



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL ARSÉNICO
SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOSOMAL EN EL
HÍGADO DE RATONES BALB/c

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

SANDRA ARTEAGA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

MEXICO, D.F.

ABRIL, 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.

AGRADECIMIENTOS:

AL PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM

Y

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT), POR
LA BECA OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

A LOS MIEMBROS DE MI COMITÉ TUTORAL:

DRA. PATRICIA RAMIREZ NOGUERA:

Gracias por el apoyo brindado y por todas las facilidades otorgadas en la realización de este proyecto, gracias por sus enseñanzas y su paciencia, gracias maestra por todos los momentos compartidos a lo largo de estos años. "HAY PERSONAS EN NUESTRA VIDA QUE A PESAR DE TODO Y PASE LO QUE PASE NUNCA TERMINARAN POR IRSE".

DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE:

Gracias por sus atenciones, sus consejos, por compartirme de sus conocimientos, por las sugerencias, por brindarme de su tiempo, por estar siempre dispuesta y por todo su apoyo en la realización de este trabajo de maestría.

DRA. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO:

Un agradecimiento especial por todos sus buenos consejos, su confianza, su disposición y por toda la ayuda brindada en la elaboración de este proyecto y por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES:

Agradezco su interés, su valiosa contribución y el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis.

DRA. ELIA ROLDAN REYES:

Gracias por su confianza, su valiosa ayuda, por su disposición y por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis.

A LA UNAM Y A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN:

Agradecimiento especial a la máxima casa de estudios por permitirme el honor de pertenecer a la familia universitaria, Gracias a todos mis maestros y a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en mi formación académica y en mi formación como individuo.

DEDICATORIAS:

Por sobre todas las cosas gracias a DIOS por que nada seria posible sin
Su gracia,

A MIS PADRES:

HILDA Y AGUSTIN:

No importa cuantos años viva, pero nunca me alcanzara la vida para agradecerles lo inmensamente amorosos, incondicionales leales y generosos que han sido conmigo, aunque aún no se hayan inventado palabras lo suficientemente grandes para expresarles el amor que siento por ustedes, solo quiero decirles que todo mis logros, siempre será consecuencia de lo maravilloso que ha sido la vida a su lado, gracias por no perder la confianza en mi y gracias por ser el mejor ejemplo de superación, de lucha y perseverancia.

A MIS HERMANAS:

YADY, MIRY, CARY, NAYE:

Mil gracias por su cariño, su apoyo incondicional, su amistad, su complicidad y por que se que pase lo que pase estaremos siempre juntas para compartir la vida, gracias por todos los bellos momentos, gracias por ser como son, gracias chunquitas por ser las mejores hermanas de este mundo.

A MI NEGRITO EDGAR Y A SEBASTIAN

Ustedes dos son los mas hermosos de esta familia gracias por ser tan amorosos y por ser la chispa que siempre ilumina mi día, gracias por que no importa que tan duro sean los tiempos siempre se que en ustedes encontrare paz, esperanza y mucha alegría.

A MI CUÑADO CARLOS:

Gracias por tu cariño, por tu apoyo, por tu amistad y por decidir ser parte de mi familia.

A JOEL GARCIA LARA:

Lo que pueda escribir en estas líneas va ser poco para agradecerte todo tu amor, todo tu cariño, tu paciencia, tu alegría, tu complicidad y todo tu apoyo, gracias por estar conmigo incondicionalmente en las buenas y en las malas , mi vida es muchísimo más bella desde que te tengo a ti, gracias a Dios por ponerte en mi camino.

A MIS AMIGUIS:

ISMA, BETY, FABY, NIDYA, MARTHA, IRIS, VICTOR, AMBAR, LILIAN, ARLETTE, LUPITA, JAQUE, OMAR, ROCIO.

Por su amistad, por tantos y tantos momentos hermosos y por la dicha de contar con su cariño y apoyo, gracias por dejarme ser parte de su vida.

ÍNDICE

Página

CAPITULO I

1.0- RESUMEN	5
2.0- INTRODUCCIÓN	9
¿POR QUE ESTUDIAR EL ARSÉNICO	9
Hidroarsenicismo	10
3.0- GENERALIDADES DEL ARSÉNICO	10
Distribución ambiental de Arsénico	11
Fuentes Naturales de Arsénico	11
Fuentes antropogénicas de Arsénico	12
Plaguicidas	13
El agua de bebida como una fuente de exposición ambiental de Arsénico	13
Niveles de As en el medio Ambiente	14
Niveles permisibles de As	15
Biotransformación del Arsénico	15
Toxicidad de los compuestos Arsenicales	17
Metilación de As como un proceso de Bioactivación	17
Eventos celulares asociados a la toxicidad del arsénico <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	18
Arsénico y Estrés Oxidativo	18
Arsénico y su afinidad a los sulfhídricos	19
Daño proteico inducido por Arsénico	19

CAPITULO II

4.0.- PROTÉOLISIS CELULAR	22
5.0.- GENERALIDADES DEL PROTEOSOMA	24
Como son los Proteosomas	24
Proteosoma 26S	24
Subunidad 20S	25
Subunidad 19S	26
6.0.- GENERALIDADES DE LA UBIQUITINA	28

Función de la Ubiquitina	29
7.0.-PROTÉOLISIS NO LISOSOMAL MEDIADA POR EL SISTEMA UB-PROTEOSOMA	30
Como ocurre la degradación proteica mediada por el sistema Ub-Proteosoma	31
El sistema de Ubiquitinación	31
El sistema de degradación proteosomal	34
Señales de degradación	36
Agregación proteica y agrosomas	38
CAPITULO III	
8.0.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
9.0.- HIPÓTESIS	40
10.- OBJETIVOS DEL TRABAJO	40
Objetivo General	40
Objetivo Específico	40
11.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	41
Determinación de la actividad proteosomal	41
Aislamiento del proteosoma 26S y su caracterización	42
Ubiquitinación	42
12.- RESULTADOS	43
13.- DISCUSIÓN	50
14.- CONCLUSIONES	54
15.- COMENTARIOS Y PERSPECTIVAS	55
16.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ÍNDICE PÁGINA	DE	FIGURAS	Y	TABLAS
		Figura 1: Camino de la biotransformación del Arsénico		16
		Figura 2: Estructura del proteosoma		27
		Figura 3: Esquema de la vía Ubiquitina-Proteosoma		33
		Figura 4: Actividad proteosomal similar a quimiotripsina en homogenado de Hígado de ratón BALB/c		44
		Figura 5: Concentración de proteínas en $\mu\text{g/ml}$ para cada una de las fracciones proteosomales		45
		Figura 6: Determinación de la actividad proteosomal en Unidad de Fluorescencia para cada fracción proteosomal		46
		figura 7: Densitometría y Western blot para la síntesis de Ubiquitina		47
		Tabla 1: Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal para las subunidades alfa del proteosoma		48
		Tabla 2: Análisis de la densitometría del Western blott de Ubiquitina de los homogenados del hígado de ratón		49

ABREVIATURAS

As	Símbolo químico del Arsénico
Asi	Arsénico inorgánico
As ^{III}	Arsenito de sodio
As ^V	Arsenato de sodio
MMA ^{III}	Acido monometil arsenoso
MMA ^V	Acido monometil arsínico
DMA ^{III}	Acido Dimetil arsenoso
DMA ^V	Acido Dimetil arsínico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
EPA	Agencia de protección al ambiente de Los Estados Unidos de Norte América
SAM	S-adenosilmetionina
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado
DNA	Acido desoxirribonucl3ico
ATP	Trifosfato de Adenosina
ADP	Difosfato de Adenosina
NADH	Nicotina Adenina Di nucle3tido Reducido
HSP-70	Prote3na de choque t3rmico 70
HSP-90	Prote3na de choque t3rmico 90
NF- κ B	Factor nuclear- κ B
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
MAPK	Prote3na cinasa activada por mit3genos
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonico
EDTA	Acido etilen diamino tetrac3tico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
SFB	Suero Fetal Bovino
BDF	Enfermedad del pie negro(Black Foot Disease)
Ub	Ubiquitina
Ub-Proteosoma	V3a Ubiquitina-Proteosoma
LLVY_AMC	Sustrato espec3fico del proteosoma con actividad similar a quimi3tripsina
CDK	Cinasa dependiente de ciclinas
CK	Citoqueratina
-SH	Grupo tiol
kD	Kilodaltons

1.0.- RESUMEN:

El arsénico (As) es un contaminante ambiental y reconocido carcinógeno humano (Mandal y Suzuki 2002, Vahter y cols. 2002). En el Este y Sureste de los Estados Unidos de Norteamérica, en Alaska, en la India, en Chile, Argentina y en algunas zonas de México (Chihuahua, Coahuila, Durango, San Luís Potosí, Puebla e Hidalgo) existen elevadas concentraciones de As en el agua potable para consumo humano. Entre las manifestaciones clínicas relacionadas con la exposición crónica al arsénico se incluyen; lesiones en piel, melanosis, queratosis e hiperqueratosis, la exposición crónica al arsénico inorgánico se ha asociado con un aumento en la incidencia de cáncer de piel, hígado pulmón riñón y vejiga (Mandal y Suzuki 2002).

Varios mecanismos han sido propuestos con los que se pretende entender el daño celular inducido por As y sus repercusiones. Entre ellos destacan los que asocian el daño directo o indirecto a biomoléculas con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hughes y cols. 2002). Sin duda un factor común en todos estos efectos genotóxicos y citotóxicos ejercidos por el As o sus metabolitos, es la alteración proteica en su función o estructura, en algunos casos, se puede revertir la alteración a su normalidad o de lo contrario la proteína entra a una vía de degradación proteica no lisosomal dependiente de ubiquitina (Carrard y cols. 2003, Bredfeldt y cols. 2004, Miller y Gordon 2005).

Este sistema es uno de los principales mecanismos de regulación de la síntesis y expresión proteica celular que cuando se altera se comprometen fenómenos celulares fundamentales en los organismos como la división, proliferación y diferenciación celular entre otros (Rossi y Loda 2002).

Por esta razón y considerando que el arsénico afecta la estructura de proteínas celulares relacionadas con procesos celulares importantes, nos interesó estudiar cual es el efecto del As^{III} *in vivo* sobre la actividad proteosomal en el hígado (órgano blanco de los efectos tóxicos ejercidos por el arsénico y el principal en su biotransformación), de ratones machos de la cepa BALB/c. En particular, estudiamos el efecto sobre la capacidad proteolítica lisosomal semejante a quimiotripsina mediante ensayos fluorométricos después del aislamiento por gradientes de glicerol de la subunidad 26S del proteosoma y conocer el efecto del Arsénico sobre la síntesis de ubiquitina en el hígado de ratones mediante análisis por western blot.

Para emprender este estudio, se administraron diferentes concentraciones de arsenito de sodio 0, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, y 5.0 mg Arsenito de Sodio/Kg o como control positivo 2.5 y 5.0 mg Griseofulvina /Kg por vía oral durante 9 días.

Los resultados obtenidos muestran que en el hígado de los ratones expuestos a arsénico, la actividad proteosomal específicamente la actividad similar a quimiotripsina se modificó considerablemente y este efecto está relacionado con la dosis diaria de As administrada durante los 9 días de exposición, estos resultados fueron observados en las dosis de arsenito de sodio que van de 2.5 y 5.0 mgAs/Kg , donde la mayor inhibición proteosomal se presentó en 5.0 mgAs/Kg, encontrándose que se inhibe la actividad proteosomal similar a quimiotripsina hasta en un 31% con respecto al control negativo y en los resultados obtenidos del western blot de los homogenados hepáticos observamos que a las dosis administradas de Arsenito de sodio los niveles de ubiquitinación en el hígado de los ratones expuestos no se ven modificados en comparación con el control negativo.

Abstract.

Arsenic (As) is an environmental toxic agent, known as human carcinogen. In the east and southeast of United States of North America, Alaska, India, Chile, Argentina and some Mexico regions (Chihuahua, Coahuila, Durango, San Luis Potosi, Puebla and Hidalgo) have high As concentrations in drinking water. Usual use of this kind of water has been related with skin diseases, melanosis, queratosis and hyperqueratosis. Chronic exposure to inorganic arsenic (As^{III}) it has been reported in many places of the world and it has been associated with increased risk to lung, liver and skin cancer as well as in bladder and kidney.

There are several mechanisms associated to toxic effects observed by arsenic exposure. As a common factor, the protein damage is one of the effects involved. They are genotoxic and cytotoxic effects induced by the As or its metabolites and some proteins are damaged in expression, synthesis and structure. In some cases, the alterations can be reversed to its normal process or entering in a process of protein degradation processes no lysosomal dependant of ubiquitin. This proteolytic system is the major mechanisms involved on synthesis and protein cell expression. When is modified cellular phenomenon in organisms like division, proliferation and cellular differentiation, gene expression among others are in risk.

For this reason and considering that the arsenic modifies cellular protein function, we are interested in the study the effect of the As (III) in vivo in the proteasomal activity in the liver (target organ of the toxic effects of the arsenic and on biotransformation) of male BALB/c mice. The aim of this research work was focuses in the study on the effects in the lysosomal proteolytic capability by fluorogenic tests after the 26S subunit of the proteasome isolation by glycerol gradients. We evaluated the ubiquitin synthesis after arsenic exposure by Western blot analysis.

Different concentrations of arsenite were administrated (0, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5 y 5.0 As/Kg body weight) or Griseofulvine/Kg body weight (2.5 y 5.0 mg) by oral via for 9 days.

The results shown that in the mice's liver exposed to arsenic, the proteasomal Chymotrypsin-like activity was considerably modified and this effect is related

with the arsenic doses administrated. The significant effect was observed 2.5-5.0 mgAs/Kg body weigh. The main inhibition was founded in 5.0mg/Kg, where the proteasomal activity ranged 31% under negative control. There was a not effect on ubiquitin synthesis after exposure.

The above results are important if we consider that some arsenic toxic effects are protein function related. The correct protein turnover (synthesis-degradation) could be involved organ function.

2.0.- INTRODUCCIÓN:

¿POR QUE ESTUDIAR EL ARSÉNICO?

El arsénico es un elemento que se encuentra en todos los ambientes naturales en concentraciones traza, estudios epidemiológicos en poblaciones tan diversas como lo son Taiwán, Argentina (Hopenhayn-Rich 1996), Chile y México (en zonas como Chihuahua, Coahuila, Durango, San Luís Potosí, Puebla e Hidalgo) (Steinmaus 2005), han detectado que la concentración de este metaloide se ve aumentada considerablemente en el agua de bebida de estas poblaciones ya sea por las características geoquímicas de la zona o por la realización de diversas actividades humanas que contribuyen al incremento de su concentración ambiental (Mandal y Suzuki 2002) .

