

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

“Análisis de la participación de p53 en la regulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno producidas en la respuesta celular a arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>)”

Tesis que presenta

M. EN C. JOSÉ GLUSTEIN POZO MOLINA

para obtener el Grado de

**Doctor en Ciencias**

en la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Director de la Tesis

Dr. José Efraín Garrido Guerrero

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio No. 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante los fondos del proyecto No. 105174 y la beca No. 166970.

## **DEDICATORIAS**

### **A mis padres**

Porque siempre han estado a mi lado apoyándome y creyendo en mi incondicionalmente y por ayudarme siempre que los he necesitado durante todos los años de mi existencia. Mamá siempre has creído que puedo llegar a donde me lo proponga y se que siempre estarás ahí cuando te necesite.

Papá porque eres un excelente hombre y siempre has estado pendiente de mi, por tus consejos y tu esfuerzo por sacarnos adelante y se que continuarás haciéndolo.

Pero sobre todo por el amor que me han brindado.

### **A mis hermanas**

A quienes quiero mucho y con quién he pasado muy buenos momentos juntos y se que siempre podremos contar con nosotros.

### **A David**

Compartimos demasiado durante tantos años (no los suficientes) y espero sigas observándome. Estamos en la competencia.

### **A Ana**

Por todo el amor que me has brindado, por estar a mi lado apoyándome y ayudándome incondicionalmente durante todos estos años y se que continuarás haciéndolo, por aguantarme tantos años y hacer posible que haya cumplido uno de mis objetivos y por todos los momentos de felicidad que me has brindado. Espero compensarte todo lo que has hecho por mi y no defraudarte.

### **A Glusteincito**

Por su amor y todo lo que me ha enseñado a cerca de la vida, por la alegría que me ha dado y por todos los momentos que hemos estado juntos. Ahora espero tener más tiempo para convivir mucho más y jugar más y tener muchos pero muchos momentos felices. :)

### **A Jazmín**

Por su cariño y toda la ayuda que nos ha brindado cuidando y educando a Glusteincito, lo que me permitió terminar esta etapa de mi vida profesional de una manera más fácil.

### **A Victor y Rocío**

Porque son parte importante de mi familia, gracias por su apoyo, cariño y consejos.

### **A mis amigos de siempre**

Luis, Eliseo, Isidro (compa), Francisco, Camilo, Perea, Gil, Raúl, Eduardo que siempre han estado a mi lado en las buenas y en las malas, siempre aprendiendo y evolucionando juntos, porque siempre me han dado todo su cariño, apoyo, atención y sobre todo, amistad. Por todos los momentos que hemos y seguiremos compartiendo, por los milagros del nuevo milenio, por los “ayyyy mis amigos”, por las pláticas kilométricas, por la competencia y todo lo que nos ha caracterizado. Gracias por estar a mi lado.

### **A Alberto**

Por la amistad que me has dado y por todo lo que he aprendido de ti, por el apoyo que me has dado a lo largo de estos años, por la ayuda sobresaliente que me brindó para poder titularme de manera exitosa y a tiempo, y por todo el trabajo de laboratorio que llevó a cabo para redondear mi proyecto y así poderlo comunicar. Gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Dr. Efraín Garrido**

Por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por la atinada dirección del proyecto, por sus comentarios y sugerencias, por las puertas que me ayudó a abrir, pero sobre todo, por su interés en mi aprendizaje, su apoyo (que seguramente seguirá brindándome), la confianza y la amistad que me ha brindado.

### **A mis asesores**

Por los excelentes comentarios que enriquecieron el trabajo realizado y por todas sus enseñanzas.

### **A Pedro**

Porque siempre me ayudó con consejos, sugerencias y asesoría técnica en los diferentes ensayos que realicé y sobre situaciones vivenciales.

### **A mis compañeros y amigos del Laboratorio 1**

Alberto, Alfredo, Ángeles, Jairo, Vicky, Janet, Alicia, Vania, Pancho y Bianca. Porque con ellos compartí muchos de los mejores momentos del doctorado, porque me apoyaron y ayudaron en incontables ocasiones, porque de todos ellos aprendí a cerca de múltiples cosas y por ser excelentes personas.

### **A mis amigos del CINVESTAV**

Jorge, Jesús, Jorge, Rocío, Claudia porque con ellos crecí y conviví desde la maestría hasta el doctorado y sobretodo Angélica que me ayudó y apoyó mas allá de lo que cualquiera esperaría. A todos ustedes les agradezco su amistad y se que siempre podremos contar el uno con el otro.

### **A mis amigos de Iztacala**

Julia, Isabel y René muchas gracias por aceptarme y apoyarme en mi vida profesional productiva, espero seguir contando con su apoyo y amistad.

### **A Gaby**

Por toda la ayuda con los trámites y papeleo.

