



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DIFERENCIAS EN LA EXPRESION DE LA  
PROTEÍNA P53 EN LINFOCITOS  
HUMANOS**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A:  
CINTIA VARGAS ANAYA



Director de Tesis:

DRA. ANA MARIA SALAZAR MARTÍNEZ

Asesor Interno:

DRA. ELÍA ROLDAN REYES

México D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María Salazar Martínez por compartir su tiempo y conocimiento conmigo pero sobre todo por la paciencia y apoyo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Elia Roldán Reyes por el apoyo y asesoría brindado durante este proceso.

A la Q.F.B. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño por sus consejos y orientación en las técnicas experimentales, así como el gran apoyo brindado.

A la Dra. Patricia Ostrosky Shejet por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio.

A los miembros del jurado por sus observaciones y valiosos comentarios en la revisión de este trabajo.

- Dr. Mario Agustín Altamirano
- Dra. Ana María Salazar Martínez
- Dra. Elia Roldán Reyes
- Biól. Carlos Martínez Montoya
- Dr. José Luis Morán Perales

Este trabajo recibió financiamiento de CONACYT y PAPIT-DCAPA (UNAM).

---

---

## DEDICATORIAS

Agradezco a Dios por estar siempre conmigo y permitirme disfrutar la vida como hasta ahora.

A mis padres por ser mi apoyo incondicional y estar conmigo en todas mis locuras. Gracias por la confianza que han depositado en mí pero sobre todo por el gran amor que me han dado.

A mi hermana Jazbel por ser mi cómplice y siempre darme el ánimo que necesito, todo es por ti.

A mi abuela por ser la luz de esta maravillosa familia, gracias por tu protección y tu inmenso cariño.

A mis tíos y primos por permitirme pertenecer a una familia tan unida que me ha demostrado en las buenas y en las malas que todo se puede.

A mis grandes amigos Adrian, Brenda, Enrique y Paty (patito); no importa donde estemos ni lo que hagan siempre están conmigo.

A mis amigos de Licenciatura Beyibet, Blanquita, Claudia, Luis, Marlene, Palemos, Rebeca, Rodolfo, Vianey por todas esas aventuras y momentos inolvidables.

A mis amigos de laboratorio Abel, Eddy, Erick, Fer, Gerardo, Ileana, Juanito, Mariana, Natalia, Paty men, Paula, Polet por tantos momentos agradables e inmensas risas. A mis compañeros de laboratorio Arturo, todos los Juanes y todos los Pablos, Sonia, Tere por brindarme su amistad.

---

---

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. INTRODUCCION</b>	3
<b>2.1 REGULACION DEL CICLO CELULAR</b>	3
2.1.1 Aspectos generales del ciclo celular	3
2.1.2 El control celular y su función en la eliminación del daño al DNA	4
<b>2.2 EL GEN TP53</b>	9
2.2.1 LA PROTEINA P53	10
2.2.2 ESTRUCTURA	11
2.2.3 FUNCIONES CELULARES	12
2.2.3.1 Regulación en el ciclo celular	13
2.2.3.2 Apoptosis	14
2.2.3.3 Reparación	15
2.2.3.4 Senescencia celular	16
2.2.4 ACTIVACION DE LA PROTEINA	16
<b>2.3 LA UBIQUITINACIÓN EN LA REGULACIÓN CELULAR</b>	19
<b>2.4 EL PROTEOSOMA</b>	21
2.4.1 ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN	21
2.4.2 FUNCIÓN	23
2.4.3 INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA	24
2.4.4 INHIBIDOR: MG132	25
<b>2.5 LA RESPUESTA INMUNE: EL PAPEL DEL LINFOCITO</b>	26
<b>3. JUSTIFICACION</b>	28
<b>4. HIPOTESIS</b>	29
<b>5. OBJETIVOS</b>	30
<b>6. MATERIAL Y METODO</b>	31

---

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	31
6.2 OBTENCION DE MUESTRAS Y CULTIVO DE LINFOCITOS	33
6.3 TRATAMIENTOS	33
6.4 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD	34
6.5 INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA P53	34
6.6 ANÁLISIS ESTADISTICO	35
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>36</b>
7.1 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD	36
7.2 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE INDUCCIÓN DE P53	37
7.3 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE P53 AL INHIBIR SU DEGRADACIÓN VÍA PROTEOSOMA	40
7.4 EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS EN LINFOCITOS TRATADOS CON MG132	42
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>9. CONCLUSION</b>	<b>47</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>48</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>49</b>

---

---

## ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
As	Arsénico
ATM	Ataxia Telangectasia Mutated
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	relación de ATM y Rad3
CD	Grupo de Diferenciación
Cdk	Cinasa dependiente de Ciclina
CKI	Proteína Inhibidora de las Cdk
DNA	Acido desoxirribonucleico
DUBs	Enzimas Desubiquitinizantes
E1	Enzima Activadora de Ubiquitina
E2	Enzima Conjugante de Ubiquitina
E2F	Factor de Transcripción
E3	Enzima Ubiquitina Ligasa
HECT	Homologo a E6-AP C-terminal
HPV16	Virus del Papiloma Humano 16
INK4	Inhibidor de la Quinasa 4
Kb	Kilobase
KDa	kilodalton
MDM2	murine doble diminute 2
MDM4	murine doble diminute 4
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
NK	Asesinas Naturales
NLS	Señal de Localización Nuclear
Pb	pares de bases
PHA	Fitohemaglutinina
Rb	Retinoblastoma
RI	Radiación Ionizante
RING	Really Interesting New Gene
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SV40	Virus del Simio 40

---

---

<b>Tc</b>	Célula T citotóxica
<b>TCR</b>	Receptor de Antígeno de Célula T
<b>TH</b>	Célula T colaboradora
<b>TP53</b>	Gen supresor de tumor p53
<b>UV</b>	Ultravioleta



## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Control del Ciclo celular. Participación de las Cdk's, ciclinas y puntos de control	6
<b>Figura 2</b> Cascada de señalización de la respuesta de los puntos de control	9
<b>Figura 3</b> Dominios funcionales de la proteína p53	12
<b>Figura 4</b> Vías de activación y respuesta de p53	18
<b>Figura 5</b> Estructura del proteosoma	22
<b>Figura 6</b> Estructura del inhibidor MG132	25
<b>Figura 8</b> Efecto cictotóxico del arsenito de sodio (As) en linfocitos no estimulados (Go)	36
<b>Figura 9</b> Efecto cictotóxico del arsenito de sodio (As) en linfocitos estimulados con PHA	37
<b>Figura 10</b> Expresión de p53 en función del tiempo	38
<b>Figura 11</b> Donadores agrupados por el patrón de expresión de la proteína p53 en linfocitos circulantes sin estimulación mitogénica (Go) tratados con As	39
<b>Figura 12</b> Donadores agrupados por el patrón de expresión de la proteína p53 en linfocitos estimulados con mitógeno (PHA) tratados con As.	39
<b>Figura 13</b> Comparación de los grupos en función de las condiciones sin estimulación (Go) y con estimulación mitogénica (PHA) y los patrones de expresión de p53	40
<b>Figura 14</b> Detección de la proteína p53 en linfocitos humanos tratados con As y el agente MG132	41
<b>Figura 15</b> Detección de la proteína p53 en linfocitos humanos tratados con As y MG132 por grupos	42
<b>Figura 16</b> Análisis del coeficiente de Bax/Bcl2 en linfocitos humanos estimulados (PHA) y tratados con MG132	43

---

## 1. RESUMEN

La proteína p53 es una fosfoproteína clave en el control del ciclo celular y en la prevención de la proliferación celular descontrolada que puede llevar al cáncer. Su actividad como factor de transcripción está relacionada en procesos como la reparación del DNA, la estabilidad del genoma, la apoptosis, la señalización celular, la senescencia y la angiogénesis. Las células responden al daño incrementando los niveles de p53. Dado que los linfocitos humanos son las células más empleadas en el monitoreo de individuos expuestos a sustancias tóxicas, este trabajo se enfocó a evaluar la expresión de p53 en linfocitos humanos ante el reto *in vitro* con arsenito de sodio para determinar si las diferencias en la expresión de p53 entre individuos son debidas a alteraciones en la vida media de la proteína.

Se evaluó la cinética de expresión de p53 por inmunodetección en cultivos de linfocitos *in vitro* con el agente genotóxico arsénico a diferentes tiempos (3 a 48 h) en ausencia y presencia del mitógeno fitohemaglutinina. Se evaluó la estabilización de la proteína p53 por inhibición de la formación del proteosoma adicionando el agente MG132 y la asociación con las proteínas Bax (proapoptótica) y Bcl2 (antiapoptótica).

Los resultados obtenidos muestran dos patrones de expresión en la cinética de inducción de la proteína p53: 1) la expresión de la proteína se mantiene constante hasta las 48 h y 2) la expresión de la proteína va aumentando de manera gradual. Al inducir la proteína p53 con arsénico y posteriormente impedir su degradación mediante la inhibición del complejo proteosomal con el agente MG132, los niveles de la proteína p53 aumentaron aún más, sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grupos que mostraron diferente cinética de inducción de p53. Esto sugiere que los bajos niveles de p53 no son dependientes de una mayor degradación de p53-vía proteosomal.

En las células tratadas con MG132, no se encontraron cambios significativos en la inducción de la proteína apoptótica Bax y tampoco hubo cambios en el balance apoptótico Bax/Bcl-2, por lo que se descartó que el

---

incremento de la proteína p53 pudiera deberse a la inducción de muerte celular por un efecto tóxico del agente inhibidor del proteosoma.

Este trabajo aportó conocimiento para tratar la sensibilidad individual ante agentes que dañan el genoma, tales como el arsénico.

---

## 2. INTRODUCCION

### 2.1 REGULACION DEL CICLO CELULAR

#### 2.1.1 Aspectos generales del ciclo celular

La función más importante del ciclo celular es duplicar con exactitud la gran cantidad de DNA de los cromosomas y luego segregar las copias con precisión en dos células hijas [1, 2].

El ciclo celular implica un conjunto ordenado de eventos que para su mejor comprensión y estudio ha sido dividido en dos fases: la interfase (que comprende las fases S, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) y la fase M. En la primera ocurren todos los procesos metabólicos y regulatorios para la progresión ordenada del ciclo celular, mientras que la fase M agrupa la mitosis (reparto de material genético nuclear) y a la citocinesis (división del citoplasma). Las células pueden dejar de dividirse y entrar a un estado temporal o reversible, entrando en un estado de aparente “reposo” llamado fase G<sub>0</sub> [3, 4].

En la **fase S** (S de síntesis) es donde se lleva a cabo la duplicación del DNA, ocupando cerca de la mitad del tiempo total del ciclo celular en una célula de mamífero [1].

Entre la fase S y M de cada ciclo se encuentran fases de intervalo (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> del inglés “gap”) que le permiten a la célula disponer de más tiempo para crecer (aumentando el número de proteínas y organelos) lo que mantiene a la célula activa metabólicamente [1]. En la **fase G<sub>1</sub>** se sintetizan RNA y proteínas, puede variar su duración dependiendo de las condiciones externas y las señales. En la **fase G<sub>2</sub>** la célula se prepara para la mitosis sintetizando proteínas nuevas y se caracteriza por un aumento de tamaño [1, 2].

En la **fase M** (de mitosis) se lleva a cabo la división celular ocupando menos tiempo. La fase M se subdivide a su vez en: profase, metafase, anafase, telofase en donde se lleva a cabo la repartición del material genético hasta que finalmente la célula es dividida mediante un anillo contráctil de actina y miosina, lo que produce dos células hijas idénticas [1].

---

Cuando ya no se requieren más células, las condiciones en  $G_1$  no son favorables o bien cesa de dividirse pueden entrar en un estado de reposo o latencia denominada  $G_0$  en el cual la célula pueden permanecer días, semanas o años antes de volverse a dividir e incluso podrían no salir nunca de este estado [1, 2].

### **2.1.2 El control celular y su función en la eliminación del daño al DNA**

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y supervisión estrictos. La información acerca de la finalización de los acontecimientos del ciclo celular, así como señales procedentes del entorno hace que el sistema de control se detenga en puntos específicos [1].

Hacia finales de la década de 1980 se identificaron algunas de las proteínas clave del sistema de control del ciclo celular, con ello se introdujo un nuevo concepto que hasta el día de hoy sigue siendo objeto de investigación y que a lo largo de los años se ha ido modificando, nos referimos a los puntos de control [1, 5].

Los puntos de control son como retenes donde se revisan distintas características del medio y la célula, si un evento del ciclo celular está incompleto se manda una señal inhibitoria a los acontecimientos posteriores, por ejemplo, se impide la entrada en la mitosis si la replicación del DNA no ha finalizado, o la progresión hacia  $G_1$  y  $G_2$  se puede retrasar mediante mecanismos de frenado si el DNA se ha dañado por agentes químicos, dando tiempo para que este daño sea reparado después de lo cual el freno del ciclo celular se libera y la progresión se reanuda [1].

El componente principal del motor del ciclo celular es una familia de proteínas llamada cinasas dependientes de ciclinas (Cdk) cuya actividad aumenta y/o disminuye a medida que la célula progresa a través del ciclo. Los reguladores más importantes de las Cdk son las proteínas denominadas ciclinas, llamadas así por que experimentan un ciclo de síntesis y degradación en cada ciclo celular. Los complejos Cdk-ciclina actúan como un interruptor molecular que desencadena un acontecimiento en el ciclo celular [1, 6].

Los complejos Cdk-ciclina también son regulados por la unión de proteínas inhibitoras de Cdk (CKI, de Cdk inhibitor proteins). Existe una gran variedad de proteínas CKI, las cuales participan principalmente en el control de las fases  $G_1$  y S [1]. En mamíferos, tres proteínas relacionadas inhibitoras de CDK o CIP ( $p27^{KIP1}$ ,  $p57^{KIP2}$  y  $p21^{CIP}$ ) parecen estar relacionadas con la inhibición de la fase S. Una segunda clase de inhibidores de los complejos ciclina-CDK, se llama INK4 (Inhibidores de la quinasa 4) comprende varias proteínas pequeñas que interactúan con CDK4 y CDK6 bloqueando el paso a través de  $G_1$ , una de estas es la p16 que es un supresor de tumores [6].

Todos estos complejos se inactivan como consecuencia de la proteólisis regulada de las ciclinas, esta degradación se produce mediante un mecanismo dependiente de ubiquitina. En dicho mecanismo está implicado un complejo enzimático que reconoce secuencias específicas de aminoácidos de la ciclina y que mediante la unión de numerosas moléculas de ubiquitina, marca a la proteína para su completa degradación en los proteosomas [1, 2].

Se han postulado varios puntos de control cuya función es permitir o restringir las acciones propias de cada una de las fases del ciclo.