Se conoce que la exposición al As provoca en el hombre diversos efectos patológicos (Hidroarsenicismo) que han resultado de gran interés en el ámbito de la salud pública mundial entre los que se encuentra un aumento en la incidencia de cáncer de piel, hígado, vejiga y riñón (Bredfeldt y cols. 2004), donde el riesgo para la salud humana está asociado con la especie química de As que se encuentre, su concentración y el tiempo de exposición del hombre a este elemento o sus metabolitos (Styblo y cols. 2000).

A pesar de la reconocida toxicidad ejercida por el arsénico, el mecanismo o los mecanismos mediante los cuales genera este tipo de daño no se conocen del todo. Por lo que nuestro interés en el estudio toxicológico del arsénico se debe tanto al gran número de personas que se hayan expuestas a este elemento en diversas zonas de nuestro país, al riesgo demostrado que supone para la salud de estas poblaciones la exposición a altas concentraciones de Arsénico, así como a la complejidad de los procesos involucrados.

Hidroarsenicismo.

Los efectos de la exposición debido al contacto con agua contaminada con altos niveles de Arsénico se han relacionado con aumento de cáncer de piel, pulmón hígado, riñón y vejiga (Guha 2005), también se han descrito enfermedades propias de las poblaciones expuestas al arsénico, como neoplasias de piel, incluyendo principalmente la enfermedad de Bowen y el carcinoma de células basales (Bredfeldt y cols. 2004). Además de los efectos dérmicos se ha descrito la enfermedad del pie negro, un desorden vascular oclusivo que en casos graves provoca gangrena de las extremidades inferiores, esta enfermedad fue descrita en Taiwán y se cree que está relacionada con el Hidroarsenicismo y la desnutrición poblacional de la zona . Hoy en día la enfermedad de los pies negros es un grave problema a nivel poblacional en Bangladesh. El As también se ha relacionado con malformaciones congénitas y con un aumento significativo en la tasa de abortos (Mandal y Suzuki 2002).

3.0.- GENERALIDADES DEL ARSÉNICO:

El Arsénico (As) es un elemento ubicuo, se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre tanto en el aire como en el agua, en su forma metaloide o formando parte de diversos compuestos químicos, aislado por primera vez en el año 1250 AC por Albertus Magnus, este elemento ha sido un centro de controversia en la historia de la humanidad ya que ha sido empleado en medicina, agricultura, en la industria de la electrónica y de la metalurgia entre otras (Mandal y Suzuky 2002).

Es clasificado químicamente como un elemento no-metal o metaloide, perteneciente al grupo VA y periodo 4 de la tabla periódica junto al Nitrógeno, Fósforo, Antimonio y Bismuto, su número atómico es 33 y su masa atómica 74.92, se puede encontrar en tres estadios de oxidación: el elemental (0), el trivalente (+3 o -3) y el pentavalente (5+), en la naturaleza existe en forma libre o combinada, El Arsénico puro tiene una coloración gris metálico y la mayoría de los compuestos orgánicos e inorgánicos del arsénico tienen una coloración blanca o incolora. El As no tiene olor o sabor especial, por lo que su presencia en la comida, en el aire o en el agua pasa desapercibida (Andrew y cols 2003).

Distribución ambiental de Arsénico.

El contenido de As en la corteza terrestre está entre 1.5 y 2.0 mg/Kg, siendo el elemento número 20 en la lista de los elementos más abundantes la corteza terrestre, 14 en el agua de mar y el 12 en el cuerpo humano (Mandal y Suzuky 2002)

El As se libera en la atmósfera mediante procesos de alta temperatura, como los de las centrales eléctricas alimentadas con carbón, la combustión de vegetación y los volcanes. El proceso natural de biometilación y reducción de arsinas también libera Arsénico en la atmósfera en su mayoría como As_2O_3 y se mantiene sobre todo adsorbido sobre la materia particulada.

El viento dispersa estas partículas que vuelan a la tierra. Entre las formas de Arsénico disueltas en el agua figuran el arseniato, el arsenito, el ácido metil arsónico, y el ácido dimetilarsónico. En aguas y sedimentos bien oxigenados, casi todo el arsénico se encuentra en estado pentavalente, termodinámicamente más estable. Algunas especies de arsenito y arseniato pueden intercambiar el estado de oxidación en función del potencial de

oxidación-reducción, el pH y los procesos biológicos, la erosión por viento o agua puede transportar rocas y suelo meteorizado y muchos compuestos del arsénico tienden a adsorberse en el suelo y con la lixiviación suelen recorrer distancias cortas en este medio.

Fuentes Naturales de Arsénico.

El Arsénico está ampliamente distribuido en gran número de minerales, las mayores concentraciones en general, se dan en forma de arseniuros de cobre, plomo, plata y oro o como impurezas de sulfuro.

El Arsénico entra a la biósfera primariamente por formaciones geológicas (Rosen y cols. 2002), las zonas donde se dan con frecuencia altas concentraciones de As, son las áreas con actividad geotérmica notable, así como los suelos procedentes de roca madre de origen volcánico, el arsénico normalmente está presente como arseniuros metálicos o como sulfuros de arsénico, se encuentra en más de 245 especies minerales, los principales minerales que contienen arsénico son: la Arsenopirita, Rejalgar (As_4S_4) y el oropimente (As_2S_3) (Mandal y Suzuki 2002).

Aunque el As es estable en condiciones reductoras (forma trivalente) no es frecuente encontrarlo en su estado fundamental. La forma oxidada, Arseniato, aunque es la más abundante en la naturaleza (se encuentra normalmente en los depósitos sedimentarios), está fuertemente enlazada a los minerales del suelo, particularmente a los óxidos e hidróxidos metálicos coloidales mediante enlaces iónicos .

Fuentes Antropogénicas de As.

Los mayores productores de Arsénico son China, Francia, México, Perú, Namibia, Suiza y Estados Unidos y estos países tienen el 90% de la producción mundial de Arsénico. Existen 2 fuentes principales de contaminación ambiental de arsénico, extracción y fundición de minerales y por el uso de pesticidas que en su composición contengan As (Carbonell y cols. 1995).

Extracción y Fundición de minerales:

La existencia del arsénico en minerales de zinc-plomo, de cobre y su presencia en muchas piritas son causa de contaminación por arsénico en el entorno de

los sitios de fundición y tratamiento de los minerales debido a la volatilización de algunos compuestos durante el proceso de fundición, la mayoría de estas emisiones gaseosas se dan en forma de trióxido, el cual forma ácido arsenioso al disolverse en agua. Los minerales auríferos también contienen altas concentraciones de arsénico, principalmente la arsenopirita y se da como trióxido en las emisiones de las plantas carboníferas, desembocando en problemas de contaminación cerca de las minas de oro, el polvo y los gases emanados desde las operaciones de fundición han contaminado suelos y plantas, variando los grados según la distancia desde la zona de muestreo al lugar de la emisión.

Plaguicidas.

El As se encuentra naturalmente y como consecuencia de ciertas actividades humanas, como la agricultura, ya que se ha empleado en la manufactura de pesticidas, insecticidas, herbicidas o desfoliantes durante muchos años. Desde el siglo diecinueve y hasta la mitad del siglo veinte los arsenicales inorgánicos fueron usados como pesticidas generales en huertos y cultivos de papas, el arseniato de plomo fue usado para el control de insectos en huertos y como pesticida en la lucha contra el gusano de las manzanas y peras.

Los arsenicales orgánicos han remplazado, en la mayoría de los casos, a los inorgánicos como herbicidas selectivos o generales. Son aplicados en proporciones más bajas que los arsenicales inorgánicos y de este modo se reducen en general los problemas asociados con la acumulación de arsénico en suelos agrícolas, pero puntualmente pueden persistir y merecen ser estudiados (Carbonell y cols. 1995, Mandal y Suzuky 2002).

El Agua para beber como una fuente de exposición a Arsénico.

El arsénico se haya ampliamente distribuido en la naturaleza presente en el aire, suelo y agua, es un elemento que generalmente no se encuentra en forma pura en el medio ambiente, es decir, usualmente se halla en forma combinada con otros elementos tales como oxígeno, cloro y azufre, y cuando se encuentra en esta forma se le conoce como As inorgánico (Asi). Por otro lado, cuando se combina con carbón e hidrógeno se le conoce como As orgánico. Las características de reactividad y toxicidad de las sales del As dependen de su estado oxidativo, presentándose en forma trivalente As^{III} y

pentavalente As^V siendo las formas trivalentes las más reactivas. Entre las especies químicas de As presentes en el ambiente, el arsénico inorgánico es considerado el más peligroso (Vahter y cols. 2002).

La presencia de concentraciones altas de As en el agua de consumo humano (Basu y cols. 2001), junto con las emisiones industriales representan las fuentes más relevantes de exposición a As^I en humanos de diferentes áreas geográficas. Es un hecho frecuente la ingestión de agua contaminada con arsénico, la cual proviene de la filtración del As^I de la tierra y de las rocas que lo contienen como constituyente natural en grandes cantidades (Mandal y Suzuki 2002, Vahter y cols. 2002).

La mayor vía de exposición al As de la población humana ocurre a través del agua de bebida que se encuentra contaminada con este metaloide en concentraciones más altas de lo que se considera seguro para el hombre. Estudios epidemiológicos han reportado que la ingestión crónica de elevados niveles de arsénico está asociada con un incremento en la incidencia de cáncer de piel, pulmón, vejiga e hígado (Muños y cols. 2002, Vahter y cols. 2002, Andrew y cols. 2003). Otra fuente de exposición, de menor importancia toxicológica, es la ingestión de alimentos de origen marino (peces y crustáceos), los cuales contienen concentraciones bajas de As^I y concentraciones altas de especies arsenicales de toxicidad menor como son los arsenoazúcares, arsenobetaína y arsenocolina (Carbonell y cols. 1995). Las especies de As^I que han sido consideradas de mayor importancia desde el punto de vista toxicológico son: el ácido arsónico (As^III), ácido arsénico (As^V), ácido metilarsónico (MMA^V) y ácido dimetilarsínico (DMA^V) (Styblo y cols. 2000)

Niveles de Arsénico en el medio ambiente.

Los niveles de arsénico en el entorno son variables. En el aire, los niveles son los más bajos en áreas remotas o rurales, más altos en áreas urbanas y los más altos en las zonas cercanas a fuentes industriales. En el agua, los niveles de arsénico son los más bajos en el agua de mar, más altos en los ríos y lagos y los más altos en las aguas subterráneas de las áreas con depósitos de roca volcánica o de minerales ricos en arsénico. Las concentraciones de arsénico

en suelos y sedimentos aumentan cuando hay fuentes de contaminación, ya sean éstas naturales y/o de origen humano (Carbonell y col. 1995).

Niveles permisibles de Arsénico.

El límite máximo permitido para la concentración de As en el agua de bebida en México es de 50 µg/litro (50 ppb). La US Environmental Protection Agency por sus siglas en inglés EPA ha propuesto una reducción drástica (de 50 a 10 ó 20 µg/litro) en dicho límite. Así, la Organización Mundial de la Salud estableció un valor guía de 10 µg/litro para el arsénico presente en agua de bebida. Se ha estimado que más de 10 millones de individuos en el mundo están expuestos a concentraciones elevadas de iAs debido a la presencia de este metaloide en el agua de bebida, generalmente obtenida de pozos profundos.

Biotransformación del Arsénico.

Cerca del 70 – 90% del Arsénico que ingresa al cuerpo por ingestión es absorbido principalmente a través del tracto gastrointestinal donde después es distribuido a diferentes órganos y tejidos. El arsénico es transportado principalmente al hígado, en este órgano parte del arsénico inorgánico (Asi) es metilado a dos derivados, sin embargo el arsénico podría también ser metilado en otros tejidos. La mayoría de los mamíferos incluyendo el ratón y el hombre metabolizan el arsénico inorgánico vía metilación a ácido metilarsónico (MMA) y ácido dimetilarsínico (DMA), los cuales junto con la especie no metilada son excretados en la orina (Hughes y cols. 1999), cuando un organismo se haya expuesto crónicamente a altas dosis de Arsénico, parte de este agente es retenido en el pulmón y el porcentaje de los metabolitos en orina se ve disminuido (Vahter y cols. 1984, 2002, Hughes y cols. 1999, 2002).

La metilación ocurre vía reducción alternativa de arsénico pentavalente a trivalente y por la adición de un grupo metilo, donde la S-adenosilmetionina (SAM) es el principal donador de grupos metilos y el glutatión (GSH) actúa como un cofactor esencial para esta vía como se muestra en la Figura 1 (Vahter y cols. 2002).

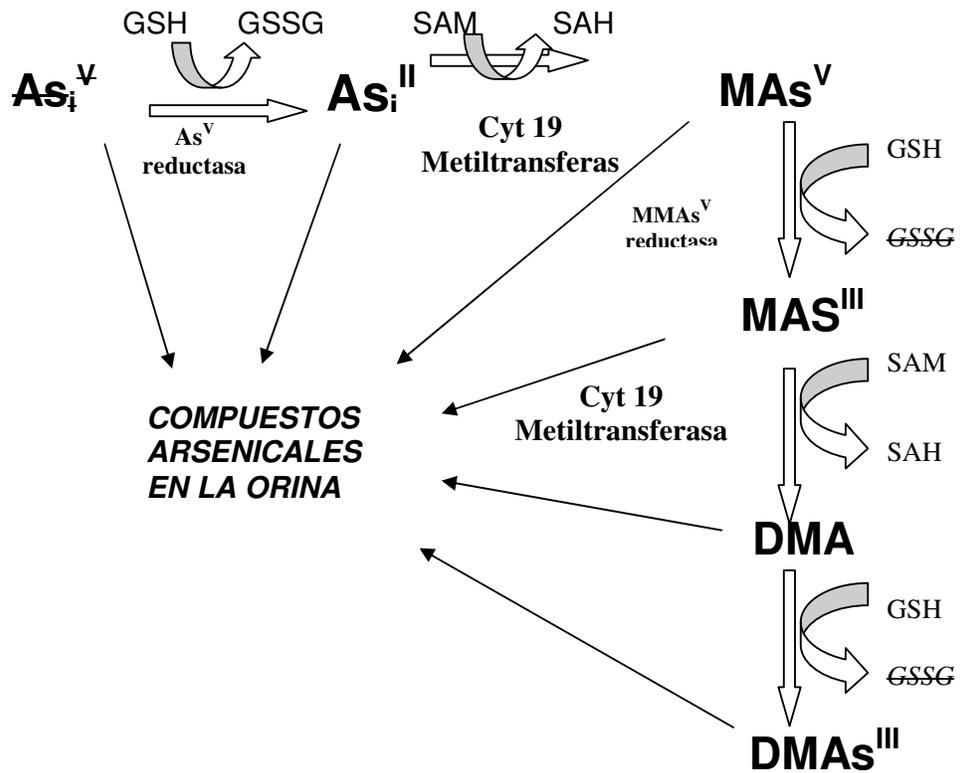


FIGURA 1: Camino de la biotransformación del Arsénico
Modificado de Kitchin y cols 2003

Toxicidad de los compuestos Arsenicales.

