifosfato
ADP	Adenosin-5'-difosfato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Fosfato
GSH	Glutación reducido
PDH	Piruvato deshidrogenasa
MMA <sup>V</sup>	Ácido monometilarsenico
SAM	S-adenosilmetionina
DMA <sup>III</sup>	Ácido dimetilarsenoso
γ-GCS	Gama glutamil cisteína
GST	Glutación-S-transferasa
NO	Óxido nítrico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
PTP	Proteínas tirosín fosfatasa
PTK	Proteinas tirosín cinasa
MAPK	Proteín cinasa activadas por mitógeno
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa

AP-1	Proteína activadora 1
Nrf2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide 2
HECT	Ligasas tipo E3-homólogas al carbono terminal E6AP
DUB	Enzimas desubiquitinizantes
MVB	Cuerpo multivesicular
IFN- $\gamma$	Interferon gama
PACE	Elemento de control del proteosoma
Ump1	Proteína de maduración de ubiquitina
RE	Retículo endoplásmico
DSB	Rompimiento de doble cadena
CL	Similar a quimiotripsina
TL	Similar a tripsina
PGPH	Peptidil-glutamil- hidrolizante
BrAAP	Actividad sobre cadenas de aminoácidos ramificados
SNAAP	Actividad sobre aminoácidos neutros pequeños
IDE	Enzima degradante de insulina
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
EGC	Epigallocatequina
ECG	Epicatequina-3-galato
EC	Epicatequina
LLVY-AMC	Leucina-leucina-valina-tirosina acoplado a cumarina



## **ABSTRACT**

Ubiquitin /proteasome ATP requiring system is a proteolytic non-lysosomal complex. This system is responsible for the degradation of structurally abnormal or misfolded proteins and regulatory proteins as transcriptional factors, enzymes and growth regulators that have short half- lives.

The proteasome exist in two forms, 26S proteasome and 20S proteasome. The proteolytic active core is the 20S form, which includes several proteolytic enzymes. The 26S form has besides of 20S proteasome, a regulatory complex formed by a basal ring composed of ATPase subunits and a lid of several non-ATPase units which recognize ubiquitinated substrates.

Arsenic is worldwide human carcinogen that affects a variety of processes within the cell. Arsenite (As III), one the major inorganic forms of arsenic, is known to cause sulphhydryl depletion, inhibit numerous enzymes, generate reactive oxygen species, disrupt structural organization of filamentous proteins and numerous regulatory proteins among the others effects. In order to know if As (III) could modify the proteolytic activity of proteosome/ubiquitin system, we assessed chymotripsin-like activity of the purified proteosome from liver slices cultures exposed to arsenite and the ubiquitin synthesis.

The Chymotripsin-like activity decline significantly to 26S proteasome forms in the liver slices culture exposed in the range 0.01, 1 and 100 nM during 3 hrs. The proteolytic activity was reduced by 60%. The ubiquitin synthesis was not modified by early arsenite exposure in the organotypic culture.

These results suggest that arsenite altered the proteolytic activity in BALB/c mice liver in vitro. The inhibitory effects could be compromise protein catabolism in the liver, increasing hepatic susceptibility to arsenic effects.

## RESUMEN

El sistema ubiquitina-proteosoma dependiente de ATP es un complejo proteolítico no lisosomal. Este sistema es responsable de la degradación de proteínas con estructura anormal o mal plegadas y de proteínas reguladoras como factores de transcripción, enzimas y reguladores del crecimiento que tienen una vida media corta.

El proteosoma puede existir en dos formas como proteosoma 26S y 20S. El proteosoma 26S es un complejo multisubunidad, en el cual se encuentra el centro activo proteolítico 20S y el complejo regulador 19S. El proteosoma 20S es una partícula semejante a un barril, que se presenta como una pila de cuatro anillos formados de dos anillos externos  $\alpha$  y dos anillos internos  $\beta$ , asociados en el orden de:  $\alpha \beta \beta \alpha$ . Los anillos  $\alpha$  y  $\beta$ , están formados, cada uno, de siete subunidades.

El arsénico es un carcinógeno humano que afecta una variedad de procesos en la célula. El arsenito (As III), una de las principales formas inorgánicas del arsénico, es conocido por causar disminución de grupos sulfhídrico, inhibición de numerosas enzimas, generar especies reactivas de oxígeno, romper la organización estructural de proteínas filamento y de proteínas reguladoras, entre otros efectos. Para conocer si el As (III) podía modificar la actividad proteolítica del sistema ubiquitina-proteosoma, se determinó la actividad similar a quimiotripsina del proteosoma purificado de cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsenito así como también se evaluó la síntesis de ubiquitina.

La actividad similar a quimiotripsina disminuye significativamente en los cultivos organotípicos expuestos a arsénico en las concentraciones de 0.01, 1 y 100 nM, durante 3 horas, reduciéndose la actividad hasta un 60%. Por otro lado, la síntesis de ubiquitina no fue modificada por la exposición temprana a arsénico en los cultivos organotípicos.

Estos resultados sugieren que el arsenito altera la actividad proteolítica en el hígado de ratones BALB/c *in vitro*. Posiblemente este efecto inhibitor compromete el catabolismo proteico en el hígado incrementando la susceptibilidad hepática.

# CAPÍTULO I

## ARSÉNICO

### 1.1 FUENTES DE EXPOSICIÓN

El arsénico inorgánico (iAs) es un conocido carcinógeno humano que se encuentra en la naturaleza en diferentes formas químicas y estados de oxidación (-3, 0,+3, +5). (Hughes et al., 2002)

Episodios de envenenamiento por arsénico han sido reportados en todo el mundo, principalmente en Argentina, Chile, México, Taiwán, India y Bangladesh, y en menor número se han visto casos de toxicidad crónica en Polonia, E.U.A, Canadá, Hungría y Japón (Basu et al. 2001).

La exposición al iAs puede provenir de fuentes naturales, industriales, de la comida o bebida. Así, estos incidentes en todo el mundo se pueden dividir en tres categorías (Mandal et al. 2002).

1. Contaminación natural del agua con arsénico.
2. Contaminación de arsénico por fuentes industriales.
3. Contaminación de arsénico por comida y bebida.

#### 1.1.1 CONTAMINACIÓN NATURAL DEL AGUA CON ARSÉNICO

El iAs es generalmente encontrado en concentraciones bajas en el agua natural. Las concentraciones de arsénico en el agua para consumo humano en la mayor parte de las regiones del mundo es de menos de 10µg/l (WHO 2001).

La Agencia de Protección al Ambiente (EPA, 2001) recomienda como concentración máxima permisible de arsénico en el agua de bebida, 10 µg/l. Sin embargo, se han localizado en algunas partes de E.U.A concentraciones de arsénico de 50-100 µg/l y en el oeste de Bengala concentraciones de 200-600 µg/l (Das et al., 1995), mientras que los contenidos de arsénico en el agua de mar son de 1-8 µg/l (Jonson, 1972).

El ion arsenato es la principal forma química principal en la cual el iAs se presenta, debido a que es la forma termodinámicamente más estable. Para el agua de beber oxigenada a pH 8.1, la proporción de iAs (V) – iAs (III) es  $10^{26} : 1$  (Johnson, 1972).

La concentración basal de iAs en agua es de 1-10  $\mu\text{g/l}$ , encontrándose valores hasta de 100-5000  $\mu\text{g/l}$  en áreas de mineralización de sulfatos y minería (Smedley et al., 1996). A potenciales redox altos o moderados el iAs puede ser estabilizado como una serie de oxianiones pentavalentes (arsenato),  $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$  y  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Sin embargo, en la mayor parte de las condiciones reductoras (ácidas y alcalinas) y menor potencial redox, las especies de arsenito trivalente ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ) predominan. Las formas  $\text{As}^0$  y  $\text{As}^{3-}$  son raras en ambientes acuáticos.

En el ambiente marino predominan compuestos de arsénico orgánico complejos tales como sales de tetrametilarsonium, arsenocolina, óxidos de dimetil (ribosil) arseninas y arsénolípidos, arsenoazúcares. Sólo una fracción menor del arsénico total en los océanos permanece en solución en el agua de mar, debido a que la mayoría es asimilada en los materiales particulados suspendidos (Irgolic et al., 1995).

En varias áreas geográficas se ha reportado la ingestión de concentraciones elevadas de iAs a través del agua de bebida, principalmente en Argentina, Chile, México, Taiwán, India y Bangladesh, y en menor número se han reportado casos de toxicidad crónica en Polonia, E.U.A, Canadá, Hungría y Japón (Basu et al., 2001).

### 1.1.2 CONTAMINACIÓN DE ARSÉNICO POR FUENTES INDUSTRIALES

Estas exceden en el ambiente a las fuentes naturales en una proporción de 3 a 1 (Woolson, 1983), debido a que el humano al utilizar los recursos naturales libera iAs al aire, agua y suelo, además de afectar las concentraciones de iAs de plantas y animales. (Piver, 1983).

En los años 50's, los principales productores de iAs fueron China, Rusia, Francia; México, Alemania, Perú, Namibia, Suecia y E.U.A., contando con casi el 90% de la producción mundial (Nelson, 1977). Durante los años 70's, cerca del 80% del consumo de iAs se hizo con propósitos agrícolas. En el presente esta forma de uso ha disminuido. Aproximadamente, 97% del iAs producido era con fines de manufactura en la forma de arsénico blanco y el 3% restante se utilizaba como metal para adiciones metalúrgicas, en especial para aleaciones de plomo y cobre (Minerals Yearbook., 1973).

#### **a) Insecticidas**

El iAs fue principalmente usado para la preparación de insecticidas y pesticidas. En 1955, la producción mundial de iAs fue de 37,000 toneladas. De esta cantidad, 10,800 toneladas. Fueron producidas en los Estados Unidos, sin embargo, su consumo doméstico excedió las 18,000 toneladas, utilizándose principalmente como pesticida, en la forma de arsenato (Valle et al., 1960).

#### **b) Herbicidas**

Los arsenicales inorgánicos, principalmente arsenito de sodio, fueron usados desde 1890 como herbicidas, particularmente como esterilizantes de suelo no selectivos (EPA, 1980).

#### **c) Desecantes y Conservadores de madera**

El ácido de arsénico ha sido usado extensamente como un desecante de algodón durante muchos años. 2,500 toneladas de ácido arsénico ( $H_3AsO_4$ ) fueron usados como desecantes de 1,222, 000 acres de algodón en E.U.A en 1964 (con una población de cerca de 495.000 hab. ) (Fordyce et al., 1995)

El arsenato de cobre cromatado y el arsenato de cobre amoniacal en combinación son usados en el 99% de los conservadores de madera arsenicales (Perker, 1981).

#### **d) Aditivos de alimentos**

Muchos compuestos de arsénico son usados para aditivos en alimentos de aves y cerdos, tales como  $H_3AsO_4$ , ácido 3-nitro-4-hidroxi fenilarsónico, etc. Todos los ácidos fenilarsónicos fueron usados para aditivos de alimentos por la Ley de Aditivos de Alimentos de 1958 (Food Additive Compendium, 1975).

## 1.2 EFECTOS TÓXICOS

La presencia de signos de toxicidad depende de la magnitud de la exposición al iAs, dado por dosis y tiempo de exposición. La mayor parte del iAs ingerido es excretado del cuerpo a través de la orina, heces, piel, cabello, y uñas. Casi todos los órganos son afectados; pero los síntomas clínicos aparecen insidiosamente después de 6 meses a 2 años o más dependiendo de la cantidad de iAs a la que se estuvo expuesto (Das et al., 1995).

La toxicidad aguda del iAs está relacionada con su forma química y estado de oxidación. Un principio básico es que la toxicidad aguda del arsénico trivalente es mayor que la del arsénico pentavalente (Hughes, 2002). Por muchos años se creyó que la toxicidad aguda del iAs era mayor que la del arsénico orgánico y por lo tanto, la metilación de arsénico inorgánico era una reacción de desintoxicación. Este dogma fue sostenido debido a que el ácido dimetilarsínico ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ), el principal metabolito excretado de iAs, es menos tóxico que el arsénico inorgánico. Sin embargo, se ha encontrado que un derivado del ácido monometilarsínico ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ) es más tóxico que el arsenito. La mayor toxicidad aguda de los intermediarios trivalentes metilados del arsénico sugiere que la metilación del iAs no es solamente un mecanismo de desintoxicación (Cullen et al., 1989).

La toxicidad crónica del iAs es la más discutida en términos de sistemas de órganos afectados: piel, hígado, sistema nervioso, sistema cardiovascular y sistema respiratorio (Cebrián et al., 1983; Yeh et al., 1968).

### 1.2.1 HEPATOTOXICIDAD

El hígado tiende a acumular arsénico con exposiciones repetidas, la implicación hepática es reportada más comúnmente como una complicación de exposiciones crónicas en períodos de meses o años. La acumulación del arsénico se da de manera significativa en el hígado. Una importante característica de toxicidad crónica es una forma de fibrosis hepática que causa hipertensión portal, pero no progresa a cirrosis (Nagvi et al., 1994).

Los exámenes histopatológicos del hígado en individuos crónicamente expuestos a elevadas concentraciones de As ( $0.2\text{-}2.0\ \mu\text{g/L}$ ) muestran la presencia de fibrosis en el tracto portal que ocasionalmente causan hipertensión y sangrado de varices esofágicas

(Mazumder et al., 1988). Otras alteraciones comúnmente asociadas a la intoxicación por arsénico son cirrosis (Lin y Chen, 1986) y angiosarcoma (Falk et al., 1981).

La exposición crónica al iAs induce cambios hepáticos incluyendo cirrosis, hipertensión portal sin cirrosis, degeneración grasa y neoplasia hepática primaria. Las personas expuestas a iAs pueden recurrir a la atención médica con pérdida de sangre por várices esofágicas, ictericia, daño mitocondrial, funciones mitocondriales dañadas y del metabolismo de la porfirina (Guha, 2001; Santra et al., 1999; Nagvi et al., 1994), congestión, infiltración grasa, colangitis, colecistitis e hígado crecido (Chakraborty et al., 1987; Ding et al. 1987). El análisis de sangre algunas veces muestra niveles elevados de enzimas hepáticas, infiltración grasa hepática y cirrosis del hígado de pacientes que usaron solución de Fowler (Franklin et al., 1950). No hay evidencia de disfunción hepática de numerosos trabajadores expuestos a polvo de arsénico por inhalación (Ide et al., 1988).

Se ha observado un incremento de la expresión de citoqueratinas (CK) en respuesta al daño hepático ocasionado por la exposición a iAs, específicamente la CK 18 en la línea celular hepática humana WRL-68, donde además se promueve un desarreglo dosis dependiente de los filamentos citoplásmicos (Ramírez et al., 2000). Recientemente se ha asociado la inducción de la CK18 con la respuesta al daño oxidativo generado por la exposición a i As, lo cual podría ser considerado como un indicador temprano de toxicidad por arsénico en el hígado (Gonsebatt et al., 2007).

## **1.3 MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO**

### **1.3.1 MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO PENTAVALENTE**

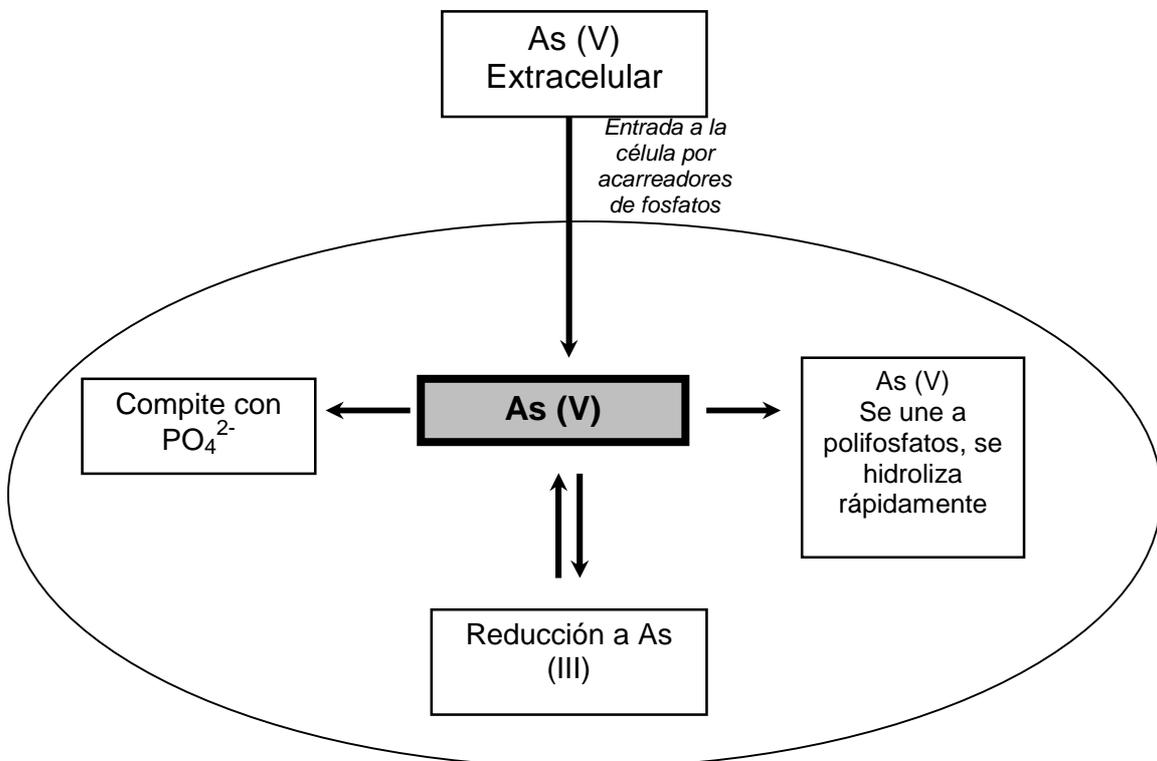
El arsenato puede reemplazar fosfato en muchas reacciones bioquímicas debido a su estructura y propiedades similares (Dixon, 1997).

El arsenato desacopla *in vitro* la formación de adenosin-5'- trifosfato (ATP) por un mecanismo de arsenólisis. A nivel de sustrato, la arsenólisis puede ocurrir durante la glicólisis. En un paso de la ruta glicolítica, el fosfato es unido enzimáticamente a D-gliceraldehído-3-fosfato para formar 1,3-bifosfo-D-glicerato. El arsenato puede

reemplazar fosfato en esta reacción para formar el anhídrido 1-arsenato-3-fosfo-D-glicerato. Sin embargo, este anhídrido es inestable y se hidroliza a arsenato y 3-fosfoglicerato. La baja estabilidad del anhídrido arsénico puede ser debida al largo de la unión As-O, la cual es aproximadamente 10% más larga que la unión P-O. El ATP es generado durante glicólisis en la presencia de fosfato, pero no de arsenato (Dixon, 1997).

A nivel mitocondrial, la arsenolisis puede ocurrir durante fosforilación oxidativa. adenosin-L a 5'-difosfato-arsenato es sintetizada por partículas submitocondriales de adenosin-5'-difosfato (ADP) y arsenato en la presencia de succinato. Tanto a nivel de sustrato como a nivel mitocondrial, la arsenolisis disminuye *in vitro* la formación de ATP por el reemplazo de fosfato con arsenato en las reacciones enzimáticas (Gresser, 1981).

El arsenato puede también reemplazar los fosfatos en el DNA y ocasionar la inhibición de los mecanismos de reparación del DNA. Tal acción puede explicar la clastogenicidad asociada a la exposición del arsénico (Figura 1). Sin embargo, no hay evidencia directa que muestre que el arsenato es incorporado en el DNA (Aposhian et al., 2000).



**Fig. 1 Disposición del arsenato en células de sistemas de mamíferos** (Aposhian et al., 2004). (Aposhian H.V. et al., 2004).

### 1.3.2 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO TRIVALENTE

Grupos funcionales específicos en enzimas, receptores o coenzimas, tales como tioles o sulfhidrilos cercanos, juegan un papel principal en la actividad de estas moléculas. Los arsenicales trivalentes fácilmente reaccionan *in vitro* con moléculas que contienen un grupo tiol como glutatión (GSH) y cisteína (Scott et al. 1993).

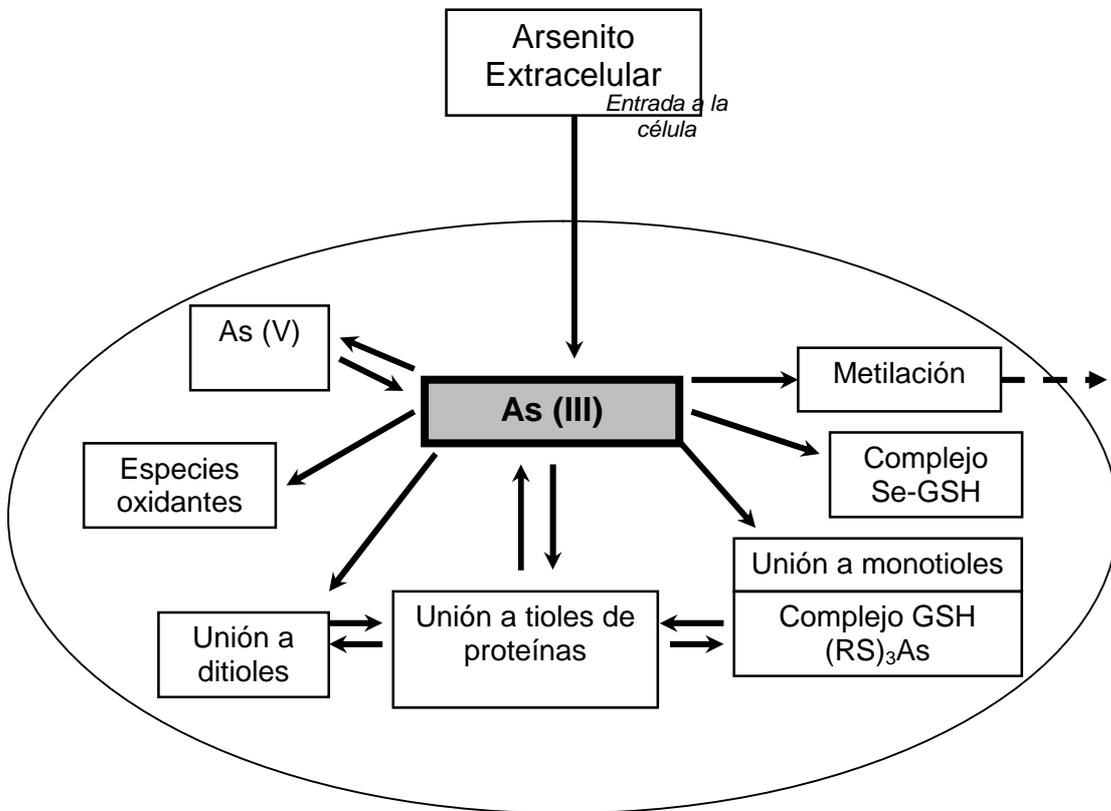
La unión a proteínas *in vitro* ocurre principalmente con  $\text{MMA}^{\text{III}}$  y  $\text{DMA}^{\text{III}}$  que con las formas orgánicas pentavalentes. El arsenito tiene una mayor afinidad a los ditiolos que a los monotioles. La unión del arsénico trivalente a grupos tiol importantes puede inhibir eventos bioquímicos importantes lo cual puede provocar toxicidad (Figura 2). Además, la unión de arsenito a sitios no esenciales en proteínas puede ser un mecanismo de toxicidad (Aposhian et al., 2000).