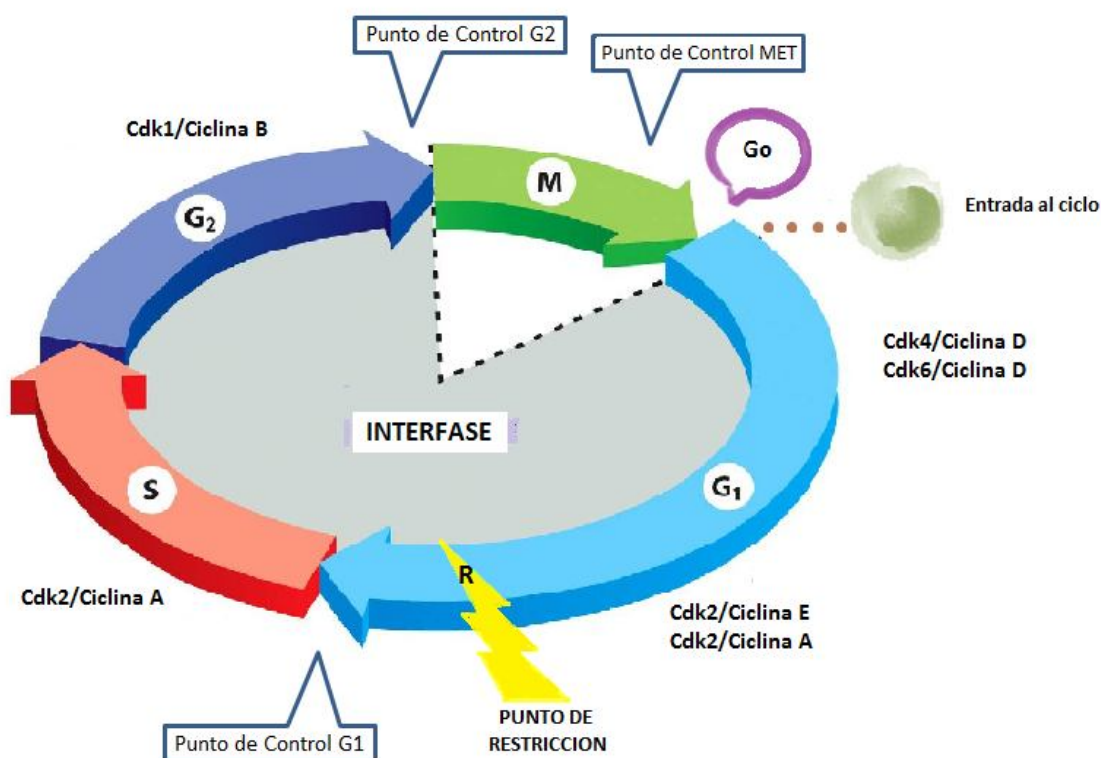
**El punto de restricción** se encuentra en la fase  $G_1$  y se le conoce así porque si la célula lo pasa se encuentra comprometida de forma irreversible a entrar en el ciclo celular [1, 2]. La Cdk 4/6 ciclina D interacciona con el motor del ciclo celular a través de la proteína del retinoblastoma (Rb) y el complejo p27 provocando una irreversible transición [5].

**El punto de control  $G_1/S$**  se encuentra justo después del punto de restricción la célula comprueba si su entorno es favorable y si el genoma está listo para ser replicado [5].

**El punto de control  $G_2/M$**  se encuentra al final de la fase  $G_2$  y principio de la fase M y su función principal es la de revisar que el genoma se haya duplicado correctamente, las células que no replican todos sus cromosomas no entran en mitosis y son retrasadas por Wee1 en la transición S-  $G_2$  catalizada por Cdc25C [5].

**El punto de control de la fase M** tiene como objetivo revisar que los cromosomas se hayan unido correctamente al huso mitótico impidiendo la entrada en anafase específicamente en la metafase [1, 6].

En el ciclo celular existen otros puntos de control, los principales y que comparten homologías con las levaduras son los mencionados anteriormente, sin embargo, en los últimos años otro punto de control que ha tomado importancia, es el punto de control de la replicación (también conocido como S/M), este punto de control se ha relacionado con el proceso por el cual se inhibe la mitosis, mientras que la replicación del DNA está en marcha o se bloquea [4].



**Figura 1. Control del ciclo celular.** Participación de las Cdk y ciclina y puntos de control. Tomado y modificado [1].

Existen cuatro clases de ciclinas principales que se unen a las Cdk. **Cdk2/ciclina E** (G<sub>1</sub>/S) determina que la célula está lista para replicar el DNA; **Cdk2/ciclina A** se une a su Cdk durante la fase S y son necesarias para iniciar la replicación del DNA pero también evita que exista una doble replicación;

---

**Cdk1/ciclina B** activa los eventos de la Mitosis induciendo el ensamblaje del huso mitótico y asegurando que los cromosomas replicados se unan a este, su concentración aumenta a medida que las células progresan a través de G<sub>2</sub>, alcanza su máximo durante la metafase y desciende después de la anafase [6]. La cuarta clase de ciclina (**Cdk4/ciclina D y Cdk6/ciclina D**) ayuda a realizar el paso a través del inicio o del punto de restricción (Fig. 1) [1].

Las células que cumplen con los requisitos para dividirse, se comprometen a completar el ciclo celular a menos de que exista una amenaza a la integridad del genoma. Cuando existe algún daño al DNA tras la exposición de radiación o agentes químicos, es esencial que sean reparados antes de que la célula intente duplicarlos o segregarlos. El sistema de control del ciclo celular puede detectar con facilidad el daño en el DNA y detener el ciclo en los puntos de control. La presencia de daño al DNA, que puede causar cáncer o envejecimiento prematuro desencadenando una red de señalización alterando el ciclo celular en lugares específicos [5, 7]. Esta red tiene cuatro componentes: sensores, mediadores, transductores y efectores [4].

El primer paso para activar esta red de señalizaciones bioquímicas es reconocer el daño al DNA con la ayuda de los puntos de control que se asocian a proteínas **sensores** de daño, tales como Rad9, Rad1 y Hus1 (complejo 9-1-1) que, aunque no son esenciales para la progresión normal del ciclo celular, si lo son para el mecanismo que se encarga de bloquear la división celular después del daño al DNA [5]. Una vez que el DNA está dañado, el complejo 9-1-1 es reclutado al sitio de daño bajo la regulación del complejo Rad17-RFC facilitando la fosforilación mediada por ATR y ATM [7]. Aunque existen diferentes puntos de control parecen que comparten los mismos sensores durante el reconocimiento del daño al DNA [4].

Existen cuatro tipos de **mediadores** que contienen proteínas BRCA1 que sirven como módulos de interacción: 53BP1, MDC1, TopBP1 y BRCA1. Estos mediadores ayudan a facilitar la fosforilación de ATM, además de jugar un papel esencial en la activación de las quinasas en los puntos de control, estas moléculas interactúan con sensores, transductores y efectores [4, 7].



---

Una vez que la señal inicial de daño al DNA se ha emitido por los sensores y mediadores es traducida rápidamente a las cinasa ATM y ATR (también sensores), que son proteínas que fosforilan un gran número de sustratos que funcionan en la reparación del DNA, apoptosis y arresto celular [5, 7]. La actividad de la proteína cinasa ATM es baja pero puede ser estimulada por agentes que producen rompimientos de doble cadena *in vivo*. Una vez estimulada la proteína ATM fosforila muchas otras proteínas entre ellas BRCA1, Chk2, p53 y así misma [4, 7].

Por su parte, ATR tiene homología con ATM y spRad3, de ahí su nombre de ATR. Esta proteína es activada por luz UV *in vivo*. En células humanas ATR existe en un complejo estable con ATRIP una pareja potencial reguladora. Una vez que ATR es activada se desplaza al lugar de replicación del DNA fosforilando y activando Chk1 [7].

Las proteínas cinasa Chk1 y Chk2 (**Transductores**) fueron identificadas como esenciales para el arresto en el ciclo celular antes de la mitosis, en respuesta al daño al DNA o bloqueo de la replicación. La proteína Chk1 es fosforilada a Ser317/345 en respuesta al daño. Esta fosforilación es bloqueada en células que carecen de ATR e inhibida en células que tienen una cantidad reducida de Rad17 e incluso si carecen de Hus1, lo que nos habla del mecanismo asociado con los sensores de daño al DNA que regulan la fosforilación de Chk1 que, como consecuencia fosforila a Cdc25 [4, 7].

En contraste, se conoce que Chk2 es indispensable para el desarrollo prenatal. Esta proteína se activa por fosforilación de su residuo de treonina 68 de una manera dependiente de ATM en respuestas a tratamientos con radiación ionizante, que a su vez fosforila Cdc25, BRCA1 y p53. Aunque ATM-Chk2 funciona en el control de la fase S se considera importante por la fosforilación de Cdc25A que desencadena su ubiquitinación y degradación [7].

Siguiendo esta cadena de señalización se encuentran moléculas **efectoras** como p53 y la familia Cdc25. La familia Cdc25 (A, B y C) es activadora de los complejos Cdk/ciclinas regulando las transiciones del ciclo celular. Por otro lado, la proteína p53 juega un papel importante como supresor de tumor en la célula para someterse a las diferentes respuestas (reparación,

arresto o apoptosis), En condiciones normales p53 se encuentra en niveles bajos debido a su regulador negativo Mdm2. Sin embargo en respuesta al daño al DNA, las proteínas ATM y ATR fosforilan e inhiben Mdm2 de manera que p53 se estabiliza (Fig. 2). La proteína p53 se considera esencial para el arresto en la fase G<sub>1</sub>, promoviendo diversos genes como p21<sup>CIP1</sup> que inhibe la actividad de la Cdk2/ciclina E inhibiendo así la transición G<sub>1</sub>/S [4, 7].

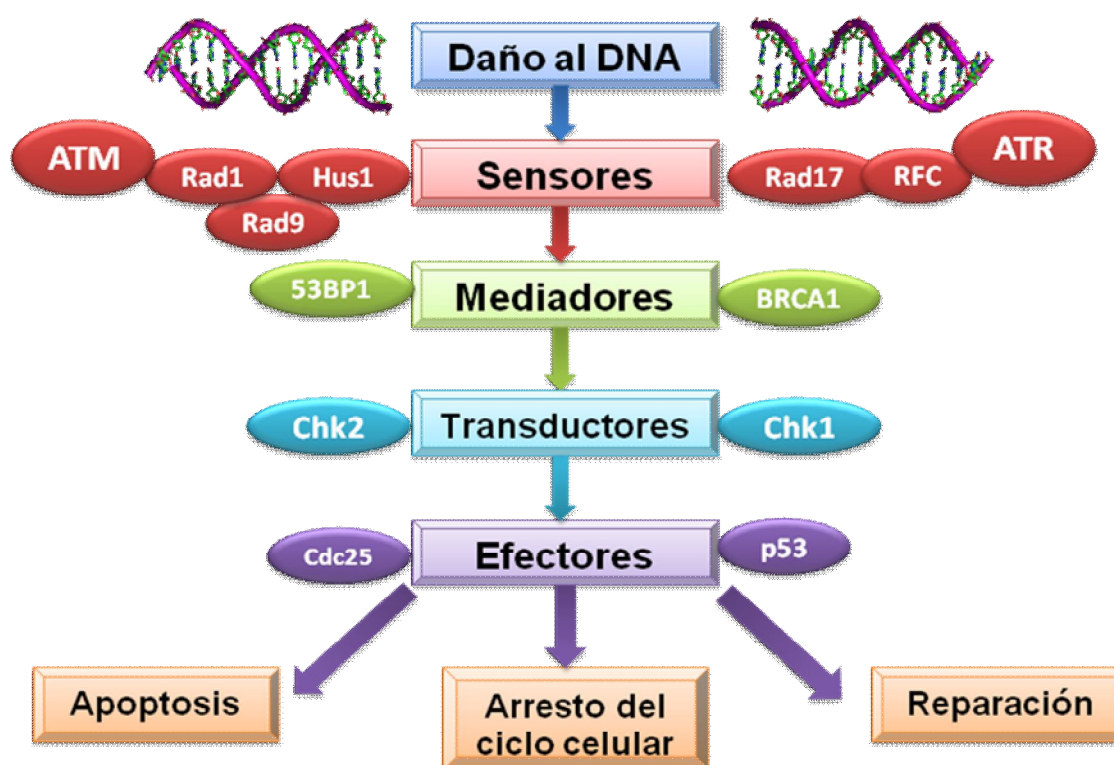


Figura 2. Cascada de señalización de la respuesta de los puntos de control. Tomada y modificada [4, 7].

## 2.2 EL GEN TP53

En tejidos normales la homeostasis se conserva por un proceso regulado por la proliferación y la muerte celular. Cuando existe un desequilibrio en una u otra parte se desarrolla un estado canceroso. Por ello es que los oncogenes y los genes supresores de tumores desempeñan un papel relevante codificando proteínas que inhiben la proliferación celular excesiva [8].

---

El gen TP53 (llamado así por el peso molecular de su producto proteico) es uno de los genes más importantes dentro del grupo de genes supresores, ya que las mutaciones puntuales o deleciones en este gen se han observado en aproximadamente en el 50% de las enfermedades malignas, aunque la frecuencia del daño depende del tipo de tumor [1, 9-11].

El gen TP53 ha sido denominado “el guardián del genoma” ya que coordina los procesos esenciales del mantenimiento de la estabilidad del genoma en un organismo multicelular [10]. Lo que ha hecho que p53 sea tan necesario es su papel en la división celular, apoptosis y en el mantenimiento de la estabilidad genómica [1, 10]. En condiciones normales la proteína p53 no es estrictamente necesaria para el crecimiento normal y funcionalidad de un organismo [10]. Se ha observado que en ratones con el gen mutado o inactivado producen descendientes normales, sin embargo, desarrollan tumores a edades tempranas debido a la ausencia de las funciones de este gen supresor [1, 10].

El gen comprende cerca de 20 kb de DNA que contienen 11 exones y 10 intrones, que están localizados en el brazo corto del cromosoma 17p13 [9].

### **2.2.1 LA PROTEINA P53**

La proteína fue identificada por primera vez en 1979 como una proteína relacionada con la transformación celular que se acumulaba en el núcleo de células cancerosas y se unía fuertemente al antígeno T largo del virus del simio 40 (SV40) [9, 11].

La proteína p53, pertenece a una única familia de proteínas que incluye tres miembros: p53, p63 y p73. A pesar de que están estructural y funcionalmente relacionadas entre sí, p53 parece haber evolucionado en organismos superiores para prevenir el desarrollo de tumores, mientras que p63 y p73 tienen un papel en la biología del desarrollo normal [9]. Su compleja expresión como una serie de isoformas de larga duración y un N- terminal truncado que tiene actividades opuestas han hecho que sea difícil evaluar su

---

contribución en la supresión tumoral. Sin embargo, se cree que pueden estar relacionados con la inducción de p53 por daño al DNA [12].