La toxicidad de los compuestos de As depende principalmente de su estado de oxidación y de su composición química, anteriormente se consideraba al arsénico inorgánico trivalente como la forma química de mayor toxicidad. Ya

que diversos estudios señalaban que los arsenicales metilados pentavalentes (MMAs^V y DMAs^V) eran significativamente menos tóxicos y menos mutagénicos que el Asi, por lo que la biotransformación de Asi había sido generalmente aceptada como un proceso de desintoxicación.

Sin embargo, estudios recientes han mostrado que los arsenicales metilados trivalentes, MMAs^{III} y DMAs^{III}, son más tóxicos que el Arsénico inorgánico trivalente (Asi^{III}) en diferentes modelos experimentales:

- 1) Inhiben la actividad enzimática de flavoproteínas reductasas dependientes de NADPH que mantienen el estado redox como son la GSH reductasa y tioredoxin reductasa (Styblo y cols. 2000).
- 2) Son más citotóxicos que el iAs^{III} en diferentes tipos de células animales y de humanos (Petrick y cols. 2000).
- 3) Tienen mayor actividad genotóxica en linfocitos humanos, además de que afectan directamente al ADN desnudo
- 4) La letalidad de MMAs^{III} es cuatro veces mayor a la del Asi^{III} en hámster expuesto a dosis únicas (Petrick y cols. 2001)

La metilación del Arsénico como un proceso de Bioactivación.

Se sabe que el As^{III} es más tóxico que el As^V, en distintos estudios se han analizado por separado los compuestos metilados de As, tanto trivalentes como pentavalentes, y parece ser que los compuestos pentavalentes MMA^V y DMA^V son menos tóxicos que el Arsénico trivalente, pero sus análogos metilados trivalentes MMA^{III} y DMA^{III}, son por lo menos tan tóxicos como el As trivalente (Gebel y cols 2001), esto indica que parece ser que el As trivalente es altamente tóxico aunque esté metilado (Petrick y cols. 2001, Styblo y cols. 2000). Por esta razón recientemente se ha puesto en duda la hipótesis de que la metilación es un proceso de desintoxicación del As y que, por el contrario, la metilación del Arsénico inorgánico puede ser una vía de activación (Styblo y cols. 2000), contradiciendo la general aseveración de que únicamente las especies inorgánicas del Arsénico son las formas tóxicas activas

Eventos celulares asociados a la toxicidad del Arsénico *in vivo* e *in vitro*.

El arsénico es un conocido carcinógeno humano pero el mecanismo mediante el cual ejerce este tipo de daño no se conoce aún. Se ha establecido que el As

no daña directamente al DNA, pero puede actuar como un agente carcinogénico indirecto al inhibir mecanismos de reparación del DNA como es la reparación por escisión de nucleótidos y de esta manera incrementando indirectamente mutaciones en el DNA (Andrew y cols. 2003).

Los mecanismos involucrados en la formación de neoplasias por el As en contraste con otros químicos carcinógenos humanos, no se conocen bien en parte por que el metaloide no induce mutaciones en células bacterianas o en células de mamíferos, aunado a esto; existe una falta de predictividad en modelos experimentales para este agente, probablemente por las diferencias metabólicas entre especies (Kirkpatrick y cols. 2003).

Varios mecanismos han sido propuestos para tratar de entender el daño celular inducido por As y sus repercusiones, a continuación se mencionan algunos de los más destacados.

Arsénico y Estrés oxidativo.

Algunos autores han sugerido que los efectos provocados por la exposición a As pueden estar relacionados con la formación de especies reactivas de oxígeno (Kirkpatrick y cols. 2003), ya que se han presentado evidencias que lo soportan en células de mamífero (Yamanaka y cols. 1990). De manera similar, la adición de vitamina E puede proteger a los fibroblastos humanos de la toxicidad provocada por el arsénico. Se ha sugerido que la actividad de promoción tumoral del DMA puede deberse a la acción de especies reactivas que contienen oxígeno, tales como el radical peroxil dimetilarsénico $(\text{CH}_3)_2\text{As-O-O}$ (Rin y cols. 1995, Yamanaka y cols. 1993). La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su presencia en el metabolismo del As también se ha relacionado con la inducción de un tipo de aducto entre el ADN y algunas proteínas en órganos blancos así como en la activación o inactivación de factores de transcripción que promueven la carcinogénesis.

As y su afinidad a grupos Sulfhídrido.

Un mecanismo de toxicidad asociado a la carcinogenicidad inducida por el arsénico, es el que se genera por la elevada afinidad del metaloide a grupos

sulfhidrilo (-SH) facilitando su acumulación en uñas, piel e hígado. Como el Arsénico es químicamente similar al fósforo, es probable que participe en muchas reacciones celulares. Compuestos organoarsenicales específicos, por ejemplo, arsenobetaína, arsenocolina o arsenolipidos se han encontrado en algunos organismos y se ha demostrado que el arsénico reemplaza al fósforo en los grupos fosfato del DNA (Carbonell y cols. 1995, Brendfeldt y cols. 2004). Los efectos tóxicos asociados a este tipo de daño celular se han observado con enzimas y proteínas partícipes en la organización, diferenciación, especialización y división celular así como en la reparación del daño. El Arsénico inorgánico induce la síntesis de varias proteínas incluidas las de estrés y las citoqueratinas (CKs) (Riley y cols. 2001,2003, Gonsebatt y cols. 2007)

Daño proteico inducido por Arsénico.

Los efectos tóxicos asociados al daño protéico inducido por arsénico se han observado con enzimas y proteínas partícipes en la organización, diferenciación, especialización y división celular así como en la reparación del daño (Kirkpatrick y cols. 2002). Se sabe que el arsénico inorgánico modifica la estructura y función de diversas proteínas incluidas las de estrés y las citoqueratinas (CKs) (Riley y cols. 2003), estimula la cascada de las proteínas cinasas (MAPK) y activa factores de transcripción (AP-1) que regulan la proliferación celular entre otros efectos (Bredfeldt y cols. 2004).

La función y estructura no son las únicas características necesarias para una correcta función proteica, lo es también, el equilibrio dinámico entre su expresión-síntesis y degradación. Al respecto, existen pocas evidencias que relacionan a los arsenicales con el sistema proteolítico no lisosomal ubiquitina-proteosoma. Este complejo altamente conservado en eucariontes, es responsable de la degradación de las proteínas dañadas, mal plegadas o proteínas que por necesidades celulares necesitan ser recambiadas. Diversas proteínas son blanco de la actividad del sistema, entre ellas destacan algunos complejos ciclina-cinasas, mediadores químicos inmunológicos, enzimas de reparación, factores de transcripción, proteínas de respuesta a estrés y apoptosis (Kirkpatrick y cols. 2003, Bredfeldt y cols. 2004).

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, particularmente en respuesta al estrés, las proteínas o péptidos tienden a agregarse y esta organización adversa puede ocasionar alteraciones en la funcionalidad y/o conformación estructural correspondiente para lo cual fueron diseñados (Riley y cols. 2001). En algunos casos estas proteínas pueden revertir su estado a la normalidad o de lo contrario entran en proceso de degradación no lisosomal mediado por el sistema Ubiquitina-Proteosoma. Alteraciones en este proceso de degradación protéica induce la segregación de proteínas o péptidos al citoplasma como cuerpos de inclusión (agresomas, también conocidos como cuerpos de Mallory) (Riley y cols. 2003, Johnston y cols. 1998).

Uno de los mecanismos no lisosomales más importantes involucrados en la proteólisis de estos sustratos insolubles intracelulares es justamente la vía ubiquitina-proteosoma (Carrard y cols. 2003).

Se ha reportado que una de las proteínas que regula al proceso y que se conoce como p62 interactúa no covalentemente con la ubiquitina regulando el proceso, p62 es una proteína codificada por genes de respuesta temprana inducida por una variedad de señales celulares relacionadas con la proliferación celular, diferenciación y particularmente en respuesta al daño oxidativo.

En el hígado, unas de las proteínas tejido específico que regulan su función, estructura y síntesis son las citoqueratinas 8 y 18 que son rápidamente degradadas a través de la vía ubiquitina-proteosoma, en repuesta al estrés celular inducido por agentes como el etanol. Cuando este sistema de control de calidad y cantidad protéica falla, las citoqueratinas son secuestradas formando los agresomas (Bardag-Gorce y cols 2003).

Sin embargo existen evidencias recientes que muestran que la exposición a arsenicales induce la acumulación de proteínas anormales o mal plegadas y que la célula adapta su maquinaria de degradación protéica, específicamente se ha estudiado un componente del proteosoma 26S que es inducido por arsenito de sodio, pero no por otros agentes químicos, este componente se

conoce como AIRAP (Arsenite-inducible, cysteine- and histidine-rich RNA-associated protein), el cual está asociado fuertemente a la subunidad 19S del proteosoma alterando las propiedades bioquímicas que facilitan el tránsito del sustrato hacia la cavidad interna del proteosoma, donde ocurre la degradación protéica, lo que sugiere heterogenicidad en la composición del proteosoma la cual está dado por la necesidad de respuesta a los diferentes sustratos (Stanhill y cols. 2006).

Estas evidencias en conjunto, muestran los efectos pleiotrópicos inducidos por compuestos arsenicales y su complejidad para asociarlos directa o indirectamente a los procesos de transformación celular y cáncer inducidos por estos tóxicos.

4.0.-PROTÉOLISIS CELULAR:

La célula, unidad fundamental de la vida, es un lugar en el que miles de reacciones ocurren simultáneamente, las células coordinan estas acciones a través de mensajes transmitidos por proteínas de un lugar a otro, cuando estos mensajes que controlan momento a momento las acciones celulares son alterados el resultado puede derivar en la modificación de diversos procesos celulares indispensables y que se han asociado con muerte celular o el cáncer, los mensajes transmitidos por las proteínas han de ser rápidos e inmediatos, de no ser así se vuelven obsoletos y las proteínas han de ser destruidas y hay que preparar un nuevo mensajero que a menudo acarrea instrucciones opuestas.

Los tipos de proteínas que una célula produce, dependen de los genes, ellos determinan la secuencia en que deben unirse las 20 subunidades básicas, los aminoácidos y cómo se pliegan las cadenas en hélices o bucles compactos para construir diferentes clases de proteínas, dotada cada una de forma y estabilidad específica que le viene impuesta por su composición de aminoácidos. Estas proteínas se han de sintetizar en respuesta a las necesidades celulares del momento como transportar una proteína a una localización celular adecuada y degradarla cuando ya ha pasado la necesidad como lo que ocurre con las ciclinas dependientes de cinasas que marcan la pauta de la de progresión/inhibición del ciclo celular (López-Araiza y cols. 2002).

Como todos los componentes del organismo, el proteoma está también en un estado dinámico de síntesis y degradación. Los distintos mecanismos proteolíticos poseen diferentes requerimientos fisiológicos y permiten al organismo adaptarse a condiciones ambientales y fisiológicas en continuo cambio.

En la degradación de proteínas intracelulares existe un mecanismo conocido como el sistema Ubiquitina-Proteosoma que interviene de manera directa en el funcionamiento y recambio de muchas proteínas (Bence y cols. 2001, Omary 2000, Harper y cols. 2006). Esta importante vía se encuentra involucrada en la regulación de procesos celulares críticos, tales como: control del ciclo celular, reparación del DNA, oncogénesis, catabolismo de proteínas anormales, modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, modulación de receptores

de superficie y canales iónicos, procesamiento de antígenos, biogénesis de los ribosomas, transcripción, infección vírica, degeneración neural y muscular, diferenciación celular, respuesta al estrés, etc. (Carrard y cols. 2003, Rossi y Loda. 2002).

Hasta principios de los años ochenta del pasado siglo, la degradación proteica fue un área de investigación poco atendida por los científicos, la destrucción de las proteínas celulares era un proceso terminal no específico. Aunque se sabía que las proteínas tenían que destruirse, no se apreció entonces, en toda su magnitud, la especificidad del proceso y su repercusión en el control de numerosos procesos celulares. El descubrimiento de la cascada compleja de la vía ubiquitina-proteosoma, supuso una revolución y a partir de aquí, la degradación de las proteínas ha adquirido una nueva dimensión. Hoy se sabe, gracias a los trabajos de los investigadores premiados con el Nobel en el año 2004 Glickman y Ciechanover (Glickman y Ciechanover 1998, 2002) que la degradación de las proteínas celulares mediante el sistema ubiquitina, es un proceso complejo, enormemente controlado en el tiempo y estrictamente regulado, que se encuentra involucrado en numerosos procesos básicos de la vida y la muerte de la célula, en la salud y la enfermedad. La proteólisis intracelular tiene componentes lisosómicos y no lisosómicos, siendo los últimos los involucrados por el sistema de la ubiquitina-proteosoma (Cascales 2004).

5.0.-GENERALIDADES DEL PROTEOSOMA:

¿Como son los proteosomas?

El proteosoma 26S fue observado por primera vez en micrográfrica electrónica de lisados de eritrocitos humanos en el año 1968 y por su estructura se le dio el nombre de cilindro, pero su función se estableció en 1980 (Li y cols. 2005)

Se sabe que toda la degradación proteica citosólica es realizada por los proteosomas, comparados con el tamaño de las proteínas, los proteosomas son estructuras enormes. Mientras una proteína promedio pesan entre 40.000 a 80.000 daltons, los proteosomas de las células de organismos superiores pesa 2.5 millones de daltons (Gao y Karin 2005). En la célula, los proteosomas se encuentran en gran cantidad. Una célula típica contiene aproximadamente 30, 000 proteosomas, se conocen una gran variedad de sustratos del proteosoma, relacionados con diversos procesos celulares como la proliferación y diferenciación celular, la regulación metabólica, la respuesta al estrés y la eliminación de proteínas anormales, y la apoptosis entre otros (Miller y Gordon 2005), se sabe que otros procesos celulares se activan con la degradación de una proteína inhibidora clave, esta eliminación de proteínas reguladoras reviste particular interés en la transición entre etapas del control del ciclo celular, que van desde G1 hasta la mitosis (Rossi y Loda 2002, Naujokat y cols. 2007).

Proteosoma 26S.