La piruvato deshidrogenasa (PDH) es un complejo multi-subunidad que requiere el cofactor ácido lipoico, un ditiol, para actividad enzimática (Peters, 1955). El arsenito inhibe PDH, tal vez, debido a la unión al ácido lipoico. Se ha demostrado que el  $\text{MMA}^{\text{III}}$  es un inhibidor más potente de la PDH que el arsenito. La PDH oxida piruvato a acetil-CoA, un precursor para los intermediarios del ciclo del ácido cítrico. El ciclo del ácido cítrico degrada los intermediarios, y esto provee equivalentes reduciendo el sistema de transporte de electrones para la producción de ATP. La inhibición de PDH puede llevar a la disminución de ATP. También, los intermediarios del ciclo del ácido cítrico pueden ser usados en la gluconeogénesis (Szincicz y Forth, 1998).

La fuerte unión entre el  $\text{iAs}^{\text{III}}$  y el sulfuro puede ser la razón por la cual el arsénico se acumula en la queratina de cabello y uñas. Se ha propuesto que el arsénico trivalente forma una estructura de anillo con los ditiolos vecinos de la queratina en el cabello (Peters et al., 1955). El arsénico inhibe enzimas, tales como piruvato oxidasa, aminoácido-S-oxidasa, colina oxidasa y transaminasa. Aunque el  $\text{iAs}^{3-}$  es la forma más tóxica, el  $\text{iAs}^{5-}$  como arsenato puede interrumpir las reacciones al competir con el fosfato.

Los arsenicales trivalentes metilados como  $\text{MMA}^{\text{III}}$  son potentes inhibidores de la glutatión reductasa (GR) y tioredoxin reductasa (TR). La inhibición puede ser debida a la interacción del arsénico trivalente con grupos tiol importantes en esas moléculas. La actividad de arsenicales trivalentes metilados es mayor que la del arsenito,  $\text{MMA}^{\text{V}}$  y

DMA<sup>V</sup>. La inhibición de esas enzimas puede alterar estados redox y eventualmente llevar a citotoxicidad (Styblo et al., 1996).



**Fig. 2 Disposición del arsenito en células de sistemas de mamíferos** (Aposhian. et al., 2004). (Aposhian H.V. et al. 2004).

## 1.4 METABOLISMO DEL ARSÉNICO

Es bien sabido que el arsenito es más tóxico que el arsenato. Esto puede ser debido en parte a las diferentes proporciones que la célula toma. A concentraciones equimolares, la acumulación de arsenito en muchos tipos celulares es más rápida en comparación con la del arsenato (Vega et al., 2001; Lerman et al., 1980).

En los humanos, los compuestos de iAs son metabolizados por metilación seguida de la excreción en orina. Las especies metiladas pentavalentes de arsénico son excretadas más rápido que las inorgánicas (Marafante et al., 1987), sin embargo las trivalentes son retenidas mayor tiempo que las pentavalentes. La metilación ocurre principalmente en el hígado y en menores cantidades en otros órganos, tales como riñón, cerebro y pulmón.

Se ha propuesto que la biotransformación del iAs en el organismo se lleva a cabo mediante una serie de reacciones de reducción y de metilación oxidativa. Waters et al (2004a, 2004b) han sugerido que la metiltransferasa de arsénico (AS3MT) es la enzima determinante en el metabolismo del iAs, ya que cataliza tanto los procesos de metilación, con la sulfo-adenosil metionina (SAM) donadora de grupos metilos, así como los procesos de reducción en presencia de reductores endógenos como el GSH, el sistema tioredoxina y el ácido lipoico, formándose las especies trivalentes y pentavalentes, que son metabolitos intermediarios o finales en esta vía. La reducción de arsenato a arsenito es necesaria antes de que ocurra la metilación.

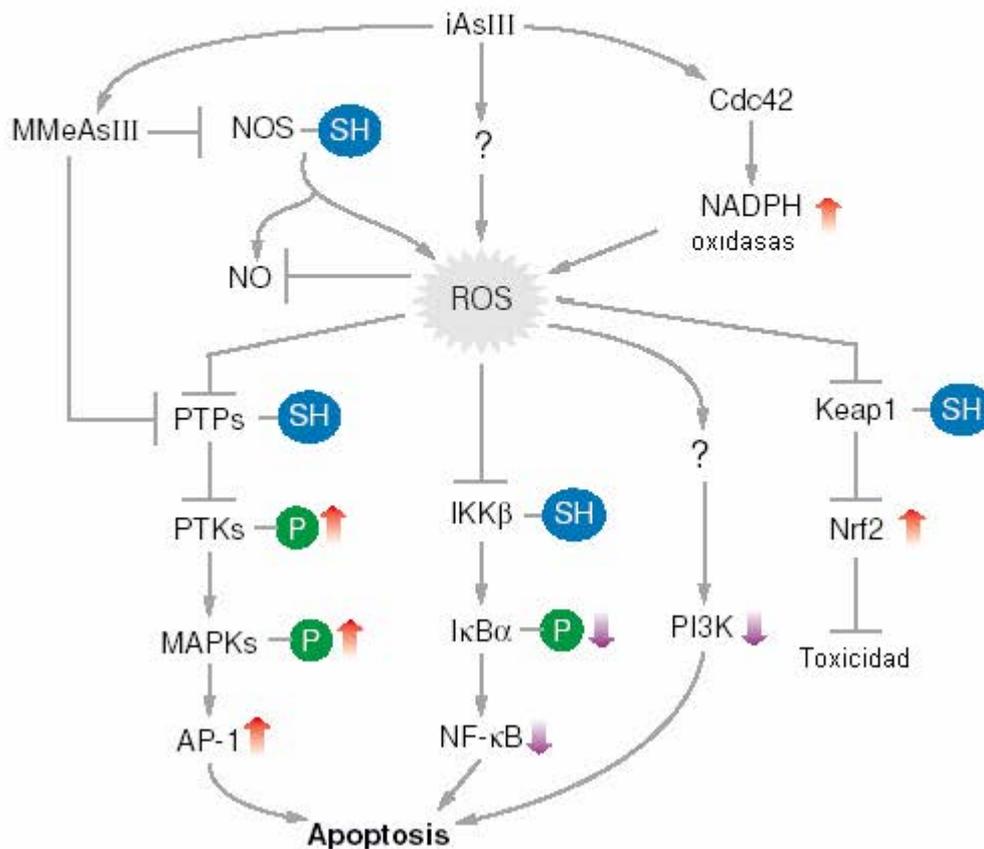
Primero la metilación de iAs involucra una reducción de  $iAs^V$  a  $iAs^{III}$ , seguida de la incorporación de un grupo metilo en la molécula de  $iAs^{III}$  para obtener el ácido monometil arsónico ( $MMA^V$ ), después se postula una reducción del  $MMA^V$  a  $MMA^{III}$  previa a la segunda metilación, produciéndose el ácido dimetil arsénico ( $DMA^V$ ), el cual sufre una tercera reducción ( $DMA^V$  a  $DMA^{III}$ ) seguida de una tercera metilación, formándose el óxido trimetil arsénico ( $TMAO^V$ ), recientemente identificado en muestras de orina de individuos ambientalmente expuestos a  $As_i$ ; este compuesto trimetilado ha sido considerado de menor toxicidad (Thomas y col., 2001; 2007). Una vez que los arsenicales son metilados, éstos no son desalquilados (Zakharyan y col., 2001).



La mayoría de los humanos expuestos a arsénico excretan 10-30% de arsénico orgánico, 10-20% de  $MMA^{(V+III)}$  y 60-80%  $DMA^{(V+III)}$ , pero esto difiere en algunas poblaciones (Vahter y Concha, 1995). Los humanos, a diferencia de otras especies, excreta mayores cantidades de MMA (Vahter, 2002).

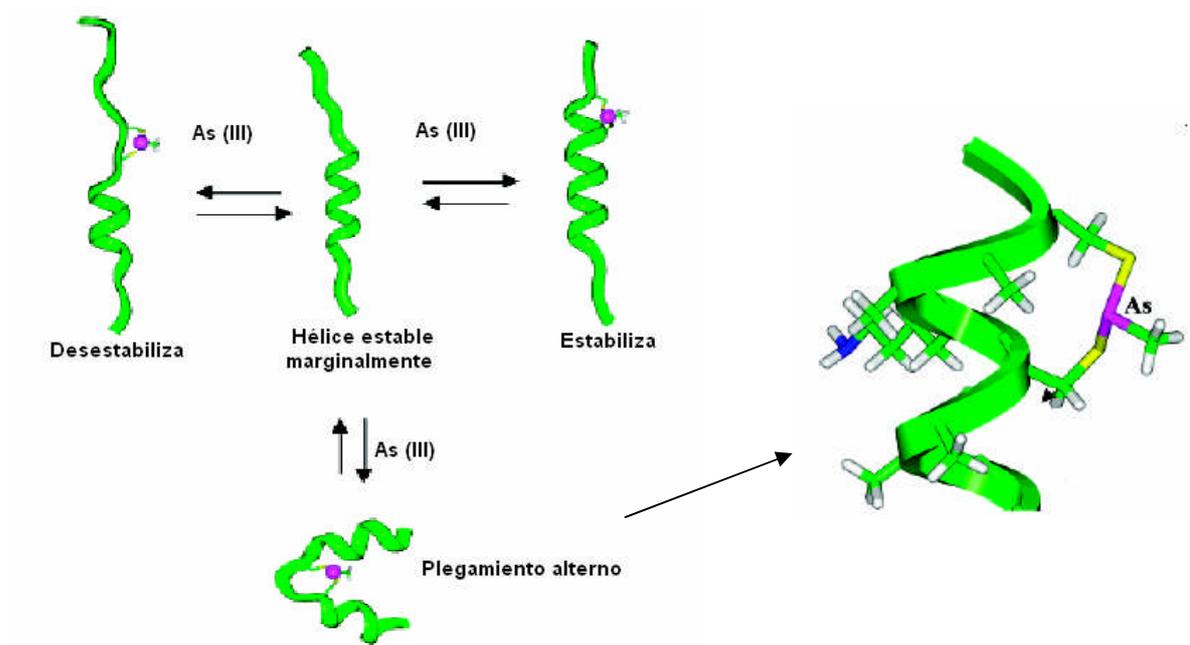
Comparativamente con el arsenito o los metabolitos pentavalentes, los metabolitos metilados trivalentes son altamente reactivos, así como potentes inhibidores de la GR y TR (Styblo et al., 1996; Lin et al., 1999).

Cuando hay una alta concentración de arsenito en la célula, el GSH es consumido y la  $\gamma$ -GCS, la enzima limitante de la síntesis del GSH, es sobrerregulada. Este efecto probablemente no es sólo un proceso químico, sino también una reacción enzimática catalizada por isoenzimas GST, que genera la formación de complejos As (SG)<sub>3</sub>. Se ha descrito que el complejo con GSH es requerido para remover el arsénico de la célula a través de los transportadores de resistencia a fármacos (MRPs) (Kala et al., 2000). Debido a esto, cualquier bloqueo de  $\gamma$ GCS, GST o MRP, aumenta la toxicidad del arsenito en las células, y siendo estos controlados por Nrf2, cualquier delección de este factor de transcripción incrementa la citotoxicidad mediada por arsénico (Figura 3). Así mismo, la exposición a arsénico puede promover la apoptosis por rompimiento en las señales de transducción, activación de AP-1, inactivación de NF-kB, y/o supresión de la señalización PI3K/Akt. Debido a las proteínas que regulan AP-1, NF-kB, Nrf2 y NO sintetasa, las cuales tienen tioles reactivos, su modificación oxidativa por especies reactivas de oxígeno, generadas durante la exposición a arsénico, puede ser el paso decisivo mediador de la respuesta celular y toxicidad (Kumagai y Sumi, 2007).



**Fig. 3 Reducción del NO mediada por arsénico, cascadas de transducción de señales y alteración en factores de transcripción.** iAsIII, arsenito inorgánico; MMeAs<sup>III</sup>, ácido monometilarsenoso; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas de oxígeno; PTPs, Proteínas tirosín fosfatasa; PTKs, Proteínas tirosín cinasas; MAPKs, proteína cinasas activadas por mitógeno; IKK, IκB cinasas; PI3K, fosfoinositol 3 cinasa; AP-1, proteína activadora 1; NF-κB, factor nuclear κB; Nrf2, factor relacionado al factor nuclear eritroide 2; Keap 1, proteína 1 asociada ECH. (Kumagai y Sumi, 2007).

En algunos casos, la apoptosis es el resultado de la unión del arsenito a proteínas en la mitocondria (Larochette et al., 1999). Sin embargo, existen otros muchos blancos de ataque por arsénico intra y extracelulares. Entre estos, numerosas enzimas que utilizan disulfuros redox activos, como la lipoamida deshidrogenasa, GR, y la TR. En la mayoría de los casos, el arsénico se une a dos residuos de cisteína posicionados en una  $\alpha$ -hélice, ocasionando un aumento en el enrollamiento o la formación de pliegues alternos. La pérdida total de la estructura de  $\alpha$ -hélice y la formación de este pliegue alternativo, hace al péptido estable a una desnaturalización por calor (Figura 4) (Cline et al., 2002).



**Fig. 4** Representación esquemática de la unión del  $\text{As}^{3-}$  a un péptido helicoidal que contiene dos residuos de cisteína (Cline et al., 2002).

## **CAPÍTULO II**

### **LA UBIQUITINA EN EL SISTEMA DE DEGRADACIÓN NO LISOSOMAL**

#### **2.1 INTRODUCCIÓN**

La ruta ubiquitina-proteosoma es la ruta principal de degradación de proteínas celulares dañadas y mal plegadas. El proteosoma desempeña una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular degradando muchas enzimas limitantes y proteínas reguladoras primordiales, como reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, y supresores de tumor (Coux et al., 1996). Este es un complejo multisubunidad que existe en varias formas moleculares distintas. Las formas 20S y 26S fueron las primeras en ser identificadas, y más recientemente, otras, tales como el inmunoproteosoma y el proteosoma “híbrido” (Tanahashi et al., 2000).

El proteosoma en sus múltiples formas está involucrado en el procesamiento de antígenos para el complejo mayor de histocompatibilidad clase I, proliferación celular y apoptosis (Naujokat y Hoffmann, 2002; York et al., 1999).

#### **2.2 UBIQUITINA**

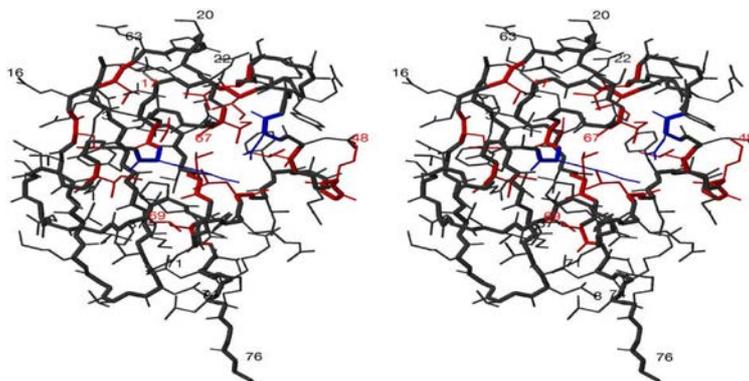
La ubiquitina está presente en todas las células eucariotas y es una de las proteínas más altamente conservadas. Puede existir en su forma libre o unida de forma covalente a una variedad de proteínas citoplásmicas, nucleares e integrales de membrana, y es esencial para la degradación selectiva de estas proteínas (Hershko A. et al., 1984).

La degradación de proteínas mediada por ubiquitina es uno de los principales mecanismos para la proteólisis, importante en muchos eventos celulares, incluyendo el control de vida media de proteínas reguladoras, la remoción de proteínas mal plegadas y la producción de péptidos inmunocompetentes (Baumeister et al., 1998; Coux et al. 1996; Hilt et al., 1996). La ubiquitina también está involucrada en el tráfico de proteínas

(Reggiori et al., 2001), reparación del DNA (Hoege et al., 2002), rutas de señalización (Khush et al., 2002) y transcripción (Gonzalez et al., 2002).

La estructura de la ubiquitina fue revelada por cristalografía de rayos X. Su estructura es altamente estable y consiste de cinco cadenas  $\beta$  y una alfa-hélice de 3.5 giros y un giro de hélice. La primera y última cadenas  $\beta$  ( $\beta 1$  y  $\beta 5$ ) están orientadas paralelamente una con otra (figura 5). Mientras que todas las otras cadenas  $\beta$  vecinas son anti-paralelas (Vijay-Kumar et al., 1987).

La ubiquitina presenta un plegamiento estructural altamente conservado en numerosas proteínas eucariotas y tiene un lazo ancestral a la proteína procariota ThiS (Wang et al., 2001). La familia de la ubiquitina ha sido definida por su homología estructural con la ubiquitina y se ha dividido en dos familias: Proteínas similares a ubiquitina tipo I y proteínas con dominio similar a ubiquitina tipo II. Las proteínas similares a ubiquitina están involucradas en una variedad de diferentes rutas biológicas, mientras que algunas proteínas con dominio similar a ubiquitina han sido encontradas unidas a subunidades proteosomales, sin embargo aun no se conoce su significado funcional (Walters et al., 2004).



**Fig. 5 Estructura de la ubiquitina.** Los residuos en rojo se encuentran predominantemente dirigidos hacia el interior de la proteína (Walters et al., 2004).

### 2.2.1 PROTEÍNAS SIMILARES A UBIQUITINA TIPO I

Estas proteínas pueden existir libres o unidas covalentemente a otras proteínas vía una cascada enzimática. Igual que la ubiquitina, son expresadas como productos de fusión, permitiendo que numerosas porciones (de DNA) sean expresadas durante cada ciclo de transcripción / traducción. Las proteínas de fusión son subsecuentemente separadas en

moléculas funcionales por una isopeptidasa en el carbono terminal, donde hay usualmente un motivo diglicina (Kahyo et al., 2001)

SUMO-1 (Small Ubiquitin-related MOdifier) es una proteína tipo 1 ampliamente estudiada. Es conservada desde levaduras hasta mamíferos y es en su secuencia 18% similar a ubiquitina. Tiene una amplia lista de sustratos y los efectos de la conjugación de SUMO-1 son diversos.

La llamada sumolización puede afectar la localización intracelular de las proteínas, para lo cual son conjugadas. La conjugación de SUMO-1 para factores de transcripción puede regular su actividad, como se ha visto para c-Jun, p53, y c-Myb. La sumolización puede también proteger a las proteínas de la degradación, como es el caso de I $\kappa$ B $\alpha$  (Desterro et al., 1998). Se ha encontrado evidencia de intercomunicación entre la ubiquitinación y sumoylación, sin embargo el mecanismo y significado funcional aun no es claro.

### **2.2.2 PROTEÍNAS CON DOMINIO SIMILAR A UBIQUITINA TIPO II.**

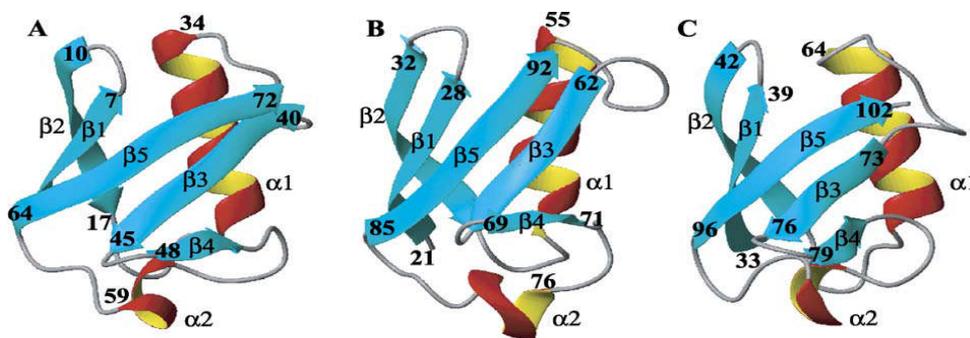
Estas proteínas son definidas por la presencia de dominios similares a ubiquitina en el contexto de una gran proteína. Estos dominios similares a ubiquitina carecen del motivo diglicina en el carbono terminal y no son rotas o ligadas a otras proteínas (Walters et al., 2004).

La proteína Rad23 de *S. cerevisiae* y sus dos homólogos humanos, hHR23a y hHR23b, son proteínas con dominio similar a ubiquitina, con un dominio similar a ubiquitina en el extremo N-terminal y dos dominios asociados a ubiquitina. Su mejor función caracterizada es en la reparación del DNA, particularmente en la reparación por escisión de nucleótido y reparación por escisión de bases (Masutani et al., 1994).

Varios miembros de la familia tipo II interaccionan directamente con el proteosoma, como es el caso de Rad23/hHR23, Dsk2/PIIC, el cofactor BAG-1 y la proteína que interacciona con Nedd8, NUB1 (Hiyama et al., 1999). Todos estos, excepto BAG-1 se han encontrado unidos a la subunidad reguladora S5a del proteosoma. S5a es hallada libre en la célula y es también parte de la partícula reguladora 19S, que está localizada entre la tapa y base del subcomplejo (Hiyama et al., 1999).

Recientemente se han identificado otras subunidades del proteosoma que pueden también unirse a ubiquitina y dominios similares a ubiquitina. La AAA ATPasa S6' (también conocida en levaduras como Rpt5) es encontrada en la base del proteosoma, en la partícula reguladora 19S, y se ha visto que interacciona con cadenas poliubiquitinadas sólo cuando está en el complejo proteosomal. Como una ATPasa, S6' puede proveer la unión entre el sustrato reconocido por la cadena poliubiquitinada y el subsecuente desplegamiento del sustrato que debe ocurrir en preparación para su translocación en la cámara proteolítica del proteosoma 20S (Lam et al., 2002).

En estudios en levaduras se ha reportado que dos componentes adicionales de la base del subcomplejo, Rpn1 y Rpn2, se unen a dominios similares a ubiquitina. Estas dos proteínas son subunidades no ATPasas cuyos homólogos humanos son S2 y S1, respectivamente. Se demostró que Rpn1 solo es capaz de interactuar de forma directa con los dominios similares a ubiquitina de Rad23 y Dsk2 (Elsasser et al., 2002). Sin embargo, otro grupo de investigación propuso que estas dos proteínas con dominio similar a ubiquitina cada una, une un complejo proteico Rpn1/Rpn2 en el proteosoma (Figura6) (Saeki et al., 2002).



**Fig. 6 Comparación de la estructura secundaria de miembros de la familia de ubiquitina revelando un plegamiento altamente conservado.** (a) Ubiquitina; (b) proteína SUMO-1 de la familia de ubiquitina tipo I; (c) proteína hPLIC-2 de la familia de ubiquitina tipo II (Walters et al., 2004).

### 2.3 ENZIMAS UBIQUITINIZANTES

Durante los últimos 10 años, la conjugación de la ubiquitina y proteínas similares a ubiquitina con proteínas intracelulares surgió como un importante mecanismo para regular numerosos procesos. Estos incluían progresión del ciclo celular y señales de traducción, transporte a través de la membrana plasmática, control de calidad de

proteínas en el retículo endoplásmico, regulación de la transcripción y control de crecimiento. La función de la ubiquitinación en la mayoría de estos procesos es promover la degradación de proteínas específicas, requiriendo un complejo enzimático para unir la ubiquitina y removerla de los sustratos proteicos (Hochstrasser, 1996; Weissman 2001).

La conjugación de ubiquitina en un sustrato requiere al menos tres enzimas diferentes, y la organización de su cascada es jerárquica. La primera enzima, E1 o enzima activadora de ubiquitina, lleva a cabo la activación dependiente de ATP del carbono terminal de ubiquitina, formando una unión covalente intermedia con ubiquitina en la cual la glicina terminal de ubiquitina se une a un grupo tiol de un residuo de cisteína en el sitio activo de E1. Posteriormente, la ubiquitina es transferida a la cisteína en el sitio activo de una enzima conjugante de ubiquitina o E2. Finalmente, un tercer factor, E3 o ubiquitina-protein ligasa, cataliza la transferencia de la ubiquitina a una lisina en el sustrato de la proteína (o en algunos casos, al grupo amino terminal), formando una unión amida. En la mayoría de los eucariotes, hay sólo una E1, un considerable pero limitado número de E2 (cerca de 60 en mamíferos) y un número mucho mayor de E3 (Pickart, 2001).