### 2.2.2 ESTRUCTURA

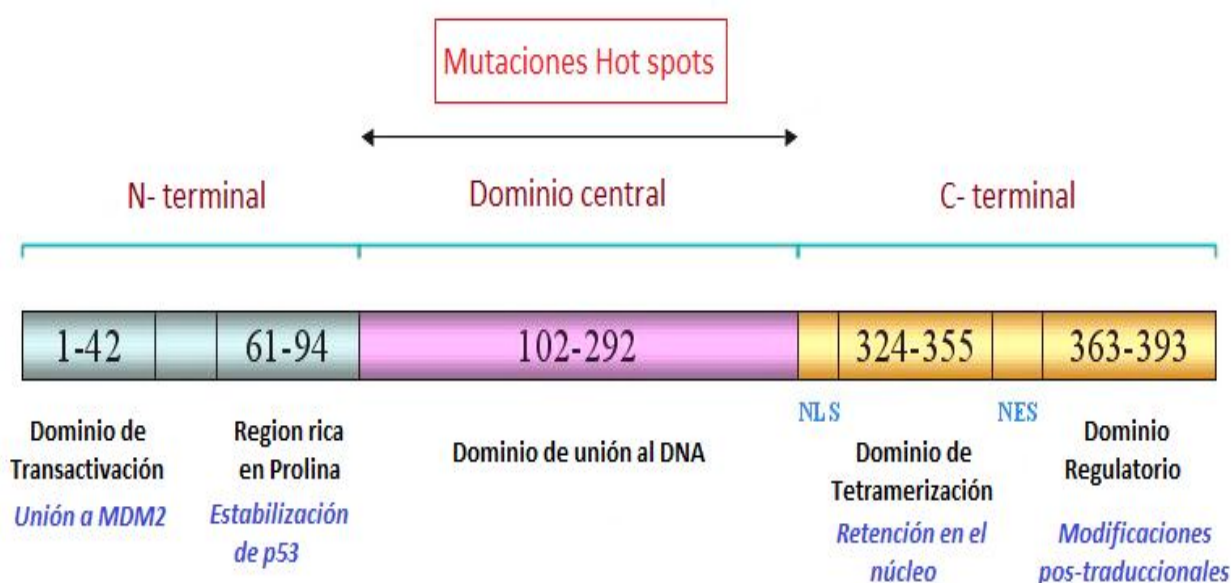
El gen TP53 es continuamente transcrito y traducido, pero la proteína es rápidamente sujeta a degradación vía dependiente de ubiquitina en el proteosoma [10].

La p53 humana es una fosfoproteína nuclear con un peso de 53 kDa de 393 aminoácidos que cumple sus funciones en el núcleo, [9] formando un complejo tetramérico que reconoce una secuencia específica de DNA y estimula la transcripción de genes que tienen un elemento de DNA adyacente al promotor [10].

La proteína p53 está compuesta de tres regiones que se dividen en 5 dominios estructurales y funcionales diferentes: una **región N- terminal** que es requerida para la actividad transcripcional e interactúa con varios factores de transcripción como MDM2, contenida en un dominio amino terminal (aminoácidos del 1 al 42) y un dominio rico en prolina (aminoácidos del 61 al 94) que juega un papel en la estabilidad de p53 y su actividad como supresor, ya que si esta región es eliminada p53 se vuelve más susceptible a la degradación por MDM2 [9, 10].

Existe también una **región central** (aminoácidos del 102 al 292) compuesta principalmente del dominio de unión al DNA que es requerida para la unión a secuencias específicas de DNA (conocidas como sitios consenso que contienen dos copias de 10 pb con una secuencia 5'-PuPuPuC(A/T)-(T/A) GPyPyPy-3' separadas de 0-13 pb). La importancia de esta región radica en que la mayoría de las mutaciones encontradas en los tipos de cáncer están en esta región, más aún, aproximadamente el 80% de los estudios de mutaciones de p53 ha sido centrado entre los aminoácidos 126-306 [9] [11]; jugando un papel importante en la habilidad de p53 al mostrar su actividad como factor de transcripción [10].

Finalmente una **región C-terminal** (aminoácidos del 301 al 393) que contiene un dominio de oligomerización (aminoácidos del 324 al 355), dicha región es responsable de la tetramerización de la proteína ya que si este dominio se daña puede causar la inactivación funcional de la proteína [10]. Por último, un dominio de carboxilo terminal de regulación (aminoácidos del 363 al 393) con una señalización de localización nuclear (NLS) y señalizaciones de exportación nuclear, funcionando como un dominio de regulación negativa además de que también está implicado en la inducción de la muerte celular (Fig. 3) [9].



**Figura 3. Dominios Funcionales de la proteína p53.** Tomado y modificado [9].

### 2.2.3 FUNCIONES CELULARES

La proteína p53 es esencial para prevenir la alteración de la proliferación celular y el mantenimiento de la integridad del genoma. Bajo ciertos estímulos p53 es activada y se desempeña como un regulador esencial que desencadena diversas respuestas biológicas, tanto a nivel celular como de todo el organismo. Para llevar a cabo estas funciones, p53 incrementa sus niveles a través de modificaciones pos-traduccionales resultando así en la activación de genes blanco de p53 [9].

---

Muchas de las múltiples funciones de p53 incluyendo el principal como supresor tumoral, pueden ser atribuidas a su capacidad de actuar como un factor de transcripción de secuencia específica que regula la expresión de diferentes genes que a su vez regulan varios procesos celulares [9].

Las consecuencias biológicas de la actividad de p53 incluyen regulación del ciclo celular parando por un corto tiempo a la célula en un punto de control, inducción de apoptosis, desarrollo, diferenciación, recombinación del DNA, senescencia celular cesando la división celular, entre otras [9, 10, 13].

### **2.2.3.1 Regulación en el ciclo celular**

El sistema de control del ciclo celular puede detectar el daño en el DNA y detener el ciclo en los puntos de control. Cuando el daño en el DNA es reparado, la señal inhibidora se desactiva y la progresión del ciclo celular se reanuda [1]. Estudios en mamíferos han demostrado que proteínas como Rad9, Rad1, Hus1 y Rad17 son factores esenciales que activan los puntos de control actuando como sensores que se acumulan en el sitio al reconocer el daño al DNA [7]. El arresto en  $G_1$  y S impide que se copien bases dañadas, que perpetuarían las mutaciones del genoma. La replicación de DNA dañado también promueve reestructuraciones cromosómicas que pueden contribuir con el cáncer. El arresto en  $G_2$  permite que los daños del DNA de doble cadena se reparen antes de la mitosis [6]. La inducción de arresto en el ciclo provee de tiempo adicional a la célula para que sea reparado el daño genómico antes de entrar a fases críticas [9].

Las células con p53 funcional estimulan la transcripción de varios genes. Uno de estos genes codifica una proteína CKI llamada  $p21^{waf1/Cip1}$ , la cual al aumentar sus niveles, se une a los complejos CDK-ciclina e inhibe sus actividades (Cdk2/ciclina E y Cdk2/ciclina A), lo cual da como resultado el arresto de las células en las fases  $G_1$  y  $G_2$ . Cuando la célula se arresta en la fase  $G_1$ , la fosforilación de la proteína Rb es inactivada lo que conduce a la liberación del factor de transcripción E2F, que funciona para inducir la expresión de genes necesarios para la entrada a la fase S [1, 6, 9].

---

Cuando el daño al DNA es extenso p53 también activa la expresión de genes que conducen a la apoptosis, que en condiciones normales se produce en células específicas durante el desarrollo de los animales multicelulares [6].

### **2.2.3.2 Apoptosis**

La muerte celular es una característica importante en el desarrollo en todos los organismos multicelulares. En el cuerpo humano de un adulto sano, cada hora mueren miles de millones de células en la médula ósea y en el intestino. Las células que experimentan la muerte celular programada a menudo exhiben cambios morfológicos precisos, que se denominan en conjunto apoptosis (a partir del término griego que significa “caer” como las hojas de un árbol). Estos cambios incluyen decrementos notables del volumen celular y la modificación del citoesqueleto haciendo evidente la condensación de la cromatina y degradación del DNA en fragmentos. Después de esto, la célula libera diminutos cuerpos apoptóticos que contienen organelos intactos. Los macrófagos que fagocitan estos cuerpos apoptóticos se asegura que no se libere el contenido intracelular hacia el tejido circuncidante lo que incluye las enzimas proteolíticas, proteínas y moléculas oxidantes. Además se posibilita que los componentes orgánicos de la célula muerta sean reciclados por la célula que los digiere. En consecuencia a esto, la apoptosis no induce una respuesta inflamatoria local [1, 8].

La apoptosis en leucocitos y otros tipos de células se acompaña de la expresión de varios genes. Algunas de las proteínas específicas inducidas por estos genes llevan a apoptosis, otras son críticas durante esta última y algunas más la inhiben. Por ejemplo, la inducción de apoptosis en timocitos mediante radiación, que se da solo cuando se encuentra presente la proteína p53. Por otra parte, los miembros de la familia Bcl-2, codifican productos proteicos que inhiben la apoptosis [8].

Aunque la inducción de la apoptosis incluye diferentes señales que dependen de tipos celulares implicados puede inducirse, por ejemplo, a las células T para que mueran por supresión de factores de crecimiento,

---

tratamiento con glucocorticoides o señalización por TCR. Todos los casos de muerte real de la célula comprenden la activación de un grupo especializado de proteasas conocidas como caspasas. En la actualidad se sabe que en los mamíferos hay cuando menos 14 proteasas de cisteína o caspasas y todas las muertes celulares requieren la actividad de cuando menos un subconjunto de estas moléculas. Asimismo, se sabe que en cada célula del cuerpo se producen proteínas caspasa, lo que sugiere que cada célula tiene el potencial de iniciar su propia muerte [8].

Este proceso de activación se inicia por señales intra y extracelulares de muerte, las cuales hacen que moléculas adaptadoras se agreguen y activen a las procaspasas (precursora inactiva de caspasas) generando una cascada proteolítica amplificadora [1].

La activación de las procaspasas puede inducirse desde el exterior a la célula (vía extrínseca o receptor de muerte), por ejemplo en un linfocito citotóxico puede inducir apoptosis expresando una proteína llamada ligando Fas (o receptor de muerte) que se une y activa los receptores de Fas de la superficie de la célula reclutando proteínas adaptadoras intracelulares que se unen y agregan moléculas de procaspasa 8 las cuales activan la cascada de caspasas [1, 9]. Mientras que cuando la célula está estresada también puede autoeliminarse desde el interior (vía intrínseca o de la mitocondria) de la célula, en la que domina la familia de proteínas Bcl-2, que está compuesta por 3 clases: *proteínas anti-apoptóticas* (Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>), *proteínas pro-apoptóticas* (Bax, Bak y Bcl-X<sub>I</sub>) y *proteínas pro-apoptóticas Bid* (Bad, Noxa y Puma) haciendo que las mitocondrias liberen citocromo c al citosol, el cual se une a la proteína adaptadora Apaf-1 agregando moléculas de procaspasa 9 iniciando la apoptosis [1, 9].

### 2.2.3.3 Reparación

Las células detenidas pueden ser liberadas de nuevo al ciclo de proliferación a través de funciones bioquímicas de p53 que faciliten la



---

reparación incluyendo la reparación por escisión de nucleótido y la reparación por escisión de base [9].

Algunas proteínas que participan en este proceso son Gadd45 (growth arrest and DNA-damage inducible protein 45) [9].

#### **2.2.3.4 Senescencia celular**

Dentro de la división celular también existen mecanismos intracelulares que pueden limitar la proliferación celular. La inducción de p53 es esencial para la supresión tumoral, conduciendo a la célula a diferentes resultados biológicos. Uno de estos resultados conocidos tiene lugar en los fibroblastos humanos. Cuando estos fibroblastos se cultivan en un medio estándar solo se dividen de 25 a 50 veces, cuando hay continua expresión de oncogenes dominantes, la proliferación se enlentece y finalmente se detiene haciendo que las células entren en un estado de no proliferación del cual ya no se recuperan volviéndose irreversible [1, 12].

#### **2.2.4 ACTIVACION DE LA PROTEINA**

En ausencia de estrés celular la proteína p53 es mantenida en niveles bajos por una rápida ubiquitinación intracelular, lo que impide su acumulación. Durante la progresión del ciclo celular, los bajos niveles de la proteína son controlados con precisión [9]. Sin embargo, esto no significa que la proteína no tenga actividad [10]. En células con crecimiento normal, la vida media de la proteína está limitada a minutos mientras que el estrés celular o exposición a agentes dañinos al DNA la prolongan hasta horas [9].

La regulación de los niveles y actividad de la proteína p53 involucra una red compleja de proteínas celulares dentro de las que está incluida HPV16 E6, SV40 antígeno T, MDM2, entre muchos otros. Un ejemplo de esto es la unión de SV40 antígeno T, con p53 incrementando la estabilidad de la proteína, mientras que la asociación con E6 o MDM2 acelera su degradación [9, 10]. La proteína Mdm2 se ha encontrado que desempeña un papel adicional en el

---

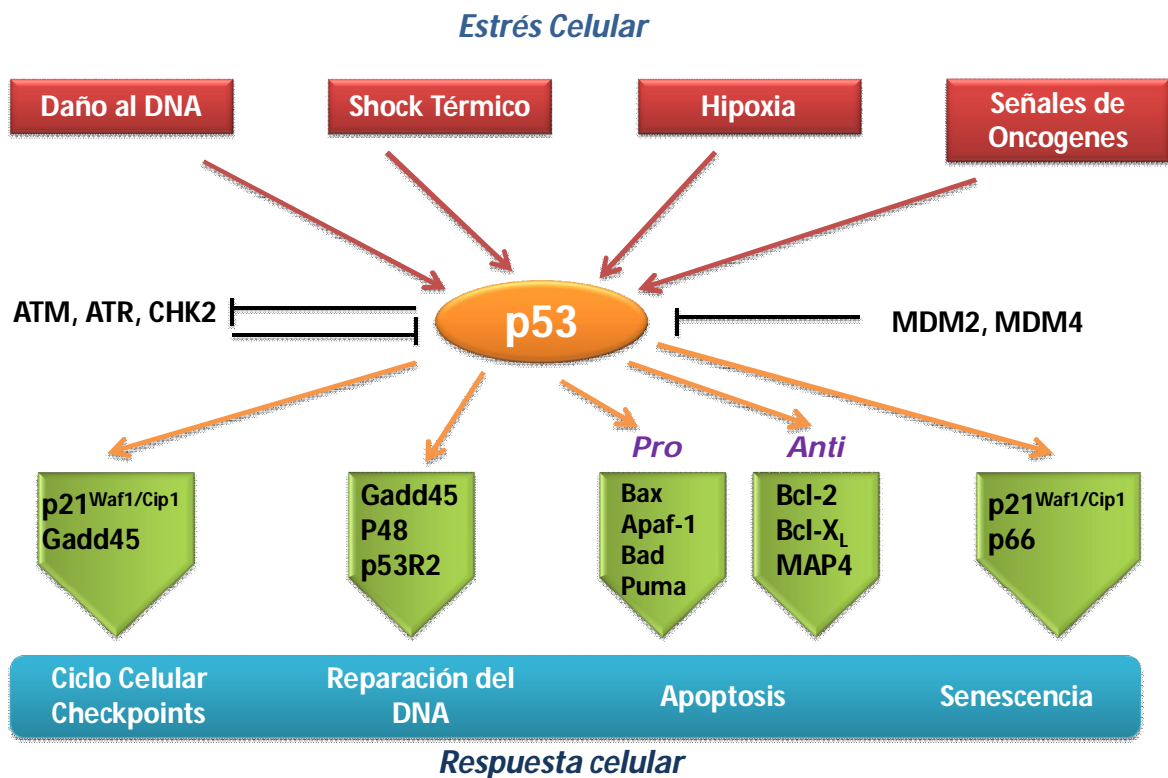
bloqueo de la interacción de p53 con el aparato transcripcional por unión y blindaje del dominio de transactivación de p53 dentro de la región N-terminal. La proteína Mdm2 media la ubiquitinación y la degradación dependiente de proteosoma de p53 [13] a través de su actividad como ubiquitina ligasa, ya que una vez que p53 ha sido marcada es exportada al citoplasma moviéndola lejos de su sitio de acción (el núcleo) promoviendo la rápida degradación por el proteosoma de ambas proteínas [9, 10]. Sin embargo, p53 también es limitada por otros reguladores como MDM4 (mejor conocido como MDMX) que inhiben la transcripción mediada por p53 [12].