Los proteosomas son grandes complejos proteicos dependiente de ATP, el 1% de proteínas celulares, con muchas copias en el citosol y el núcleo (Wilkison y cols. 1998). La forma del proteosoma que reconoce y degrada las proteínas poliubiquitinadas es el proteosoma 26S (Hershko y Ciechanover 1998, Naujokat y cols 2007). El proteosoma es una proteasa multimérica que cataliza el paso final de la degradación de las proteínas intracelulares vía Ubiquitina-proteosoma (Carrard y cols. 2003). El proteosoma esta constituido por una partícula central con aspecto de túnel que es la subunidad donde se encuentra la actividad multicatalítica (Subunidad 20S) a la que acompañan dos copias de

la subunidad reguladora (Subunidad 19S) situadas en ambos extremos de la partícula central como formando un gorro en cada extremo (Figura 2) (Koster y cols. 1995, Ferrell y cols. 2000, Miller y Gordon 2005)

Es ampliamente conocido que la degradación proteosomal es importante para el mantenimiento de la homeostasis celular, por su función en la degradación de proteínas mutantes dañadas o no funcionales (Glickman y Ciechanover 2002, Kaiser y Huang 2005), sin embargo se sabe también que el proteosoma interviene en la eliminación dirigida de proteínas reguladoras de la célula, como factores de transcripción, moléculas de señalización, inhibidores del ciclo celular supresores de tumores, receptores tirosin cinasas, entre otros (Rossi y Loda 2002).

Subunidad 20S.

El proteosoma existe en múltiples formas en las células eucariota y en todas las isoformas se encuentra el núcleo catalítico (CP) conocido como proteosoma 20S (Hershko and Ciechanover 1992,1998). Su función es la degradación de proteínas Ubiquitinadas, hidroliza péptidos y proteínas mal plegadas, es inactivo en caso de proteínas plegadas y no Ubiquitinadas (Wilkinson y cols.1998, Wilkinson 2004, Miller y Gordon 2005).

El núcleo catalítico del complejo es el proteosoma 20S de 720 KDa de 40 subunidades diferentes, una partícula cilíndrica que consiste en cuatro anillos con siete diferentes subunidades cada uno, que están presentes en dos copias y en una sola localización, de forma que la partícula presenta un asimetría doble, los cuatro anillos heteroheptaméricos yuxtapuestos están formados por subunidades α y β , estudios de microscopia electrónica revelan que el proteosoma de *Saccharomyces cerevisiae* tiene una estructura cilíndrica compuesta de 4 anillos heptaméricos constituidos por 7α 7β 7β 7α (Bardag-Gorce y cols. 2003), la cavidad interna posee un diámetro de 13 Å, el proteosoma 20S se caracteriza por tres actividades proteolíticas distintas, las cuales están en la parte central de la cavidad del complejo 20S, solo las 3 subunidades β tienen sitios proteolíticos, basados en su especificidad, los sustratos han sido definidos como peptidasas con actividad de caspasa (β 1), actividad de tripsina(β 2) y de quimiotripsina (β 5) (Naujokat y cols 2007).

Las subunidades alfa son importantes para el ensamble del proteosoma 20S y la unión con el complejo regulador 19S (Bardag-Gorce y cols. 2004, Glickman y Ciechanover 2002, Wolf y cols. 2004, Kaiser y Huang 2005, Naujokat y cols. 2007).

Subunidad 19S.

La partícula reguladora 19S RP, es un complejo multimérico de 890 Kda. Una importante función de la subunidad 19S del proteosoma es el reconocimiento de las proteínas Ubiquitinadas y otros sustratos potenciales del proteosoma (Wilkinson y cols. 1998, Miller y Gordon 2005). La partícula reguladora o 19S presenta diferentes funciones bioquímicas; además de que reconoce los sustratos poliubiquitinados, tiene la actividad de isopeptidasa que separa la cadena de poliubiquitinas a monómeros de ubiquitina para su reciclaje por que la Ubiquitina no es degradada por el proteosoma, la subunidad 19 se haya unida a la subunidad catalítica 20S y abre un poro de entrada y tiene la actividad de una chaperona reversa desnaturalizando el sustrato y translocándolo para que pueda ingresar al proteosoma 20S y ser degradada.

Estudios genéticos en levaduras han demostrado la presencia de ATPasas y no-ATPasas en la subunidad 19S y revelan una interacción directa entre esas ATPasas y las subunidades $\alpha 7$ del proteosoma 20S.

Rn10 es una de las subunidades más estudiadas del complejo 19S proteosomal y se sabe que se une a los conjugados de poliubiquitina. (Ferrell y cols. 2000, Naujokat y cols. 2007)

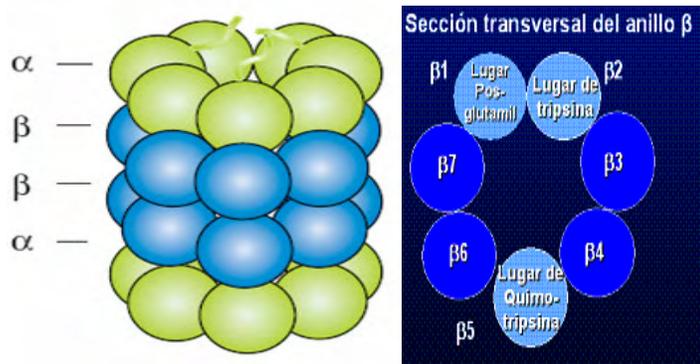
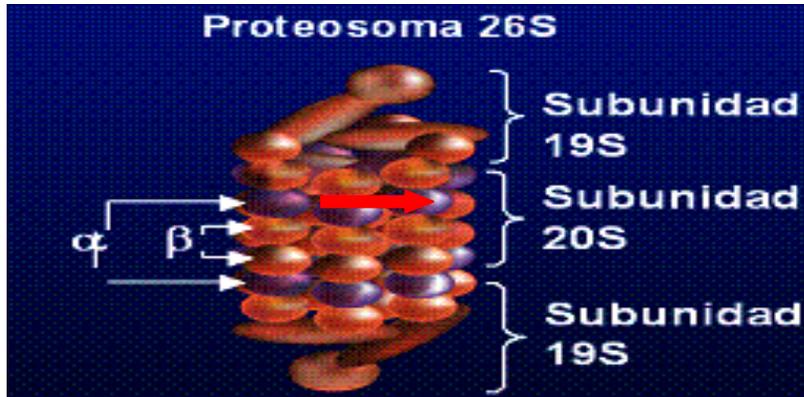


FIGURA 2.- Estructura del proteosoma con sus distintas subunidades, sección transversal del anillo donde reside la actividad proteolítica (Miller y Gordon 2005).

6.0.-GENERALIDADES DE LA UBIQUITINA:

La Ubiquitina fue aislada por primera vez por Golstein y colaboradores en 1975 a partir de timo bovino y posteriormente se encontró en diferentes tejidos y organismos, al principio se creyó que participaba en la diferenciación de los linfocitos.

Es un polipéptido de 76 aminoácidos y 8.6 KDA que está formada por 5 láminas B y una gran hélice Alfa, presente en las células eucariotas y está altamente conservada entre especies (Hershko y cols. 1998, Hartmann-Petersen y cols. 2004, Kaiser y Huang 2005)

El nombre Ubiquitina se debe a su ubicua presencia en casi todos los tipos de células, es también una de las proteínas más conservadas durante la evolución, la secuencia de aminoácidos es casi idéntica solo 3 aminoácidos varían desde los insectos al hombre, esto sugiere que la mayoría de los aminoácidos que forman la ubiquitina son esenciales ya que cualquier mutación a lo largo de la evolución se hubiera eliminado por selección natural (Cascales 2004, Gao y Karin 2005).

Es una proteína estable al calor que posee una estructura globular. Tiene una gran capacidad para conjugarse con otras proteínas en un proceso que requiere energía. Es esta propiedad la que la capacita para encontrarse implicada en muchos procesos celulares, por ejemplo la ubiquitina se conjuga con la ciclina en la fase G1 y M del ciclo celular jugando un papel muy importante en la regulación de dicho ciclo, la ubiquitina interviene también en la reparación del DNA, embriogénesis, la regulación de la transcripción, apoptosis etc (Carrard y cols 2003).

Función de la Ubiquitina.

Tradicionalmente la ubiquitinación ha sido asociada a eventos proteolíticos en el proteosoma 26S, recientemente la ubiquitinación ha sido involucrada en otros mecanismos regulatorios, como en la activación de protein cinasas y en mecanismos de la respuesta inmune (Neriah 2002).

Las proteínas existen como una cadena lineal de aminoácidos, que puede degradarse con el tiempo ya que tal reacción es termodinámicamente favorable en medio acuoso, la degradación temporal de proteínas se denomina recambio proteico. La relación entre la degradación y la síntesis de una proteína es lo que determina su concentración en la célula. De este recambio se deduce que algunas proteínas tienen una vida media larga y otras una vida media corta.

La ubiquitina tiene una función importante que es la vigilancia del recambio proteico en la célula, regulando estrictamente la degradación de proteínas específicas (Kaiser y Huang 2005), mediante la degradación proteica las células pueden eliminar una proteína que a su vez regulaba otra función (López- Araiza 2002). Esto es lo que ocurre con un factor de transcripción necesario para la expresión de un gen particular. Además esta forma de control es muy efectiva ya que la eliminación de una proteína reguladora asegura que el proceso regulador efectuado por esa proteína se ha desconectado, en ese contexto una estrategia alternativa es simplemente inactivar las proteínas no deseadas, cambiando su conformación. La simple hidrólisis del enlace peptídico de las proteínas no necesita energía, sin embargo, la ubiquitina, funciona de manera dependiente del ATP (Harper y cols. 2006). La razón es que para degradar determinadas proteínas, estas tienen que ser Ubiquitinadas o específicamente marcadas para ser reconocidas por la maquinaria que va a realizar la degradación. La ubiquitina no degrada proteínas, su misión es etiquetarlas para la degradación que va a ser efectuada por el proteosoma 26S (Rossi y Loda 2002 , Gao y Karin 2005).

7.0.- PROTEOLISIS NO LISOSOMAL MEDIADA POR LA VIA UBIQUITINA-PROTEOSOMA:

La degradación selectiva de muchas proteínas de vida corta, en las células eucariota se lleva a cabo por el sistema Ubiquitina-proteosoma, en este proceso las proteínas son marcadas para la degradación. La ubiquitina media la degradación de proteínas reguladoras (Wilkinson y cols. 1998), las cuales juegan un papel importante en el control de numerosos procesos celulares, tales como la progresión del ciclo celular, la transducción de señales, la regulación transcripcional y la endocitosis (Naujokat y cols. 2007). El sistema Ub-proteosoma ha sido implicado en la respuesta inmune, el desarrollo y la muerte celular programada, por lo que alteraciones en alguno de los procesos mediado por la ubiquitina se ha asociado a diversas condiciones patológicas entre las que destacan los procesos de transformación maligna, (Hershko y Ciechanover 1998). La vía ubiquitina proteosoma, es el principal mecanismo en la célula para el catabolismo proteico (Miller y Gordon 2005), interviniendo de manera directa en el funcionamiento y recambio de muchas proteínas reguladoras incluyendo ciclinas, inhibidores de cinasas dependiente de ciclinas(CDK), p53, NF-κB, c-Fos, c-Jun y proteínas de membrana como CFTR, otros sustratos para esta vía incluyen proteínas desnaturalizadas o plegadas anormalmente (Ciechanover 1994, Glickman y Ciechanover 2002).

La vía Ub-Proteosoma se encuentra involucrada en la regulación de procesos celulares críticos tales como:

- *Regulación del ciclo celular
- *Biogénesis de orgánulos
- *Diferenciación celular
- * Modulación de la respuesta inmune e inflamatoria
- *Modulación de receptores de superficie y canales iónicos

*Reparación del DNA

(Miller y Gordon 2005)

¿Como ocurre la degradación proteica mediada por el sistema Ub-Proteosoma?

La vía ubiquitina-proteosoma comprende dos pasos importantes que permiten la degradación selectiva de las proteínas que necesitan ser eliminadas de la célula, figura 3.

El primer paso consiste en la ubiquitinación de la proteína a ser degradada. Éste es un proceso sumamente regulado que suele iniciarse cuando una molécula simple de ubiquitina se pega a un residuo de lisina del sustrato protéico. El reconocimiento de la proteína es un evento específico cuya selectividad es conferida por las enzimas involucradas en esta reacción. Otras moléculas de ubiquitina se agregan de forma secuencial para formar la cadena de poliubiquitina, lo que permite el reconocimiento de la proteína diana por el proteosoma.

El segundo paso requiere de un proteosoma 26S funcional. La subunidad 19S tiene un receptor que se une a la cadena de poliubiquitina de la proteína diana para luego facilitar el corte enzimático del sustrato (Glickman y Ciechanover 2002).

Para asegurar la eliminación eficiente de una cierta proteína en un determinado momento, tanto la conjugación de la proteína como la degradación de los sustratos ubiquitinados han de estar estrictamente regulados.

El sistema de Ubiquitinación.

En el proceso de conjugación covalente de la ubiquitina con la proteína sustrato intervienen tres reacciones enzimáticas secuenciales que conllevan la unión del carboxilo terminal de la ubiquitina con el grupo E-amino de un residuo de lisina (K) de la proteína sustrato (Hershko y Ciechanover 1992, Ciechanover y cols. 1994, Wilkinson y cols. 1997, 1998, 2002, 2004), recientemente se ha descrito un paso adicional que requiere la participación de una cuarta enzima, la E4

que es requerida para hacer más eficiente el ensamblaje de la cadena de poliubiquitinas (Miller y Gordon 2005).

Una molécula de ubiquitina (Ub) es primeramente activada vía la formación de un enlace tioéster con la enzima activadora de Ub que es la E1, esta Ub activada es transferida por una enzima conjugadora de Ub o E2 una vez más vía formación de un nuevo enlace tioéster, la Ub activa es después transferida al sustrato en colaboración de una enzima ubiquitinligasa o E3, la Ub es unida covalentemente a la proteína sustrato mediante una unión isopeptídica entre un carboxilo terminal de la glicina de la Ub y el grupo aminoterminal de la lisina de la proteína blanco, una unión isopeptídica similar es formada entre el grupo carboxilo terminal de la Ub con el grupo amino de la lisina de otra molécula de Ub de esta manera una cadena de la poliubiquitina se va formando por adiciones de monómeros de Ub en sucesivas rondas de ubiquitinación (Wilkinson 1998, 2002, 2004) .

Las proteínas unidas a la cadena de poliubiquitina son reconocidas por el proteosoma para su degradación proteolítica, con el resultante reciclado de monómeros de la ubiquitina por enzimas desubiquitinizantes (Hershko y Ciechanover 1992, 1998).