Las proteínas pueden ser alteradas en uno o varios residuos de lisina por una sola ubiquitina o por oligómeros de ubiquitina. La conjugación por ubiquitina en un sustrato en particular puede tener diferentes consecuencias. La forma en la que la señal de ubiquitina es interpretada depende de la localización intracelular del sustrato, el número de cadenas de ubiquitinas unidas, y la topología de su enlace. De esta forma, el destino de un conjugado ubiquitina-proteína depende en parte de la longitud del oligómero de ubiquitina y de la configuración de las uniones ubiquitina-ubiquitina en la cadena. La ubiquitina tiene siete residuos de lisina, todos los cuales pueden unir ubiquitinas, sin embargo solo uniones en Lys27 y Lys 48 pueden dirigir las proteínas a su degradación (Hartman-Petersen y Gordon, 2004). Cadenas de cuatro o más ubiquitinas, en las que el carbono terminal de una ubiquitina se une a Lys 48 de la siguiente ubiquitina, promueve eficientemente la unión de la proteína modificada al proteosoma 26S, con la subsiguiente degradación del sustrato en pequeños péptidos, pero reciclándose la ubiquitina (Pickart; 2001). En contraste, la monoubiquitinación o unión de cadenas cortas de ubiquitina que están unidas a su vez por Lys 63, a una proteína puede tener una variedad de consecuencias que no incluyen degradación proteosomal. Por ejemplo,

muchas proteínas de membrana plasmática, particularmente en levaduras, pueden ser monoubiquitinadas, resultando en su endocitosis y acarreo a la vacuola (lisosoma) para degradación ( Hicke; 2001; Dupre et al., 2001).

Como ya se mencionó anteriormente, en las células eucariotas, el principal mecanismo para el control de la proteólisis involucra la modificación covalente por un polímero de ubiquitina, el cual marca las proteínas blanco para la proteólisis y su posterior degradación.

*Pero: ¿Cómo la célula sabe que proteínas marcar?*

Se han identificado complejos multiproteicos, conocidos como ubiquitin protein ligasas E3, las cuales funcionan eligiendo blancos específicos para ubiquitinación. Estas proteínas E3 se unen tanto a las proteínas blanco como a las enzimas conjugantes de ubiquitina E2, seleccionando y promoviendo la ubiquitinación. Se ha encontrado que diferentes proteínas que contienen un dominio llamado “el dedo RING” (RING ( Really Interesting New Gene) finger) provee rasgos significantes en como el marcaje por ubiquitina es realizado (Waterman et al., 1999; Lorick et al., 1999). El dedo RING es un pequeño dominio de unión a zinc encontrado en muchas proteínas funcionalmente distintas, y hasta ahora no se les conoce una función en general. Se ha visto que el dedo RING puede interaccionar específicamente con enzimas conjugantes de ubiquitina E2, promoviendo la ubiquitinación y las proteínas que contienen dedos RING pueden actuar como ubiquitin protein ligasas E3 (Freemont 2000). Estas enzimas E3 con dominio RING son subdivididas en dos clases: E3 de péptido simple, en los que los motivos de reconocimiento de sustrato y los dedos RING residen en el mismo polipéptido, y los complejos E3 multiproteicos con una más intrincada división de labor (Joazeiro y Weissman, 2000).

Otra clase en la que se ha clasificado a E3 es en las ligasas tipo E3-homólogas al carbono terminal E6AP (HECT), en este caso posee una actividad catalítica que acepta directamente ubiquitina proveniente de E2 y la transfiere al sustrato de unión (Pickart; 2001).Las enzimas E3 HECT se encuentran desde levaduras hasta humanos y están definidas por un dominio HECT de 350 aminoácidos, identificado originalmente en la proteína viral E6-AP. Su dominio amino terminal es el que le confiere reconocimiento

de sustrato, y el dominio HECT en el carboxilo terminal posee la actividad catalítica, transfiriendo directamente la ubiquitina a su sustrato (Joazeiro y Weissman, 2000).

Mientras que las E3 ligasas con dominio HECT son verdaderas enzimas, las E3 con dominio RING son distinguidas proteínas adaptadoras, debido a la presencia de una serie de histidinas y cisteínas con un espacio característico que sirve tanto para reclutar E2 al sustrato y como cofactor que realiza la modificación del sustrato por la E2 (Joazeiro y Weissman, 2000).

Además de E3, se conoce una enzima llamada E4, cuya función es unir cadenas multiubiquitinadas y esta íntimamente involucrada en la degradación de sustratos específicos. Tanto E3 como E4 proporcionan un mecanismo mediante el cual las proteínas ubiquitinadas pueden ser enviadas al proteosoma directamente. Sin embargo, es más probable que cooperen con otros factores de reparto, tales como las proteínas de traslado UBL-UBA en el transporte al proteosoma 26S (Miller et al.; 2005).

## **2.4 SUSTRATOS DE UBIQUITINACIÓN**

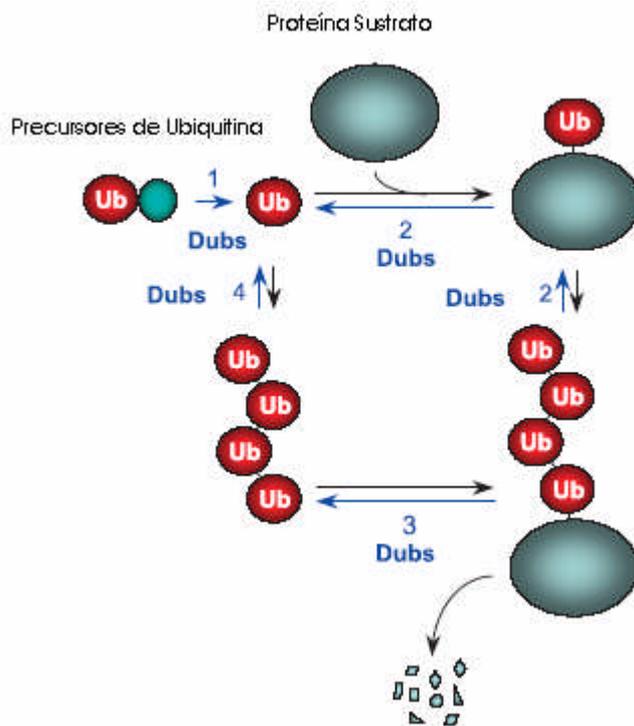
Como otras modificaciones transcripcionales que controlan la función proteica, la conjugación de ubiquitina es frecuentemente regulada en respuesta a señales extracelulares. Aparentemente la fosforilación en los residuos de treonina y serina pueden marcar a las proteínas para una rápida degradación por el sistema proteolítico mediado por ubiquitina (Karin et al., 2000; Willems et al., 1999). En tales casos, la fosforilación inducible permite el reconocimiento del sustrato por la maquinaria de ubiquitinación, comúnmente por el componente E3. Así, el marcaje para regulación, en este caso, es el sustrato.

Por espectrometría de masas se han identificado más de 1000 sustratos candidatos a ubiquitinación en *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo genoma codifica alrededor de 5800 proteínas. A primera vista, parece que una gran fracción del proteoma es ubiquitinada. No obstante, como se sabe proteínas mal plegadas pueden generarse por diversos motivos, como son fallas en la traducción, y problemas en el plegamiento así como por daño oxidativo (McClellan et al., 2005).

## 2.5 ENZIMAS DESUBIQUITINIZANTES

A pesar de que la ubiquitina se une de manera covalente a diversas proteínas celulares, es una proteína con una vida media sorprendentemente larga. Esto es el resultado de la remoción eficiente de la ubiquitina de sus conjugados por las enzimas desubiquitinizantes (DUBs), llevándose a cabo antes de la proteólisis de la proteína conjugada (Swaminathan et al., 1999). Se estima que existen más de 70 DUBs codificadas por el genoma humano y junto con las enzimas E1, E2 y E3 y el proteosoma forman el sistema ubiquitina-proteosoma (Kaiser y Huang, 2005).

La desubiquitinación de las proteínas es importante por numerosas razones. Se ha sugerido que es un mecanismo de corrección donde la ubiquitina es removida de proteínas marcadas incorrectamente, así mismo es importante para mantener la proporción normal de proteólisis, ayudando a mantener una reserva suficiente de ubiquitina libre en la célula. Además las DUBs son responsables de procesar precursores de ubiquitina inactivos y mantener el proteosoma 26S libre de cadenas de ubiquitina no ancladas que puedan competir con sustratos ubiquitinados por sitios de unión a ubiquitina (Amerik et al., 2004).



**Fig. 7 Funciones de las DUB's en la ruta de la ubiquitina.** (Amerik y Hochstrasser, 2004).

- 1) Procesamiento de precursores de ubiquitina.
- 2) Edición o rescate de los conjugados de ubiquitina, los cuales son generalmente aductos para otras proteínas en la célula, pero pueden estar también ligados a pequeños nucleófilos, como el glutatión.
- 3) Reciclado de ubiquitina u oligómeros de ubiquitina desde conjugados proteína-ubiquitina marcados para degradación.
- 4) Desensamble de oligómeros de ubiquitina no anclados.

Las DUBs son un gran grupo de enzimas que específicamente cortan moléculas unidas a ubiquitina después del carboxilo terminal del último residuo de ubiquitina (Gly76) (Wilkinson et al., 1998). Si la molécula unida a ubiquitina es una proteína, la unión es generalmente de tipo amida. La ubiquitina es siempre sintetizada en una forma de precursor inactivo con una extensión carboxilo terminal más allá de la glicina terminal. Cuando la ubiquitina esta unida postraduccionalmente a una proteína, usualmente se une a la lisina del grupo  $\epsilon$ -amino, resultando en una unión isopéptido o amida distinto. La ubiquitina activada es también susceptible a ataque por pequeños nucleófilos intracelulares, algunos, tales como glutatión y poliaminas, que se encuentran en abundancia, así las DUBs son esenciales para prevenir estos eventos. Muchas DUBs pueden hidrolizar diferentes tipos de uniones químicas, sin embargo, no necesariamente con igual eficiencia. En este caso, muchos miembros de esta familia de enzimas pueden romper uniones éster, peptídicas e isopeptídicas a ubiquitina a altas proporciones (Mayer et al. 1989).

## **2.6 DESENSAMBLE DE OLIGÓMEROS DE UBIQUITINA**

La mayoría de los eucariontes contienen niveles significativos no sólo de ubiquitina libre, sino también de cadenas de poliubiquitina no unida a sustrato. Estas cadenas pueden ser generadas de novo por enzimas de unión a ubiquitina o a través de la liberación de sustratos poliubiquitinados por las DUBs. La acumulación de niveles excesivos de estas cadenas de ubiquitina, sin embargo, pueden inhibir procesos dependientes de ubiquitina, particularmente proteólisis proteosomal (Amerik et al., 1997). Sorprendentemente, una sola DUB es responsable del desensamble de una cadena de ubiquitina no anclada, *in vivo*, al menos en levaduras. Esta DUB, llamada Ubp14 en levaduras e isopeptidasa T en mamíferos, está entre las DUBs mejor caracterizadas enzimológicamente. *In vitro*, la isopeptidasa T actúa preferentemente, en cadenas de ubiquitina no ancladas, desensamblándolas desde el extremo carboxilo terminal libre con un grupo Gly76. Esta isopeptidasa es muy sensible a cualquier modificación del extremo carboxilo terminal de la ubiquitina próxima en la cadena, por ejemplo, la pérdida de los dos últimos residuos de glicina en esta ubiquitina hace al oligómero de ubiquitina completamente refractario a la acción de la isopeptidasa. La Ubp14 y la isopeptidasa T no pueden actuar en sustratos con proteínas

poliubiquitinadas, primero, la cadena de ubiquitina debe ser liberada de su sustrato por otra DUB (Amerik et al., 1997).

## **2.7 DESUBIQUITINACIÓN Y PROTEÍNAS DE TRÁFICO DE MEMBRANA**

Existe un segundo tipo de degradación de proteínas mediado por ubiquitina, en el que las proteínas son marcadas para la vacuola/lisosoma, más que para el proteosoma. Los sustratos en esta ruta son proteínas de membrana, la mayoría, proteínas de superficie celular que son endocitadas y dirigidas a la vacuola por uniones de ubiquitina a sus dominios citosólicos (Hicke, 2001; Dupre et al., 2001; Shaw et al., 2001). La monoubiquitinación de proteínas en la superficie celular es importante para el paso de internalización en la endocitosis, sin embargo, los pasos subsecuentes pueden también depender de esta modificación. La internalización de algunos sustratos aumenta por su unión a cadenas cortas de ubiquitina en los que los monómeros de ubiquitina están unidos por Lys63. El paso mejor caracterizado dependiente de ubiquitina seguido de la endocitosis, es la clasificación de proteínas durante la maduración del endosoma tardío en un cuerpo multivesicular (MVB). Los cuerpos multivesiculares se forman por involución y vesicularización de la membrana limitante del endosoma. Las proteínas que son destinadas a la vacuola interior, tales como las proteínas de superficie marcadas para proteólisis, deben catalogarse en estas regiones de membranas involucionadas, para lo que se requiere que sean monoubiquitinadas (Amerik et al., 2004).

Debido a que la ubiquitina tiene una vida media larga *in vivo*, debe ser recuperada de estas proteínas de membrana antes de la completa vesicularización. La DUB de levadura implicada en este proceso es Doa4 (Swaminathan et al. 1999), mientras que en humanos la DUB más relacionada a Doa4 es la proteína UBPY reguladora del crecimiento (Kato et al., 2000).

## **CAPITULO III**

### **EL PROTEOSOMA**

#### **3.1 INTRODUCCIÓN**

Es notable que la destrucción selectiva de proteínas celulares dependiente de ATP es asegurada por dos rutas distintas coordinadas en eucariontes: primero un proceso capaz de marcar selectivamente proteínas apropiadas formando la señal de degradación por la unión covalente de ubiquitina y después, un evento subsiguiente que involucra un ataque proteolítico de las proteínas ubiquitinadas por el proteosoma lo cual energía metabólica para ambos pasos (Hochstrasser, 1997; Hershko et al., 1998).

La ruta ubiquitina-proteosoma se ha visto involucrada en varios procesos metabólicos importantes, tales como el ciclo celular, metabolismo celular, apoptosis, transducción de señales, respuesta inmune y control de calidad de proteínas (Tanaka, 1998; Coux et al. 1996; Dubiel et al. 1995; Hilt et al. 1995).

Consecuentemente, esta maquinaria de proteólisis es capaz de catalizar el rompimiento de proteínas no sólo irreversiblemente, sino también de una forma rápida y oportuna, lo que significa que este es un “nuevo” sistema regulador, evolutivamente hablando, que surgió para las reacciones biológicas llevadas a cabo en eucariontes (Tanaka, 1998).

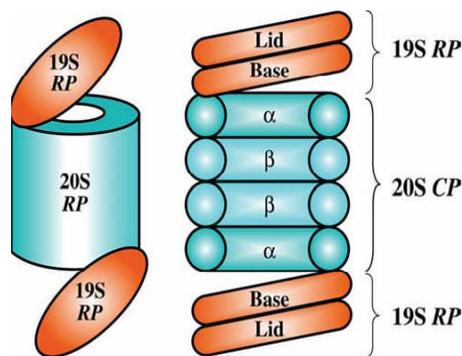
Al avanzar en el estudio del proteosoma se descubrió que la regulación de la muerte de proteínas es tan importante como su biosíntesis, siendo esta última la más estudiada en bioquímica. Actualmente, los genes involucrados en el sistema ubiquitina-proteosoma comprende cerca del 1.5% de todo el genoma en levadura, indicando que esta ruta de degradación es mucho más compleja comparada con la maquinaria de síntesis de proteínas (Hochstrasser, 1997).

#### **3.2 ESTRUCTURA DEL PROTEOSOMA**

El proteosoma 26S es un gran complejo proteolítico de multisubunidades, de aproximadamente 2 MDa, el cual incluye numerosas enzimas proteolíticas en la ruta

mediada por ubiquitina y ATP. El centro activo proteolítico del proteosoma 26S es el proteosoma 20S, que tiene una masa molecular de 700 a 750 kDa, mientras que el complejo regulador es el 19S, formado por un anillo basal compuesto de subunidades de ATPasa y una tapa compuesta de subunidades no-ATPasa, las cuales reconocen sustratos ubiquitinados mal plegados destinados a proteólisis por el proteosoma (Bardag-Gorce et al., 2004).

El proteosoma 20S es una partícula semejante a un barril, que se presenta como una pila de cuatro anillos formados de dos anillos externos  $\alpha$  y dos anillos internos  $\beta$ , asociados en el orden de:  $\alpha \beta \beta \alpha$ . Los anillos  $\alpha$  y  $\beta$ , están formados, cada uno, de siete subunidades. Las estructuras primarias de estas subunidades muestra alta homología inter-subunidad en especies y alta conservación evolutiva en diversos eucariontes, sugiriendo que constituyen una familia multi-gen y podrían haberse originado de un gen ancestral común (Tanaka, 1998).



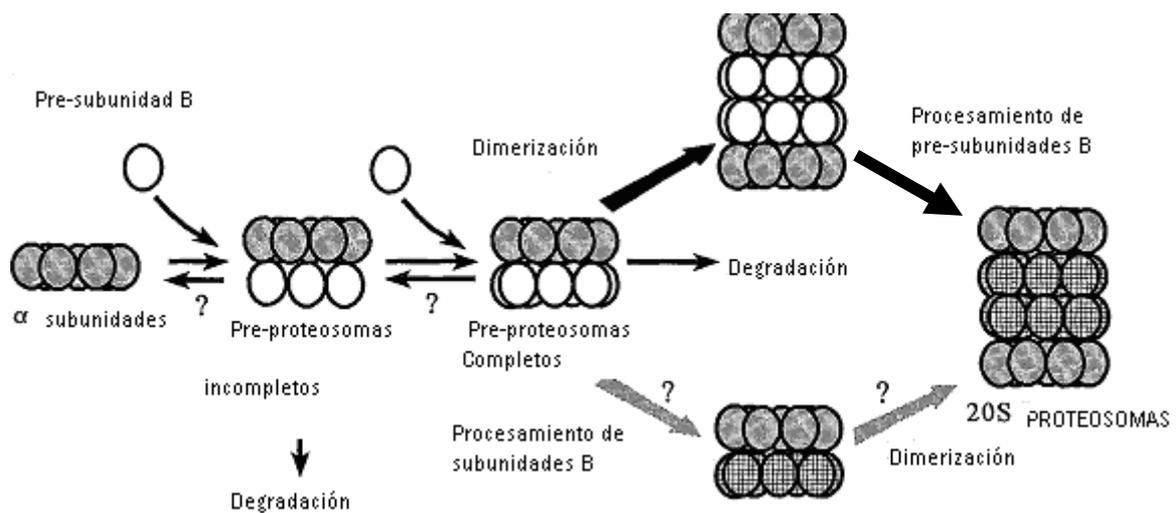
**Fig. 8 Estructura del proteosoma 26S** (Miller J. y Gordon C., 2005).

Análisis altamente estructurados por cristalografía de rayos X, muestra que 14 subunidades independientes (7  $\alpha$  y 7  $\beta$ ) están ensambladas en un complejo sencillo (Coux et al. 1996; Baumeister et al. 1998). Este proteosoma es definido como treonina proteasa, debido a que tres de las siete subunidades  $\beta$  tienen actividad catalítica en residuos de treonina en el extremo amino terminal. Estas subunidades proteosomales tipo  $\beta$  son sintetizadas como pro-proteínas y procesadas a sus formas maduras por remoción de sus pro-secuencias amino terminal para ser activas, ocurriendo esto por un mecanismo autocatalítico (Tanaka, 1998).

En levaduras se han encontrado siete subunidades  $\alpha$  y siete  $\beta$ , mientras que, en humanos se han reportado siete subunidades  $\alpha$  y diez subunidades  $\beta$ . La existencia de tres subunidades beta extra fue un rompecabezas, sin embargo, recientemente se encontró que el interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) induce el reemplazo de tres subunidades  $\beta$  expresadas constitutivamente ( X, Y y Z) por subunidades inducibles por el IFN- $\gamma$  (llamadas LMP7, LMP2 y MECL-1, respectivamente) las cuales tienen una alta similitud de aminoácidos con la subunidad reemplazada, produciéndose de esta forma, “immunoproteosomas”, responsables de la producción de ligandos MHC clase I a través del procesamiento inmunológico de antígenos intracelulares (Tanaka y Kasahara, 1998). Las tres subunidades inducibles por el IFN- $\gamma$  pueden reemplazar subunidades constitutivas catalíticas del proteosoma 20S durante la biogénesis del proteosoma (Schmidt y Kloetzel, 1997). MECL1 requiere LMP2 para su eficiente incorporación en el proteosoma, y los pre-proteosomas que contienen LMP2 y MECL1 requieren LMP7 para su eficiente maduración. De esta forma existe un mecanismo que favorece el ensamble de immunoproteosomas homogéneos que contienen las tres subunidades inducibles por el IFN- $\gamma$  (Tanaka, 1998).

El proteosoma 20S existe de forma latente en las células. Este hallazgo es consistente con la observación estructural de que el centro del anillo alfa está casi cerrado, evitando la penetración de proteínas en la superficie interna del anillo beta, donde los sitios proteolíticos activos están localizados (Baumeister et al., 1998). De esta forma, la interacción entre el 20S y el complejo regulador 19S, abre el canal del proteosoma para la entrada de la proteína (Tanaka, 1998).

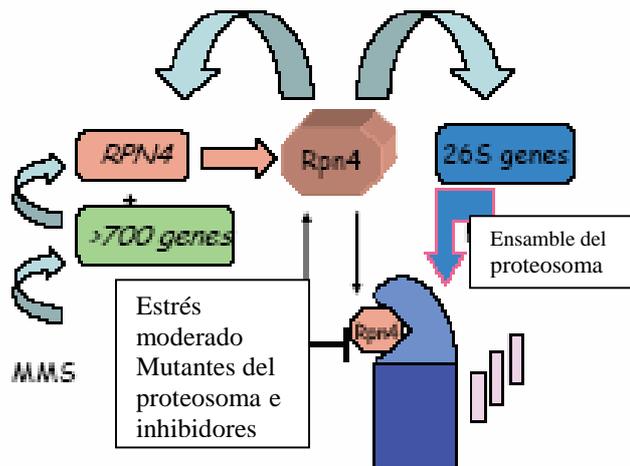
El complejo regulador 19S puede asociarse con el proteosoma 20S en una forma dependiente de ATP para formar el proteosoma 26S. Esta estructura consiste en el proteosoma 20S localizado centralmente que funciona como máquina catalítica, y dos subunidades 19S unidas al 20S en direcciones opuestas. La subunidad 19S contiene aproximadamente 20 subunidades heterogéneas de 25 a 110 kDa, que pueden ser clasificadas en dos subgrupos: un subgrupo de al menos 6 ATPasas que son estructuralmente similares y altamente conservadas durante la evolución, y un subgrupo de cerca de 14 subunidades no relacionadas estructuralmente en los miembros de la familia de las ATPasas ( Coux et al., 1996; Hilt et al., 1995 ).