Siguiendo estímulos intracelulares y extracelulares, tales como el daño al DNA (por medio de radiación ionizante, radiación UV, aplicación de drogas citotóxicas o agentes quimioterapéuticos e infección por virus), shock térmico, hipoxia y sobreexpresión de oncogenes, p53 es activada previniendo su degradación vía proteosoma y eliminando su actividad con Mdm2 (Fig. 4) [9, 11].

En respuesta al daño al DNA, por ejemplo, señales iniciales son rápidamente traducidas a proteínas ATR y ATM que a su vez fosforilan a p53 en distintos sitios; en este evento ATM interviene inhibiendo la interacción con sus reguladores negativos Mdm2 y Mdm4 evitando la degradación de p53 [7, 11].

La proteína p53 también es inducida a través de la vía supresora de tumores ARF, que ha sido considerada para funcionar independientemente de la vía de daño al DNA. ARF es un importante inhibidor de Mdm2 (lo que lo vuelve un regulador positivo de p53) que esta normalmente presente en niveles bajos [12].

La unión de p53 con el DNA dañado se puede dar de forma específica (activa) y no específica (latente). En la forma no específica la proteína es capaz de reconocer elementos de cadena sencilla de DNA, bases no apareadas y presenta un aumento en la actividad 3'-5' exonucleasa. Por el contrario, la forma específica carece de actividad exonucleasa pero adquiere la capacidad de asociarse con el DNA [10].



**Figura 4. Vías de Activación y respuesta de p53.** Tomado y modificado [9].

La activación de p53 involucra un incremento en los niveles de la proteína provocando un alargamiento en su vida media así como cambios estructurales de ésta. Modificaciones post-traduccionales generalmente resultan en la estabilización de p53 y su acumulación en el núcleo, donde p53 interacciona con sitios de secuencia específica [14], tales modificaciones pueden ser fosforilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación y el secuestro del citoplasma junto con complejos de unión covalente y no covalente con otras proteínas. Muchas, de estas modificaciones ocurren en las regiones N- y C-terminal de la proteína de p53 [9, 10].

La fosforilación y la acetilación son las principales modificaciones de la capacidad de activación de transcripción de p53, al mismo tiempo que evitan que la proteína p53 se vuelva blanco de la degradación de estas modificaciones, logrando la anulación de la interacción con Mdm2 [9, 10].

De las modificaciones post-traduccionales, la fosforilación es la que resulta principalmente en la estabilización de la proteína; cuando se produce un estrés celular se fosforilan cerca de 20 serinas y treoninas en p53 inducidas por daño al DNA en la región N-terminal. Por su parte, la acetilación también tiene una función crucial en la estabilización de la proteína por medio de la región C-terminal al acetilar diversas lisinas que se encuentran involucradas en la regulación de su ubiquitinación y proteólisis inducida por MDM2 [9]. Además de la existencia de coactivadores de transcripción tales como p300/CBP y PCAF que acetilan a Lys-320 de la región de localización nuclear de p53 generando un incremento significativo en su función de transactivación [10].

El incremento en el nivel de p53 en respuesta a los tratamientos con drogas se ha asociado directamente con el grado de daño cromosómico. Generalmente la proliferación se ve alterada cuando las células han sido tratadas con algún agente, aunque puede, como en el caso de la bleomicina, inducir micronúcleos sin afectar la viabilidad [14].

Mientras que p53 en respuesta al daño inducido por UV o RI, comienza a fosforilar a Ser33 y Ser37 en la región N-terminal y a su vez ya fosforilada activa a p300 y PCAF para inducir la acetilación de p53 en Lys373/Lys 382 y Lys320 respectivamente [9].

### 2.3 LA UBIQUITINACIÓN EN LA REGULACIÓN CELULAR

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos de 8.5 kDa presente en todas las células eucariotas cuya principal función es la de marcar otras proteínas para su proteólisis vía dependiente del proteosoma o para regular diferentes funciones no proteolíticas como su participación en las vías de tráfico vesicular y la regulación en la modificación de histonas [13, 15, 16].

El proceso de ubiquitinación es dependiente de ATP, es un proceso enzimático muy ordenado que se traduce en la unión covalente de ubiquitina al sustrato. La ubiquitina es unida por una cascada de enzimas la cual comprende a la *enzima activadora de ubiquitina* E1 que se une y activa la ubiquitina de manera dependiente de ATP al carbono terminal. Una vez activada, la

---

ubiquitina es transferida a la cisteína en el sitio activo de la *enzima conjugadora de ubiquitina* E2. Finalmente, la *ubiquitina ligasa* o E3 cataliza la transferencia de la ubiquitina a una lisina en el sustrato reconociéndolo de forma específica. La ubiquitina tiene 7 aceptores de lisina que podrían ser potencialmente utilizadas para el proceso de conjugación de ubiquitina, resultando en cadenas de ubiquitinas de diferentes longitudes (cuatro o más monómeros de ubiquitina), tipos y consecuencias funcionales que es reconocida por el proteosoma 26S [13, 17]. En células eucariotas, generalmente solo hay una enzima E1, un poco más de 25 enzimas E2 y cientos de ubiquitina ligasa E3 y como cada enzima E2 puede interactuar con múltiples enzimas E3 se puede aumentar la especificidad al sustrato [15-16].

Existen dos tipos de modificación de la ubiquitina: la mono-ubiquitinación y multi-ubiquitinación. Mientras que las mono-ubiquitinación están involucradas en eventos no proteolíticos de la regulación de histonas y endocitosis; la multi-ubiquitinación se refieren principalmente a la degradación proteolítica [17].

La ubiquitina etiqueta proteínas que son canalizadas dentro de un complejo proteico el proteosoma 26S, compuesto de un núcleo catalítico 20S y dos reguladores 19S, conduciéndolas a su subsecuente degradación mientras que las ubiquitinas pueden ser recicladas [13].

Para que la célula sepa qué proteínas deben ser marcadas, se han identificado a dos proteínas de ubiquitina ligasa E3 que facilitan la transferencia de ubiquitina al sustrato. Por una parte, se utilizan proteínas que contienen un dominio llamado el dedo "RING" (Really Interesting New Gene) que promueve la ubiquitinación al interactuar con enzimas conjugantes de ubiquitina E2. Mientras que otras enzimas E3 poseen el dominio HECT que les confiere una actividad catalítica en un residuo de cisteína que acepta directamente ubiquitina y la trasfiere al sustrato [13].

La remoción de la ubiquitina de proteínas es un paso regulador muy importante en este sistema, llevado a cabo mediante la acción de enzimas desubiquitinizantes (DUBs) que reconocen el enlace llevando a cabo la proteólisis con la finalidad del reciclaje de la ubiquitina para devolverlas al citoplasma [13].

---

## 2.4 EL PROTEOSOMA

La mayor parte de las proteínas en células de mamíferos se hidrolizan por una enzima que requiere ATP y el proteosoma. En esta vía, presente tanto en el núcleo como en el citosol, las proteínas mal plegadas o dañadas o cuya presencia ya no es necesaria para una función celular específica, se marcan para la degradación por unión covalente de múltiples moléculas de ubiquitina para llevar a cabo una proteólisis que corre a cargo del proteosoma [17].

### 2.4.1 ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN

La forma más común del proteosoma es la denominada 26S un complejo proteolítico dependiente de ATP de aproximadamente 2400 kDa y cerca de 31 subunidades diferentes [16, 17]. El complejo proteolítico 26S se encuentra en el citoplasma y núcleo de células eucariotas, la distribución varía de acuerdo al tipo de célula. El proteosoma parece someterse a redistribución entre el núcleo y el citoplasma. En este último, el proteosoma se localiza cerca del centrosoma, en la superficie externa del retículo endoplásmico y las redes del citoesqueleto [15]. Esta estructura contiene un núcleo catalítico 20S en donde las proteínas son degradadas y dos subcomplejos 19S que proporcionan especificidad al sustrato mal plegado y regulan la entrada al núcleo del complejo (Fig. 5) [15, 18, 19].

El proteosoma 20S (de masa molecular de aproximadamente 700 kDa) es de forma semejante a un barril, es una partícula abundante, comprende cerca de 1% de las proteínas de la célula. Está compuesto por 28 subunidades proteicas que se organizan en cuatro anillos apilados que encierran una cámara central cilíndrica donde se produce la proteólisis. Sus dos  $\beta$ -anillos centrales o internos están formados por 7 subunidades que contienen múltiples sitios proteolíticos (proteasas) que funcionan juntos en la degradación de las proteínas. Los dos  $\alpha$ -anillos externos también se forman de 7 subunidades cada uno, rodeando una pequeña abertura por donde entran los sustratos polipéptidos que son reconocidos. Estos  $\alpha$ -anillos son esenciales para el ensamblaje de la partícula 20S con la partícula reguladora 19S que inicia los

cambios conformacionales en el N-terminal permitiendo que ambas estructuras funcionen como una puerta que controla la entrada de las proteínas al centro proteolítico [15-18].

El análisis del complejo 20S por difracción de rayos X y estudios de mutagénesis puso en evidencia el nuevo tipo de mecanismo proteolítico. A diferencia de las proteasas convencionales, las partículas de 20S y 26S no se limitan a romper las proteínas de la célula y liberar los fragmentos resultantes en el citosol. Un polipéptido, una vez adoptadas por el proteosoma, se degrada por completo de una manera muy avanzada en pequeños péptidos de 3-20 residuos [18].

Los complejos 19S (también conocido como 19S cap o PA700 por su peso en KDa) esta formada por 19 subunidades que ayudan a la unión con 20S para formar el proteosoma 26S. Además de contener dos subcomplejos en donde uno contiene seis subunidades ATPasas distintas que forman la “base”. También está la otra parte del complejo llamada “Lid” o tapa contiene 13 subunidades no ATPasa [15, 16, 18].

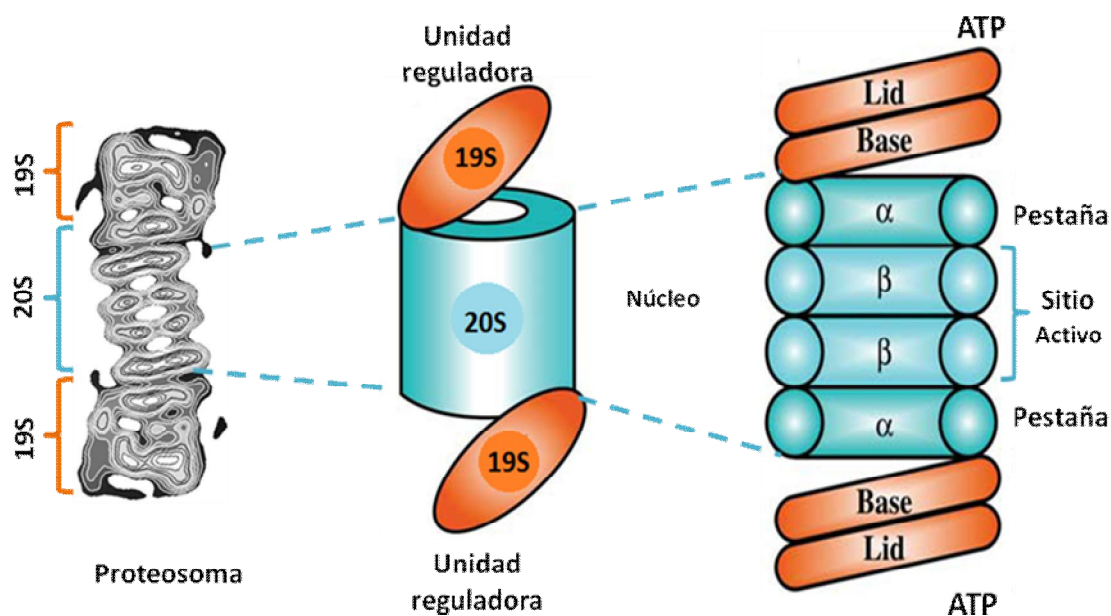


Figura 5. Estructura del proteosoma. Tomado y modificado [17, 18].

---

## 2.4.2 FUNCIÓN

Desde el descubrimiento de esta vía dependiente de ATP, se consideró que su función principal solo era la rápida degradación de la proteína con conformaciones anormales cuya acumulación en las células puede ser altamente tóxica y de muchas proteínas reguladoras, cuya vida media se ha desarrollado para facilitar la regulación de sus actividades [18]. Ahora se sabe que la destrucción de las proteínas mediada por ubiquitina desempeña un papel crucial en la regulación del ciclo celular, reparación del DNA, el crecimiento celular y la función inmune [16].

La degradación proteica a través del complejo proteosomal afecta la progresión del ciclo celular, mediante la regulación de ciclinas; además también puede causar un incremento o decremento en la actividad de la apoptosis a través de los efectos de las caspasas, Bcl-2 y el factor nuclear kB (NF-kB) [15].

Muchas de las funciones de este aparato de degradación, tales como el aislamiento de los sitios activos dentro de la partícula 20S lejos de proteínas citosólicas y la restricción de entrada de sustrato, se han desarrollado para evitar la destrucción inespecífica de proteínas celulares. Las actividades proteosomales están dirigidas a solo cinco sitios de rompimiento, en el núcleo 20S: similar a quimiotripsina, similar a tripsina y a peptidil-glutamil hidrolizante. La función de las otras cuatro subunidades  $\beta$  aún no está clara [15, 18, 19].

Para funcionar *in vivo*, el proteosoma 20S requiere la asociación de las unidades de regulación que en parte determina la especificidad de la función del proteosoma. Una de estas partículas de reglamentación es el complejo regulador 19S [15].

Este complejo, como ya se mencionó anteriormente, esta compuesto por dos subcomplejos, en los cuales la base es la única capaz de degradar péptidos y proteínas no ubiquitinadas, pero la tapa o "Lid" se requiere para degradar proteínas ubiquitinadas, dando así al proteosoma un mayor nivel de especificidad de la degradación proteolítica [15].