Características de las enzimas ubiquitinizantes

Enzima activadora E1 (Ubiquitin activating enzyme): Enzima esencial en el proceso de ubiquitinación, se inactiva por medio del calor y entonces se pierde la vía proteolítica. Existe un solo E1 como producto de un solo gen.

Enzima transportadora-conjugadora E2 (Ubiquitin carrier protein): Posee 150 residuos de aminoácidos, existen 50 formas.

Ligasa E3 (ubiquitin ligating protein): Puente de interacción entre E2 y el sustrato, existen más de 100 ligasas específicas para cada sustrato, se organizan en dos grupos HECH y RING finger (Miller y Gordon 2005).

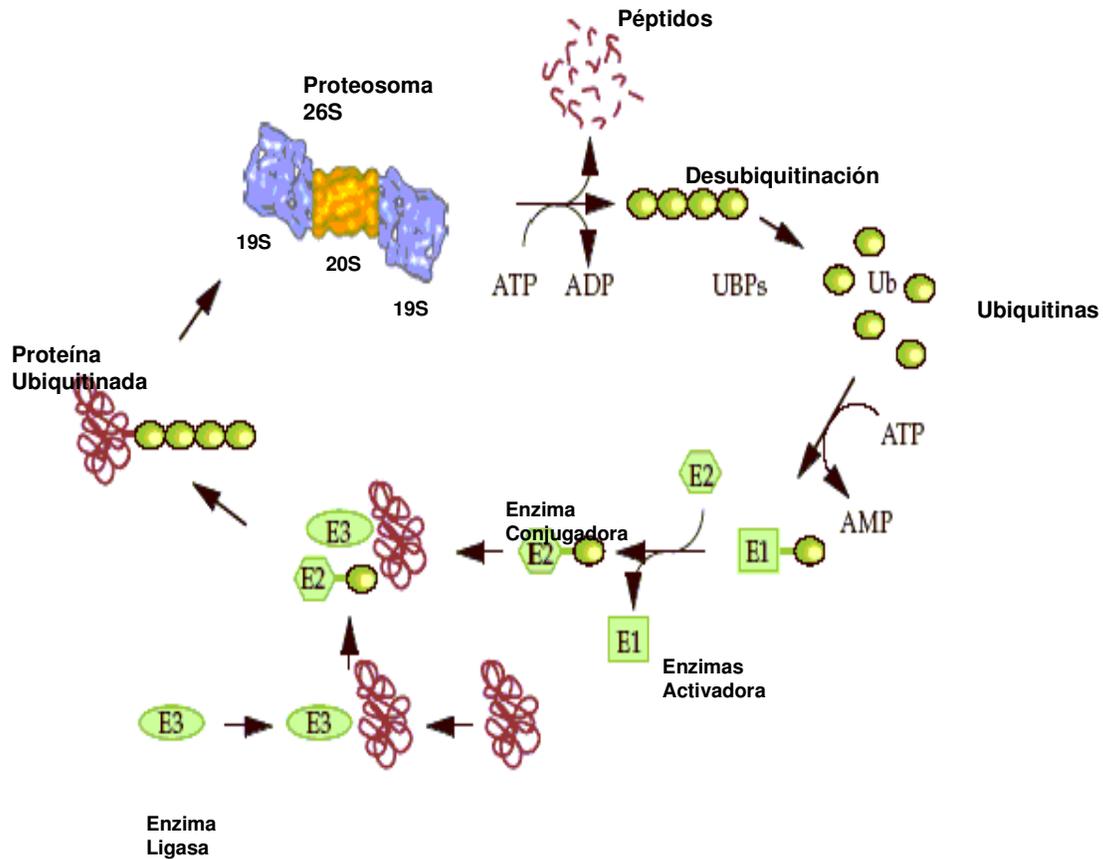


FIGURA 3: Representación esquemática de la vía Ubiquitina-proteosoma

En el proceso de conjugación covalente de la ubiquitina con la proteína sustrato intervienen tres reacciones enzimáticas secuenciales catalizadas por E1, E2 y E3, el sustrato ubiquitinado es reconocido por la subunidad 19S del proteosoma para ser degradado y con el resultante reciclado de monómeros de la ubiquitina por enzimas desubiquitinantes. (Voges y cols. 1999)

El sistema de degradación proteosomal.

Se sabe que las proteínas que han de degradarse por la vía proteosomal presentan una poliubiquitinación, es decir la adición secuencial de un número elevado de moléculas de Ubiquitina que actúan como códigos postales, para

este mecanismo se requiere la energía del ATP, la subunidad 19S actúa como un guardián exigente del paso a las regiones centrales 20S que es la partícula "core" o subunidad proteosomal donde reside la actividad multicatalítica, solo las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ son proteolíticamente activas, en los eucariota las otras subunidades $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 6$ y $\beta 7$ son inactivas, mediante análisis estructural y funcional se ha investigado la especificidad de las subunidades proteosomales hacia cierto grupo de sustratos y la actividad autolítica o catalítica que presentan. Se ha postulado que la actividad o inactividad proteolítica de las subunidades β , depende de los mecanismos de procesamiento y maduración de las mismas, basados en su especificidad los sustratos oligopeptídicos para $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ son la actividad de caspasas, actividad similar a tripsina y actividad similar a quimiotripsina respectivamente. Las células eucariotas generalmente contienen una población heterogénea del complejo 20S que contiene subunidades proteolíticas constitutivas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ y las inmunosubunidades inducibles $\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$ con una composición intermedia entre subunidades constitutivas e inmunosubunidades inducibles (Groll y cols. 1999, 2004, Naujokat y cols. 2007).

Las partícula 19S son unidades reguladoras que reconocen y se unen a la proteína sustrato marcada para la destrucción, se asume que la subunidad 19S desacopla el sustrato y lo ingresa dentro del 20S, tanto para la abertura del canal como para el desacoplamiento del sustrato se requiere energía metabólica por lo que la 19S-RP contiene seis diferentes ATPasas, que están en contacto directo con la subunidad 20S, la función de estas ATPasas es hacer el puente que permita el paso y la traslocación de la proteína que va ser destruida hacia la cavidad proteolítica del 20S (Braun y Glickman 1999, Miller y Gordon 2005, Glickman y Ciechanover 2002), la proteólisis por el proteosoma no es arbitraria, sigue un método. Aunque las unidades catalíticas actúan como endopeptidasas, porque no son las uniones terminales las que se rompen, el modo de acción preferido es por cortes sucesivos comenzando cerca del N-terminal de los residuos de treonina y la proteólisis se lleva a cabo mediante un ataque nucleofílico a las uniones peptídicas y se producen fragmentos de 4-25 aminoácidos con una media de 8 a 9 residuos, al final del proceso los

pequeños polipéptidos generados podrán ser utilizados posteriormente para la síntesis de nuevas proteínas (Groll y cols. 1999, Naujokat y cols. 2007)

El mecanismo general de degradación de las proteínas poliubiquitinadas es:

1.- Reconocimiento y unión del sustrato poliubiquitinado por el receptor en el complejo 19S.

2.- Despliegue mecánico de la proteína sustrato, dependiente de ATP

3.- Introducción de la proteína desplegada en el núcleo 20S, después de haberse desprendido la cadena de poliubiquitina por acción de isopeptidasas

4.-Rompimiento de la proteína en fragmentos de 8 a 9 residuos

5.- Salida de los péptidos por el extremo 19S opuesto

(Miller y Gordon 2005).

Señales de degradación.

Existen señales que determinan que una proteína sea marcada para su destrucción y dichas señales son reconocidas por la vía de la ubiquitina

1. Regla del Amino terminal. Existe una correlación entre la vida media de una proteína y su aminoácido N-terminal. Esta observación dio lugar a la *regla del N-terminal* (N-end rule), mediante la cual se puede predecir la vida de una proteína con base en su residuo N-terminal. Por ejemplo, las proteínas que tienen serina (S) como aminoácido N-terminal tienen vida larga, con vida media de más de 20 horas, mientras que las que tienen ácido aspártico (D) como aminoácido N-terminal, tienen una vida media de sólo 3 minutos. Se desconoce el mecanismo que acopla el reconocimiento del aminoácido N-terminal con la vida media de la proteína (Varshavsky 1997).

2. Ciertas secuencias de aminoácidos parece que son señales de degradación. Una de tales secuencias se conoce como PEST, refiriéndose a secuencias cortas de unos ocho aminoácidos están enriquecidas con Prolina (P), ácido glutámico (E), Serina (S) y Treonina (T). Un ejemplo es el factor de transcripción Gcn4p, proteína de 281 amino ácidos cuya secuencia PEST se encuentra en las posiciones 91-106. La vida media normal de esta proteína es de unos 5 minutos, pero si se elimina la secuencia PEST, la vida media se eleva a 50 minutos.

3. Algunas señales de degradación pueden estar enmascaradas u ocultas si forman parte de interacciones proteína-proteína, o pueden estar enmascaradas por inserción covalente de grupos fosfato o cadenas laterales de ciertos aminoácidos. Ambos mecanismos permitirían así, un mejor control ya que esta señal de degradación sólo necesita ser desenmascarada para que la proteína pueda ser marcada para degradación. Las señales pueden también estar ocultas en el núcleo hidrofóbico. Esto explica el porqué proteínas mutantes o parcialmente plegadas son más propicias para la degradación. Cuando tales proteínas existen en su estado nativo, las señales están ocultas y la proteína tiene vida larga, pero en un estado desplegado, las señales pueden ser detectadas por la maquinaria de la ubiquitina (Cascales 2004).

4. En todas las ciclinas se han localizado secuencias señalizadoras de degradación denominadas cajas de destrucción (destruction box), formadas por nueve aminoácidos RAALGNISN (arginina, alanina, alanina, leucina, glicina, asparragina, isoleucina, serina, asparragina), que se encuentran presentes entre los residuos 13 y 66 de la secuencia proteica.

5. Motivos KFERQ (Lisina, Fenilalanina, Acido glutámico, arginina, Glutamina): son secuencias peptídicas que marcan proteínas citosólicas para proteólisis lisosómica, siendo este motivo una de las señales para que las proteínas entren en los lisosomas. Esta secuencia hace susceptibles de la degradación lisosómica a aquellas proteínas que la presentan en ciertas condiciones de estrés, como puede ser la retirada del suero en cultivos o en tejidos y organismos en inanición (Cascales 2004).

Cuando la degradación proteica se modifica o se inhibe existen diversas repercusiones celulares entre las que destacan la agregación proteica y la formación de agresomas.

La agregación intracelular de proteínas no aparece usualmente dentro de las condiciones fisiológicas normales, a pesar de que las células están produciendo continuamente una gran cantidad de moléculas proteicas, esta observación sugiere que las células poseen un sistema de control de calidad y de reparación o degradación de las proteínas mal plegadas.

Agregación Proteica y Agresomas.

La agregación de proteínas es promovida por condiciones de estrés físico y químico, como son cambios de pH, temperatura, ionicidad o estado redox, esto puede inducir el ensamble parcial de proteínas o empaquetamiento anormal de ellas lo que resulta de la mutación de genes o modificación postranscripcionales (Johnston y cols. 1998).

Los agregados proteicos también pueden ser inducidos por agentes químicos como la Griseofulvina que tienen efectos a nivel de fosforilación, glicosilación y ubiquitinación de proteínas, en general los agregados de proteínas son insolubles y muy estables.

Los agregomas son responsables de lesiones patológicas asociadas con depósitos de proteínas, entre las que reencuentran infecciones virales, enfermedades relacionadas con el metabolismo de proteínas y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Huntington (Kopito y Ron 2000).

Las células eucariotas utilizan dos principales mecanismos en defensa de la integridad celular, el primero de ellos es la promoción del correcto plegamiento por chaperonas moleculares y la segunda es la degradación de las proteínas anormales o mal plegadas por el sistema Ub-Proteosoma, la falla de este mecanismo de control de calidad puede contribuir a la presencia de una patología celular, especialmente en células que no se dividen después de su diferenciación, como las neuronas.

Se ha demostrado que la inhibición del sistema Ubiquitina-Proteosoma afecta adversamente la degradación de proteínas como las citoqueratinas y la importancia de este sistema en la formación de Cuerpos de Mallory, que son agregomas o agregados proteicos asociados con diversas enfermedades humanas (Omary 2000, Fauster y Cadrin 2004)

8.0.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Los efectos tóxicos ejercidos por diferentes agentes metaloides entre los que destaca el Arsénico, se han observado específicamente sobre enzimas y proteínas partícipes en la organización, diferenciación, especialización y división celular así como en la reparación del daño genotóxico. 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, particularmente en respuesta al estrés las proteínas o péptidos tienden a agregarse y esta organización adversa puede ocasionar alteraciones en la funcionalidad y/o estructura correspondiente para lo cual fueron diseñados comprometiendo la viabilidad celular. Varios mecanismos han sido propuestos con los que se pretende entender el daño celular inducido por As y sus repercusiones. Dentro de la heterogeneidad de efectos asociados con la toxicidad ejercida por el arsénico un blanco celular común sin duda son las proteínas. El sistema Ubiquitina-Proteosoma ha sido identificado como la principal herramienta extralisosomal para la degradación proteica por lo que tiene una gran importancia en la regulación de procesos celulares básicos como son, activación del ciclo celular, la apoptosis, transducción de señales, presentación de antígenos, activación de la respuesta inmune, activación de la respuesta inflamatoria, entre otros por lo que es indispensable para el mantenimiento la homeostasis proteica.

Estudios genéticos establecen que la jerarquía de los sitios activos en la degradación proteosomal es la siguiente, la actividad similar a quimiotripsina proveniente de la subunidad $\beta 5$ es la más importante, seguida por la actividad similar a tripsina de la $\beta 2$ y la actividad hidrolasa de la $\beta 1$ es la menos frecuente de las tres (Wolf y cols. 2004).

Por lo anterior y considerando que el arsénico afecta la estructura de proteínas celulares relacionadas con procesos celulares importantes, nos propusimos conocer la capacidad del arsénico *in vivo* de alterar el sistema ubiquitina-proteosoma en el hígado (órgano blanco de los efectos tóxicos ejercidos por el arsénico y el principal en su biotransformación) de ratón, en particular el efecto sobre la capacidad proteolítica semejante a quimiotripsina así como los efectos sobre los niveles de ubiquitina en el hígado expuesto.

9.0.- HIPOTESIS:

El arsenito de sodio es capaz de alterar significativamente la proteólisis no lisosomal similar a quimiotripsina y la síntesis de ubiquitina *in vivo* en el hígado de ratones machos BALB/c administrados con este compuesto.

10.-OBJETIVOS DEL TRABAJO.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los efectos del Arsénico sobre la actividad proteosomal en el hígado de ratones BALB/c.