**Fig. 9 Modelo del ensamblaje del proteosoma en ratón.** (Nandi et al., 1997).

### 3.3 BIOGÉNESIS DEL PROTEOSOMA

Las subunidades del proteosoma son sintetizadas en cantidades estequiométricas sugiriendo que la transcripción de sus genes es regulada coordinadamente. Bajo condiciones leves de estrés, los niveles del proteosoma rápidamente se incrementan para participar en la remoción de proteínas dañadas. En levaduras, el factor de transcripción Rpn4 activa esta transcripción elevada. Rpn4 es una proteína de vida media corta que reconoce un motivo de elemento de control del proteosoma (PACE) en sus promotores, tanto en su propio gen como en otros más (Manhnhaupt, et al. 1999). Rpn4 es parte de un circuito de retroalimentación negativa, siendo el mismo un sustrato del proteosoma activo ensamblado. Bajo condiciones normales de crecimiento, Rpn4 es ubiquitinado por E3 y E2, pero también degradado por el proteosoma de una forma independiente de ubiquitina con una vida media de cerca de 2 minutos. Bajo condiciones de estrés, en que se requieren niveles elevados del proteosoma para afrontar los niveles elevados de proteínas dañadas, o cuando la actividad del proteosoma está comprometida (mutaciones de las subunidades 20S o por inhibidores del proteosoma), la degradación de Rpn4 es retardada, y la vida media se extiende a 16 minutos. Bajo estas circunstancias la transcripción de Rpn4 es elevada y esto lleva a la sobrerregulación de los niveles del proteosoma. (London, et al., 2004).



**Fig. 10 Regulación transcripcional del proteosoma nivelado por Rpn4. Rpn4 regula la transcripción de genes 26S (Mannhaupt, 1999).**

El ensamble de subunidades del proteosoma en el citoplasma en “medios-proteosomas” 13-16S, comprende un anillo de subunidades  $\alpha$  y pro-péptidos  $\beta$ . La chaperona de vida media corta Ump1 (proteína de maduración Ub) se une a los medios-proteosomas (Ramos et al., 1998). Estos son importados hacia el núcleo vía secuencias NLS en las subunidades alfa. Una vez en el núcleo, el proteosoma 20S se asocia con un complejo del heterodímero Nob1 y Pno1, ambas proteínas nucleares, y la subunidad 19S (Tone y Toh-e, 2002).

### 3.4 LOCALIZACIÓN DEL PROTEOSOMA

El proteosoma, como ya se mencionó, tiene una estructura similar a un barril en el que los sitios activos de varias proteasas se encuentran en la cavidad interior. El costo de este arreglo es el requisito de que los sustratos deben ser desplegados para ser introducidos en la angosta entrada al interior de la cavidad. Las células eucariotas encaran un problema topológico adicional: los proteosomas están excluidos de los organelos limitados por membrana (Rivett, 1998), en base en esto, deben estar

equipados con un sistema proteolítico distinto, o con una maquinaria de exportación de proteínas de vida corta hacia el citosol para su degradación (Kopito y Sitia, 2000).

Las proteínas destinadas al espacio extracelular y los organelos del sistema vacuolar central se pliegan en el retículo endoplásmico (RE). Un sofisticado sistema de control de calidad asegura que el plegamiento o intermediarios de ensamblado sean prevenidos de progresar al aparato de Golgi, y que las proteínas mal plegadas sean eventualmente retro-translocadas o dislocadas a través de la membrana del retículo endoplásmico al citosol para degradación en el proteosoma. El complejo Sec61, forma un canal llamado “translocón” a través del cual las proteínas nacientes son translocadas al retículo endoplásmico, razón por la que también parece ser responsable de la dislocación o mal plegamiento de las proteínas (Wiertz et al. 1996). Esta inesperada “conexión citoplásmica” entre el control de calidad en el retículo endoplásmico y los proteosomas citoplásmicos dio la respuesta al debate de cómo un gran número de proteínas nacientes podían coexistir en el lumen del RE con un sistema proteolítico agresivo (Klausner y Sitia, 1990).

La situación de las proteínas solubles del RE es más compleja, debido a que están completamente protegidas del proteosoma por la membrana del RE.

Estudios de maduración del proteosoma identificaron proteínas que van y vienen entre el nucleolo, núcleo, y citoplasma y también llevan a cabo una función dual en la biogénesis del ribosoma (Glickman y Ravech, 2005).

*Pero, ¿Puede la localización subcelular del proteosoma incluir también un paso de exporte nuclear regulado?*

En muchos casos la fosforilación de un solo residuo es una señal para la exportación nuclear y el proteosoma 26S es fosforilado en muchos sitios, en correlación con la progresión del ciclo celular, respuesta a estrés y envejecimiento (Kaplan et al., 2003).

Los sustratos son degradados en el núcleo, citoplasma y en el lado citoplásmico del retículo endoplásmico, y los proteosomas se han observado en cada compartimiento (Wojcik y DeMartino, 2003).

En el caso de las ciclinas G1 de levadura y ciclina D1 de humanos, deben ser exportadas desde el núcleo para ser degradadas (Carrano et al., 1999; Diehl et al., 1997).

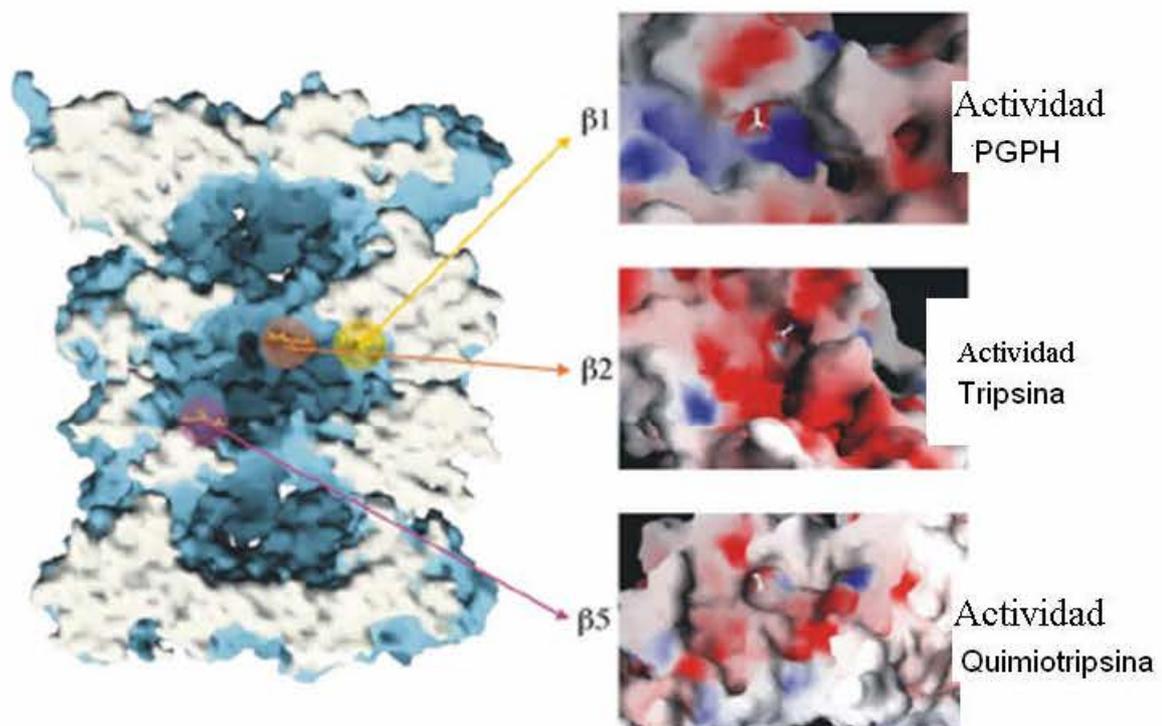
En el núcleo hay tanto evidencia física como genética de la relación de los proteosomas con rompimiento de doble cadena (DSB). El reclutamiento de proteosomas es prolongado, ocurriendo 3 horas después de la inducción de un DSB sitio-específico. Esto implica que es requerido para un estado tardío del proceso de reparación (Krogan, 2004).

### **3.5 RESIDUOS CON SITIOS ACTIVOS PROTEOLÍTICOS**

Con base en estudios cristalográficos del proteosoma 20S de *T. acidophilum* se encontró que el proteosoma 20S pertenece a una nueva clase de enzimas proteolíticas llamadas treonina proteasas. Thr1, Glu17, y Lys33 fueron identificados como los principales residuos catalíticos. Adicionalmente, Ser129, Asp166 y Ser169 localizados cerca del sitio activo de treonina parecen ser requeridos para la integridad estructural del centro proteolítico y están probablemente involucrados en la catálisis (Lowe et al., 1995; Seemuller, et al., 1995). La actividad proteolítica de ThrO<sup>γ</sup> se mostró por reaccionar con grupos funcionales electrofílicos de inhibidores o uniones peptídicas de los sustratos, mientras que Thr1N representa el protón aceptor. Ser129 O<sup>γ</sup> y Ser169 O<sup>γ</sup> forman puentes de hidrógeno con el amino N-terminal de la treonina nucleofílica, lo cual es coordinado por Asp168O, y ThrO<sup>γ</sup> forma un puente de hidrógeno con Lys33N<sup>ζ</sup>. En levaduras, la subunidad β5 puede ser inactivada por el reemplazo de Lys33 (Groll et al., 1997; Heinemeyer et al., 1997). Sin embargo, Lys33 no actúa como el aceptor de protón, pero contribuye al pKa y al estado de protonación de los grupos ionizables, puesto que su modelo de puentes de hidrógeno indica una carga positiva. Siempre la sustitución conservada de Lys33 con arginina resulta en inactivación proteolítica causada por el rearrreglo estructural del grupo guanidina de Arg33 (Groll et al., 1997). Este rearrreglo está posiblemente asociado con el cambio del pKa intrínseco de ThrO<sup>γ</sup>. Estas observaciones revelan que es absolutamente esencial el esquema exacto de los residuos responsables para la actividad catalítica de la subunidad β (Groll et al., 1995).

### **3.6 FUNCIÓN CATALÍTICA Y ESPECIFICIDAD DE LAS SUBUNIDADES DEL PROTEOSOMA**

El proteosoma eucarionte 20S muestra diferentes actividades proteolíticas, que pueden observarse *in vivo*, sin embargo, ensayos *in vitro* realizados con sustratos cromogénicos demostraron que las actividades proteosomales están restringidas a sólo cinco distintos sitios de rompimiento: similar a quimiotripsina (CL), similar a tripsina (TL), peptidil-glutamil- hidrolizante (PGPH), actividad preferente sobre cadenas de aminoácidos ramificados (BrAAP), y actividad preferente sobre aminoácidos neutros pequeños (SNAAP). Con base en estudios estructurales y mutacionales en proteosomas de levadura, se han podido identificar las subunidades responsables de estas distintas actividades (Groll et al., 1999; Groll et al., 1997; Heinemeyer et al., 1997). Generalmente, el principal residuo responsable para la formación de cada bolsillo específico S1 está localizado en la posición 45. Adicionalmente, subunidades adyacentes en los anillos  $\beta$  contribuyen a la formación de los bolsillos S1 y a su selectividad. Análisis estructurales revelaron que la subunidad  $\beta 1$  interactúa, preferentemente, con residuos de glutamato P1 de sustratos cromogénicos, debido a la localización de arginina 45 en la subunidad  $\beta 1$ . Esta observación restringió la actividad tipo peptidil-glutamil- hidrolizante del proteosoma a esta subunidad. Por otro lado, en la subunidad  $\beta 2$ , el residuo de glicina está situado en la posición 45. Consecuentemente, el bolsillo S1 de la subunidad  $\beta 2$  es muy espacioso y por consiguiente es conveniente para los residuos glutamato P1 muy grandes. El glutamato 53 en el fondo del bolsillo S1 es el responsable de la actividad similar a tripsina de esta subunidad como lo muestra su alta preferencia por residuos básicos P1 (Groll et al., 1999; Heinemeyer et al., 1997). La actividad similar a quimiotripsina puede ser atribuida a la subunidad  $\beta 5$  formada en particular por metionina 45. Sin embargo, se ha demostrado por análisis mutacionales, que esta subunidad también tiene tendencia a romper después de cadenas de aminoácidos en rama y neutros pequeños asignándole actividad de BrAAP y SNAAP a esta subunidad (Groll et al., 1997).



**Fig. 11 Representación de la superficie del proteosoma 20S de levadura, señalándose los principales sitios de actividad catalítica.**  $\beta 1$ , Actividad de peptidil-glutamil-péptido hidrolizante;  $\beta 2$ , Actividad similar a tripsina;  $\beta 3$ , Actividad similar a quimiotripsina. (Groll y Huber, 2004).

### 3.7 INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA 20S

#### 3.7.1 INHIBIDORES DE UNIÓN COVALENTE

Una inmensa serie de rutas biológicas son controladas por el proteosoma, el cual es responsable de regular la degradación de muchas proteínas importantes. De tal modo que, los inhibidores del proteosoma son candidatos fundamentales como fármacos anti-tumorales o anti-inflamatorios. El modo de acción del proteosoma 20S ha sido analizado primero con inhibidores de proteasa no específicos, descubriéndose numerosos inhibidores con una gran especificidad contra el proteosoma (Groll y Huber, 2004).

N-acetil-Leu-Leu-Norleucinal (Ac-LLnL-al, también llamado inhibidor de calpaina 1) fue uno de los primeros inhibidores del proteosoma descubiertos. A pesar de su falta de especificidad, ha sido ampliamente usado para analizar las funciones del proteosoma *in vivo*. La unión reversible de este inhibidor impide la actividad similar a quimiotripsina, y en una magnitud menor, la actividad similar a tripsina y post-acídica del proteosoma 20S eucarionte, uniéndose a todos los centros activos proteolíticos, especialmente a la subunidad  $\beta 5$  de manera covalente (Groll y Huber, 2004).

La lactacistina, producida en *Streptomyces sp*, fue el primer inhibidor del proteosoma natural identificado. La lactacistina radioactiva mostró unirse principalmente a la subunidad  $\beta 5$ , inhibiendo irreversiblemente la actividad similar a quimiotripsina. En soluciones acuosas a pH 8 el compuesto reactivo de lactacistina es espontáneamente hidrolizado en clasto-lactacistina  $\beta$ -lactona, la cual inhibe al proteosoma 20S. Se une al proteosoma 20S principalmente a átomos de la cadena por un gran número de puentes de hidrógeno. La unión covalente al amino Terminal de Thr10<sup>y</sup>, con la formación de una unión éster en el sitio activo de la subunidad  $\beta 5$ , causa la inhibición irreversible (Groll y Huber, 2004).

Es altamente específica para el proteosoma, porque no inhibe serín proteasas o activadores del plasminógeno, así tampoco tiene efecto en ninguna proteasa probada, incluyendo tripsín serín proteasas y quimiotripsina (Fenteany et al., 1995). Además de que no inhibe la degradación de proteínas lisosomales. La lactacistina, por consiguiente parece interactuar con elementos estructurales únicos para ciertas subunidades catalíticas tipo  $\beta$  del proteosoma. Estos resultados demuestran que, al contrario, de los inhibidores péptido aldehído usados en estudios del proteosoma, la lactacistina es altamente específica para el proteosoma resultando ser un agente más útil en el estudio del involucramiento del proteosoma en los procesos biológicos (Fenteany y Schreiber, 1998).

La preferencia de la lactacistina de unirse a subunidades del proteosoma ha dado un impulso para la creación de compuestos sintéticos inhibiendo sitios activos individuales en proteosomas eucariontes. Los datos estructurales del proteosoma proveen rasgos para el desarrollo de inhibidores bifuncionales, los cuales tienen numerosos sitios para una unión covalente con la proteína. Por ejemplo Maleoil-  $\beta$ Ala-Val-Arginina-al (Mal-

$\beta$ AVR-al) ha sido diseñada para bloquear específicamente la actividad similar a tripsina del proteosoma 20S de una forma bifuncional. Se ha propuesto que se une covalentemente al residuo Glu53 de la subunidad  $\beta$ 2. Estudios de densidad electrónica, han revelado una unión covalente adicional de la maleinimida con el residuo Cys118 de la subunidad  $\beta$ 3, proporcionándole su carácter bivalente. Este nuevo inhibidor promete ser una herramienta eficaz en el estudio del proteosoma, sin embargo la reactividad del grupo maleinimida hacia los grupos tiol limita su uso solo en estudios *in vitro* (Groll y Huber, 2004).

Se ha mostrado que la actividad catalítica del proteosoma es eficiente e irreversiblemente inhibida por el producto natural de la epoxomicina, el péptido  $\alpha'$ ,  $\beta'$ -epoxicetona. Este inhibidor posee una alta especificidad por el proteosoma y no inhibe otras proteasas como calpaina, tripsina, y quimiotripsina. Este inhibidor es un sistema de seis anillos que se une covalentemente a la subunidad  $\beta$ 5, formando un aducto con Thr10 $\gamma$  amino terminal del proteosoma (Groll y Huber, 2004).

### **3.7.2 INHIBIDORES NO COVALENTES**

Se ha observado que los productos naturales de *Apiospora montagnei*, TMC-95s (TMC-95<sup>a</sup>, B, C, y D), bloquean la actividad proteolítica del proteosoma selectiva y competitivamente en un bajo rango. Estos compuestos consisten de un sistema de anillos heterocíclicos de aminoácidos modificados. Este inhibidor se une a los tres sitios proteolíticos activos. TMC-95A se une no covalentemente a los sitios activos de las subunidades  $\beta$ , sin modificar sus treoninas amino terminales. Una firme red de puentes de hidrógeno conecta a TMC-95A con la proteína, estabilizando su posición.

### **3.7.3 INHIBICIÓN DEL PROTEOSOMA POR INSULINA**

La insulina promueve el crecimiento celular y lo mantiene por una amplia variedad de acciones anabólicas y anticatabólicas, incluyendo la inhibición de la proteólisis (Russell-Jones y Umpleby, 1996). La administración de insulina causa un incremento en la síntesis de algunas proteínas específicas, el efecto de la insulina en el nivel de proteínas celulares totales se atribuye casi completamente a la disminución de la

degradación de proteínas (Mortimore y Mondon, 1970). En una variedad de tipos celulares, la ausencia de insulina y aminoácidos induce la formación de vacuolas autofágicas y subsecuentemente degradación lisosomal, la cual es reversible por la adición de insulina (Mortimore y Mondon, 1970). Sin embargo, en estudios recientes se ha sugerido que mecanismos no lisosomales pueden estar involucrados (Barrett et al., 1995). El proteosoma está involucrado en la degradación de proteínas de vida corta y larga, la remoción de proteínas dañadas, control del ciclo celular, activación de factores de transcripción y presentación de antígeno (Coux et al., 1996).

En músculo de ratas diabéticas, la insulina revirtió el incremento de la proteólisis dependiente de ATP, pero su efecto aún no es claro (Pepato et al., 1996). Anteriormente se mostró que la insulina inhibe la degradación de péptidos independiente de ATP por el proteosoma *in vitro* y en cultivos de células (Hamel et al., 1997). La habilidad de la insulina para inhibir esta actividad del proteosoma es mediada por una proteína, la enzima degradante de insulina (IDE). La IDE es una enzima citosólica principalmente y es el miembro inicial de una familia de zinc metaloproteinasas responsable de la degradación de insulina en la mayoría de los tejidos (Duckworth et al., 1998). La insulina incrementa la acumulación de proteínas conjugadas con ubiquitina en células de hepatoma humano. Se piensa que el mecanismo es debido a que la insulina regula el catabolismo de la proteína IDE, al menos en parte, disminuyendo la actividad del proteosoma mediada por ubiquitina, y provee un nuevo blanco para la acción de la insulina (Bennett et al., 2000).

#### **3.7.4 INHIBICIÓN DEL PROTEOSOMA POR POLIFENOLES**

Estudios epidemiológicos han sugerido que el consumo de té tiene un efecto protector contra diversos cánceres humanos (Fujiki, 1999; Kuroda y Hara, 1999; Yang, 1999). Se les ha atribuido esta propiedad a sus principales componentes: los polifenoles, siendo los más representativos epigallocatequina-3-galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG), y epicatequina (EC), que se encuentran en el té verde y negro (Fujiki, 1999).

Una de las importantes funciones del proteosoma es permitir la progresión del ciclo celular en un tumor y proteger a las células tumorales de la apoptosis (Dou y Li, 1999).

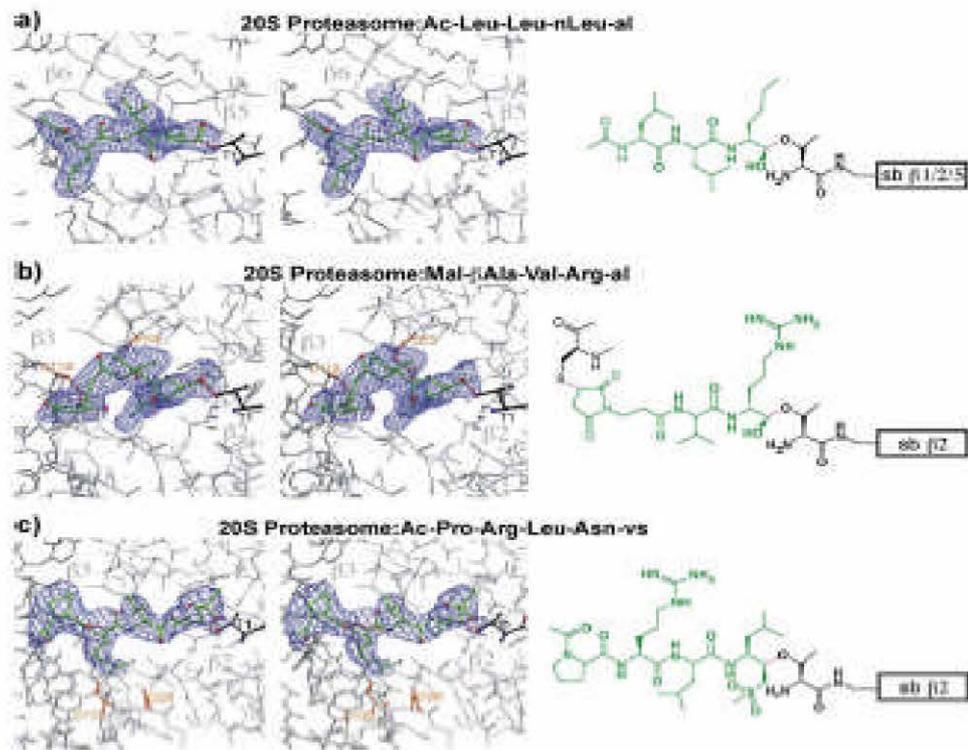
Asociándose la actividad similar a quimiotripsina del proteosoma con la supervivencia de las células tumorales (An et al., 1998). Se ha reportado que las uniones tipo éster encontradas en los polifenoles del té inhiben selectivamente esta actividad similar a quimiotripsina *in vitro* e *in vivo*. Entre los polifenoles estudiados, ECGC mostró una fuerte actividad inhibidora del proteosoma 20S y 26S tanto de extractos celulares de tumor y células de tumor intactas, sugiriéndose que las propiedades preventivas del té verde y negro pueden ser atribuidas, al menos en parte, a su habilidad inhibidora originada por la formación de un complejo ECGC- proteosoma (Nam et al., 2001).

### **3.7.5 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA**

Los inhibidores del proteosoma han provisto una vasta información sobre las importantes funciones del proteosoma y de la ruta de ubiquitina en muchos procesos biológicos, así como la identificación de numerosos sustratos del proteosoma. Los efectos biológicos obtenidos por el tratamiento de las células con inhibidores del proteosoma pueden ser extremadamente diversos, dependiendo del tipo de célula, estado de proliferación de la célula, naturaleza y cantidad del inhibidor, así como el tiempo de exposición. Esto deber ser tomado en cuenta, además de que la mayoría de los inhibidores no son exclusivamente específicos, y sus efectos biológicos pueden ser parcialmente explicados por inhibición de otras proteasas (Groll y Huber, 2004).