---

Dado el papel central del sistema de degradación mediado por ubiquitina en diversos procesos celulares, se plantea que las consecuencias de la desregulación de este sistema pueden contribuir al desarrollo de padecimientos como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas e inmunes [16].

### 2.4.3 INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA

Los estudios de la expresión de una proteína han utilizado inhibidores para investigar los mecanismos responsables. Desde 1994, los inhibidores farmacológicos del proteosoma se han utilizado para simplificar muchos de estos estudios de las funciones *in vivo*, arrojando resultados relevantes sobre la importancia de la vía ubiquitina-proteosoma. Si estos inhibidores expresan una disminución o un incremento en el nivel de una proteína, se puede usar como un muy fuerte indicativo de la degradación mediada por el proteosoma [18].

Los inhibidores del proteosoma pueden ser de origen natural o sintético, y existen al menos 5 clases importantes de inhibidores del proteosoma: péptidos de aldehídos, péptidos de sulfona de vinilo, péptidos de boronato, péptidos de epoxiquetones y  $\beta$ -lactona [13, 15, 19].

Lactacistina y sus derivados de  $\beta$ -lactona son productos naturales y los primeros en ser identificados con la habilidad de inhibir al proteosoma. Por su parte, los boronatos son de unión covalente, reversible y muestran una gran especificidad [15, 18].

Estos agentes inhibidores bloquean cerca del 90% de la degradación de proteínas anormales y de corta duración, estas últimas comprenden cerca del 10 al 20% de las proteínas celulares [18].

Los experimentos con inhibidores del proteosoma en cultivos celulares, bajo condiciones óptimas de nutrición, indicaron que la degradación de las proteínas se lleva a cabo por la vía del proteosoma (cerca del 80 al 90%). Por el contrario, los inhibidores de la proteólisis lisosomal solo bloquean del 10-20% de la degradación total de la proteína, aunque el lisosoma, a través de la

formación de vacuolas, podría explicar una larga fracción de degradación en tejido completamente diferenciado *in vivo* o en ayuno [18].

La inhibición de la proteólisis es fácilmente revertida mediante la eliminación de los inhibidores [18].

#### 2.4.4 INHIBIDOR: MG132

Se han identificado varios tipos de inhibidores del proteosoma que pueden entrar fácilmente en la célula e inhibir selectivamente la vía ubiquitina-proteosoma. Dentro de los más utilizados están los péptidos aldehídos tales como Cbz-leu-leu-leucinal ( $C_{26}H_{41}N_3O_5$ ) mejor conocido como MG132 (Fig. 6) que es de estado transitorio y principalmente de actividad quimiotripsina y reversible [18, 20]. Este inhibidor es de tipo sintético y un efectivo bloqueador de la actividad proteolítica del proteosoma [19, 21].

Entre los efectos que puede tener este inhibidor, se ha demostrado que suprime la inflamación y la proliferación, además de poseer actividad pro-apoptótica a través de la formación de ROS [20, 21].

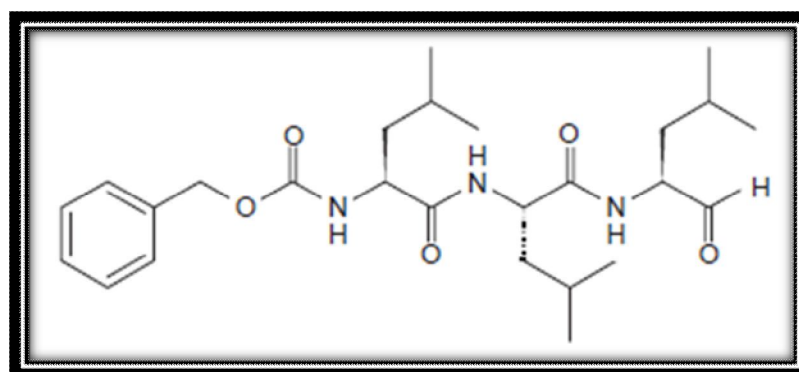


Figura 6. Estructura del inhibidor MG132. Tomado de Lee [18].

---

## 2.5 LA RESPUESTA INMUNE: EL PAPEL DEL LINFOCITO HUMANO

La principal función del sistema inmune es proteger a los organismos multicelulares de los agentes patógenos, generando una enorme variedad de células o moléculas capaces de reconocer y eliminar invasores extraños que están distribuidos en todo el cuerpo [8, 22].

La respuesta inmunitaria es una secuencia compleja de acontecimientos desencadenados por introducción de un estímulo que suele culminar en la eliminación de microorganismos o moléculas tóxicas producidas por ellos, de esta manera se discrimina entre lo propio y lo ajeno, siendo esto último lo que activa una reacción efectora que suprime o neutraliza al invasor [1, 8, 22].

Lo anterior es el resultado de la acción de dos sistemas complementarios, el sistema humoral y el sistema celular. El sistema humoral (del latín *humor* “fluido”) está dirigido contra infecciones bacterianas y virus extracelulares y a proteínas externas individuales, que se ven atacados por los anticuerpos los cuales son producidos por los linfocitos B. Por su parte, el sistema inmune celular gracias a la ayuda de los linfocitos T destruye las células propias infectadas por virus, parásitos y tejidos ajenos [2]. De esta manera estos sistemas proporcionan especificidad y memoria contra antígenos reconocidos con anterioridad [23].

Los linfocitos T se desarrollan en el Timo a partir de células precursoras que migran hasta allí a través de la sangre desde tejidos hematopoyéticos [1]. Durante este proceso, la célula T adquiere la capacidad de expresar en su membrana una molécula única de unión a antígeno la ya mencionada receptor de célula T (TCR) [8].

Los receptores de los linfocitos T sólo reconocen antígeno unido a proteínas de membrana llamadas molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que intervienen en este proceso de reconocimiento (llamado presentación de antígeno) que son glicoproteínas genéticamente diversas que están presentes en las membranas celulares. Cuando un linfocito T reconoce antígenos asociados con una molécula MHC sobre una célula, en

---

circunstancias apropiadas el linfocito prolifera y se diferencia en diversas células T efectoras [8].

Los cultivos de células linfoides primarias se pueden obtener mediante aislamiento directo de linfocitos a partir de sangre periférica. Los linfocitos pueden cultivarse en medio basal con composición química definida (que contiene solución salina, azúcares, aminoácidos, vitaminas y otros nutrientes) al que se añaden diversos suplementos séricos [8].

La sangre periférica representa una de las fuentes más accesibles de linfocitos que pueden ser estudiados bajo condiciones controladas, por lo que se pueden repetir. Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten estudiar con eficacia diversas interacciones celulares [8]. Los antígenos frente a los cuales se exponen los cultivos de linfocitos son numerosos y variados. Las sustancias como las lectinas derivadas de plantas actúan como antígenos y activan a linfocitos de modo no inmunitario, estimulando la división celular, eliminando principalmente los controles intracelulares negativos. Ejemplos de estas lectinas son la concavalina A derivada de habichuelas y la fitohemaglutinina (PHA) del frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*) [1]. La PHA estimula a los linfocitos T *in vitro* de humanos, imitando la activación de complejos TCR [23].

---

### 3. JUSTIFICACION

En nuestro país, la exposición humana a contaminantes ambientales se presenta con frecuencia, generando un impacto en la salud. La exposición a múltiples químicos compromete la integridad del material genético. Por lo que es importante evaluar el daño al DNA inducido por agentes xenobióticos. En líneas celulares se ha observado que la activación/estabilización de la proteína p53, en respuesta a señales de daño y estrés celular, conlleva a un aumento de los niveles de la proteína. Por lo tanto, se ha propuesto que esta proteína podría ser útil como indicador de daño. Dado que los linfocitos humanos son las principales células utilizadas en monitoreo de poblaciones en riesgo, el aumento en los niveles de p53 en este modelo podría convertirse en otro parámetro importante en la evaluación de la exposición humana a contaminantes ambientales, tales como el arsénico.

En estudios preliminares se encontraron diferencias en los niveles de la proteína p53 en linfocitos de sangre periférica de individuos sanos, esto, tanto en los niveles basales como en los linfocitos tratados *in vitro* con sustancias genotóxicas. Por lo que en este trabajo se plantea que estas diferencias individuales podrían deberse a cambios en la cinética de inducción de la proteína. También se ha propuesto que pueden existir alteraciones en la degradación y/o estabilización de la proteína p53 vía ubiquitina-proteosoma, y que este podría tener consecuencias en la susceptibilidad a la exposición a agentes genotóxicos. La caracterización de los mecanismos de activación de p53 es una línea de investigación que requiere ser explorada con la finalidad de entender las respuestas individuales ante las exposiciones ambientales y farmacológicas a agentes xenobióticos.

---

## 4. HIPOTESIS

En linfocitos de individuos sanos tratados con arsenito de sodio se encontrarán diferencias en la expresión de la proteína p53, las cuales podrían estar involucradas con los cambios en su regulación y degradación.

---

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar si las diferencias en la expresión de p53 entre individuos sanos están asociadas con los cambios en la degradación y/o estabilización de la proteína.

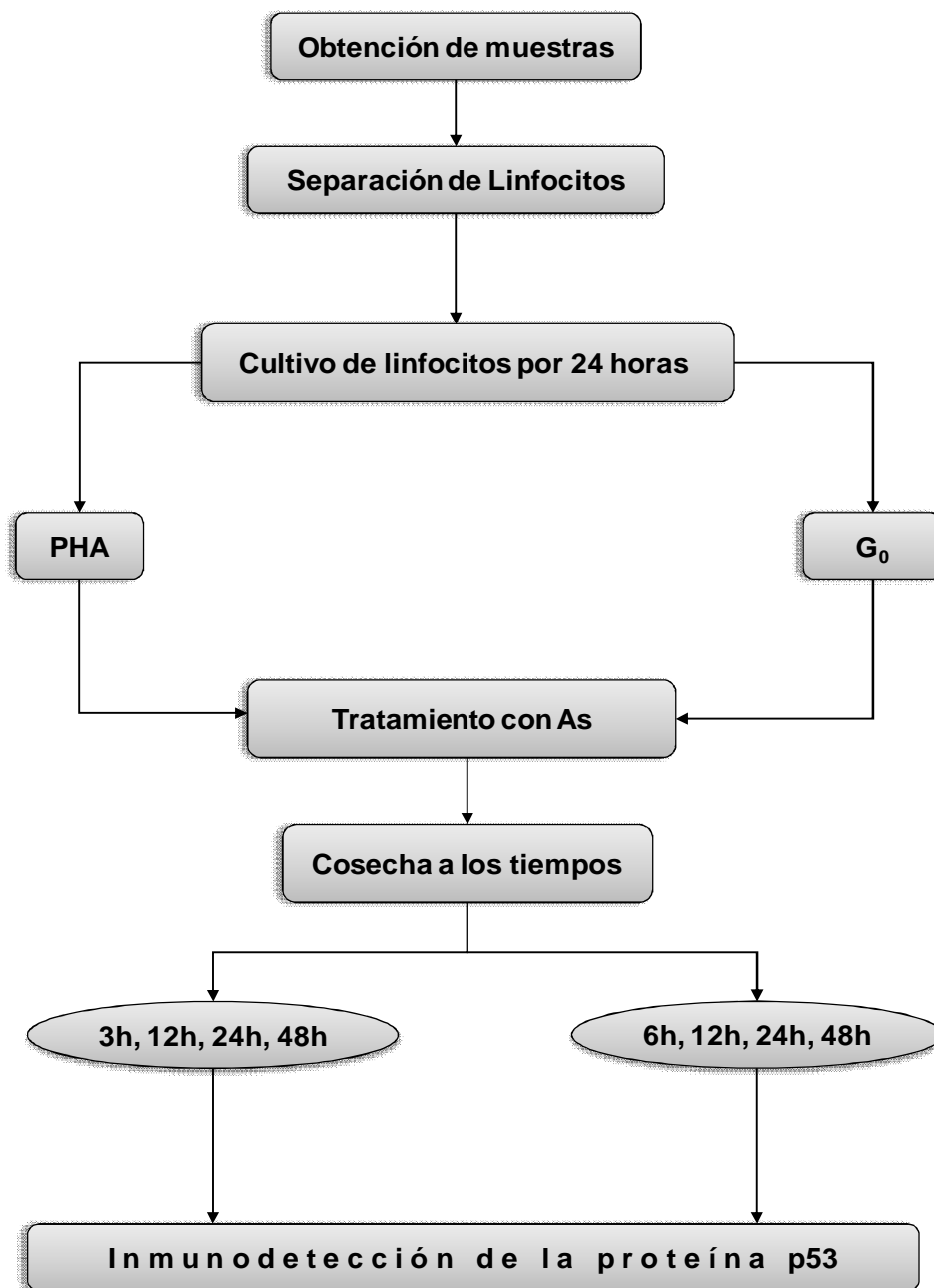
### Objetivos Particulares

- 1.- Estandarizar la inducción de la proteína p53 en los linfocitos de sangre periférica en ausencia y presencia de estimulación mitogénica y tratados *in vitro* con un agente genotóxico (arsenito de sodio).
- 2.- Evaluar la cinética de inducción de la proteína p53 en los linfocitos de sangre periférica de diferentes donadores tratados durante 3, 6, 12, 24 y 48 h con arsenito de sodio.
- 3.- Determinar si el incremento de los niveles de la proteína p53 depende de la inhibición de su degradación por la vía ubiquitina-proteosoma, utilizando un agente inhibidor de la formación del proteosoma (MG132).