OBJETIVO ESPECIFICO:

Determinar la capacidad del Arsenito de sodio en el hígado de ratones machos de la cepa BALB/c de alterar la actividad proteosomal utilizando el sustrato específico LLVY_AMC para evaluar la actividad similar a quimiotripsina.

Aislar las subunidad catalítica con actividad similar a quimiotripsina del proteosoma a partir de los homogenados de hígado de ratones BALB/c.

Conocer el efecto del Arsénico sobre la síntesis de ubiquitina en el hígado de ratones mediante análisis por Western blot.

11.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

Para el estudio de los efectos tempranos *in vivo* del arsenito de sodio sobre la vía ubiquitina-proteosoma se desarrolló la siguiente estrategia experimental:

Se trabajó con 8 lotes de 5 ratones machos de la cepa BALB/c de peso entre 21-28g con una edad de 4-6 semanas. A cada lote se les administró durante 9 días, una dosis diaria por vía oral de arsenito de sodio a diferentes concentraciones (Lote 1 (Agua destilada, control negativo), Lote 2: 0.3 mg/Kg, Lote 3: 0.6 mg/Kg, Lote 4: 1.25 mg/Kg, Lote 5: 2.5 mg/Kg y Lote 6: 5.0 mg/Kg y como control positivo lote 7: 2.5 mgGris/Kg y Lote 8: 5.0 mgGris/Kg).

Determinación de la Actividad proteosomal.

Los Homogenados del hígado se prepararon con 1 ml de amortiguador (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP-40 (Sigma Aldrich Chemical, St.Louis Missouri). Cada reacción contenía 3µg de proteína de los homogenados. El sustrato específico del proteosoma LLVY-AMC (Boston Biochem) tendrá una concentración final de 10µM. Cada ensayo se incubó 30min a 37°C y la fluorescencia se determinó utilizando filtros de excitación de 360/460λ de emisión.

Considerando que en los ensayos anteriores en los que utilizamos el homogenado crudo del tejido pudieran estar presentes proteasas con actividad similar a quimiotripsina, decidimos aislar las subunidades proteosomales mediante gradientes de glicerol (Bardag-Gorce y cols, 2002) A continuación se indica brevemente como se realizó.

Aislamiento del proteosoma 26S y su caracterización.

El proteosoma 26S se purificó a partir de hígado fresco, los homogenados se fraccionaron con gradientes de glicerol (10-40%), en un buffer de aislamiento del proteosoma (500mM de Tris-HCl pH= 7.5, 100 mM de ATP, 50mM de MgCl₂ y 50mM de DTT (Sigma Aldrich Chemical, St. Louis Missouri), se centrifugó a 27,000rpm durante 22 horas a 4°C. Con objeto de caracterizar las fracciones obtenidas de los gradientes de la ultra centrifugación, se realizaron análisis de western blot y para ello primeramente se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se preparó la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se procedió a la inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos para el proteosoma dirigidos contra la subunidad alfa de la subunidad 20S acoplados a peroxidasa (Zymed^R Laboratories, invitrogen immunodetection). El cromógeno de revelado fue la diaminobencidina (DAB).

Se evaluó la actividad de cada fracción obtenida utilizando 3 µg de proteína total siguiendo el método anteriormente descrito.

Ubiquitinación.

Para caracterizar la síntesis de ubiquitina en los ratones tratados con arsenito de sodio, una vez transcurrido el periodo de tratamiento, el hígado fresco se homogenizó en un buffer lisis de ubiquitinación (10mM Tris-HCl pH=7.4, 10µg/ml Leupeptina, 10µg/ml Aprotinina, 10µg/ml inhibidor de tripsina, 1mMPMSF, 10mM NEM y NP-40 al 1%; Sigma Aldrich Chemical, St. Louis Missouri), y se procedió a la inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos para ubiquitina acoplada a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) y el cromógeno de revelado fue la diaminobencidina (DAB).

12.- RESULTADOS:

En el presente trabajo nos propusimos conocer el efecto que tiene el arsénico conocido carcinógeno humano en el sistema ubiquitina-proteosoma específicamente sobre la actividad similar a quimiotripsina en el hígado de ratón expuesto a diferentes dosis de arsenito de sodio.

Para alcanzar los objetivos planteados abordamos el estudio de este sistema Ubiquitina-Proteosoma desde dos perspectivas, primeramente evaluamos la actividad similar a quimiotripsina en el proteosoma 26S en homogenados crudos de hígado de ratones BALB/c expuestos a arsenito de sodio y en fracciones proteosomales purificadas obtenidas por gradiente de glicerol. Por otro lado caracterizamos la síntesis de ubiquitina después de la administración subcrónica de Arsenito de sodio. La caracterización del funcionamiento proteosomal y de la síntesis de algunos de sus componentes nos permitió estimar su actividad *in vivo* en organismos expuestos diariamente al arsénico.

En la figura 4 se presentan los resultados obtenidos de los ensayos enzimáticos realizados con los homogenados de hígado para establecer las condiciones de trabajo se utilizaron 40 µg de proteína total que se incubó con 10 µM de LLVY-AMC, sustrato específico del proteosoma con actividad similar a quimiotripsina durante 30 y 60 minutos.

Se realizaron ensayos previos con objeto de asegurar que la cantidad del sustrato no fuera un factor limitante en la reacción se probaron diferentes concentraciones de sustrato.

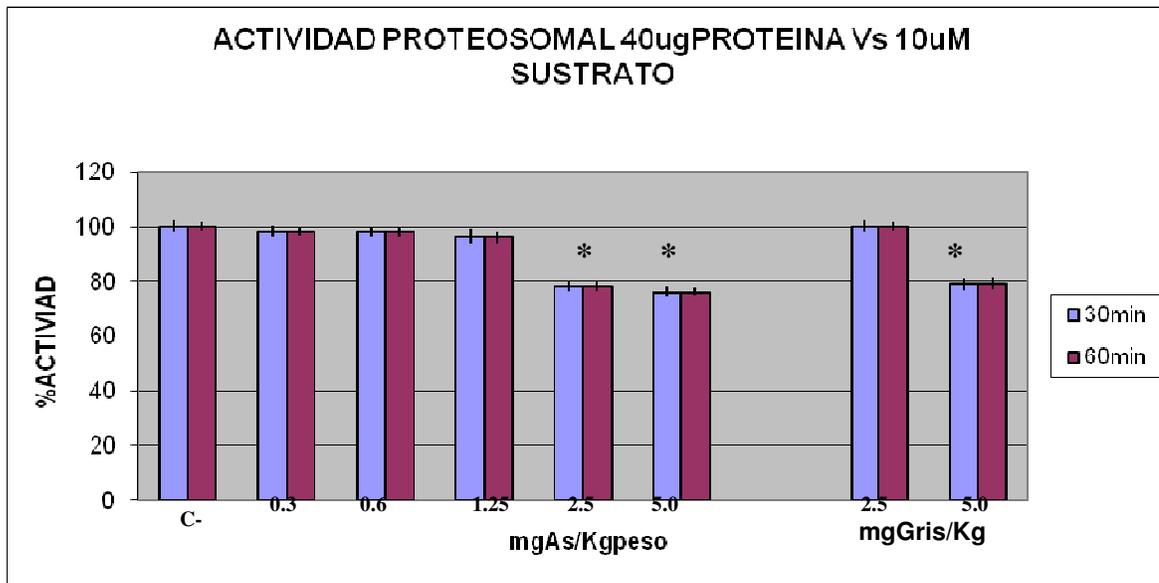


Figura 4: Actividad proteosomal similar a quimiotripsina en homogenados de hígado de ratón BALB/c tratados con diferentes concentraciones de Arsenito de sodio y griseofulvina.

**diferencias estadísticamente significativas con respecto al control*

(ANOVA $P < 0.05$; $F = 4.8$).

Los resultados mostraron que solo en las concentraciones de 2.5 y 5.0 mg/kg de peso el arsenito de sodio fue capaz de inhibir significativamente la actividad proteosomal hasta un 31% respecto al control negativo. La inhibición fue similar cuantitativamente a la que se observó para griseofulvina 5.0 mg/kg.

Una vez estandarizada la metodología y considerando que en el extracto crudo de hígado puedan existir proteasas con actividad similar a quimiotripsina procedimos al aislamiento de las fracciones proteosomales mediante gradientes de glicerol (10-40% de glicerol). Este es un método utilizado para purificar parcialmente el proteosoma 26S de extractos celulares (Seeger y cols. 1996, Bardag-Gorce 2002). Las 40 fracciones del hígado de cada uno de los ratones tratados fueron colectadas de mililitro en mililitro (Bardag-Gorce 2004).

Para conocer la concentración de proteínas presentes en cada una de las fracciones proteosomales extraídas con gradientes de glicerol se realizó su cuantificación mediante el método de Bradford. Observando que las concentraciones mas altas de proteínas se encontraron en las primeras fracciones de extracción (Fracciones 1- 13) correspondientes a 10-20% de glicerol.



Figura 5: Promedio de la concentración de proteínas en $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Bradford 1976) de cada una de las 40 fracciones extraídas del hígado de ratón por medio de gradientes de glicerol.

Reportes previos sugieren que durante el aislamiento proteosomal mediante gradientes de glicerol la fracción proteosomal catalítica se encuentra en las fracciones correspondientes al 30-40% de glicerol (Bardag-Gorce y cols 2002 y 2004).

Como se puede observar la actividad proteosomal similar a quimiotripsina es mayor cuando la cantidad de proteínas es más baja en las fracciones 21-40 (Figura 5 y 6).

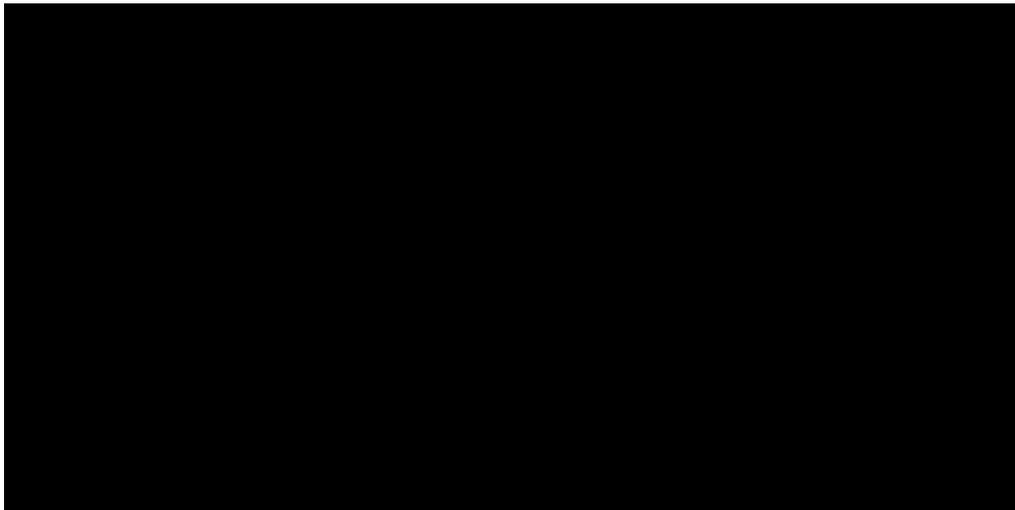


Figura 6: Actividad proteosomal en Unidades de fluorescencia, de cada una de las 40 fracciones extraídas por medio de gradientes de glicerol.

Para estimar la actividad proteosomal promedio observada en el hígado de ratones expuestos a las diferentes concentraciones de arsenito de sodio, decidimos considerar el intervalo de las fracciones (F21- F40) y de esta manera la actividad enzimática medida sería atribuida directamente al proteosoma y no a otras enzimas con actividad similar (Actividad de quimiotripsina) que pudieran estar presentes en el homogenado hepático.

Esta decisión está apoyada en reportes previos los cuales muestran que durante el aislamiento del proteosoma, la fracción proteosomal 26S se encuentran en los gradientes con más alta densidad. Estas evidencias muestran que las fracciones catalíticas se encuentran en los gradientes de glicerol entre 30 y 40%, es decir en el intervalo de las fracciones 27-35 (Bardag-Gorce y cols 2002 y 2004).

En la figura 7 se muestra el promedio de la actividad enzimática similar a quimiotripsina de cada una de las fracciones (21 al 40) extraídos del hígado de los ratones tratados con arsenito de sodio y con griseofulvina. Encontrando que la actividad proteosomal se ve disminuida significativamente por el Arsénico. La inhibición significativa respecto al control es dependiente de la dosis de exposición a partir de la 2.5 mg/kg de arsenito de sodio. En las dosis 0.3-1.25 mg/kg se observó ligeramente una disminución en esta actividad sin llegar a ser significativa.

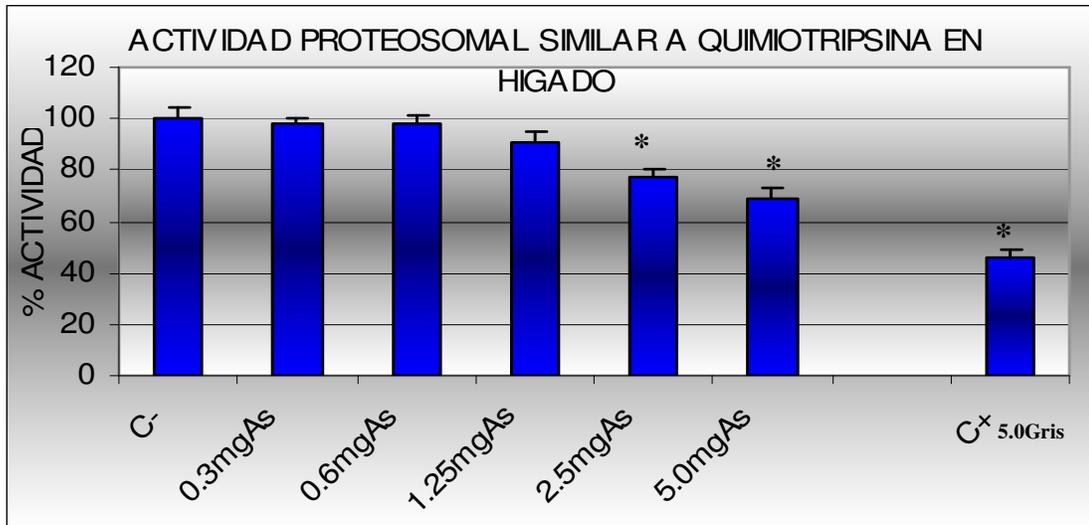


Figura 7.- Actividad proteosomal similar a quimi tripsina en fracciones proteosomales de hígado de ratones BALB/c tratados con diferentes concentraciones de Arsenito de sodio y griseofulvina. La actividad enzimática en las fracciones se evaluó por análisis fluorométrico, utilizando para ello un sustrato específico con actividad similar a quimi tripsina (LLVY-AMC).