La inhibición del proteosoma puede causar arresto del ciclo celular en varios estadios como G1/S y G2/M. Parcialmente, este efecto puede ser debido a la protección de reguladores positivos y negativos del crecimiento celular con la activación subsiguiente de rutas de señalización, a menudo disparando apoptosis (Kloetzel, 1998). Además, los inhibidores del proteosoma, afectan otros procesos biológicos como diferenciación celular, inflamación y respuestas inmunes (Groll y Huber, 2004).

Los inhibidores del proteosoma estabilizan fuertemente la proteína IKB $\alpha$ , la cual es un inhibidor selectivo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, involucrado en la respuesta inflamatoria (Groll y Huber, 2004).



**Fig. 12 Representación del proteosoma 20S acompañado con inhibidores sintéticos de unión covalente; a) inhibidor calpaina I, b) Mal-βAla-Val-Arg-al y c) Ac-Pro-Arg-Leu-Asn-vs. (Groll y Huber, 2004).**

## **4.2 HIPOTESIS**

- ❖ El arsenito de sodio es capaz de alterar significativamente la proteólisis no lisosomal similar a quimiotripsina después de una exposición corta (3 hrs.) en el hígado de ratones machos BALB/c.

## **4.3 OBJETIVOS**

### **4.3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la capacidad del arsenito de sodio de alterar en corto tiempo la actividad proteosomal en el cultivo organotípicos de hígado de ratón, mediante el análisis de la degradación enzimática hacia un sustrato específico (LLVY-AMC).

### **4.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la capacidad del arsenito de sodio de alterar en 3 horas la actividad proteosomal en el cultivo organotípicos de hígado de ratón, mediante el análisis de la degradación enzimática hacia un sustrato específico (LLVY-AMC).
- Conocer la síntesis de la ubiquitina en cultivos organotípicos de hígado de ratones BALB/c tratados con arsenito de sodio.

## **CAPITULO IV**

### **DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### **4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Cuando el plegamiento de las proteínas es anormal o su desdoblamiento no se presenta o se presenta bajo condiciones fisiológicas adversas o en condiciones patológicas, las proteínas o péptidos tienden a agregarse a través de la exposición de residuos hidrofóbicos, ocasionando alteraciones en la funcionalidad y/o estructura correspondiente para lo cuál fueron diseñadas. En algunos casos, se pueden revertir a su estado normal o entrar en proceso de degradación no lisosomal como la degradación proteosómica. Las alteraciones en este proceso de degradación, ocasiona que la célula segregue proteínas o péptidos al citoplasma conocidos como cuerpos de inclusión. Uno de los mecanismos no lisosomales más importantes involucrados en la proteólisis de estos sustratos insolubles intracelulares es el proteosoma el cual requiere de la ubiquitinación de los sustratos insolubles y ATP. El arsénico es conocido por afectar muchos procesos celulares, uno de ellos la proteólisis dependiente de ubiquitina al inhibir la arginilación del sustrato y por tanto la conjugación con ubiquitina (Klemperer y Pickart, 1989), además de que a bajas concentraciones causa acumulación de conjugados de proteína-ubiquitina de alto peso molecular (Kirkpatrick et al., 2003). Dado que cualquier alteración en el equilibrio de la síntesis y degradación proteica ocasiona consecuencias que se pueden reflejar en los efectos tóxicos producidos por el arsénico y considerando que el hígado es el órgano biotransformante de este metaloide nos interesa conocer la capacidad del arsenito de sodio de alterar la actividad proteolítica similar a quimiotripsina en hígado de ratones de la cepa BALB/c y las repercusiones que pudiera tener estas exposiciones sobre alguno de los componentes de la vía ubiquitina-proteosoma.

## **4.2 HIPOTESIS**

- ❖ El arsenito de sodio es capaz de alterar significativamente la proteólisis no lisosomal similar a quimiotripsina después de una exposición corta (3 hrs.) en el hígado de ratones machos BALB/c.

## **4.3 OBJETIVOS**

### **4.3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la capacidad del arsenito de sodio de alterar en corto tiempo la actividad proteosomal en el cultivo organotípicos de hígado de ratón, mediante el análisis de la degradación enzimática hacia un sustrato específico (LLVY-AMC).

### **4.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la capacidad del arsenito de sodio de alterar en 3 horas la actividad proteosomal en el cultivo organotípicos de hígado de ratón, mediante el análisis de la degradación enzimática hacia un sustrato específico (LLVY-AMC).
- Conocer la síntesis de la ubiquitina en cultivos organotípicos de hígado de ratones BALB/c tratados con arsenito de sodio.

## **4.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.4.1 PREPARACIÓN Y CULTIVOS DE REBANADAS DE HÍGADO.**

El modelo empleado para la realización del presente trabajo, fue el de cultivos organotípicos de hígado de ratón, ya que aporta numerosas ventajas en el estudio toxicológico dirigido a un órgano, como la preservación de la estructura del tejido y por tanto la interacción célula-célula.

Los hígados de ratón se obtuvieron de ratones machos BALB/c sacrificados por dislocación cervical. Los hígados se extrajeron rápidamente en condiciones estériles y se colocaron en una caja de Petri con medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y con 1% de aminoácidos esenciales, sin antibióticos. Las rebanadas se obtuvieron manualmente con un grosor entre 1-2 mm, se pesaron y se transfirieron a placas de cultivo. Los cultivos se incubaron a 37°C, 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> durante 2 horas para normalizar las condiciones de cultivo. Transcurrido este período, las rebanadas se expusieron a arsenito de sodio en el rango de concentraciones 0.01, 1, y 100 nM teniendo como control negativo rebanadas de hígado no expuestas y como control positivo, para el estudio de la actividad proteosomal, a las rebanadas expuestas a lactacistina 10 µM, un inhibidor específico de la actividad similar a quimi tripsina.

Todos las exposiciones fueron durante 3 horas, después de este tiempo se homogenizaron con un ruber polismar, en el buffer correspondiente a la determinación posterior:

Para determinación de actividad proteosomal, en buffer de Tris (50mM) pH 7.5, NaCl (150mM), EDTA (0.5 mM), NP40 0.5%; para aislamiento del proteosoma en buffer de Tris (50 mM) pH 7.5, ATP (2mM), MgCl<sub>2</sub> (5mM), DTT (1mM); para western-blot de ubiquitina en buffer de lisis, Tris (10mM) pH 7.4, NP40 1%, Aprotinina (10mM), Leupeptina (10mM), Inhibidor de Tripsina (10mM), PMSF (1mM), N-etilmaleimida (10mM).

#### **4.4.2 VIABILIDAD CELULAR**

##### **DETERMINACIÓN DE POTASIO**

La viabilidad celular se determinó por medio de la cuantificación del índice de K<sup>+</sup> intracelular/g de tejido. A 350 µl del homogenado se le adicionaron 700 µl de ácido sulfosalicílico 2%, se centrifugó 10 min. a 3000 rpm., se obtuvo el sobrenadante, el cual se sometió a sonicación para romper las células 1 min. por triplicado. Posteriormente se realizó una dilución tomando 250 µl de la muestra y se aforó a 25 ml con agua destilada. Se realizó una curva estándar con concentraciones de 0.5, 2.5, 5.0, 7.5, y 10 ppm de potasio. La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro Varian GTA-100 spectrA-A.800 (Dogterom 1993).

##### **4.4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOSOMAL**

La actividad proteosomal en los cultivos organotípicos se evaluó utilizando el sustrato del proteosoma, un péptido de leucina-leucina-valina-tirosina acoplado a cumarina LLVY-AMC (BostonBiochem), el cual es específicamente degradado por las subunidades con actividad semejante a la quimiotripsina en el proteosoma. Los cultivos organotípicos de hígado se homogenizaron en 250 µl de amortiguador (50mM Tris pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 0.5mM, NP40 0.5%) (IGEPAL, SIGMA ALDRICH). Cada reacción tenía 50 µg de proteína de los homogenados y 10 µM del sustrato LLVY-AMC, incubándose 30 minutos a 37°C, pasado este tiempo se procedía a detener la reacción con hielo. La fluorescencia dada por el rompimiento del sustrato y la consecuente liberación de cumarina, se determinó en el fluorómetro utilizando filtros de excitación de  $\lambda$ 360/460λ de emisión.

##### **4.4.4 AISLAMIENTO DEL PROTEOSOMA**

Con el objetivo de purificar el proteosoma 26S de los cultivos organotípicos de hígado se homogenizaron en 50mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM ATP, 5mM MgCl<sub>2</sub> y 1mM DTT (Hough et al., 1987). Los homogenados se centrifugaron 20 min. a 10000 rpm, posteriormente se cargaron en un gradiente de glicerol (10-40%), y se centrifugaron a 23000 rpm a 4°C durante 22 horas, transcurrido ese tiempo se colectaron manualmente fracciones de 1 ml. Se determinó la concentración de proteínas por el método de

Bradford (Bio-Rad) a cada fracción. La pureza de la fracción proteosómica se determinó mediante ensayos enzimáticos con 10  $\mu$ M del sustrato LLVY-AMC con 10 $\mu$ g de proteína, durante 30 min. de incubación a 37°C, cuantificándose su extinción fluorogénica (Bardag-Gorce et al., 2004) y caracterizadas por inmunotransferencia como sigue.

#### **4.4.5 INMUNOTRANSFERENCIA PARA LAS SUBUNIDADES ALFA DEL PROTEOSOMA**

Las muestras de cada fracción del aislamiento del proteosoma se corrieron en electroforesis SDS-PAGE al 10% y después fueron electrotransferidas a membranas PVDF (Bio-Rad Laboratorios). Los sitios no específicos para la proteína se bloquearon con leche descremada en polvo (Carnation) 2%, BSA 0.5% y TBS incubándose durante toda la noche a 4°C. Las inmunotransferencias se expusieron al anticuerpo monoclonal para las subunidades alfa del proteosoma (Zymed Laboratorios). Se utilizó como anticuerpo secundario anti IgG-ratón acoplado a peroxidasa, realizándose la inmunodetección con diaminobenzidina 1%.

#### **4.4.6 UBIQUITINACION**

Una vez transcurrido el período de incubación y tratamiento, los cultivos organotípicos se homogenizaron en buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.4, NP 40 1%, 10 mM Aprotinina, 10 mM Leupeptina, 10 mM Inhibidor de tripsina, 1 mM PMSF y 10 mM de N-etilmaleimida para prevenir el proceso de desubiquitinación. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad). Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% y se procedió a la inmunotransferencia a membranas PVDF. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-ubiquitina (Zymed Laboratorios) y un anticuerpo secundario IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa. La inmunotransferencia se reveló con diaminobenzidina 1%.

## 4.5 RESULTADOS

En este trabajo de investigación se estudió la capacidad del arsenito de sodio de modificar la actividad proteolítica no lisosomal específica para la subunidad  $\beta$  5 del proteosoma en cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos durante tres horas con dosis única en el rango de concentraciones de 100 nM, 1 nM, y 0.01 nM de arsénico. Los efectos fueron comparados con respecto a lactacistina 10  $\mu$ M, un inhibidor específico de la actividad proteosomal.

Inicialmente se cuantificó la concentración de potasio intracelular para determinar la viabilidad celular (Gráfico 1).

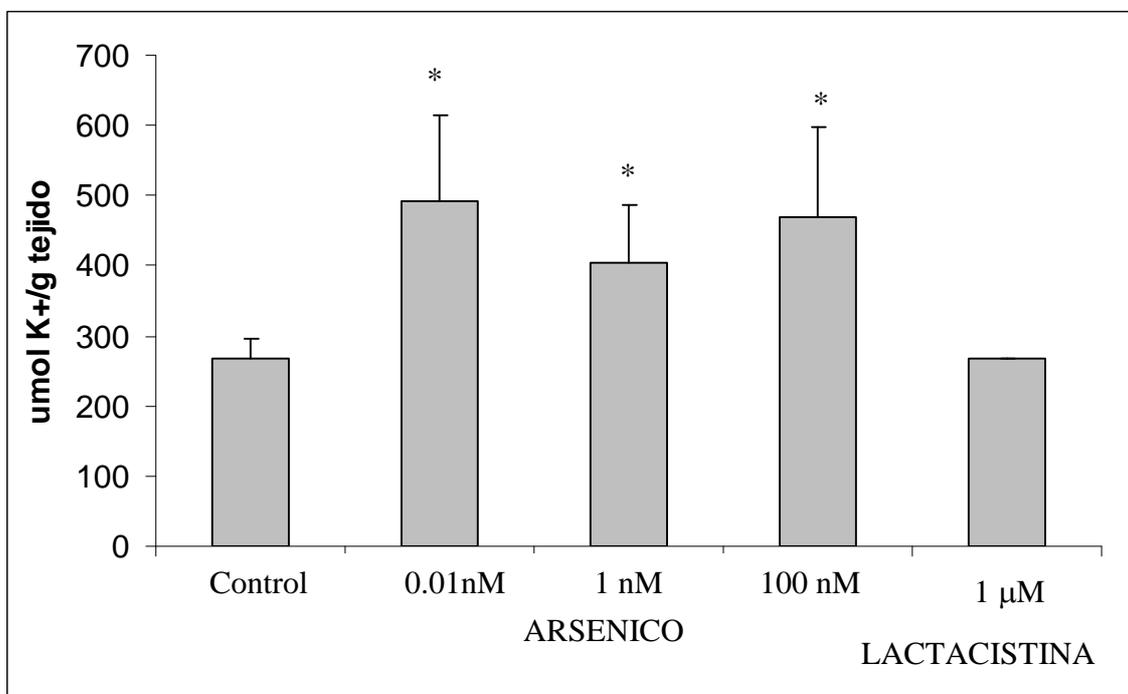


Gráfico 1. Determinación de potasio intracelular en los cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con arsenito de sodio. \* Dato Significativo con respecto al control negativo (Prueba de Tuckey).

Se ha demostrado que el arsénico inhibe la bomba de sodio (Kenney et al., 1988), y como se observa en el gráfico, el arsénico ocasiona un aumento en la concentración de potasio intracelular, posiblemente debido a este evento. Una vez corroborado que las células tras la exposición a arsénico a las diferentes concentraciones permanecían viables, pues las concentraciones de potasio intracelular estaban por arriba de 40  $\mu$ mol/

g tejido (el valor mínimo para considerar una célula viable), se continuo con la evaluación de la actividad proteosomal similar a quimiotripsina con homogenados crudos de las rebanadas de hígado de ratón. Con objeto de optimizar la reacción se cuantificó dicha actividad en diferentes condiciones experimentales (Grafico 2).

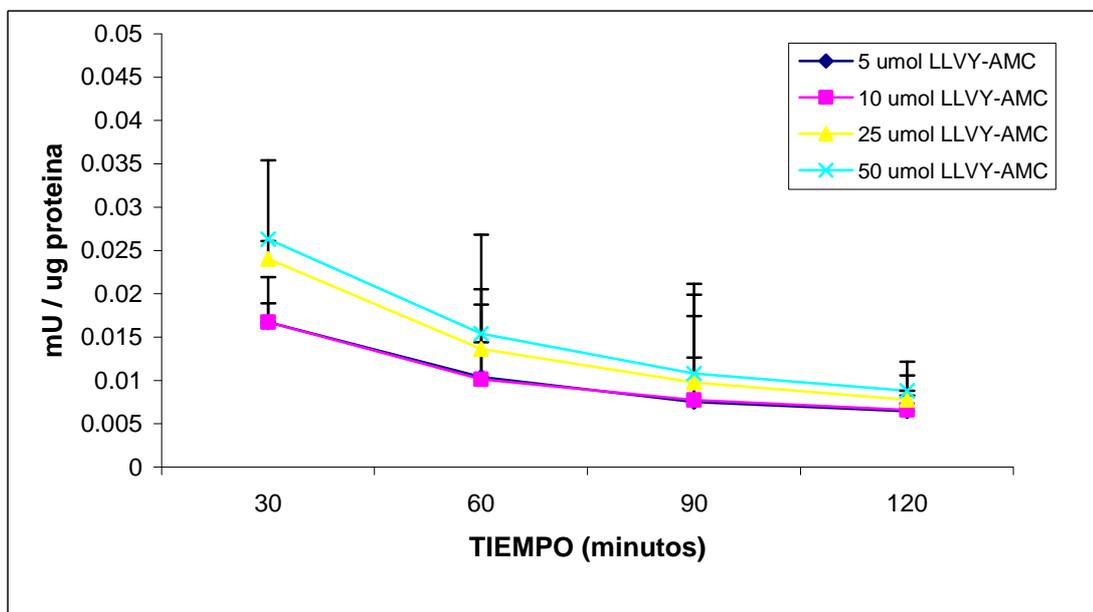
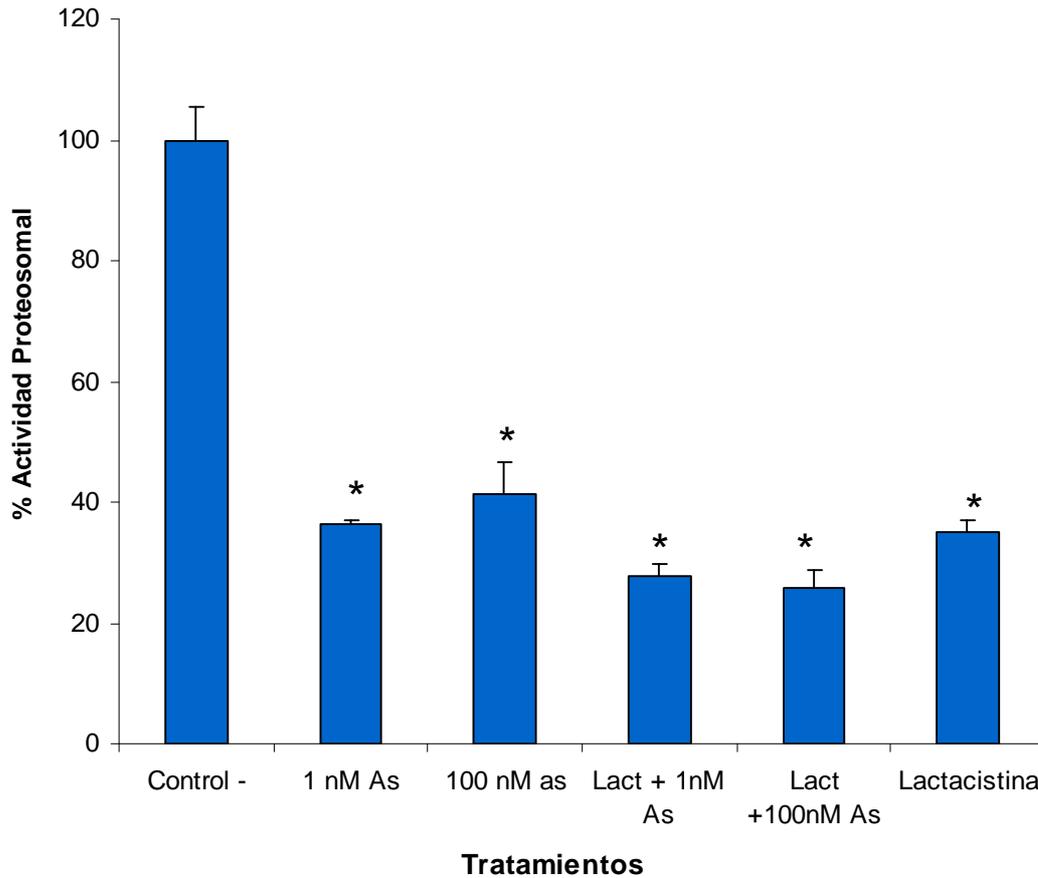


Gráfico 2. Determinación de la actividad proteosomal similar a quimiotripsina con diferentes concentraciones de sustrato LLVY-AMC y tiempos de incubación, con 50 $\mu$ g de proteína.

Considerando que en la degradación *in vitro* del sustrato LLVY-AMC por el proteosoma, el tiempo de incubación donde se presenta la mayor actividad es a 30 minutos, y que con las diferentes concentraciones de sustrato, el comportamiento es similar (gráfico 2), se decidió realizar la cuantificación fluorométrica de la degradación proteosomal en presencia de arsénico utilizando 10  $\mu$ M de sustrato LLVY-AMC, y 30 minutos de incubación a 37°C.

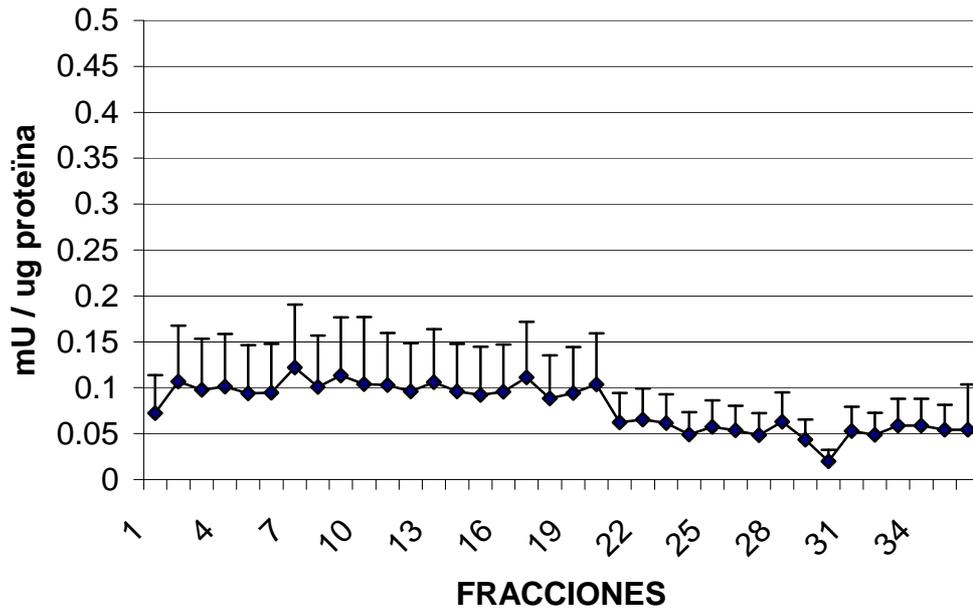
Observamos que el arsénico en las concentraciones de 1 y 100 nM inhibe la actividad enzimática proteosomal similar a quimiotripsina en el homogenado en crudo proveniente de los cultivos organotípicos en un 60% aproximadamente respecto al control, de manera semejante al inhibidor específico del proteosoma, lactacistina. Al estar expuestos los cultivos organotípicos a arsenito de sodio y lactacistina la degradación del sustrato disminuyó considerablemente (Gráfico 3).



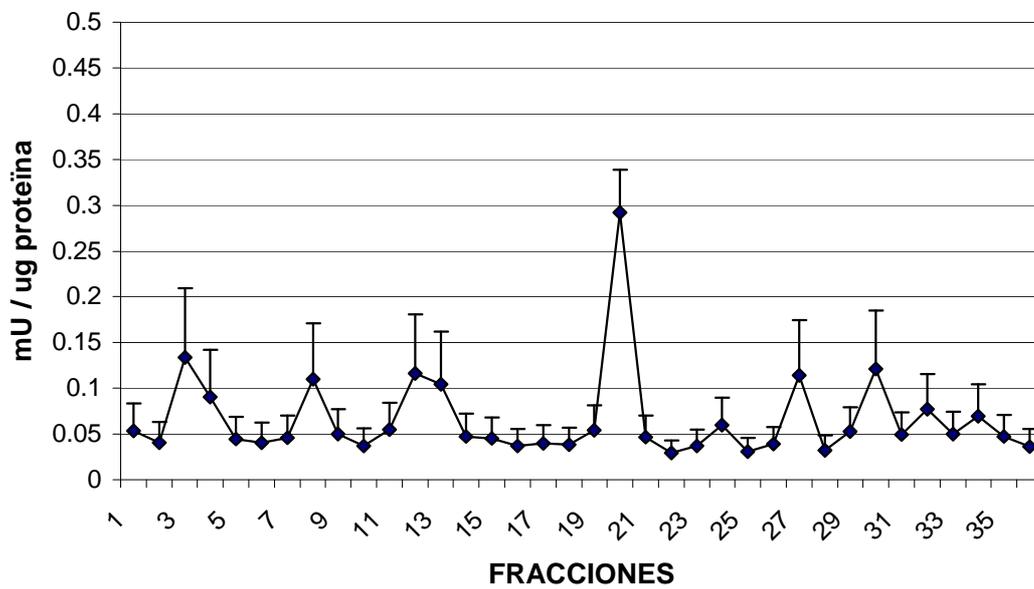
**Gráfico 3.** Determinación de la actividad proteosomal similar a quimiotripsina en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con diferentes concentraciones de arsénico y lactacistina durante 3hrs. \* Dato significativo con respecto al control negativo (Prueba de Tuckey).