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

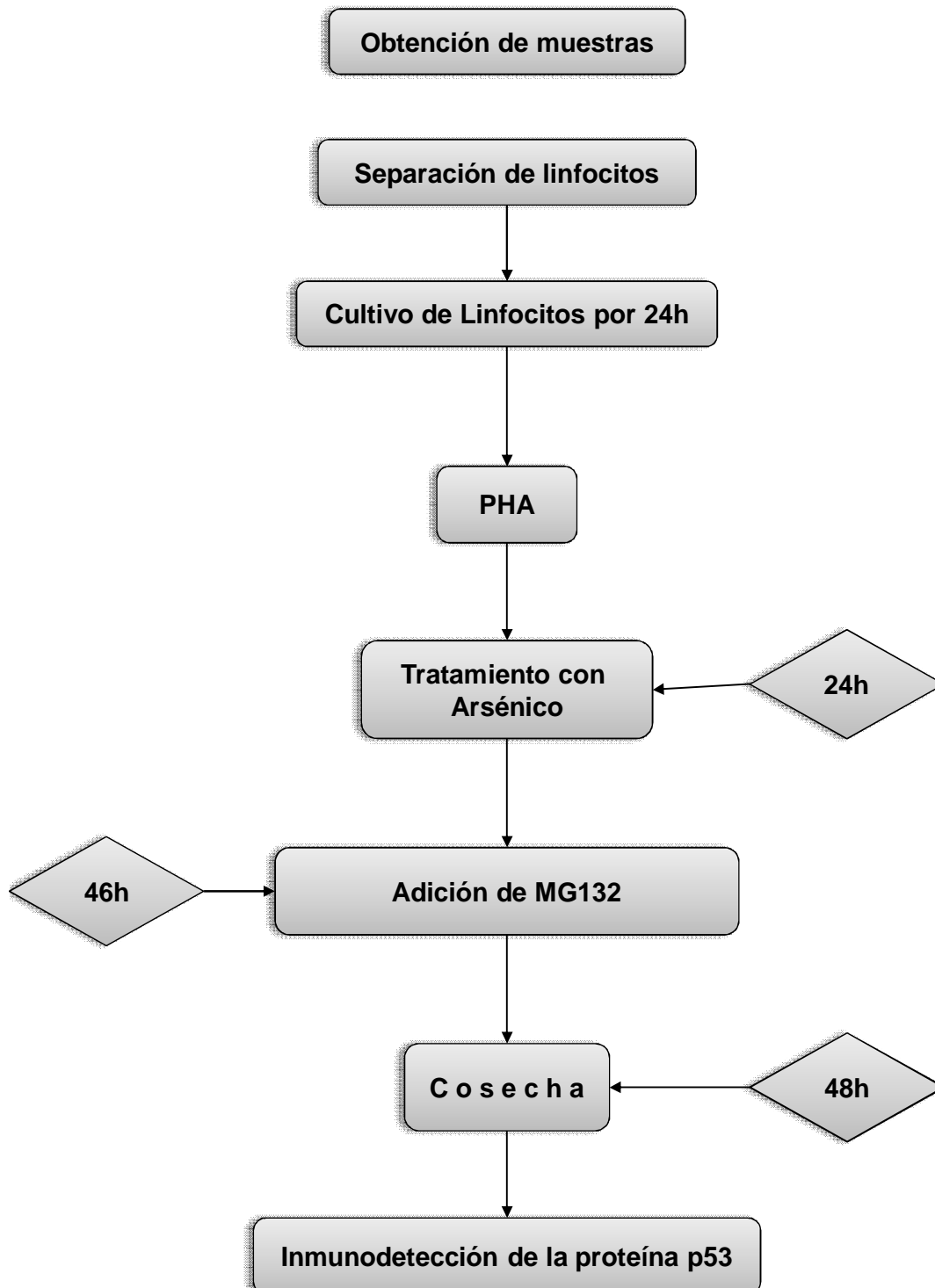
### 6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

#### CINÉTICA DE INDUCCIÓN DE P53





## EVALUACION DE LOS NIVELES DE P53 AL INHIBIR SU DEGRADACIÓN VIA PROTEOSOMA



---

## 6.2 OBTENCION DE MUESTRAS Y CULTIVO DE LINFOCITOS

Se extrajo sangre heparinizada (aproximadamente 15 ml) por venopunción de donadores sanos, no fumadores y no expuestos a fármacos.

Las células mononucleadas fueron separadas por un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque 1:3. En las que se observan 3 fases: la primera o superior de suero, la segunda o intermedia de Ficoll-Histopaque y la tercera o inferior de eritrocitos. Entre las 2 primeras fases se observa un halo blanco que corresponde a los linfocitos. Este halo de células color blanco es el que se recupera y el que se lleva a conteo celular.

Para los cultivos sin estimular ( $G_0$ ) se sembraron  $4 \times 10^6$  células en un medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 5%, aminoácidos no esenciales al 1% (10 mM Gibco) y L-glutamina al 1% (2mM Gibco).

En los cultivos estimulados (PHA) se sembraron  $4 \times 10^6$  células en un medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 15%, aminoácidos no esenciales al 1% (10 mM Gibco) y L-glutamina al 1% (2 mM Gibco). Se agregaron 200  $\mu$ l del agente mitogénico, fitohemaglutinina.

## 6.3 TRATAMIENTOS

Se utilizó el arsenito de sodio (As), un agente genotóxico con evidencia de efectos clastogénicos y aneugénicos, que aumenta los niveles de p53. Se prepararon soluciones estériles acuosas de As (1M). Por diluciones se obtuvieron las concentraciones finales (2  $\mu$ M) para cada uno de los tiempos deseados.

Para los cultivos sin estimular ( $G_0$ ) los linfocitos se incubaron a 37°C durante 24 h, posteriormente los cultivos se trataron con 2 $\mu$ M de As durante 24.h.

En los cultivos estimulados (PHA), los linfocitos se incubaron a 37°C durante 24 h, posteriormente los cultivos se trataron con 2 $\mu$ M As durante 24 h.

Para la evaluación de la cinética de expresión de p53 se realizaron cultivos de linfocitos con y sin el agente genotóxico durante 3, 6, 12, 24 y 48 h; en presencia y ausencia de un mitógeno PHA. Los cultivos celulares y la determinación de proteína se realizaron por triplicado para confirmar el patrón de expresión de cada individuo.

Para evaluar los niveles de la proteína p53 al inhibir su degradación mediada por el proteosoma, se realizaron cultivos de 48 h en presencia de PHA. A estos linfocitos estimulados se les trató con arsenito de sodio (As) durante las últimas 24 h para dar tiempo a la expresión de la proteína p53. A las 46 h se adicionó el agente inhibidor MG132 (10  $\mu$ M) y finalmente los cultivos fueron cosechados a las 48 h.

#### **6.4 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD**

Para evaluar los efectos citotóxicos del compuesto utilizado se analizó la viabilidad de las células durante los diferentes tiempos (3, 6, 12, 24 y 48 h) realizando el ensayo de tinción dual FDA/BrEt, el cual se usa como indicador para evidenciar la integridad de la célula. El BrEt tiñe los ácidos nucleicos de las células dañadas, observándose un color anaranjado-rojo al microscopio de fluorescencia; mientras que las células viables toman el color verde fluorescente del reactivo FDA. Se tomaron 25  $\mu$ l de la solución FDA/BrEt y se agregaron a las células, de esta mezcla se volvieron a tomar 25  $\mu$ l que fueron puestos en una laminilla. Se analizaron 100 células por triplicado al microscopio de fluorescencia con el objetivo de 20x aumento y filtro de excitación de 515-560 nm.

#### **6.5 INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA P53**

Después de los tratamientos las células fueron cosechadas y se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS) [24]. Los linfocitos fueron lisados en hielo en una solución salina amortiguadora de fosfatos con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se recuperó el sobrenadante y se tomaron 5  $\mu$ l de cada muestra

---

para la cuantificación de las proteínas totales mediante un ensayo colorimétrico (Lowry).

Para realizar las inmunodetecciones se usaron 40  $\mu$ g del lisado de proteínas, la muestra se desnaturalizó durante 5 minutos a 80°C en una solución amortiguadora (2% SDS, 80 mM Tris pH 6.8, 10% glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.01% de azul de bromofenol). Para la electroforesis se preparó un mini gel de SDS-poliacrilamida al 12%. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. Una vez terminada la transferencia la membrana fue bloqueada con leche en polvo baja en grasa al 1% durante toda la noche.

La detección de la proteína p53 se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal anti-p53 (DO-1) y fue reconocida por un anticuerpo secundario anti-IgG unido a la enzima peroxidasa de ratón. Después la membrana fue incubada con anticuerpo contra la proteína  $\beta$ -actina y con una peroxidasa de cabra acoplada, la cual se utilizó como control interno de cargado de gel. Para la detección de la proteína Bax se utilizó el anticuerpo policlonal anti-Bax (N-20), posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG unido a una peroxidasa de conejo. Mientras que para Bcl-2 se utilizó un anticuerpo monoclonal acoplado a una peroxidasa de ratón.

Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas en placas de autoradiografías utilizando el sistema de peroxidasa (ECL, Amsterdam).

Finalmente, se midió la densidad óptica mediante el programa Quantity One (Bio Rad).

## 6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizó la normalidad de los datos para posteriormente realizar el análisis estadístico con la prueba de ANOVA de una sola vía para muestras con distribución normal, seguida de la prueba de Tukey para comparación múltiple. Los datos que se consideraron estadísticamente significativos tuvieron una  $p < 0.05$ .

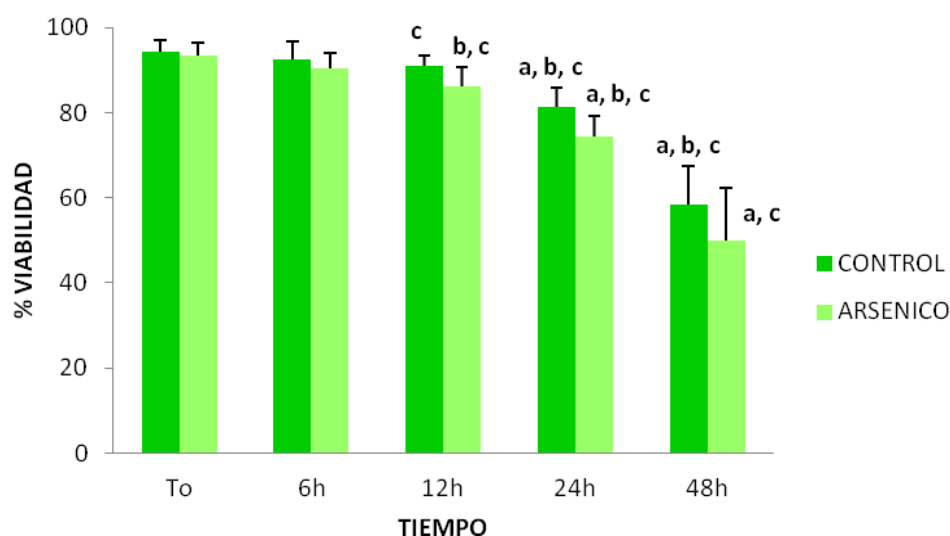
## 7. RESULTADOS

### 7.1 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

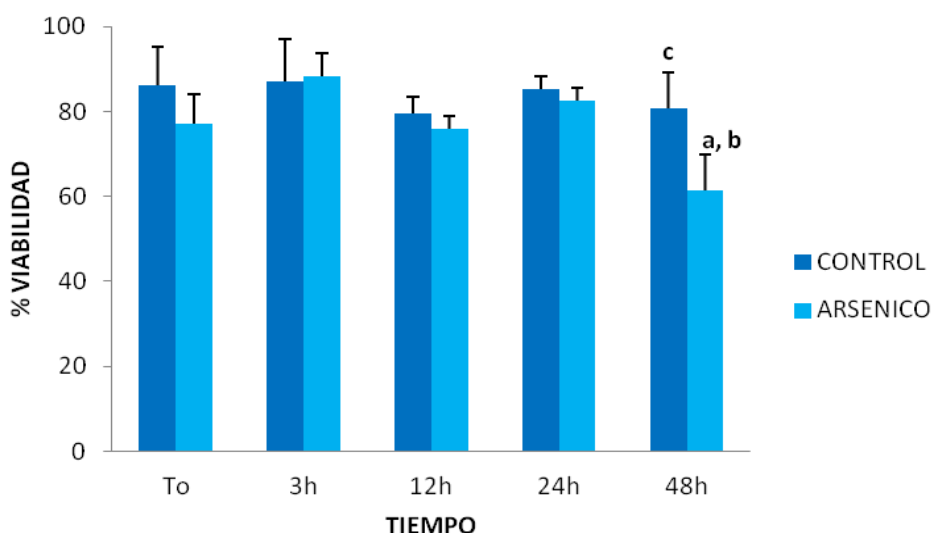
Los efectos citotóxicos del As se evaluaron mediante el uso del ensayo de FDA/BrEt en cultivos de linfocitos sin estimular y estimulados con PHA.

En los linfocitos  $G_0$  tratados con As se observó que hay una disminución de la viabilidad celular en función del tiempo. Se observó una disminución a partir de las 24 h y que continua hasta las 48 h, se encontraron diferencias significativa de los tiempos de 24 h y 48 h con respecto al tiempo  $T_0$ , 6 h y 12 h, tanto en los controles como en los cultivos tratados con As (Fig. 8) ( $p < 0.05$ ).

En los cultivos estimulados con PHA durante diferentes tiempos (3, 12, 24 y 48 h), con respecto al tiempo solo se observaron cambios en las células respecto a las 3 h y 24 h tratadas con As. A las 48 h, se encontró una diferencia significativa con respecto al tratamiento (Fig. 9).



**Figura 8. Efecto citotóxico del arsenito de sodio (As) en linfocitos no estimulados ( $G_0$ ).** Los resultados muestran el promedio de tres experimentos separados por triplicado. En donde **a**  $p < 0.05$  con respecto al control  $T_0$ ; **b**  $p < 0.05$  con respecto al tiempo de 6h; **c**  $p < 0.05$  con respecto al tiempo de 12 h



**Figura 9. Efecto citotóxico del arsenito de sodio (As) en linfocitos estimulados con PHA.**

Los linfocitos fueron estimulados con PHA durante 24h y posteriormente con As durante 48h más. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos separados por triplicado. En donde **a**  $p < 0.05$  con respecto al tiempo de 3 h; **b**  $p < 0.05$  con respecto al tiempo 24 h; **c**  $p < 0.05$  con respecto al tratamiento.

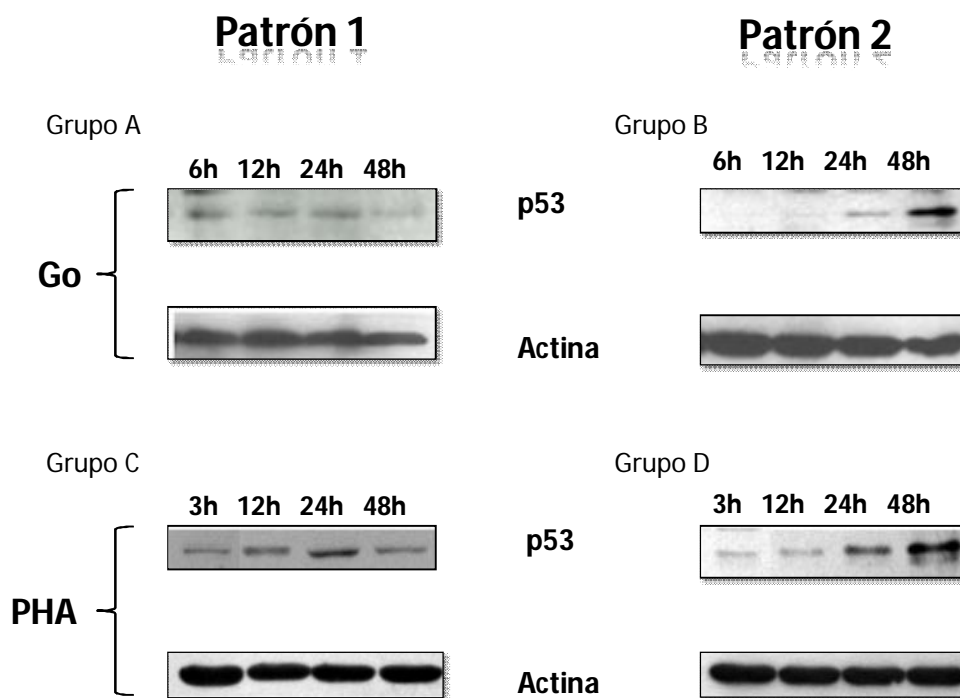
## 7.2 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE INDUCCIÓN DE P53

Para evaluar la cinética de inducción de la proteína p53 en linfocitos humanos, se realizaron cultivos celulares de 7 individuos sanos, bajo dos diferentes condiciones: (1) linfocitos sin estimulación tratados con As; (2) linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (PHA) tratados con As. Se obtuvo el promedio de 3 experimentos independientes para confirmar el patrón.