**diferencias estadísticamente significativas con respecto al control*

(ANOVA $P < 0.05$; $F = 4.8$).

Durante el ensamble proteosomal convergen diferentes subunidades proteicas y su correcto ensamble es indispensable en la regulación del reconocimiento, ingreso y degradación de sustratos al proteosoma. Las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 1$ han sido reportadas como las responsables del ensamble del proteosoma 20S y de la formación del anillo heptamérico y cambios en esta conformación puede afectar la asociación de las subunidades 20S y 19S (Bardag-Gorce y cols 2004).

Con objeto de conocer si en las fracciones proteosomales obtenidas con gradientes de glicerol (21-40) la subunidad α estaba presente, se identificaron utilizando anticuerpos específicos para ellas.

En tabla 1 se observa el anticuerpo que reconoce específicamente subunidades alfa del proteosoma 20S en todos los tratamientos. Cabe resaltar que en todos los casos a excepción del control positivo (griseofulvina), se detectaron 2 bandas de diferente peso molecular. El anticuerpo empleado reconoce subunidades ensambladas y no ensambladas lo que nos estaría

sugiriendo que el sistema proteosomal en respuesta a la exposición a arsenito de sodio favorece el reclutamiento de las subunidades α .

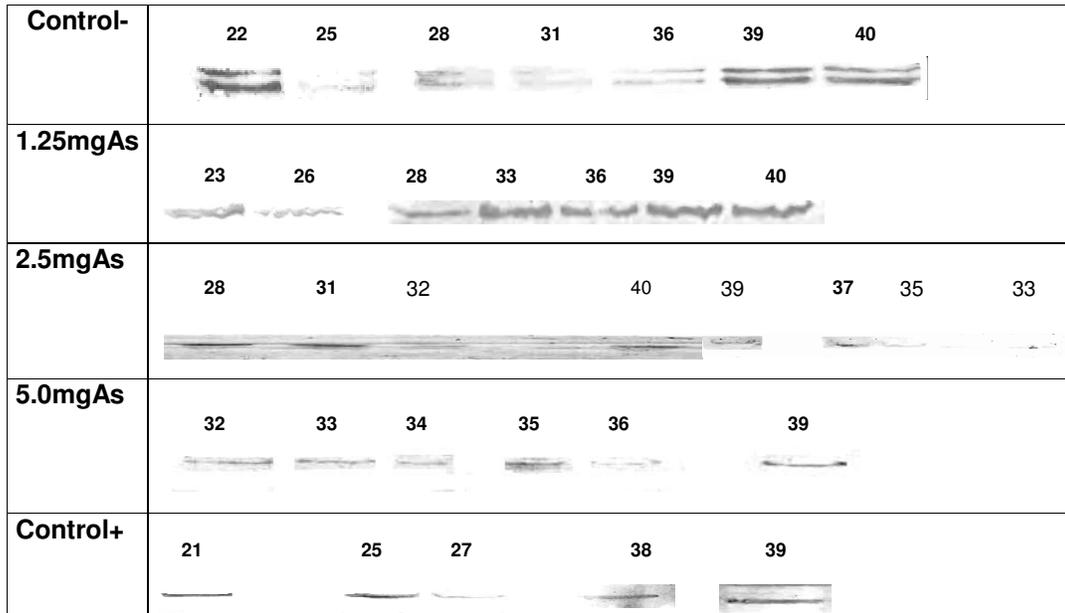


TABLA I.- Caracterización mediante el análisis de Western blot de las fracciones hepáticas proteosomales de ratones de la cepa BALB/c expuestos durante 9 días a dosis orales diarias de Arsenito de sodio (1.25-5.0 mg/Kg). Las fracciones se obtuvieron por su separación en gradientes de glicerol.

Una vez evaluada la actividad proteosomal, procedimos a caracterizar la síntesis de Ubiquitina por western blott y se hizo la densitometría de los homogenados hepáticos obtenidos de cada una de las dosis administradas de arsenito de sodio, En la tabla 2 observamos que la síntesis de ubiquitina en el hígado de los ratones expuestos a arsenito de sodio no se modifica con ninguna dosis de exposición en comparación con el control negativo.

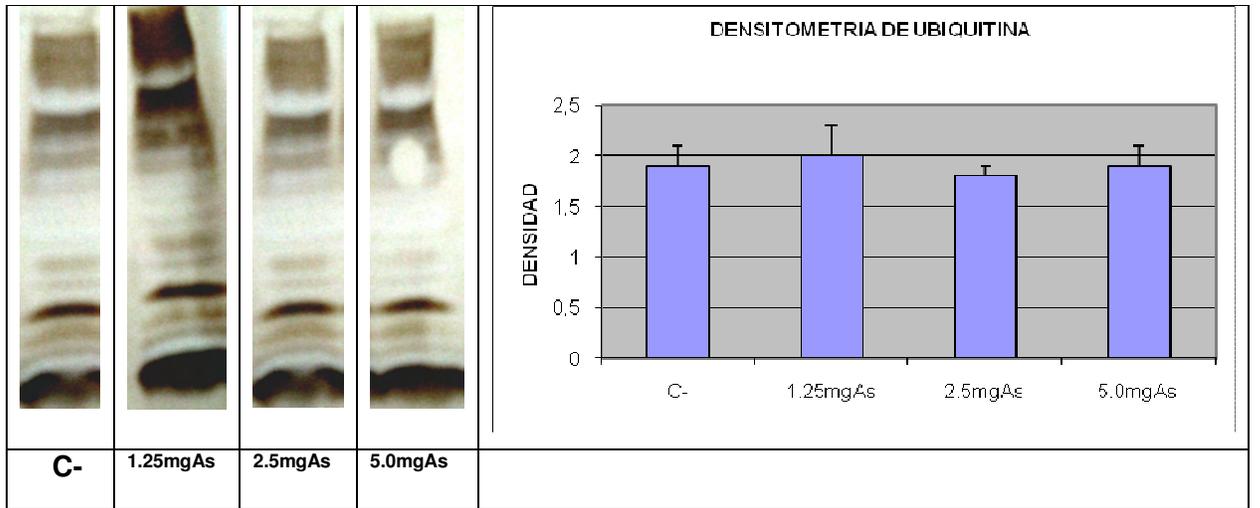


Tabla 2: Análisis de la densitometría del Western blot de Ubiquitina de los homogenados del hígado de ratón.

13.-DISCUSIÓN:

El destino final de una gran mayoría de proteínas mal plegadas, no funcionales o proteínas cuya vida media se ha extinguido es la degradación selectiva en el proteosoma dependiente de Ubiquitina, sistema enzimático esencial para la vida.

Para asegurar la degradación eficiente de una proteína por el sistema Ubiquitina-Proteosoma, es indispensable el buen funcionamiento de cada uno de los componentes que lo integran y que activarán el procesamiento encaminado para su poliubiquitinación y degradación del sustrato por el complejo proteosomal, cuyos componentes se regulan jerárquicamente y cuando alguno de estos componentes se ven afectados ya sea por factores extracelulares o intracelulares, este mecanismo de proteólisis no lisosomal se compromete poniendo en riesgo el equilibrio protéico.

En este trabajo los resultados mostraron que el arsénico es capaz de inhibir significativamente la actividad proteosomal similar a quimiotripsina *in vivo* en el hígado de ratones BALB/c.

Dado que el proteosoma es un sistema enzimático dependiente de ATP y con diversos blancos en su estructura y función, nuestros resultados son relevantes si consideramos que el 90% de la degradación proteosomal en la célula se genera a través de la subunidad β 5 con actividad similar a quimiotripsina.

Los resultados de este estudio *in vivo*, muestran que en el hígado de los ratones expuestos a arsénico, la actividad proteosomal específicamente la actividad similar a quimiotripsina se modificó considerablemente y este efecto está relacionado con la dosis administrada de arsénico, estos resultados fueron observados en las dosis de arsenito de sodio que van de 2.5 y 5.0 mgAs/Kg peso, donde la mayor inhibición proteosomal se observó en 5.0 mgAs/Kg, encontrándose que se inhibe la actividad proteosomal similar a quimiotripsina hasta en un 31% con respecto al control negativo.

Situación que el arsénico puede estar originando por inhibición directa sobre la actividad similar a quimiotripsina en el proteosoma ya que inhibe específica y extensamente esta función en el hígado (Bardag-Gorce y cols. 1999), existen evidencias que indican que el arsénico tiene efectos sobre la síntesis y función enzimática alterando la cascada de las MAPK (Bredfeldt y cols. 2004) entre otras.

Considerando que los metabolitos metilados generados durante la biotransformación del arsénico se han asociado con una toxicidad mayor respecto a la especie inorgánica trivalente (Liu y cols. 2002), cabría la posibilidad que en las dosis significativamente inhibitorias de la actividad proteosomal en el hígado de ratón expuestos durante nueve días; las especies reactivas de oxígeno formadas durante la bioactivación (Miller y Gordón 2005) ejerzan daño directo sobre diversas estructuras proteosomales comprometiendo su función.

Cabe mencionar que en las concentraciones administradas de arsenito de sodio de 0.3 , 0.6 y 1.25 mgAs/Kg peso no se encontró un efecto inhibitorio significativo de la actividad proteosomal en el hígado de ratones de la cepa BALB/c con respecto a los lotes control negativo, tomando en cuenta que se trabajó sobre con un sistema vivo podemos decir que probablemente a estas concentraciones de arsenito de sodio el tejido pone en marcha mecanismos celulares capaces de contrarrestar los efectos tóxicos inducidos por este metaloide (arsenato reductasas, transportadores de fosfato, GSH y otros antioxidantes) (Liu y cols. 2002).

En el caso de exposición a arsénico la proteína asociada a la resistencia a multi drogas (MDRP) secuestra al As libre o conjugado con glutatión u otros tioles (Rosen 2002). En el caso de la remoción de proteínas por el proteosoma, hay evidencias que sugieren que la inactivación del gen *aip-1* en *C. elegans* compromete la sobrevivencia del parásito expuesto a arsenito pero esto no sucede con otros agentes tóxicos. El producto de la transcripción de este gen produce un componente conocido como AIRAP (Arsenite-inducible, cysteine- and histidine-rich RNA-associated protein) que se asocia a la partícula 19S. Esta asociación le confiere facilidad de tránsito por la subunidad 19S del proteosoma de los sustratos (proteínas dañadas y no funcionales) al interior de la partícula 20S del proteosoma promoviendo su degradación, por lo que se ha propuesto que en estos organismos expuestos a arsénico el proteosoma promueve una capacidad adaptativa frente al tóxico (Stanhill y cols 2006)

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo podemos decir que la susceptibilidad del sistema proteosomal a los efectos ejercidos por el arsénico

es alta, en particular hacia la función catalítica similar a quimi tripsina. Ya que la dosis máxima (5.0 mgAs/kg) administrada diariamente a ratones BALB/c es 4 veces menor que la dosis letal (DL₅₀) en ratón y rata en intoxicaciones agudas. Aunque las concentraciones menores de arsenito de sodio administradas (0.3, 0.6 y 1.25 mgAs/Kg) no fueron significativas en la inhibición de la subunidad β5, si existió una tendencia a disminuir esta actividad. Durante el período de exposición (9 días) los mecanismos de desintoxicación del hígado quizá no resultaron suficientes en las dosis más altas de arsénico (2.5 y 5.0 mgAs/Kg peso), puesto que en éstas si se afecta considerablemente la actividad proteosomal

Probablemente la afectación en alguna proporción de la estructura y actividad de componentes útiles en el reconocimiento proteosomal dependiente de ubiquitina en el hígado, se este dando pero no se ve reflejado al momento de su cuantificación.

Considerando que el arsénico es principalmente biotransformado en el hígado, son varios los autores que sugieren que el metabolismo del As entre interespecies e intraespecies es diferente probablemente por el polimorfismo en las enzimas metilantes lo que incrementa la variación interindividual en el metabolismo de los Arsenicales en el hígado (Drobná y cols 2004). Por otro lado se han identificado también diferencias tejido-específicas en cuanto a la susceptibilidad a los efectos tóxicos del arsénico (Rossi y Loda 2002), no será raro pensar que la actividad proteosomal en cada tejido podría presentar diferencias considerables. Estudios experimentales con animales de laboratorio muestran que los factores que pueden estar involucrados en estas pueden ser: la dosis de exposición, ruta de administración, tiempo de administración, especie química del arsénico administrado y estado nutricional que puede influenciar la metilación del As, en humanos además se sabe que la edad y el embarazo puede influenciar la metilación de As (Vahter 2002).

La ubiquitinación, el primer paso para que se lleve a cabo la degradación no lisosomal, esta controlada por las enzimas ubiquitin ligasas que a su vez permiten o no el marcaje (poliubiquitinación) de los sustratos protéicos que van a ser eliminados por el proteosoma 26S, estudios anteriores sugieren que

proteínas poliubiquitinadas podrían estar acumuladas cuando los proteosomas sufren alteraciones significativas (Bardag-Gorce 2002).

Kirkpatrick en 2003, mostró que el As^{III} inhibe significativamente el proceso de ubiquitinación protéica, aunado a esto han sugerido que en células renales cuando el As^{III} afecta la vía Ub-Proteosoma se alteran también los niveles y patrones de ubiquitinación de proteínas con consecuencias críticas para la célula y que además este efecto se presenta o no dependiendo de la concentración administrada de arsénico (Kirkpatrick y cols. 2003).

En este trabajo encontramos que a pesar de que se afecta significativamente la actividad proteosomal semejante a quimiotripsina (Figura 6) no se observó, al menos por Western blot cambios en cuanto a la síntesis de Ubiquitina (Tabla 2) en el hígado de los ratones tratados a estas concentraciones de arsenito de sodio con respecto a los ratones control negativo, cabe mencionar que los estudios en donde se ha relacionado un aumento en la presencia de proteínas ubiquitinadas con una falla en el sistema proteosomal 26S ha sido en modelos *in vitro* (Kirkpatrick y cols. 2003), en este estudio hemos de considerar que el mecanismo de degradación proteosomal en un sistema *in vivo* es mucho más complejo.

Creemos que sería útil conocer realmente la capacidad de la ubiquitina para reconocer sustratos degradables por el sistema proteosomal, así como la expresión de la proteína en el tejido expuesto a arsénico. La dependencia de una gran variedad de componentes durante la ubiquitinación es un proceso complejo que, debe ser estudiado dada su importancia en el recambio protéico.

Tomando en cuenta lo anterior sabemos que aun hay mucho camino por recorrer antes de conocer todas las respuesta sobre la relación de la actividad proteosomal y el sistema de ubiquitinación en exposiciones a arsénico y a otros agentes ya que la acumulación de conjugados ubiquitina-proteína no es limitada a la exposición de arsénico trivalente, sino también se ha asociado este efecto a exposiciones con Cd^{2+} y H_2O_2 (Bredfeldt y cols. 2004).