Una vez estandarizadas las condiciones óptimas de actividad enzimática para el sustrato LLVY-AMC necesario en la cuantificación de la actividad proteosomal similar a quimiotripsina y conociendo que de manera general el arsenito a las concentraciones utilizadas es capaz de modificarla, procedimos al aislamiento del proteosoma mediante gradientes de glicerol en donde se determinó la actividad proteosomal similar a quimiotripsina en las fracciones purificadas.

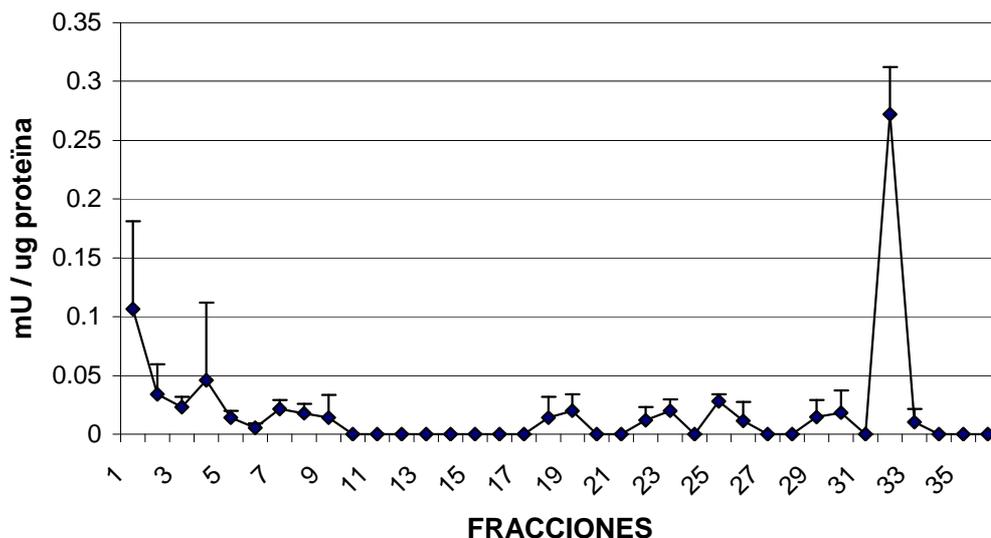
Las siguientes gráficas muestran los valores promedio por triplicado de las cuantificaciones de la actividad proteosomal en las fracciones de los homogenados de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico.



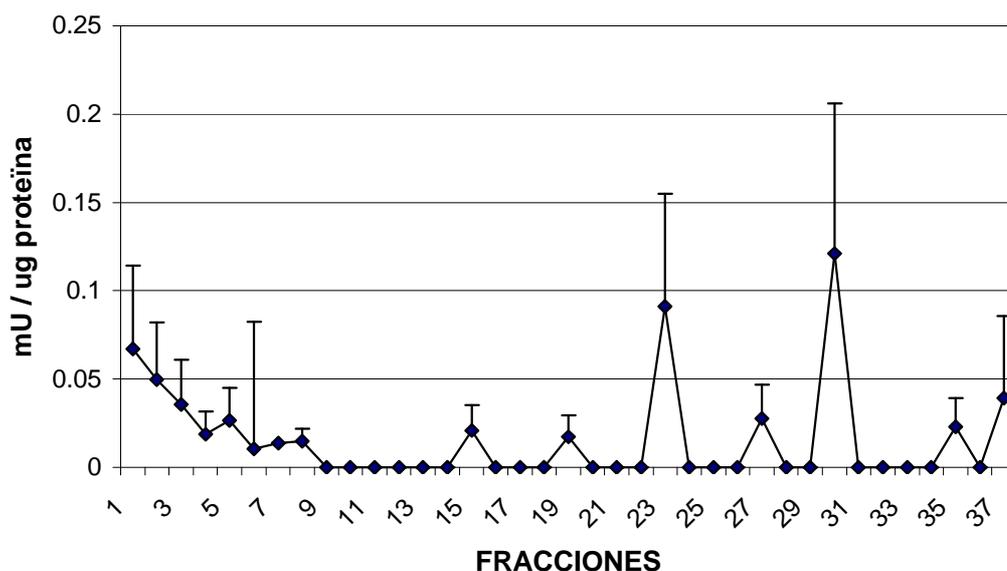
**Gráfico 4.** Determinación de la actividad proteosomal de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón control negativo.



**Gráfico 5.** Actividad Proteosomal de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 0.01 nM durante 3 hrs.



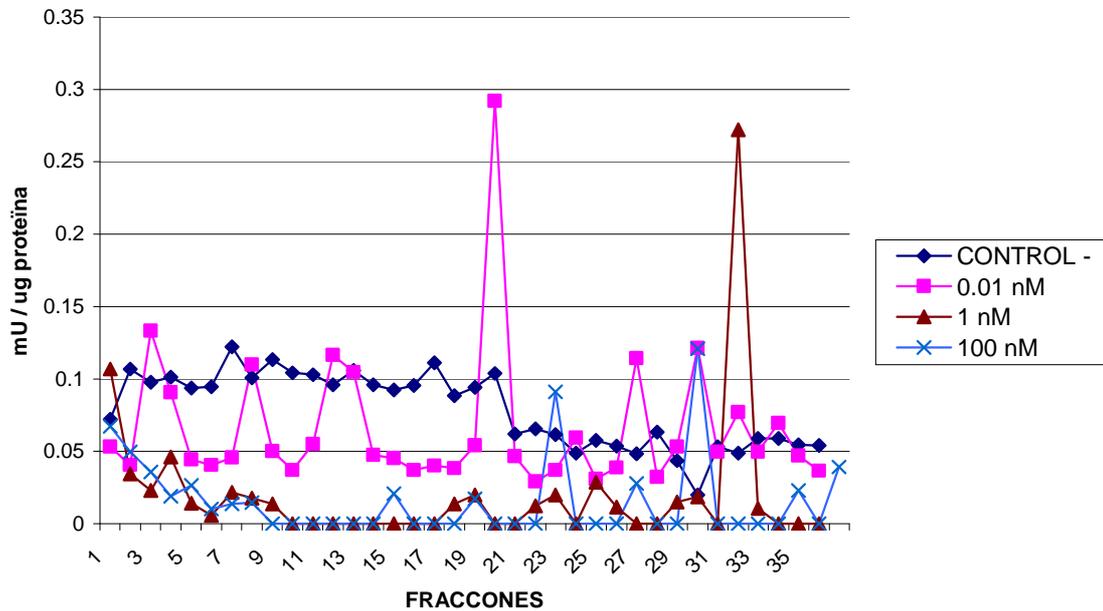
**Gráfico 6.** Actividad Proteosomal de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 1 nM durante 3 hrs.



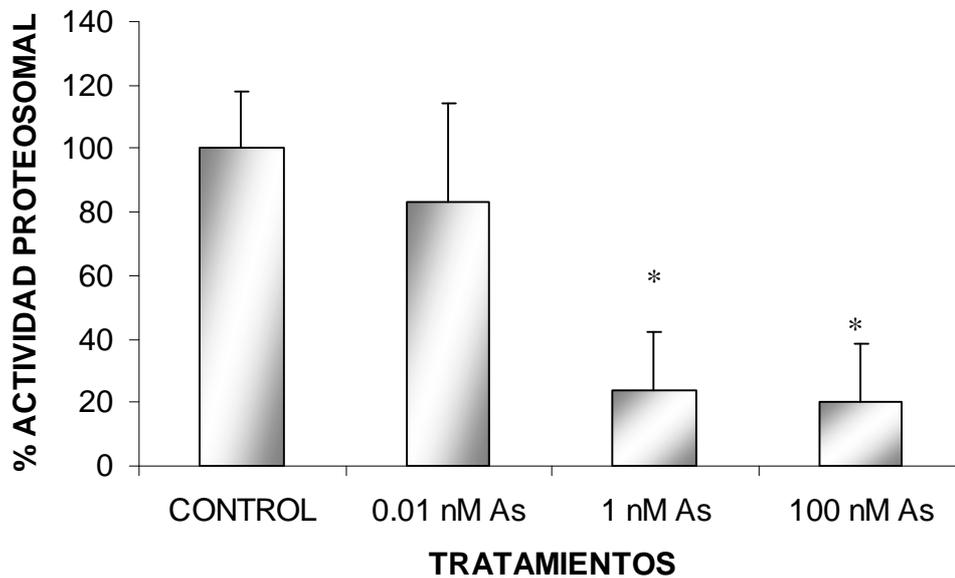
**Gráfico 7.** Actividad Proteosomal de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 100 nM durante 3 hrs.

En el control negativo la mayor actividad proteosómica se presentó en las primeras fracciones del proteosoma correspondientes a los gradientes de 10 y 20 % de glicerol (gráfico 4). En el caso de la concentración más baja de arsénico (0.01 nM), la mayor actividad proteosómica similar a quimiotripsina se observó en la fracción 20 (gráfico 5), mientras que con la concentración de 1 nM de arsénico el pico de actividad proteosómica similar a quimiotripsina se localiza en la fracción 32 (gráfico 6). En la concentración

más alta de arsénico se observan dos picos de actividad máxima en la fracciones 23 y 30 (gráfico 7) respectivamente.

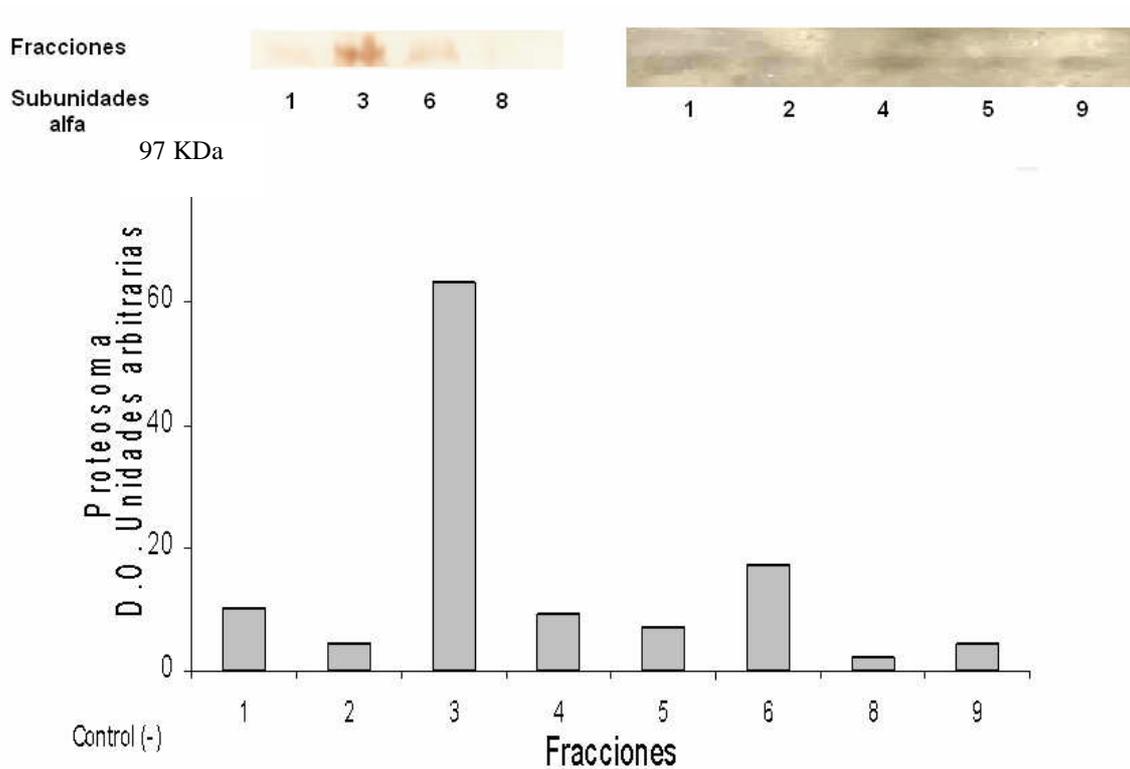


\* \*



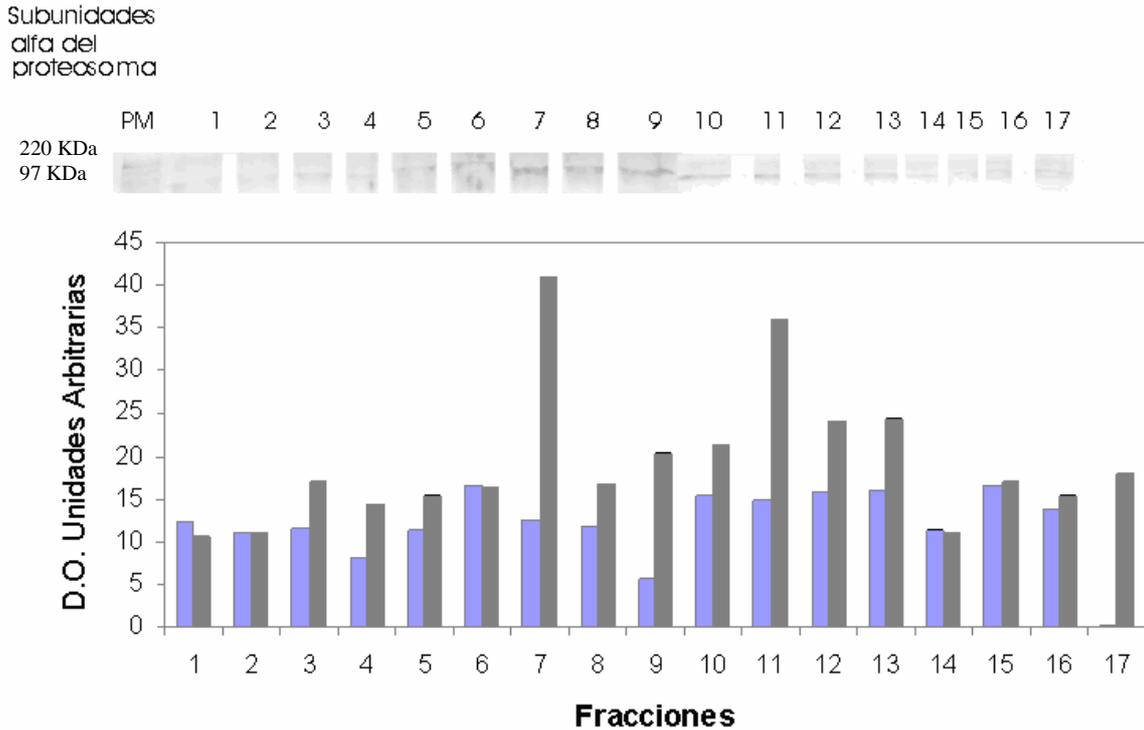
**Grafico 9.** Porcentaje de la actividad proteosomal de las fracciones de los cultivos organotipicos de hígado de ratón expuestos a arsénico durante 3 hrs. \*Dato significativo con respecto al control negativo (prueba de Tuckey).

Una parte importante del ensamblaje del proteosoma 26S son las subunidades alfa, las cuales regulan al complejo de unión y forman la entrada a la cavidad del proteosoma 20S (Peters et al., 1993), debido a que están en contacto con los componentes reguladores 19S y las subunidades beta que llevan a cabo la actividad enzimática. Estas subunidades son las primeras en reclutarse para el ensamblaje del proteosoma, por lo cual se realizó un western blot con anticuerpos dirigidos a estas subunidades, en cada fracción de los diferentes gradientes en todos nuestros tratamientos con arsénico. En el caso del control negativo sólo se observa su presencia en las primeras fracciones (1-9), siendo en la fracción 3 donde se encuentra la mayor cantidad (Gráfico 10).

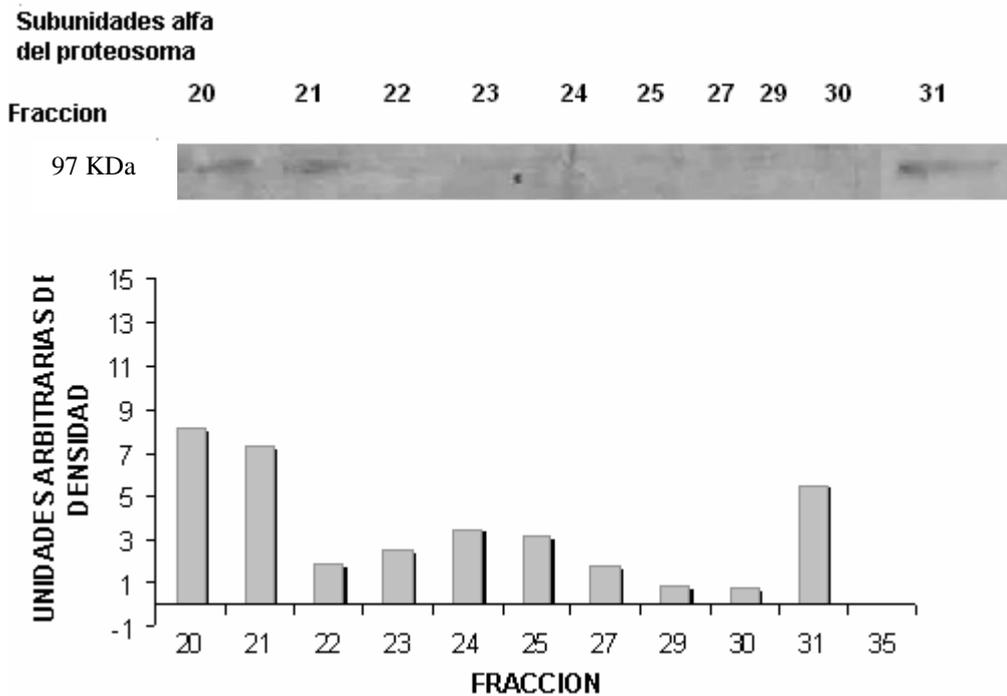


**Gráfico 10.** Western blot y análisis densitométrico de las fracciones correspondientes a los cultivos organotípicos de hígado de ratón control negativo.

En la concentración más baja de arsénico (0.01 nM) es interesante notar que es en la única que se encuentra la presencia de las subunidades alfa en casi todas las fracciones, siendo las fracciones 7 y 11 las que presentan la mayor cantidad (gráfico 11 y 12). Además de que hay presencia de dos bandas debido a que estas subunidades van formando complejos para finalmente integrar dos anillos con siete subunidades cada uno (Nandi et al., 1997).



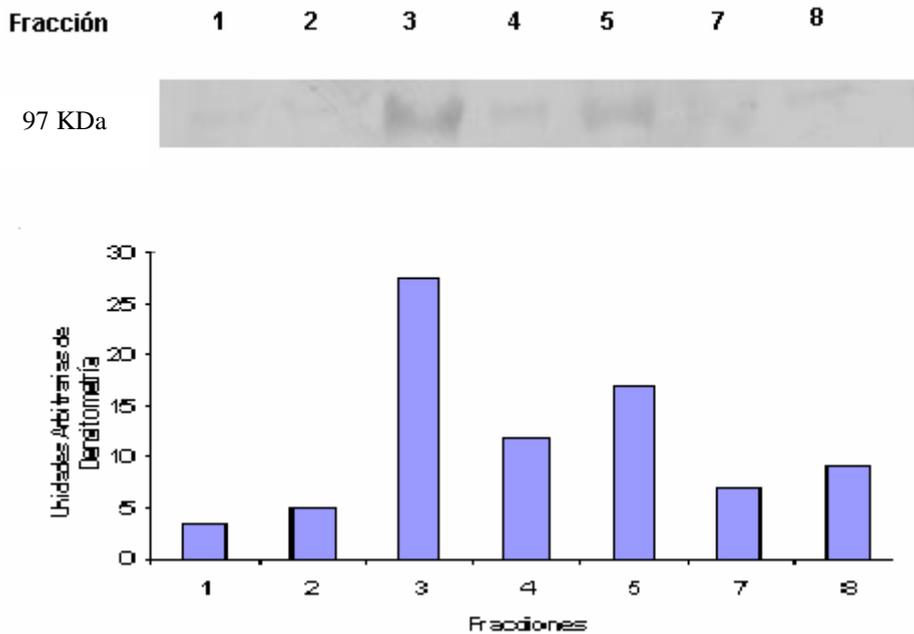
**Gráfico 11.** Western Blot y análisis densitométrico de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 0.01 nM durante 3 hrs. Las bandas en azul y gris indican la presencia de dos bandas en algunas de las fracciones.



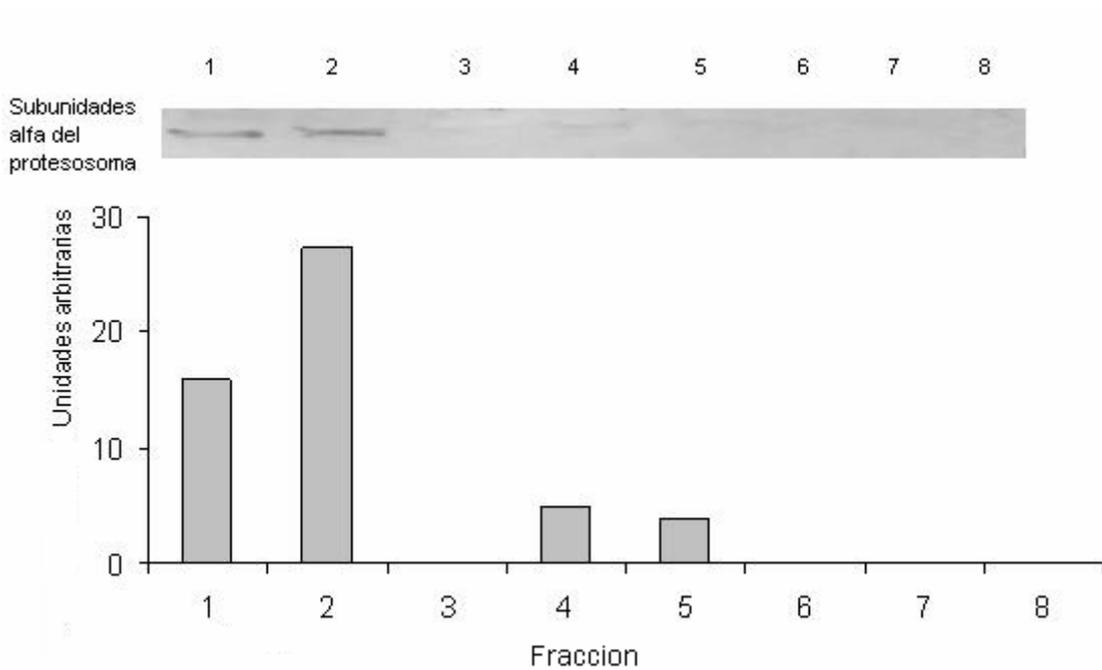
**Gráfico 12.** Western Blot y análisis densitométrico de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 0.01 nM durante 3 hr, fracciones 20 a la 35.