Los linfocitos sin estimular ( $G_0$ ) de los donadores fueron incubados con As de 6 a 48 h. Mientras que los linfocitos cultivados en presencia de PHA y tratados con As se evaluaron de 3 a 48 h. Para el análisis de los resultados, los valores de las densidades ópticas de las bandas de p53 fueron normalizados con respecto a los valores de las bandas de la proteína  $\beta$ -Actina. Para comparar los datos entre los experimentos, los valores fueron homogenizados transformando los datos del tiempo de 12 h a un valor de 1.

Al analizar la cinética de cada uno de los donadores fueron encontrados dos patrones de expresión de la proteína p53 tanto para linfocitos sin estimular

(G<sub>0</sub>) como en células estimuladas (PHA) en la respuesta al tratamiento con As. En la fig. 10 se observan los blots representativos de estos patrones.

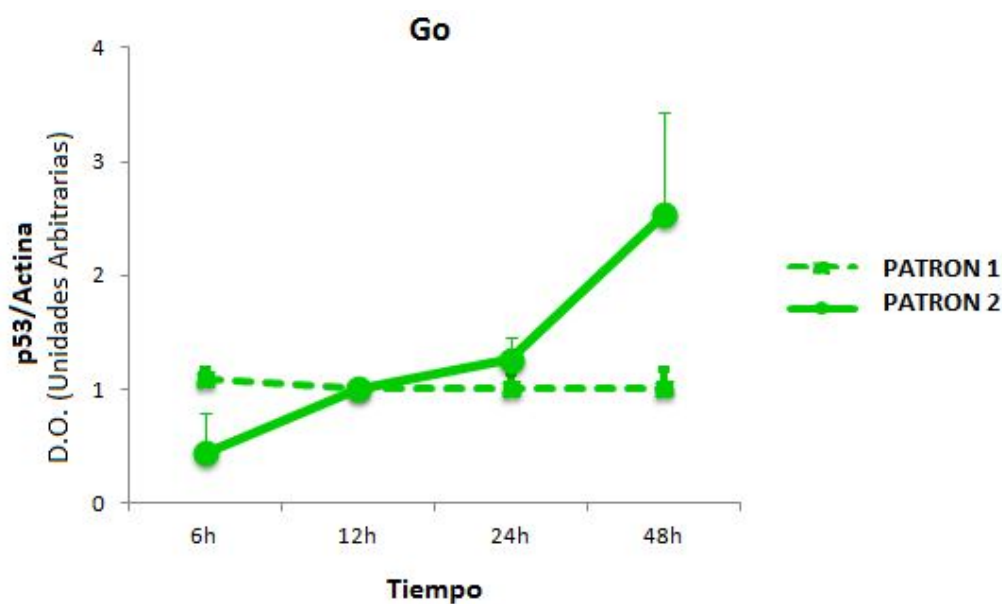


**Figura 10. Expresión de p53 en función del tiempo.** Se muestra un blot representativo de cada patrón. Concentrado en los donadores evaluados. Se utilizó como control constitutivo a la proteína  $\beta$ -Actina.

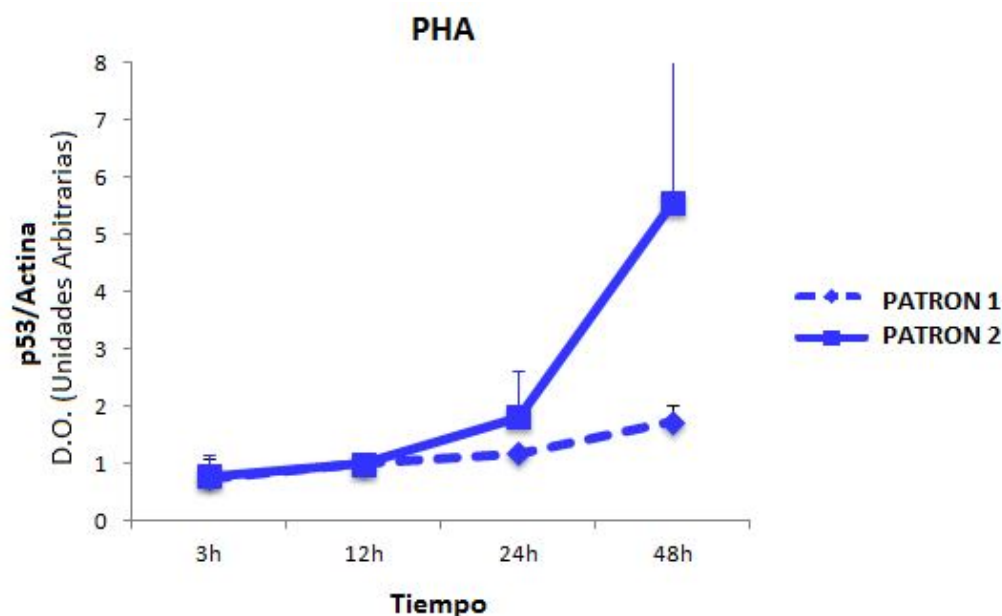
En los donadores se detectó la proteína p53 en los cultivos de G<sub>0</sub> desde las 6 h de exposición y se mantuvo sin cambios hasta las 48 h (Grupo A con el Patrón 1). Mientras que en otro grupo de donadores se observó un patrón diferente, en el cual a las 6 h se expresan niveles muy bajos de p53, sin embargo hay un incremento a las 12 h que va aumentando de manera gradual hasta las 48 h (Grupo B con el Patrón 2) (Figura 10 y 11).

En los linfocitos estimulados con PHA se observó que en algunos donadores se detectaban bajos niveles de p53 desde las 3 hasta las 12 h, con un incremento a partir de las 24 h y que aumentó ligeramente a las 48 h (Grupo C con el Patrón 1). Mientras tanto en otro grupo de donadores los niveles bajos de p53 se mantuvieron constantes desde las 3 hasta las 12 h, aumentando ligeramente a las 24 h y finalmente incrementándose aun más al llegar a las 48 h (Grupo D con el Patrón 2) (Figura 10 y 12). Interesantemente, los linfocitos de

donadores que presentan el comportamiento sin cambios en  $G_0$ , cuando son estimulados con PHA presentan un comportamiento similar al incremento en la expresión en función del tiempo de exposición a As (Figura 13).

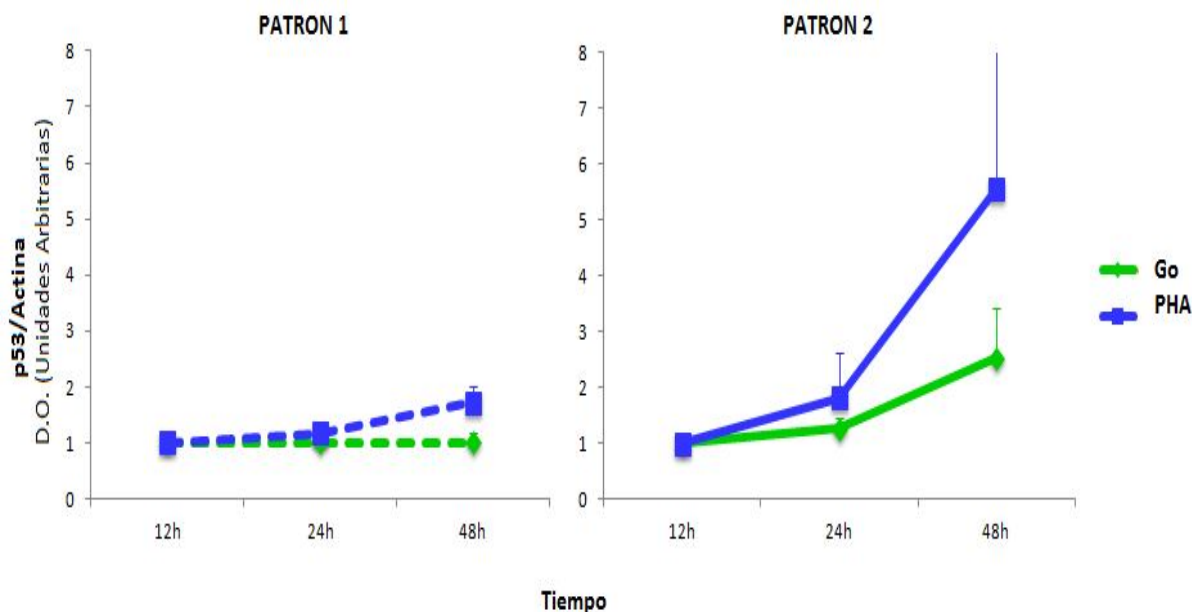


**Figura 11. Donadores agrupados por el patrón de expresión de la proteína p53 en linfocitos circulantes sin estimulación mitogénica ( $G_0$ ) tratados con As. Patrón 1 representa al grupo A. Patrón 2 representa al grupo B.**



**Figura 12. Donadores agrupados por el patrón de expresión de la proteína p53 en linfocitos estimulados con mitógeno (PHA) tratados con As. Patrón 1 representa al grupo C. Patrón 2 representa al grupo D.**



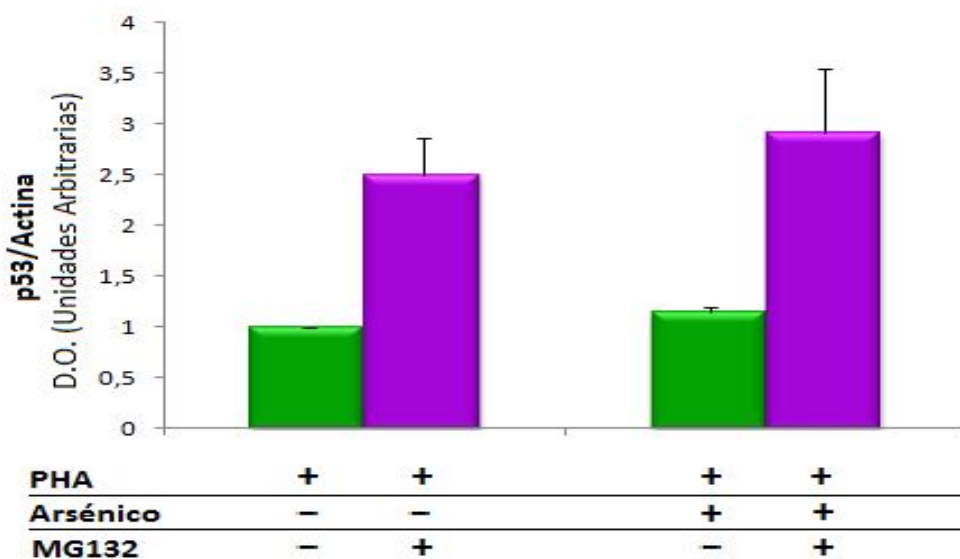


**Figura 13. Comparación de los grupos en función de las condiciones sin estimulación (G<sub>0</sub>) y con estimulación mitogénica (PHA) y los patrones de expresión de p53.** En la gráfica de la izquierda se pueden ver los patrones 1 grupos A y C; mientras que en la gráfica de la derecha se muestran los patrones 2 grupos B y D.

### 7.3 EVALUACION DE LOS NIVELES DE P53 AL INHIBIR SU DEGRADACIÓN VIA PROTEOSOMA

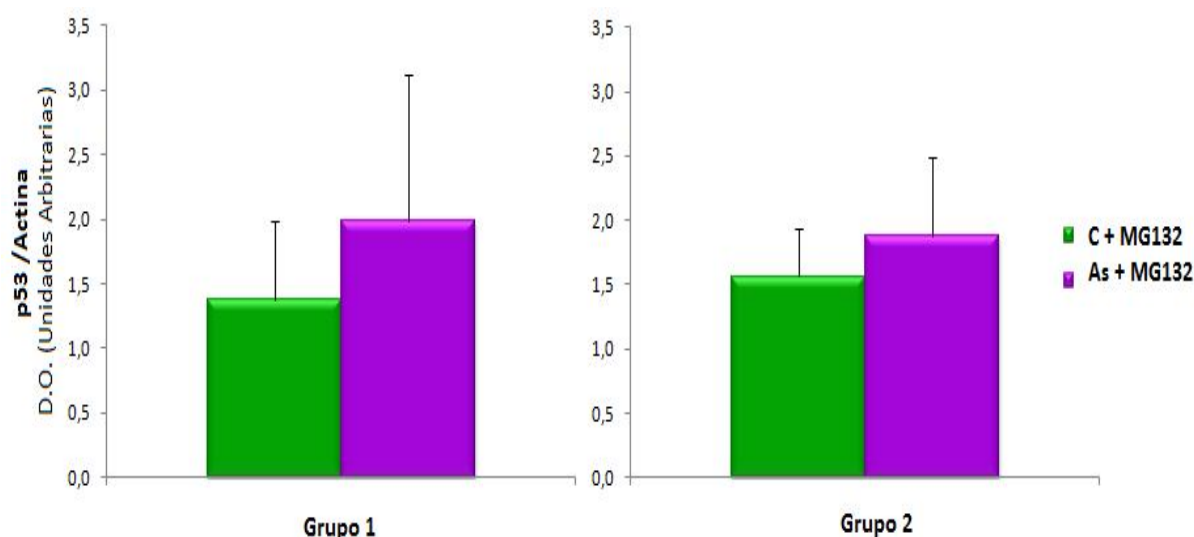
Determinar si el incremento de los niveles de la proteína p53 dependen de la inhibición de la degradación de la proteína por la vía ubiquitina-proteosoma, se realizó utilizando el agente MG132 que inhibe la formación del proteosoma. Se realizaron cultivos de linfocitos bajo diferentes condiciones: (1) linfocitos estimulados con PHA; (2) linfocitos estimulados con PHA y tratados con MG132; (3) linfocitos estimulados con PHA tratados con As y (4) linfocitos estimulados con PHA, tratados con As y MG132. Los linfocitos de todos los donadores fueron estimulados durante 24 h y tratados con As 24 h más, siendo agregado el agente MG132 en las dos últimas horas para dar tiempo a la expresión de la proteína p53 inducida por el As. Los valores fueron normalizados con la expresión de la proteína  $\beta$ -actina y ajustados a 1 con respecto al control (en este caso los linfocitos estimulados con PHA).

Los resultados indican que la expresión de la proteína p53 aumentó en las células cultivadas con el agente MG132, tanto en las células sin tratamiento, como en las tratadas con As (Fig. 14).