14.- CONCLUSIONES:

El arsenito de sodio inhibe la actividad proteosomal similar a quimiotripsina en el hígado de ratones machos de la cepa BALB/c y este efecto es dependiente de las dosis administradas de arsénico, encontrándose que en las dosis de 5.0 mgAs/Kg se inhibe la actividad proteosomal similar a quimiotripsina hasta en un 31% con respecto al control negativo.

No se observó ningún efecto en cuanto a la síntesis de ubiquitina en el hígado de ratones machos de la cepa BALB/c tratados con diferentes dosis de arsenito de sodio.

15.- COMENTARIOS Y PERSPECTIVAS:

En el presente estudio conocimos los efectos inhibitorios *in vivo* del arsénico sobre la actividad proteolítica no lisosomal (específicamente la actividad semejante a quimiotripsina) y evaluamos la síntesis de ubiquitina a diferentes dosis administradas de arsenito de sodio.

Pretendemos con el desarrollo de este trabajo de investigación sentar las bases en el estudio de las alteraciones celulares inducidas por el arsénico, en las que se compromete la integridad protéica de órganos blanco como el hígado durante exposiciones *in vitro e in vivo*.

Su función no se limita a la homeostasis protéica, existen evidencias que sugieren la posibilidad de que el sistema proteosomal esté involucrado en la remoción de proteínas constituyentes de aductos con el DNA.

Abundar en el estudio de los mecanismos de acción del arsénico relacionados con la homeostasis protéica en el hígado, es de suma importancia considerando que no se conoce el mecanismo preciso mediante el cual el arsénico genera los efectos tóxicos en las células blanco, incluyendo el efecto de inhibición proteosomal, efectos celulares que pueden estar relacionados con diversos mecanismos moleculares asociados con los signos y síntomas observados en exposiciones crónicas o agudas al metaloide, cuando proteínas celulares están comprometidas en estructura y actividad, el sistema Ub-proteosoma es fundamental para el adecuado funcionamiento de la célula, por lo que su alteración implicaría falla en la regulación y muerte celular y explicaría mucho de los hallazgos en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas y cáncer ya que, se ha establecido que el proteosoma tiene un papel importante en la patogénesis de estas enfermedades(Wójcik y DeMartino 2003).

Este es solo el principio de una serie de estudios que nos permitirán establecer la manera en que el arsénico afecta el sistema proteolítico no lisosomal ubiquitina - proteosoma y su relación con los efectos hepatotóxicos, ya que para dar una respuesta precisa es necesario evaluar el efecto de este agente sobre todo el complejo proteosomal, como es evaluando el efecto del As sobre las enzimas ubiquitinizantes-desubiquitinizantes y sobre las otras actividades

catalíticas del proteosoma, ya que además de la actividad similar a quimiotripsina (evaluada en este proyecto), el proteosoma 20S cuenta también con la actividad de hidrolasas y la actividad similar a tripsina en las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$, determinar también si al afectarse la actividad similar a quimiotripsina se afecta toda la actividad proteolítica del sistema Ub-Proteosoma, será por demás interesante también estudiar el efecto del As sobre las enzimas ubiquitinizantes E1, E2 y E3 con el fin de complementar la información obtenida en este trabajo y de esta manera abundar en los mecanismos de acción del arsénico cuando se alteran biomoléculas fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis celular como son las proteínas.

Habría que estudiar la relación que existe de los efectos observados en nuestro trabajo con la función y estructura de proteínas partícipes en la regulación de diversos fenómenos celulares incluyendo la progresión del propio ciclo celular, la supervivencia celular y obviamente la homeostasis celular, pues en muchos casos estos efectos se han asociado con los efectos tóxicos del arsénico (Bredfeldt y cols. 2004, Kirkpatrick y cols. 2003).

16.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Andrew S., Angeline S., Karagas R., Margaret R., and Hamilton W., Decreased DNA repair gene expression among individuals exposed to Arsenic in United States drinking water., *Int. J. Cancer.*, **104**:263–268., 2003.

Bardag-Gorce F., Veyrat-Durebex C., Brian Yves and Briand M., Changes in 20S Proteasome activity during ageing of the LOU rat., Université Blaise Pascal Clermont 2., *Molecular Biology.*, **26**: 89-93., 1999.

Bardag-Gorce F., Riley N., Nguyen V., French, S., McPahul W., Lue Y., French S., The role of ubiquitin-proteasome pathway in the formation of Mallory Bodies., *Exp. Mol Pathol.*, **73**:75-83., 2002.

Bardag-Gorce F., Riley N., French S., Li Jun., The proteasome inhibitor, PS-341, causes cytokeratin aggresome formation., *Experimental and Molecular Pathology.*, **76** : 9 – 16., 2004.

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

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

Bence N., Sampat R., and Kopito R., Impairment of the ubiquitin system by protein aggregation., *Science.*, **292**:1552-1555., 2001.

Braun B., Glickman M., Kraft R., Dahlmann B., Kloetzel P., Finley D., Schmidt M., The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity., *Nat. Cell Biol.*, **1** :221–226., 1999.

Bredfeldt TG., Gandolfi AJ., Effects of arsenite on UROtsa cells., *Toxicology and Pharmacology.*, **198**,412-418., 2004.

Carbonell B A., Carbonell B M., Beneyto M., Arsénico en el sistema Suelo-Planta: Significado ambiental., Universidad Alicante., Editorial.Espagráfica., España 1995.

Carrard G., Raes M., Toussaint O., Friguet B., Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes., The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, **35**: 728-739., 2003.

Cascales A M., Real academia Nacional de Farmacia., Vía de la Ubiquitina – Proteosoma., Anal Real Acad. Nac. Farm., **69**: 43-70., 2004.

Ciechanover A., The ubiquitina-proteasome proteolytic pathway., Cell, 79: 13-21., 1994.

Drobna Z., Waters S., Waltona F., LeCluysec E., Thomas D., Styblo M., Interindividual variation in the metabolism of arsenic in cultured primary human hepatocytes., Toxicology and Applied Pharmacology ., **201** :166– 177., 2004.

Fausther M., Cadrin M., Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice., Comparative Hepatology., 3-5., 2004.

Ferrell K., Wilkinson C., Dubiel W., Gordon C., Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem., Reviews. TIBS., 25-February 2000.

Gao M., Karin M., Regulating the regulators: Control of protein ubiquitination and Ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli., Molecular Cell., **19**:581-593., 2005.

Glickman M. and Ciechanover A., The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction., Physiol. Rev., **82**: 373-428., 2002.

Gonsebatt ME., Del Razo LM., Cerbon MA., Zuñiga O., Sanchez-Peña L.C., Ramirez P., Arsenite Induced oxidative damage in Mouse liver is associated with increased cytokeratin 18 expression., Arch. Toxicol., **81**:619-626., 2007.

Goering P.L., Aposhian H.V., Mass M.G., Cebrián M., The Enigma of Arsenic Carcinogenesis: Role of Metabolism. Toxicological. Science. **49**:5-14. 1999

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

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

Guha Mazumder., Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on liver. Toxicology and applied pharmacology ., **206**: 169-175. 2005

Harper E., Schulman AB., Structural complexity in ubiquitin recognition., Cell., **124**:March 24., 2006.

Hartmann-Petersen R., Gordon C., Protein Degradation: Recognition of Ubiquitinated Substrates Dispatch., Current Biology., Vol. **14**: R754–R756, © Elsevier Ltd., 2004.

Hershko A. and Ciechanover A., The ubiquitin system for protein degradation., Annu. Rev. Biochem., **61**:761–807., 1992.

Hershko A. and Ciechanover A., The ubiquitin system., Annu. Rev Biochem., **67**: 425-479., 1998.

Hershko A., Ubiquitin-mediated protein degradation., J. Biol. Chem. **263**: 15237–15240., 1998.

Hopenhayn-Rich C., Biggs ML., Fuchs A., Bergoglio R., Tello E., Smith A., Bladder cancer mortality Associates with Arsenic in Drinking Water in Argentina. Epidemiology ., **7**: 117-124., 1996.

Hughes M., Kenyon E., Edwards B., Mitchell C., Thomas D., Strain-dependent disposition of inorganic arsenic in the mouse., Toxicology ., **137** :95–108., 1999.

Hughes M., Arsenic toxicity and potential mechanisms of action., Toxicol Lett **133**:1-16., 2002.

Johnston J., Ward C., Kopito R., Agresomas cellular response to misfolded proteins., J Cell Biol ., **143**:1883-1898., 1998.

Kaiser and Huang., Review, Global approaches to understanding ubiquitination., Genome Biology., **6**:233., 2005.

Kirkpatrick D., Gandolfi., Low-level arsenite causes accumulation of ubiquitinated proteins in rabbit renal cortical slices and HEK293 cells., Toxicology and Applied Pharmacology., **186**: 101-109., 2003.

Kitchin K., Ahmad S., Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis., Toxicol Lett ., **137**:3-13., 2003.

Kopito R., Ron D., Conformational disease. Nature Cell Biol., **2**:207-209., 2000.

Koster A., Walz J., Lupas A., Baumeister W., Structural features of archaebacterial and eukaryotic proteasomes., Mol. Biol. Rep., **21**:11–20.,1995.

Li Chen .,Kiran M., Increased Proteasome Activity, Ubiquitin-Conjugating Enzymes, and eEF1A Translation Factor Detected in Breast Cancer Tissue., Cancer Res ., **65**: 13-21., 2005.

Liu J., zheng B., Aposhian H., Zhou Y., Chen M-L., Zhang A., Waalkes MP., Chronic arsenic poisoning from burning high-arsenic-containing coal in guizhou, China., Environ Health Perspect., **110**: 328-330. ,2002.

López-Araiza Hugo, Lira Irma.,Vida y muerte de las proteínas.Departamento de ciencias de la salud y Biología. UAM-México DF.2002

Mandal B., Suzuki K., Arsenic round the World: a review., *Talanta* 58: 201-235., 2002.

Miller J., Gordon C.,The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins., Minireview,FEBS Letters ., **579** ;3224–3230.,2005.

Muños O., Diaz O., Leyton I., Núñez N., Devesa V., Suner A., Velez D., montoro R., Vegetables collected in the cultivated andean area of Northern Chile: total and inorganic arsenic contents in raw vegetables., J Agric Food Chem., **50**:642-647., 2005.

Naujokat C., Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition., Biochim. Biophys. Acta.,**10**.1016: 1-8., 2007

Neriah Yinon Ben., Regulatory functions of Ubiquitination in the immune system. Revuiew., Nature., **3**: 20-26., 2002.

Omary K., Keratins turn over by Ubiquitin in a phosphorylation-modulated fashion., J. Cell Biol .,**149**: 547-552., 2000.

Petrick J., Ayala-Fierro F., Cullen W., Carter D., Aposhian V., Monomethylarsonous acid (MMA III) is more toxic than Arsenite in chang human hepatocytes., Toxicol Appl. Pharmacol., **163**, 203-207., 2000.

Petrick J., Jagadish B., Mash E., Aposhian V., Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD(50) in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase., Chem Res Toxicol **14**:651-656., 2001.

Riley N., Li J., Bardag-Gorce F., Lue Y., French S., Heat shock proteins are present in Mallory bodies (cytokeratin aggresomes) In human liver biopsy specimens. Exp., Molec. Pathol., **74**:168-172., 2003.

Riley, N., Mc Phaul L., French S., Heat shock proteins ans Mallory bodies (cytokeratin aggresomes) in human liver biopsies., Mol. Biol. Cell., **12**, 390., 2001.

Rossi S., Loda M., Review The role of the ubiquitination-proteasome pathway inbreast cancer, Use of mouse models for analyzing ubiquitination processes., Breast Cancer Research., **5**:16-22., 2002.

Rosen B., Biochemistry of arsenic detoxification., Minireview FEBS Letters., **529**: 86-92., 2002.

Seeger M., Gordon C., Ferrell K., Dubiel W., Characteristics of 26 S Proteases from Fission Yeast Mutants, which Arrest in Mitosis., J. Mol. Biol., **263**: 423–431.,1996.

Stanhill A., Haynes C., Yuhong Z., Min G., Matthew C., Steele J.,An Arsenite-Inducible 19S Regulatory Particle-Associated Protein Adapts proteasomes to Proteotoxicity., Molecular Cell **23**: 875–885., 2006.

Steinmaus C., Yuana Y., Smith A.,The temporal stability of arsenic oncentrations in well water in western Nevada ., Environmental Research., **99** :164–168., 2005.

Styblo M., Delraza LM., Vega L., Germolec DR., Comparative tocity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human., cells.,**74**, 289-299., 2000.

Vahter M., Marfante E., Dencker L., Tissue distribution and retention of 74 As-dimethylarsinic acid in mice and rats., Arch. Environ. Contam. Toxicol. Lett., **37**, 41-46.,1984.

Vahter M., Mechanisms of arsenic biotransformation.Toxicology ., **181-182**:211-217., 2002.

Varshavsky A.,The N-end rule pathway of protein degradation., Genes Cells **2**: 13-28.,1997.

Voges D., Zwickl P., Baumeister W., The 26S Proteasome: A Molecular Machine designed for controlled proteolysis., Annu. Rev. Biochem., **68**:1015–1068., 1999.

Wilkinson C., Wallace M., Morphew M., Perry P., Allshire R., McIntosh R., Gordon C., Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast., The EMBO Journal ., **17**: 6465-6476., 1998.

Wilkinson C., Wallace M., Seeger M., Dubiel W., Gordon C., Mts4 a non-ATPase subunit of the 26S protease in fission yeast is essential for mitosis and interacts directly with the ATPase subunit Mts2., J. Biol. Chem., **272**:25768–25777., 1997.

Wilkinson C., New tricks for ubiquitin and friends., Cell Biology., **12**: 545-547., 2002.

Wilkinson C., Ubiquitin: Anobel protein., Cell., **119**: 741-745., 2004.

Wolf D., Hilt W., The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal., Biochimica et Biophysica Acta., **1695**:9-31, 2004.

Wójcik C., De-Martino GN., Intracellular localization of proteasomes.,The International Journal of Biochemistry & Cell Biology ., **35**: 579-589., 2003.

Yamanaka K., Hoshino M., Okamoto M., Sawamura R., Hasegawa A., Okada S., Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for the major part likely due to its peroxy radical., Biochem Biophys Res Commun., **168**:58-64., 1990.

Yamanaka K., Tezuka M., Kato K., Hasegawa A., y Okada S., Crosslink formation between DNA and nuclear proteins by in vivo and in vitro exposure of cells to dimethylarsinic acid., **191**:1184-1191., 1993.