Cuando se caracterizaron las fracciones en el tratamiento con la concentración de 1 nM y 100 nM de arsénico, sólo se observó la presencia de las subunidades alfa en las fracciones de la 1 a la 8 para la concentración intermedia de arsénico y en las fracciones 1,2, 4 y 5, para la concentración mayor de arsénico, siendo en las fracciones 2 y 3 donde se localiza la mayor cantidad (gráfico 13 y 14).

**Subunidades alfa**

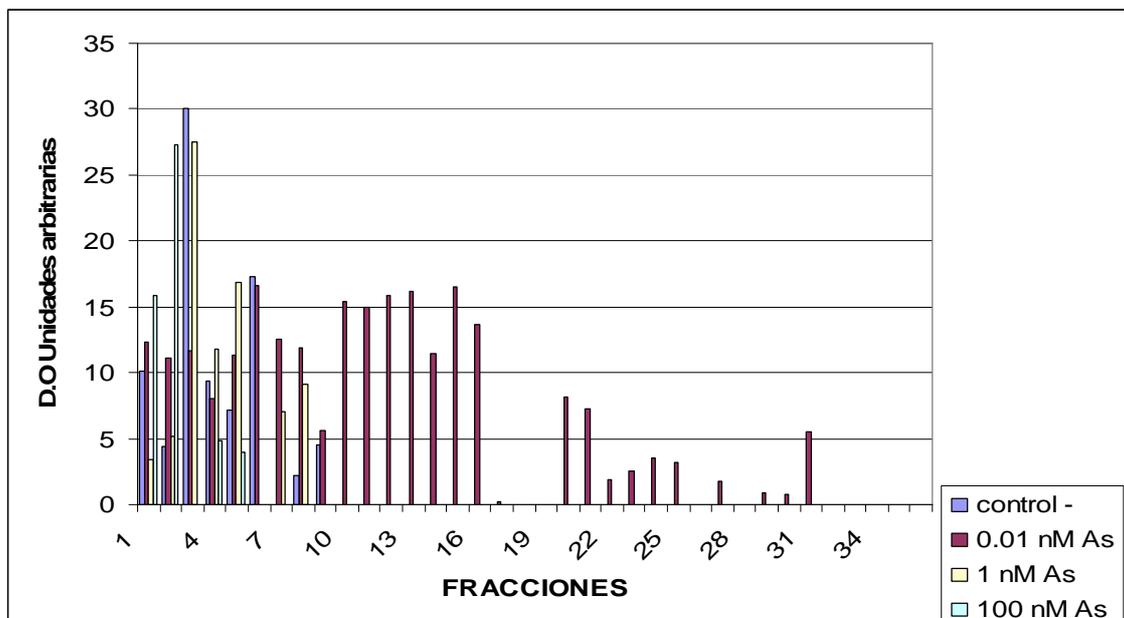


**Gráfico 13.** Western Blot y análisis densitométrico de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 1 nM durante 3 hrs.



**Gráfico 14.** Western Blot y análisis densitométrico de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico 100 nM durante 3 hrs.

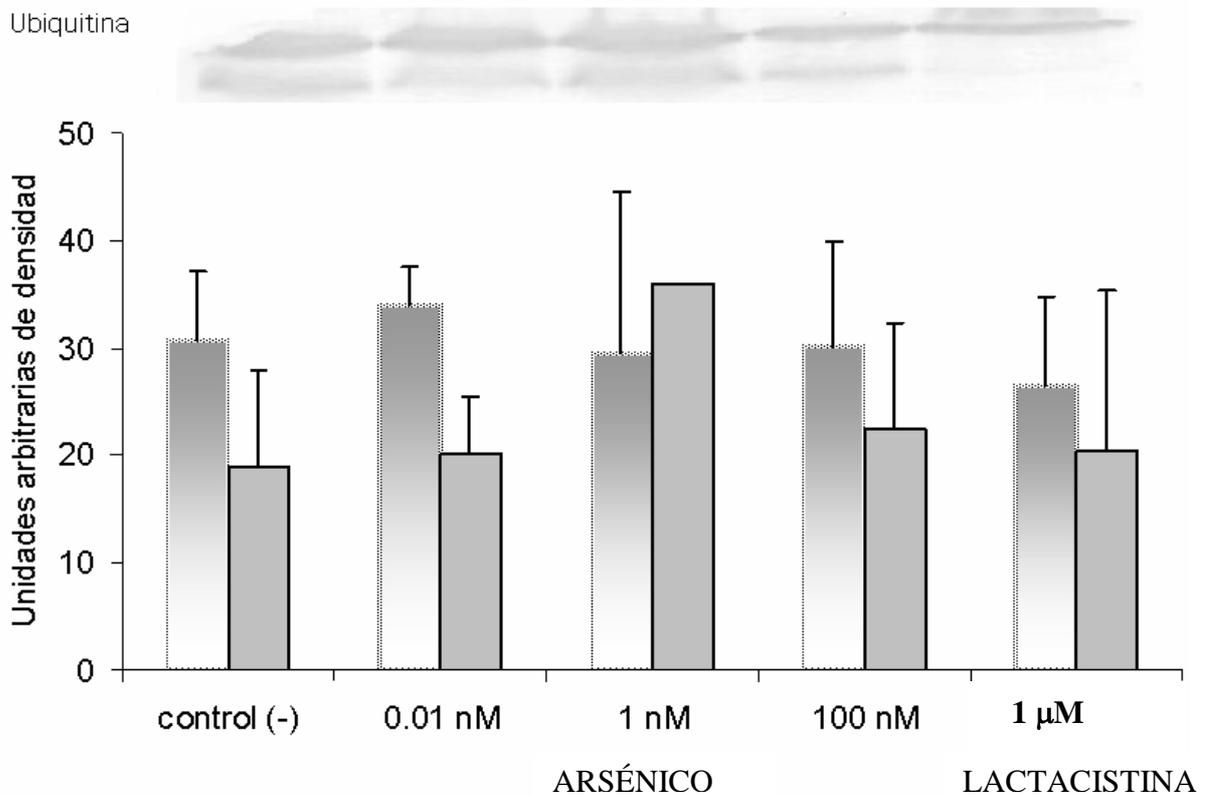
En el gráfico siguiente (15), se hace una comparación de todas las densitometrías del western blot de las subunidades alfa del proteosoma, resaltando el hecho de que en la mayoría de los tratamientos al igual que el control solo hay presencia de las subunidades en las primeras fracciones.



**Gráfico 15.** Análisis densitométrico de las subunidades alfa de las fracciones de los cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsénico durante 3 hrs.

Por otro lado, como se sabe que la ubiquitina es una proteína esencial en la degradación de las proteínas por el sistema ubiquitina-proteosoma, por lo que nos interesaba conocer si su expresión se veía alterada por la presencia de arsénico a las concentraciones utilizadas, así como por el inhibidor específico del proteosoma, lactacistina, para lo cual se caracterizó mediante western blot utilizando anticuerpos monoclonales para ubiquitina.

Los resultados nos indican la presencia de dos bandas y en base al análisis densitométrico no se observa una diferencia significativa en la expresión de ubiquitina con los tratamientos de arsénico con respecto al control (gráfico 15).



**Grafico 16.** Análisis densitométrico de ubiquitina con los diferentes tratamientos de arsénico y lactacistina.

## 4.6 DISCUSIÓN

El proteosoma 26S es un complejo con múltiples subunidades proteicas, el cual incluye numerosas enzimas con actividad proteolítica en la ruta mediada por ATP-ubiquitina, está involucrado en la degradación de proteínas importantes, como p53, Ikb $\alpha$  y ciclinas, además es responsable de la degradación de proteínas cuya estructura y función es anormal (Bardag-Force et al. 2004)

En este trabajo se demostró que el arsenito de sodio es capaz de alterar la actividad proteolítica no lisosomal específica para quimiotripsina en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados durante tres horas, con concentraciones de arsénico de 0.01, 1 y 100 nM, cabe mencionar que las concentraciones utilizadas en este trabajo son bajas y activamente tóxicas de acuerdo con algunos eventos directos que afectan a proteínas estructurales y de señalización en la célula que sabemos se afectan en exposiciones a arsénico (Ramírez et al., 2000; Gonsebatt et al 2007).

En la actividad proteosomal en cultivos organotípicos de hígado expuestos a 1 y 100 nM de arsénico, observamos una inhibición de un 60% aproximadamente, de manera similar a lo observado con el inhibidor específico del proteosoma, lactacistina. Este mismo efecto se observó cuando se expusieron los cultivos de manera conjunta con arsénico y lactacistina. Existen reportes previos en los que se observaron efectos similares en cultivos organotípicos de riñón de conejo, donde el arsénico después de 24 hrs disminuyó la actividad proteosomal hasta un 40%. (Kirkpatrick et al. 2003). Por otra parte existen reportes recientes que sugieren que la cantidad de ciertas proteínas celulares disminuye al activar su degradación por la ruta ubiquitina-proteosoma, en respuesta a la exposición a arsénico en concentraciones por arriba de 10  $\mu$ M, en células endoteliales (Chen et al. 2002; Tsou et al. 2005), indicando con esto que la respuesta puede variar de acuerdo a la concentración de arsénico utilizada.

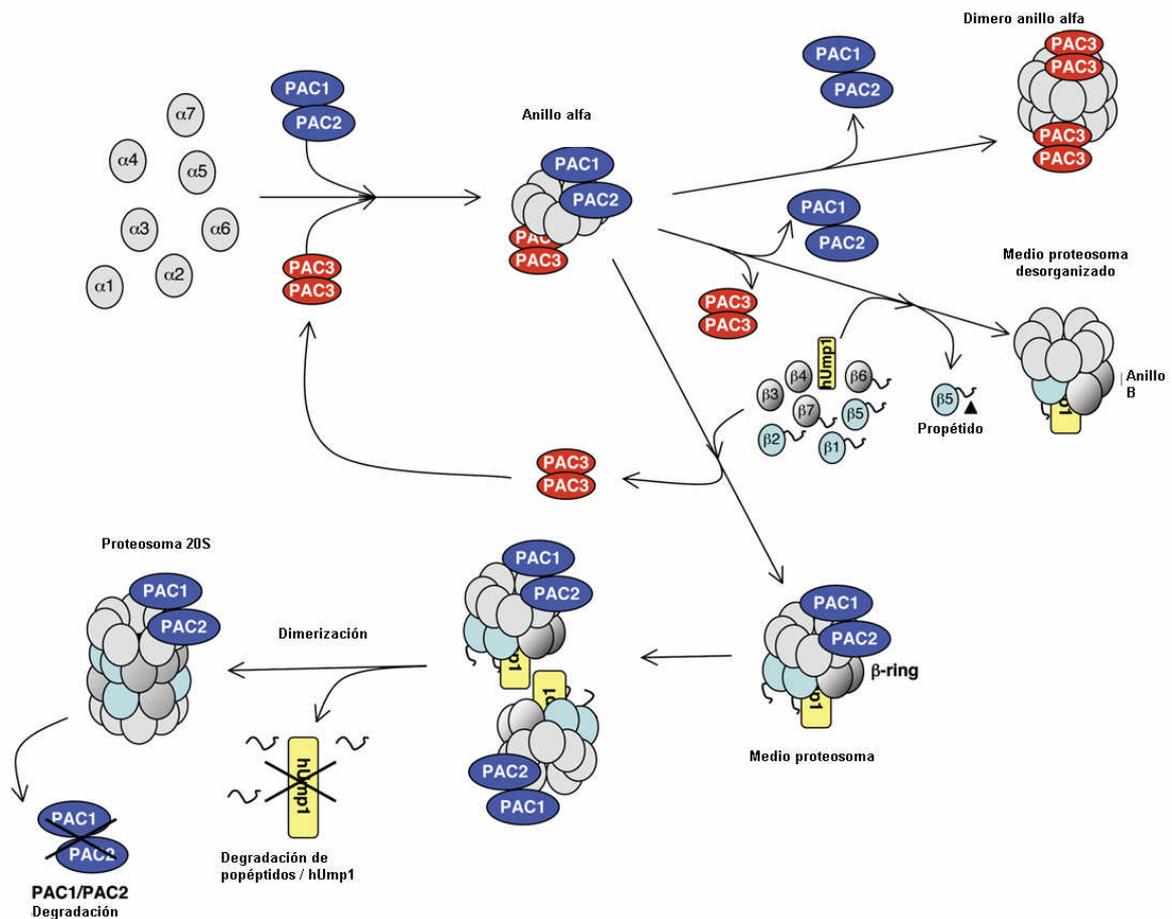
Uno de los efectos comunes asociados a la toxicidad inducida por el arsénico son las alteraciones en la estructura y función de proteínas, cuando estos efectos no se reparan o las proteínas no son eliminadas, pueden acumularse en el citoplasma generando cuerpos citoplásmicos conocidos como cuerpos de inclusión (Kopito y Sitia.2000)

Recientemente se ha sugerido que la inhibición del proteosoma causa modificación oxidante de las proteínas, llevando a su agregación y muerte celular (Demasi y Davies, 2003). Asimismo, se sabe que específicamente, la inhibición de la actividad similar a quimiotripsina puede afectar severamente la supervivencia celular bajo condiciones de estrés, y considerando que el arsénico es capaz de inducir daño oxidante en el hígado (Gonsebatt et al., 2007), es posible que este tejido experimente suficiente estrés en el intento de mantener la homeostasis celular. Por consiguiente, la disminución en la actividad similar a quimiotripsina, puede resultar en un incremento en la susceptibilidad a estrés oxidante. (Kappahn et al., 2007).

Cuando se realizó el fraccionamiento con gradientes de glicerol (10 – 40 %), se observan ciertos picos de mayor actividad proteosomal a las diferentes concentraciones de arsénico, sin embargo al hacer la comparación con respecto al control negativo se distingue que la única actividad proteosomal relevante se encuentra en las fracciones 20 y 32 de los tratamientos de 0.01 y 1 nM respectivamente (gráfico 8), actividad atribuida al proteosoma 20 y 26S. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en hígado de rata, donde la actividad similar a quimiotripsina se encontró en los mismos gradientes correspondientes al proteosoma 26S (Bardag-Gorce et al., 2004). De manera similar y utilizando columnas FPLC Brooks y colaboradores (2000) encontraron la máxima actividad proteosomal 26S en las fracciones 21-23 y la 20S en las fracciones 25-27 en hígado de rata atribuida al proteosoma 20 y 26S. Los autores señalan que no toda la actividad proteolítica puede atribuirse a este sistema, debido a que se detectó un pequeño pico de actividad hidrolítica ocasionado por proteasas no proteosomales.

Una parte importante del ensamblaje del proteosoma 26S son las subunidades alfa, las cuales regulan al complejo de unión y forman la entrada a la cavidad del proteosoma 20S (Peters et al., 1993). El ensamblaje del anillo de subunidades alfa es importante en la biogénesis de los proteosomas eucarióticos, reportándose intermediarios estructurales por coeficientes de sedimentación de aproximadamente 13S y 16S (Apher et al., 2004). La actividad proteolítica es ejercida por tres de las subunidades B, B1, B2 y B5, las cuales son sintetizadas en una forma precursora inactiva y cuyos propeptidos son removidos para permitir la formación de sitios activos, acompañados por el ensamblaje del proteosoma 20S. Este es un proceso con múltiples pasos ordenados, comenzando la formación de los anillos, con la ayuda de chaperonas específicas del proteosoma

llamadas PAC1 (chaperona ensamblante del proteosoma 1) y PAC2 (Hirano et al., 2005). Los medios proteosomas están compuestos de siete subunidades alfa, siete subunidades beta, algunas de las cuales están en su forma precursora y chaperonas dedicadas al ensamble del proteosoma, tales como hUmp1 (Burri et al, 2000; Griffin et al., 2000), PAC1 y PAC2 (Hirano et al., 2005). Finalmente, la dimerización de los dos medios proteosomas ocurre con la ayuda de hUmp1, completando la maduración del proteosoma 20S, con la remoción de los propéptidos de las subunidades beta seguido de la degradación de hUmp1, PAC1 y PAC2 (Hirano et al., 2007)



**Fig. 13 Ensamble del proteosoma** (Hirano et al., 2007).

La distribución de las subunidades proteosomales durante su aislamiento en gradientes de glicerol es diferencial. Apcher y colaboradores (2004) reportan que durante su caracterización las subunidades alfa se encontraban en las fracciones 1-15 que correspondían a las subunidades  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ , y  $\alpha_7$ , mientras que la  $\alpha_1$ , es encontrada en las fracciones 5-15, y las  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  estaban distribuidas en las fracciones 8-11. Las subunidades tipo  $\alpha$  C8 y C9 del proteosoma 20S fueron encontradas solo en las

fracciones donde se encuentra el proteosoma 20 y 26S. Las subunidades del complejo regulador 19 S se encuentran predominantemente en las fracciones que contienen al proteosoma 26S, no detectándose subunidades libres. (Brooks et al., 2000).

Al hacer una comparación entre los diferentes tratamientos con arsénico con respecto al control en lo referente a la presencia de las subunidades alfa del proteosoma en las diferentes fracciones, se puede observar que su presencia está confinada solo en las primeras, correspondientes al gradiente de glicerol del 10 %, con excepción del tratamiento más bajo de arsénico (0.01 nM) (gráfico 14). En el caso del control negativo, se puede decir que es normal que no se encuentre una actividad proteosomal relevante, así como tampoco la presencia de las subunidades alfa en gradientes de mayor densidad, pues las células se encuentran en condiciones basales normales, sin embargo la concentración de arsénico 0.01 nM es lo suficientemente tóxica para causar alteración proteica con la necesidad subsecuente de ensamblarse el proteosoma, pues como se ve tiene la mayor actividad proteosomal en un gradiente correspondiente al proteosoma 20S activo, confirmándose con la presencia de subunidades alfa en casi todas las fracciones, indicando que se está llevando a cabo el ensamble, además de la presencia de dos bandas. Existen evidencias que demuestran que las subunidades alfa deben ensamblarse bajo la influencia de diferentes estímulos celulares para integrar los dos anillos con siete subunidades cada uno promoviendo así la actividad proteolítica de las subunidades  $\beta$  (Apcher et al., 2004), se sabe que los proteosomas precursores poseen un peso molecular entre 200 y 443 kDa, formados por dos anillos: uno conteniendo todas las subunidades alfa y otro con algunos precursores  $\beta$  (Dipankar et al., 1997), lo cual concuerda con nuestros resultados, pues hay la presencia de una banda correspondiente a 220 kDa, la cual solo se observa a esta concentración de arsénico.

En la concentración mayor de arsénico (100 nM), solo hay presencia de subunidades alfa en el primer gradiente de glicerol, lo que nos indica que a esta concentración el arsénico podría estar evitando la maduración de los complejos precursores del proteosoma (complejos de subunidades alfa y beta, de densidad de 12 y 16 S), por lo cual tampoco se observa actividad catalítica proteosomal, debido a que los precursores son catalíticamente inactivos hasta que en las subunidades beta ocurre la remoción de la prosequencia de aminoácidos, dejando expuesto su residuo treonina amino terminal (Dipankar et al., 1997).

En el caso de la concentración intermedia de arsénico (1 nM) ocurre algo interesante, pues de igual manera presenta una respuesta intermedia: tiene un pico máximo de actividad en un gradiente correspondiente al proteosoma 26S , al igual que la concentración mínima de As, y por otro lado, al igual que la concentración más alta 100 nM, no hay presencia de subunidades alfa en gradientes mayores de 10% de glicerol, esto último probablemente a que la cantidad de complejos precursores del proteosoma y el proteosoma ensamblado como tal, no se encuentran en cantidades suficientes para ser detectados por el anticuerpo en el análisis de western-blot, debido a dos causas posibles:

- 1) Que el arsénico inhibe la maduración y/o ensamble de las subunidades; o
- 2) Que el arsénico ocasiona el desensamble del proteosoma.

Las subunidades alfa libres no pueden ser reconocidas por el anticuerpo utilizado, ya que solo reconoce subunidades alfa ensambladas, además de que las subunidades no incorporadas son degradadas rápidamente (Olson y Dice, 1989).

Para que se dé un adecuado ensamble del proteosoma es necesario una serie de pasos secuenciales que ocurren estrictamente bajo un orden jerárquico, durante este proceso, ocurren dos procesos celulares importantes:

- 1) El procesamiento de las subunidades  $\beta$ , que se lleva a cabo en dos pasos: primero, la prosequencia es reducida a cerca de 8 residuos de aminoácidos, seguido de la remoción de la prosequencia residual, resultando en la exposición del residuo treonina amino terminal ( Schmidtke et al., 1996).
- 2) La formación del proteosoma en ratón requiere constante síntesis de proteínas (Frentzel et al.; 1994) y estudios con ácido okadaico sugieren una función de desfosforilación en este proceso (Yang et al.; 1995).

En base a esta evidencia, así como en nuestros resultados podemos sugerir que el arsénico disminuye la actividad proteosomal en los cultivos organotípicos de hígado de ratón, debido a que las subunidades  $\beta_5$ , donde se lleva a cabo la actividad similar a quimiotripsina, esta formada particularmente por metionina (Groll et al., 1997), aminoácido con grupos sulfidrilos, que como sabemos el arsénico tiene afinidad por ellos, pudiendo causar alteración en su adecuado funcionamiento, y/o en el ensamble con otras subunidades, impidiendo la maduración de los proteosomas, y esto a su vez,

podría también estarlo ocasionando al inhibir la síntesis proteica requerida para la formación del proteosoma.

Otra posibilidad relacionada con las alteraciones en la degradación proteosomal es por la ubiquitina, la cual es una proteína esencial en la degradación de las proteínas por el sistema ubiquitina-proteosoma, por lo que nos interesaba conocer si su síntesis se veía alterada por la presencia de arsénico a las concentraciones utilizadas, ya que en reportes de otros autores observaron que la exposición a arsénico causa acumulación de conjugados de ubiquitina-proteína de alto peso molecular en cultivos organotípicos de riñón de conejo así como en la línea celular HEK293, así como también es capaz de alterar el procesamiento de proteínas ubiquitinadas después de la conjugación. (Kirkpatrick et al. 2003).

En nuestro caso, con base en el análisis densitométrico no se observó una diferencia significativa en la cantidad de ubiquitina con los tratamientos de arsénico con respecto al control (gráfico 15), de acuerdo a lo reportado por Kirkpatrick et al. (2003), donde señala que estudios de la actividad conjugante de ubiquitina sugieren que no está ocurriendo un incremento en la ubiquitinación, aunque, esto no evita la posibilidad de que ciertos blancos sean conjugados más rápidamente después de un tratamiento con bajas concentraciones de arsénico. De hecho, la identificación de sustratos de la ruta ubiquitina-proteosoma que son cada vez más modificados por bajas concentraciones de arsénico son importantes para el entendimiento de este proceso y su mecanismo. Al igual que el estudio realizado por Noreault-Conti et al., (2006), donde destaca que el tratamiento con arsenito no incrementó la acumulación de proteínas ubiquitinadas después de la exposición por 24 horas en cultivos primarios de rata.

## 4.7 CONCLUSIONES

- ❖ El arsenito de sodio en las concentraciones de 0.01, 1 y 100 nM, no altera la cantidad de la ubiquitina en cultivos organotípicos de hígado de ratón.
- ❖ El arsenito de sodio es capaz de alterar la actividad proteolítica no lisosomal específica para quimiotripsina en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados durante tres horas, con concentraciones de arsénico de 0.1, 1 y 100 nM.