**Figura 14. Detección de la proteína p53 en linfocitos humanos tratados con As y el agente MG132.** La proteína fue determinada por Western blot. Se cuantificó la intensidad de las bandas por densitometría óptica normalizadas con las bandas inmunoreactivas para  $\beta$ -Actina. Se reporta el promedio de los donadores tratados con el agente inhibidor MG132.

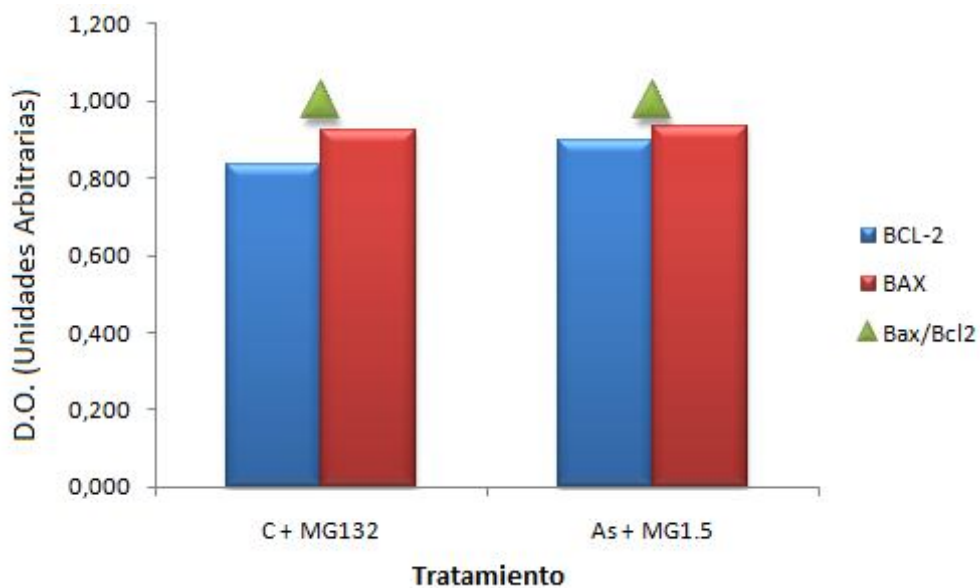
Es interesante mencionar que de forma individual todos los donadores presentaron un comportamiento similar en cada condición en la que fueron tratados, sin embargo, para el análisis se agruparon de acuerdo a la cinética de inducción de la proteína que presentaron, a pesar de esto, no se encontró una relación entre estos donadores y los patrones de expresión de la proteína p53 (Fig. 15).



**Figura 15. Detección de la proteína p53 en linfocitos humanos tratados con As y MG132 por grupos.** La proteína p53 fue determinada por Western blot. Se cuantificó la intensidad de las bandas por densitometría óptica normalizadas con actina. Se reporta el incremento a partir de su control, ordenado por grupos de acuerdo a la expresión de p53.

#### 7.4 EVALUACION DE LA APOPTOSIS EN LINFOCITOS TRATADOS CON MG132

Para validar los resultados que se obtuvieron con el tratamiento con el agente inhibidor del proteosoma MG132, se evaluó la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-2) moduladas por p53. La finalidad de este análisis fue para demostrar que los niveles de p53 no se incrementaron por un efecto tóxico que podría llevar a la muerte celular. Considerando que el balance entre Bax/Bcl2 determina su función, se calculó el coeficiente y se obtuvo un índice apoptótico, en donde los valores  $>1$  indican que hay un aumento en la expresión de Bax y por lo tanto, una disminución en la expresión de Bcl-2. Los resultados indican que el índice apoptótico fue  $\leq 1$ , indicando que no hay inducción de muerte celular programada (Fig. 16).



**Figura 16. Análisis del coeficiente de Bax/Bcl2 en linfocitos humanos estimulados (PHA) y tratados con MG132.** Las proteínas Bax y Bcl-2 fueron determinadas por Western blot. Se cuantificó la intensidad de las bandas por densitometría óptica normalizadas con actina. Se reporta el promedio de Bax y Bcl-2 de los donadores en grafica de barras y el coeficiente en puntos (triángulos).

---

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la expresión de la proteína p53 en linfocitos humanos *in vitro* ante la presencia del arsénico. Los resultados muestran que hay diferencias en la cinética de inducción entre los donadores sanos. Estos resultados son congruentes con los datos de estudios previos, en cuales se ha reportado que la expresión de la proteína p53 aumenta cuando se tratan linfocitos y líneas celulares con agentes xenobióticos [14, 24, 25]. También se observó que se incrementan ligeramente los niveles de p53 en los linfocitos estimulados con fitohemaglutinina, pero sin exposición a arsénico, probablemente debido al papel de p53 en la regulación del ciclo celular.

Nuestros datos muestran que hay diferentes respuestas en la expresión de p53 ante el agente genotóxico utilizado en este estudio. Por lo que los datos obtenidos permitieron agrupar a los donadores en dos grupos: 1) la expresión de p53 se incrementa fuertemente en función del tiempo de exposición con arsénico y 2) la expresión de p53 no cambia significativamente en función del tiempo de exposición con arsénico. Es de gran importancia mencionar que para este trabajo se utilizó una dosis de arsénico ligeramente citotóxica, capaz de aumentar los niveles de la proteína p53.

Con la finalidad de determinar si las diferencias en la expresión de la proteína p53 entre los individuos están relacionadas con alteraciones en la degradación y estabilización de la misma, se realizó el análisis de la expresión de p53 posterior al tratamiento con un agente inhibidor del proteosoma MG132. Encontrando que la expresión de la proteína p53 aumentó en las células tratadas con arsénico y con MG132, lo que sugiere que la degradación de p53 es vía ubiquitina-proteosoma. Estos resultados son apoyados por estudios realizados por Masdehors [26] en células de leucemia B-CLL (B-cell chronic lymphocytic leukemia) y linfocitos normales tratados con MG132, conduciendo a la acumulación de p53 a partir de las 3 h después del tratamiento.

La vía ubiquitina-proteosoma es importante en la degradación de proteínas involucradas en el ciclo celular, apoptosis, respuesta al estrés, transcripción y señalización. Recientemente, la ubiquitinación de proteínas ha sido implicada en una variedad de funciones reguladoras independientes del

---

proteosoma, incluyendo la reparación del DNA, activación de cinasas, entre otras.

Diversos estudios en fibroblastos humanos muestran que diferentes exposiciones al arsénico provocan cambios en el número de proteínas controladas por ubiquitina, incluyendo p53, ciclina D y GADD45 (Growth Arrest and DNA- Damage-inducible protein 45) [27, 28]. Proponiendo que la exposición a arsénico puede ejercer efectos en la vía ubiquitina-proteosoma. Por otra parte, los estudios respecto a la acumulación de proteínas ubiquitinadas muestran diferencias dependiendo de la concentración de arsénico. Mientras que con altas concentraciones de arsénico (2 mM) se inhibe la actividad de las enzimas conjugadas de ubiquitina por interacción con residuos de cisteína [29], en otros estudios, los bajos niveles de arsénico (0.5-10  $\mu$ M) causan la acumulación de proteínas conjugadas de ubiquitina en tejido renal de conejos y en la línea celular HEK293 [30]. En dicho estudio se utilizó el agente inhibidor MG132 como un control positivo, mostrando una elevada acumulación de proteínas conjugadas con ubiquitina; se observó una disminución de la actividad de una o más subunidades del proteosoma, ya sea en la expresión de los genes o en el nivel de la proteína [30]. En el presente trabajo no se encontraron diferencias entre los grupos que mostraron diferente cinética de inducción de p53, lo que nos podría indicar que los bajos niveles de p53 no son dependientes de una mayor degradación de p53-vía proteosomal. Sin embargo, otros componentes de la vía de degradación de proteínas deben ser investigadas, por ejemplo la conjugación con ubiquitina.

Es probable las diferencias en la cinética de inducción de p53 estén relacionadas con la metilación del DNA, ya que se conoce que la transcripción de genes está regulada por la metilación del DNA y que en el cáncer ocurre la inhibición de la expresión de p53 por la hipermetilación de su región promotora lo que puede conducir al desarrollo de la carcinogenesis inducida por el arsénico [31]. Sin embargo, algunos de los individuos expuestos a arsénico han mostrado un patrón de hipometilación por lo que se plantea que estados de hipo e hipermetilación pueden estar presentes en células tratadas con arsénico [32, 33].

---

Es importante entender las diferencias entre los individuos en la expresión de la proteína p53 tratando de dilucidar cuál podría ser el significado biológico de tener diferentes niveles de expresión de p53 ante el reto con agentes xenobióticos. La relevancia podría entenderse a nivel de la sensibilidad individual ante agentes que dañan el genoma por medio de la exploración de diferentes componentes de la vía ubiquitina-proteosoma.

---

---

## 9. CONCLUSION

Se encontraron diferencias en la expresión de p53 en linfocitos tratados con arsénico bajo condiciones sin estimulación ( $G_0$ ) y con estimulación mitogénica (PHA).

No se encontró una relación directa entre los bajos niveles de p53 y una mayor degradación de la proteína en los individuos con un patrón de baja expresión ante el reto con arsénico.

No hay inducción de apoptosis en los linfocitos tratados con el agente MG132, con lo que se comprueba que los niveles de p53 no se debieron a un efecto citotóxico.



---

## 10. PERSPECTIVAS

Evaluar la expresión de la proteína p53 en linfocitos de individuos expuestos a diversos xenobióticos para determinar si presentan patrones similares a los encontrados en este estudio.

Explorar la participación de otros componentes importantes en la ruta de degradación de p53 por la vía proteosómica, tales como la conjugación con ubiquitina y otras proteínas implicadas en la degradación de p53 como MDM2 y MDM4.

Identificar si las diferencias en la expresión de p53 podrían ser influenciadas por polimorfismos genéticos que afecten la función transcripcional de p53.

---

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B., Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Walter Peter. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega. 4a Ed. Barcelona. pp. 1463
2. Lehninger, 2009. *Principios de Bioquímica*. Ed. Omega. 5ta edición. Barcelona. pp. 107-1158
3. Jiménez L.F., Merchant Larios H., 2003. *Biología celular y molecular*. Ed. Pearson Educación. México D.F. pp. 614
4. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Ünsal-Kaçmaz K., Linn S., 2004. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu Rev. Biochem* 73: 39-85
5. Novák B., Sible J.C., Tyson J.J., 2002. Checkpoints in the Cell Cycle. *Encyclopedia of Life Sciences*
6. Lodish H., Berk A., Matsudaira, Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L., Darnell J., 2005, *Biología Celular y Molecular*. Ed. Medica Panamericana. 5ta edición. México D.F. pp 891
7. Niida H., Nakanishi M., 2006. DNA Damage Checkpoints in Mammals. *Mutagenesis*. 21: 3-9
8. Kindt T. J., Goldsby R. A., Osborne B. A., 2007. *Inmunología de Kuby*. Ed. Mc Graw Hill. Sexta Edición. México D. F. pp. 574
9. Bai L., Zhu W.G. 2006. P53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules* 2(4): 141-153
10. Chumakov P.M., 2000. Function of the p53 Gene: Choice between Life and Death. *Biochemistry*. 65(1): 28-40
11. Farnebo M., Bykov V.J.N., Wiman K.G., 2010. The p53 tumor suppressor: A master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 396: 85-89
12. Meek David W., 2009. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response?. *Nature*. 9: 714-723

13. Ande S.R., Chen J., Maddika S. 2009. The ubiquitin pathway: An emerging drug target in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*. 265: 199-205
14. Salazar A.M., Sordo M., Ostrosky-Wegman P. 2008. Relationship between micronuclei formation and p53 induction. *Mutation Research*. 672: 124-128
15. Adams, J., 2004. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Review*. 4: 349-360
16. Bhat K. P., Greer S.F. 2011. Proteolytic and non-proteolytic roles of ubiquitin and the ubiquitin proteasome system in transcriptional regulation. *Biochimical et Biophysical Acta* 1809: 150-155
17. Miller J., Gordon C. 2005. The regulation of proteasome degradation by multy-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Letters*. 579, 3224-3230
18. Lee D. H., Goldberg A. L., 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Elservier Science*. 8: 397-403
19. Ma Y., Fang Y., Yang Z., Cui J., Zhang L., Zhang L. 2011. Synthesis and SAR Study of Novel Peptide Aldehydes as Inhibitors of 20S Proteasome. *Molecules* 16: 7551-7564
20. Chen B., Ma Y., Meng R., Xiong Z., Zhang C., Chen G., Zhang A., Dong Y. 2010. MG132, a proteasome inhibitor, attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy in rats by modulation of mitogen-activated protein kinase signals. *Acta Biochim Biophys Sin* 42(4): 253-258
21. Hwan Y., Hyun W., 2009. The effects of MAPK inhibitor on a proteasome inhibitor, MG132-induced HeLa cell death in relation to reactive oxygen species and glutathione. *Toxicology Letters* 192: 134-140
22. Stites D. P., Abba I. T. 1994. *Inmunología Humana y Básica*. ED. Manual Moderno. México D.F. pp 418
23. LaDou, 2005. *Medicina Laboral y ambiental*. Manual Moderno. 3ra Edición México D. F.- Santafé de Bogotá, pp. 675
24. Salazar, A.M., Ostrosky-Wegman, P., Menéndez, D., Miranda, E., García-Carrancá, A., Rojas, E., 1997. Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutat Res*. 381: 259-265

25. Salazar, A.M., Calderón-Aranda, E., Cebrián, M.E., Sordo, M., Bensesky, A., Gómez, A., Ostrosky-Wegman, P., 2004. p53 expression in circulating lymphocytes of non-melanoma skin cancer patients from an arsenic contaminated region in Mexico. A pilot study. *Mol. Cellular Biochem.* 255: 25-31
26. Masdehors P., Merle-Béral H., Maloum K., Ömura S., Magdelénat H., Delic J. 2000. Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes. *Blood.* 96: 269-274.
27. Rossman T.G., Wang Z., 1999. Expression cloning for arsenite-resistance resulted in isolation of tumor-suppressor *fau* cDNA: possible involvement of the ubiquitin system in arsenic carcinogenesis. *20 (2):* 311-316
28. Vogt B.L., Rossman T.G., 2001. Effects of arsenite on p53, p21 and cyclin D expression in normal human fibroblasts- a possible mechanism for arsenite's comutagenicity. *Mutation Research.* 478 (1-2): 159-168
29. Pickart C.M., 1989. Arsenite Inhibits Two Steps in the Ubiquitin-dependent Proteolytic Pathway. 1989. *The Journal of Biological Chemistry.* 264 (32): 19245-19252
30. Kirkpatrick D.S., Dale K.V., Catania J.M., Gandolfi A.J. 2003. Low-level arsenite causes accumulation of ubiquitinated proteins in rabbit renal cortical slices and HEK293 cell. *Toxicology and Applied Pharmacology* 186: 101-109
31. Mass M.G., Wang L., 1997. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutation Research.* 386 (3): 263-277
32. Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters.* 133: 1-16
33. Hughes M.F., Beck B.D., Chen Y., Lewis A. S., Thomas D.J., 2011. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicological Sciences.* 123 (2): 305-352