## 4.8 PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró que el arsénico no altera la síntesis de ubiquitina, pero si el ensamble del proteosoma, y disminuye la actividad similar a quimiotripsina, por lo que ahora resultaría interesante conocer a que nivel afecta esta actividad el arsénico, siendo posible que altere las enzimas ubiquitinizantes a nivel estructural, pues se sabe son ricas en grupos sulfhídrico, el reconocimiento de las proteínas mal plegadas por la enzimas ubiquitinizantes (debido a posibles entrecruzamientos), o a alteraciones en las enzimas similares a quimiotripsina (B 5) cuyo sitio catalítico contiene grupos sulfhidrilo. Y si la alteración del proteosoma por el arsénico esta relacionado con alguno de los mecanismos de toxicidad del arsénico ya conocidos.

Por otro lado, conociendo que la expresión de una subunidad del proteosoma 19S, denominada AIRAP, es exclusivamente inducida en presencia del arsénico, nos gustaría saber en qué tiempo de exposición y a que dosis se expresa en el hígado, y si existe alguna relación con la alteración en la actividad proteosomal similar a quimiotripsina.

## 4.9 REFERENCIAS

Amerik A.Y.; Swaminathan S.; Krantz B.A.; Wilkinson K.D.; Hochstrasser M., In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome, *EMBO J.*, 1997, 16: 4826-4838.

Amerik, A.Y.; Hochstrasser M.; Mechanism and function of deubiquitinating enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1695: 189-207.

Apcher, G.S.; Maitland, J.; Dawson, S.; Sheppard, P.; Mayer, R.J. The  $\alpha 4$  y  $\alpha 7$  subunits and assembly of the 20S proteasome. *FEBS Letters*, 2004, 569: 211-216.

Aposhian, H.V.; Zheng, B.; Aposhian, M.M.; Le, X.C.; Cebrian, M.E.; Cullen, W.; Zakharyan, R.A.; Ma, M.; Dart, R.C.; Cheng, Z. DMPS-arsenic challenge test II. Modulation of arsenic species, including monomethylarsonous acid (MMA III), excreted in human urine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2006, 166: 74-83.

Bardag-Gorce F.; Venkatesh R.; Li J.; French B.; French S.W. Hyperphosphorilation of rat liver proteasome subunits: the effects of ethanol and okadaic acid are compared. *Life Sciences*, 2004, 75: 585-597.

Baumeister W., Walz J., Zuhl F., Seemuller E., The proteasome : paradigm of a self-compartmentalizing protease, *Cell*, 1998, 92: 367-380.

Baumeister, W.; Walz J.; Zuhl F.; Seemuller, E. *Cell*, 1998, 92: 367-380.

Barret, E.J.; Jahn, L.A.; Oliveras, D.M.; Fryberg, D.A. Chloroquine does not exert insuline-like actions on human forearm muscle metabolism. *Am. J. Physiol.*, 1995, 268: E820-E824.

Basu, A.; Mahata, J; Gupta, S; Giri, A.K. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutation Research*, 2001, 488: 171-194.

Bennett, R.G.; Hamel, F.G.; Duckworth, W.C. Insulin inhibits the ubiquitin-dependent degrading activity of the 26S proteasome. *Endocrinology*, 2000, 141: 2508-2517.

Borak, J.; Dean Hosgood, H. Seafood arsenic: Implications for human risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2007, 47: 204–212.

Brooks, P.; Fuertes, G.; Mrray, R.; Bose, S.; Knecht, E.; Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem. J.*, 2000, 346: 155-161.

Burri, L.; Hockendorff, J.; Boehm, U.; Dohmen, R.J.; Levy, F. Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 2000, 97:10348-10353.

Carrano, A.C.; Eytan, E.; Hersjo, A.; Pagano, O. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell Biol.*, 1999, 1: 193-199.

Cebrian, M.E.; Albores, A.; Aguilar, M.; Blakely, E. Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum. Toxicol.*, 1983, 2: 121-133.

Chen, F.; Zhang, Z.; Bower, J.; Lu, Y. Arsenite induced Cdc25C degradation is through the KEN-box and ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99: 1990-1995.

Cline, D.; Thorpe, C.; Schneider, J. Effects of As (III) binding on  $\alpha$ -helical structure. *American Chemical Society.*, 2002, 125: 2923-2929.

Coux O., Tanaka K., Goldberg A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, 65: 801-847.

Coux, O.; Tanka, K.; Goldberg A.L.; *Annu. Rev. Biochem.* 1996, 65: 801-847.

*Croatica. Chemica. Acta* 71, 343–359.

Cullen, W.R., Reimer, K.J. Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.*, 1989, 89: 713–764.

Das, D.; Chatterjee, B.K.; Mandal, G.; Samanta, Q.; Chakraborti, D. Arsenic in groundwater in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. *Analyst*, 1995, 120: 917-924.

Del Razo, L.; Quintanilla-Vega, B.; Brambila-Colombres, E. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2001, 177: 132-148.

Demasi, M.; Davies, K.J. Proteasome inhibitors induce intracellular protein aggregation and cell death by an oxygen-dependent mechanism. *FEBS Lett.*, 2003, 542: (1-3):89-94.

Desterro J.M.; Rodriguez J.M.; Hay R.T.; SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-KappaB activation, *Mol. Cell*, 1998, 2: 233-239.

Diehl, J.A.; Zindy, F.; Sherr, C.J. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1997, 11: 957-972.

Dipankar, N.; Woodward, E.; Ginsburg, D.; Monaco, J. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor B subunits. *The EMBO J.*, 1997, 17: 5363-5375.

Dixon, H.B.F., *Adv. Inorg. Chem.*, 1997, 44:191.

Dou, Q.P.; Li, B. *Drug Resistance Updates*, 1999, 2: 215-233.

Dogterom, P. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metab Dispos.*, 1993, 4: 699-704.

Dubiel, W.; Ferrel, K.; Rechstreiner M.; *Mol. Biol. Rep.*, 1995, 2: 27-34.

Duckworth, W.C.; Bennett, R.G.; Hamel, F.G. A direct inhibitory effect of insulin on a cytosolic proteolytic complex containing insulin degrading enzyme and multicatalytic proteinase. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269: 24575-24580.

Duckworth, W.C.; Bennett, R.G.; Hamel, F.G. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr. Rev.*, 1998, 19: 608-624.

Dupre S.; Volland C.; Haguenaer-Tsapis, Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting, *Curr. Biol.*, 2001, 11: R932-R934.

Elsasser S.; Gali R.R.; Schwickart M.; Larsen C.N.; Leggett D.S., Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains, *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3: 939-943.

Environmental Protection Agency, Ambient Water Quality Criteria for Arsenic, U.S. Environ. Prot. Agency Rep., 440/5-80-021,1980, p. 1.

Falk, H.; Caldweel, G.G.; Ishak, K.G. Arsenic-related hepatic angiosarcoma. *Am. J. Ind. Med.*, 1981, 2: 43-50.

Fenteany, G., Schreiber, S.L. Lactacystin, Proteasome function, and Cell fate. *The Journal Biological Chemistry*, 1998, 273: 8545-8548.

Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., Schreiber, S.L. *Science*. 1995, 268: 726-731.

Freemont P. Ubiquitination: RING for destruction? *Current Biol.* 2000; 10: R84-R87.

Franklin, M.; Bean, W; Harden, R.C. *Am. J. Med. Sci.*, 1959, 219: 589.

Frentzel, S.; Hurt-Pesold, B.; Seeling, A.; Kloetzel, P. 20S Proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. *J. Mol. Biol.*, 1994, 236: 975-981.

Fujiki, H. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1999, 125: 589-597.

Glickman, M.H.; Raveh, D. Proteasome plasticity. *FEBS Letters*, 2005, 579: 3214-3223.

Gonsebatt, M.E.; Del Razo, L.M.; Cerbon, M.A.; Zúñiga, O.; Sanchez-Peña, L.C.; Ramírez, P. Arsenite induced oxidative damage in mouse liver is associated with increased cytokeratin 18 expression. *Arch. Toxicology*. 2007.

Guha Mazumder D.N. *J. Indian Med. Assoc.* 2001, 99: 311.

Gonzalez F., Delahodde A., Kodadek T., Johnston S.A., Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter, *Science*, 2002, 296: 548-550.

Gregus, Z.; Nemeti, B. Purine nucleoside phosphorylase as a cytosolic arsenate reductase. *Toxicol Sci.*, 2002, 70(1):13-9.

Gresser, M.J., ADP-arseate. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256: 5981-2983.

Griffin, T.A.; Slack, J.P.; McCluskey, T.S.; Monaco, J.J.; Colbert, R.A.; Identification of proteasemblin, a mammalian homologue of the yeast protein , Ump1p, that is required for normal proteasome assembly. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 2000, 3: 212-217.

Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1997, 386: 463-471.

Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96: 10976-10983.

Groll, M., Huber, R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1695: 33-44.

Hartmann-Petersen R.; Gordon C. Protein degradation: Recognition of ubiquitinated substrates. *Current Biology*, 2004, 14: R754-R756.

Hamel, F.G.; Bennett, R.G.; Harmon, K.S.; Duckworth, W.C. Insulin inhibition of proteasome activity in intact cells. *Biochem. Res. Commun*, 1997, 234: 671-674.

Heinemeyer, W., Fisher M., Krimmer, T., Stachon, U., Wolf, D.H. The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 25200-25209.

Hershko A, Leshinsky E. Ganoth D., Heller H. ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 1619-23.

Hershko, A.; Ciechanover A., *Annu. Rev. Biochem.* 1998, 67, in press.

Hicke L.; Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2: 195-201.

Hicke L.; Protein regulation by monoubiquitination, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, 2: 195-201.

Hilt W., Wolf D. H., Proteasomes: destruction as a programme, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 96-102.

Hilt, W.; Wolf, D.H., *Trends Biochem. Sci.* 1995, 21: 96-102.

Hirano, Y.; Hendil, K.B.; Yashiroda, H.; Lemura, S.; Nagane, R.; Hioki, Y.; A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature*, 2005, 437: 1381-1385.

Hiyama H.; Yokoi M.; Masutani C.; Sugawara K.; Interaction of hHR23 con S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26S proteasome, *J.Biol. Chem.*, 1999, 274. 28019 - 28025.

Hochstrasser M.; Ubiquitin-dependent protein degradation, *Annu. Rev. Genet.*, 1996, 30: 405-439.

Hochstrasser, M. *Annu. Rev. Genet.*, 1997, 30: 405-439.

Hoegge C., Pfander B., Moldovan G.L., Pyrowolakis S., Jentsch, RAD6-dependent Dna repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO, *Nature*, 2002, 419: 135-141.

Hughes, M.F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 2002, 133: 1-16.

International Agency for Research of Cancer. In IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans 1 to 42, 1987, (Suppl. 7), p. 100.

Irgolic, K.J.; Greschonig, H.; Howard, A.G., Arsenic in: A. Townshend (Ed.), *The Encyclopedia of Analytical Science*, Academic Press, 1995, 168-184.

Joazeiro C.A.; Weissman A.M.; RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 2000, 102: 549-552.

Johnson, D.L., *Nature*, 1972, 240: 44.

Kapphahn, R.; Bigelow, E.; Ferrington, D. Age-dependent inhibition of proteasome chymotrypsin-like activity in the retina. 2007, 84: 646-654.

Kahyo T.; Nishida T.; Yasuda H.; Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor repressor p53, *Mol. Cell*, 2001, 8: 713-718.

Kaiser P.; Huang L.; Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biology*, 2005, 6: 233.1-233.7.

Kala, S.V.; Nelly, M.W.; Kala, G.; Prater, C.I.; Atwood, D.W. the MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 33404-8.

Kaplun, L.; Ivantsiv, Y.; Bakhrat, A.; Ravech, D.; DNA damage response-mediated degradation of Ho endonuclease via the ubiquitin system involves its nuclear export. *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 48727-48734.

Karin M.; Ben-Neriah Y.; Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NK-(kappa)B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 2000, 18: 621-663.

Kato M.; Miyazawa K.; Kitamura N.; A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP, *J. Biol. Chem.*, 2000, 37481-37487.

Khush R.S., Cornwell W.D., Uram J.N., Lemaitre B., A ubiquitin-proteasome pathway represses the Drosophila immune deficiency signaling cascade, *Curr. Biol.*, 2002, 12: 1728-1737.

Kirkpatrick, D.S.; Dale, K.V.; Catania, J.M.; Gandolfi, A.J. Low-level arsenite causes accumulation of ubiquitinated proteins in rabbit renal cortical slices and HEK293 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003, 186: 101-109.

Klausner, R.D.; Sitia, R.; Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 1990, 62: 611-614.

Klemperer, N.; Pickart, C. Arsenite inhibits two steps in the ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *The Journal of Biological Chemistry.*, 1989, 264:19245-19252.

Kloetzel, P.M. The proteasome system. A neglected tool for improvement of novel therapeutic strategies?. *Gene Ther.* 1998. 5: 1297-1298.

Kopito, R.; Sitia, R. Aggresomes and Russell bodies, Symptoms of cellular indigestion?. *EMBO Reports*, 2000, 31: 225-231.

Krogan, N.J. Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell*, 2004, 16: 1027-1034.

Kumagai, Y.; Sumi, D.; Arsenic: Signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. 2007. 47: 243-262.

Kuroda, Y.; Hara, Y. *Mutat. Res.*, 1999, 436: 69-97.

Lang Y.A.; Lawson M.; Velayutham M.; Zweier J.L.; Pickart C.M.; A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitination degradation signal, *Nature*, 2002, 416: 813-819.

Larochette, N.; Decaudin, D.; Jacotot, E.; Brenner, C.; Marzo, I.; Susin, S. ; Zamzami, N. *Exp. Cell. Res.* 1999, 249: 413-421.

Lerman, B.B.; Ali, N.; Green D. *Anal. Clin. Lab. Sci.*, 1980, 10: 158.

Lin, T.M.; Tsu, W.T.; Chen, C.J. Mortality of hepatoma and cirrhosis of liver in Taiwan. *Br. J. Cancer*, 1986, 54: 969-976.

Lin, S.; Shi, Q.; Nix, F.B.; Styblo, M.; Beck, M.A.; Herbin-Davis, K.M. A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem.*, 2002, 277(13):10795-803.

London, M.K.; Keck, B.I.; Ramos, P.C.; Jurgen Dohmen, R. Regulatory mechanisms controlling biogenesis of ubiquitin and the proteasome. *FEBS Lett.*, 2004, 567: 259.

Lorick K.L.; Jensen J.P. ; Fang S.; Ong A.M.; Hatakeyama S.; Weissman A.M.; RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11364-11369.

Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 1995, 268: 533-539.

- Mannhaupt, G.; Schnall, R.; Karpov, V.; Vetter, I.; Feldmann, H., Rpn4 acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEEBS Lett.*, 1999, 450: 27-34.
- Marafante, E.; Vather, M.; Norn, H.; Envall, J.; Sandstrom, M. Biotransformation of dimethylarsinic acid in mouse, hamster and man. *J Appl Toxicol.*, 1987, 7(2):111-7.
- Masutani C.; Sugawara K., Yanagisawa J.; Sonoyama T.; Ui M.; Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23, *EMBO J.*, 1994, 13: 1831-1843.
- Mayer A.N.; Wilkinson K.D.; Detection, resolution, and nomenclature of multiple ubiquitin carboxyl-terminal esterases from bovine calf thymus, *Biochemistry*, 1989, 28: 166-172.
- Mazumder, G.; Chakraborty, N. Chronic arsenic toxicity from drinking tubewell water in rural West Bengal. *Bull. WHO*, 1988, 66: 499-506.
- McClellan A.J.; Tam S.; Kagovich D.; Frydman J. P quality control: chaperons culling corrupt conformations. *Nat. Cell Biol.*, 2005, 7: 736-741.
- Miller J.; Gordon C.; The regulation of proteasome degradation by multy-ubiquitin chain binding proteins, *FEBS Letters*, 2005, 579 : 3224-3230.
- Minerals Yearbook. 1973. Department of the interior Bureau of Mines, U.S.A Vol. 1 p. 1360.
- Mortimore, G.E.; Mondon, C.E. Inhibition by insulin of valine turnover in liver. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245: 2375-2383.
- Nagvi, S.M.; Vaishnavi, C.; Singh, H. Toxicity and metabolism of arsenic in vertebrates, in: J.O. Nriagu (Ed.), *arsenic in the Environment. Part. II: Human Health and Ecosystem Effects*, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1994, 55-91.

Nam, S.; Smith, D.M.; Dou, Q.P. Ester bond containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 13322-13330.

Nandi, D.; Woodward, E.; Ginsburg, D.; Monaco, J.; Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor b subunits. *The EMBO Journal*. 1997, 17: 5363–5375.

Noreault-Conti, T.L.; Jacobs, J.M.; Trask, H.W.; Wrighton, S.A., Sinclair, J.F.; Nichols, R.C. effect of proteasome inhibition on toxicity and CYP3A23 induction in cultured rat hepatocytes: Comparison with arsenite. *Toxicology and Applied Pharmacology*. (2006),doi:10.1016/j.taap.2006.09.007.

Olson, T.S.; Dice, J.F. Regulation of protein degradation rates in eukariotes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1989, 1: 1194-1200.

Peters, R.A. Biochemistry of some toxic agents. I. Present state of knowledge of biochemical lesions induced by trivalent arsenical poisoning. *Bull. John Hopkins Hospital*, 1955, 97: 1-20.

Peters, J.M. Cejka, Z., Harris, J.R., Kleinschmidt, J.A., Baumeister, W., Structural features of the 26S proteasome complex. *Journal of Molecular Biology*, 1993, 234: 932-937.

Pepato, M.T.; Migliorini, R.H.; Goldberg, A.L.; Kettelhut, I.C. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, 1996, 271: E340-E347.

Pickart C.M.; Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70: 503-533.

Piver, W.T., *Top. Environ. Health* 1983, 6: 1.

Ramírez, P.; Del Razo, L.M.M Gutierrez-Ruiz, M.C.; Gonsebatt, M.E. arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis*. 2000, 21: 701-706.

Ramirez, P. Arsenite induced oxidative damage in mouse liver is associated with increased cytokeratin 18 expression. *Arch. Toxicology*. 2007.

Ramos, P.C.; Hockendorff, J.; Johnson, E.S.; Varshavsky, A.; Dohmen, R.J.; Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell*, 1998, 92: 489-499.

Reggiori F., Pelham H.R., Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and independent targeting, *EMBO J.*, 2001, 20: 5176-5186.

Rivett, A.J. Intracellular distribution of proteasomes. *Curr. Opin. Immunol.*, 1998, 10 : 110-114.

Russel-Jones, D.L.; Umpleby, M. Protein anabolic action of insulin growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Eur. J. Endocrinol.* 1996, 135: 631-642.

Saeki Y.; Sone T.; Yokosawa H.; Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 296: 813-819.

Santra, A.; das Gupta J. De, B.K. *Ind. Soc. Gastroenterol.*, 1999, 18: 152.

Schmidt, M.; Kloetzel, P.M. *FASEB J.* 1997, 11: 1235-1243.

Schmidtke, G.; Kraft, R.; Kostka, S.; Henklein, P.; Fromel, C. Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of B subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J.* 1996, 15: 6887-6898.

Scott, N.; Hatlelid, K.M.; MacKenzie, N.E.; Carter, D.E. Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol.*, 1993, 6: 102-106.

Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R., Baumeister, W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, 1995, 268: 579-582.

Shaw J.D.; Cummings K.B.; Huyer G.; Michaelis S.; Wendland B.; Yeast as a model system for studying endocytosis, *Exp. Cell Res.*, 2001, 271: 1-9.

Stybło, M.; Delnomdedieu, M.; Thomas, D.J. Mono and dimethylation of arsenic in rat liver cytosol in vitro. *Chem. Biol. Interact.*, 1996, 99: 147-164.

Swaminathan S.; Amerik A.Y.; Hochstrasser M. The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitination homeostasis in yeast, *Mol. Biol. Cell*, 1999, 10: 2583-2594.

Swaminathan S.; Amerik A.Y.; Hochstrasser M.; The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast, *Mol. Biol. Cell*, 1999, 10 2583-2594.

Szinicz, L.; Forth, W. Effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on gluconeogenesis. *Arch. Toxicol.*, 1988, 61: 444-449.

Tanaka K.; Molecular biology of the proteasome, *Biochem. And Biophysical Res. Comm.*, 1998, 247: 537-541.

Tanaka, K.; *J. Biochem.* 1998, 123: 195-204.

Tanaka, K.; Kasahara, M.; *Immunol. Rev.* 1998, 163, in press.

Thomas, D.J.; Stybło, M.; Lin, S. The cellular metabolism and systematic toxicity of arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2001, 176: 127-144.

Tone, Y.; Toh-e, A., Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 2002, 16: 3142-3157.

Trisha, L. Noreault-Conti, Jacobs, J.M.; Trask, H. W.; Wrighton, S.A.; Sinclair, J.F.; Nichols, R.C. Effect of proteasome inhibition on toxicity and CYP3A23 induction in cultured rat hepatocytes: Comparison with arsenite. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2006), doi:10.1016/j.tap.2006.09.07.

Tsou, T.C.; Tsai, F.Y.; Hsieh, Y. W.; Li, L.A.; Yeh, S.C.; Chang, L.W. Arsenite induces endothelial cytotoxicity by down-regulation of vascular endothelial nitric oxide synthase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, 208: 277-284.

Vabulas, R.M.; Hartl, F.U. Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science.*, 2005, 310: 1960-1963.

Valle, B.L.; Ulmer, D.D.; Wacker, W.E.C., *Arch. Ind. Health*, 1960, 21: 132.

Vather M.; Concha, G.; Nermell, B.; Nilsson, R.; Dulot, F.; Natarajan, A.T. a unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women, *Eur. J. Pharmacol.*, 1995, 293 (4): 455-462.

Vahter, M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 2002, 181: 211-217.

Vega, L.; Styblo, M.; Patterson, R.; Cullen, W.; Wang, C.; Germolec, D. Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2001, 172: 225-232.

Vijay-Kumar S.; Bugg C.E.; Cook W.J.; Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, 1998, 280: 275-286.

Walters K., Goh A., Wang Q., Wagner G., Howley P., Ubiquitin family proteins and their relationship to the proteasome: a structural perspective, *Biochimica and Biophysica Acta*, 2004, 1695: 73-87.

Wang C., Xi J., Begley T.P., Nicholson L.K., Solution structure of ThiS and implications for the evolutionary roots of ubiquitin, *Nat. Struct. Biol.* 2001, 8: 47-51.

Waterman H.; Levkowitz G.; Alroy I.; Yarden Y.; The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 22151-22154.

Weissman A.M.; Themes and variations on ubiquitylation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001, 2: 195-201.

WHO, 2001. Environmental Health Criteria 24: Arsenic and Arsenic Compounds. World Health Organization, Geneva.

Wiertz, S.; Tortorella, D.; Bogoy, M.; Yu, J.; Mothes, W.; Jones, T.R.; Rapoport, T.A.; Ploegh, H.L., Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, 1996, 384: 432-438.

Wilkinson K.D.; Hochstrasser M., in: J.M. Peters, J.R.H.D. Finley (Eds.), *Ubiquitin and the biology of the cell*, Plenum Press, New York, 1998, 99-125.

Willems A.R.; Goh T.; Taylor L.; Chernushevich I.; Shevchenko A.; Tyers M.; SCF ubiquitin protein ligases and phosphorylation-dependent proteolysis. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 1999, 354: 1533-1550.

Wojcik, C.; DeMartino, G.N. Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2003, 35: 579.

Woolson, E.A, in: W.H. Lederer, R.J. Fensterheim (Eds.), *Industrial, Biomedical and Environmental Perspective*, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1983, 239.

Yang, C.S. *Nutrition*, 1999, 15: 946-949.

Yang, Y.; Fruh, K. Ahn, K.; Peterson, P.; In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 27687-27694.

Yeh, S.; How, S.W.; Lin, C.S.; Arsenical cancer of skin-histological study with special reference to Bowsn's disease. *Cancer*, 1968, 21: 312-339.