**“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”**

Albert Einstein

**“Si todo te da igual, estás haciendo mal la cuentas”**

Albert Einstein

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1 ESTRÉS OXIDATIVO .....	3
1.2 RADICALES LIBRES .....	3
1.3 ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD. ....	6
1.4 DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS .....	9
1.5 METALES GENERADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	11
1.6 ARSÉNICO Y ESTRÉS OXIDATIVO .....	12
1.7 MECANISMOS ANTIOXIDANTES .....	15
1.8 REGULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR P53 .....	17
1.9 RESPUESTA CELULAR CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR EL ARSÉNICO ....	20
1.10 P53 Y ARSÉNICO .....	23
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>24</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>27</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
5.1 GENERAL .....	28
5.2 ESPECÍFICOS .....	28
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>30</b>
<b>7. METODOLOGÍA .....</b>	<b>32</b>
7.1 REACTIVOS .....	32
7.2 CULTIVOS CELULARES .....	32
7.3 ANÁLISIS DE CICLO CELULAR.....	33
7.4 DETECCIÓN INTRACELULAR DE ROS .....	33
7.5 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL .....	34
7.6 RT-PCR .....	34

7.7 PCR EN TIEMPO REAL (QPCR).....	35
7.8 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP) .....	35
7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	38
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
8.1 LA RESPUESTA DE FRENO EN EL CICLO CELULAR QUE PROVOCA EL TRATAMIENTO CON NAASO <sub>2</sub> ES DEPENDIENTE DE P53.....	38
8.2 LA ACTIVIDAD DE REGULADOR TRANSCRIPCIONAL DE P53 ES NECESARIA PARA GENERAR EL ARRESTO EN LA FASE S DEL CICLO CELULAR INDUCIDO POR NAASO <sub>2</sub> . .....	45
8.3 P53 PROTEGE A LAS CÉLULAS DE LA ACUMULACIÓN EXCESIVA DE ROS GENERADAS POR EL ARSÉNICO.....	46
8.4 P53 ES FUNDAMENTAL EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES RESPONSIVOS AL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR EL TRATAMIENTO CON ARSÉNICO.....	51
8.5 P53 ESTÁ INVOLUCRADO EN LA REGULACIÓN DE GENES QUE PARTICIPAN EN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR Y CUYA EXPRESIÓN ES MODIFICADA POR EL TRATAMIENTO CON ARSÉNICO. ....	59
8.6 CDC25A ES REGULADO TRANSCRIPCIONALMENTE POR UN MECANISMO INDIRECTO DEPENDIENTE DE P53 Y QUE INVOLUCRA A ATF3 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON NAASO <sub>2</sub> . .....	64
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>70</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>83</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>91</b>
12.1 ARTÍCULO PUBLICADO.....	91

## RESUMEN

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre las moléculas pro-oxidantes y antioxidantes que causa alteraciones en las biomoléculas y puede llevar a la muerte celular. El estrés es generado por radicales libres ó especies reactivas de oxígeno (ROS) que son moléculas cuya estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en su orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad. Entre las principales ROS se encuentran el peróxido de hidrógeno, el radical superóxido y el radical hidroxilo. Los efectos biológicos de las ROS son controlados en los seres vivos por mecanismos fisiológicos de defensa antioxidante, que involucran procesos encaminados a evitar el exceso de oxidación a nivel celular. Las ROS son potenciales carcinógenos debido a que facilitan la mutagénesis, la promoción de tumor y su progresión. La modificación permanente del material genético resultado del daño oxidativo representa el primer paso involucrado en la mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento. Entre los causantes de estrés oxidativo celular se encuentran los metales y metaloides, y de estos, el arsénico es uno de los principales ya que se ha asociado con la generación de diversos tipos de neoplasias malignas y otras enfermedades. En este trabajo se demostró que la respuesta celular al arsénico es dependiente del estado funcional de p53 y que además de existir diversos reportes sobre la detención del ciclo celular en las fases G1 o G2/M, la exposición al arsénico también induce un aumento en el tiempo de progresión a través de la fase S en células p53<sup>+/+</sup>. En contraste, las células p53<sup>-/-</sup> sólo presentan un aumento sutil en la fase S, lo que indica que el arsénico afecta diferencialmente el ciclo celular dependiendo del estado de p53. Se ha reportado que el arsénico induce la producción de ROS, un proceso contrarrestado por p53. Para evaluar la participación de p53 en el arresto de la fase S y la conexión entre la detención transitoria del ciclo celular y el estrés oxidativo, se evaluó la respuesta al arsénico en células MCF-7 y H1299, y se analizó el papel de p53 como un factor transcripcional en la regulación de los genes implicados en la reducción de ROS y la detención de la fase S. Se observó que el arsénico indujo un aumento en la población de células en la fase S dependiente de la presencia y actividad transcripcional de p53. Además, se demostró que el arsénico activa la transcripción dependiente de p53 de genes de detoxificación de ROS, tales como SESN1 y TIGAR, y por un mecanismo indirecto que involucra a ATF3, y que los productos de estos genes podrían ser responsables de la detención del ciclo celular en fase S, tales como CDC25A.

## **ABSTRACT**

Oxidative stress is an imbalance between pro-oxidants and antioxidants agents that cause changes in biomolecules and can lead to cell death. Stress is generated by free radicals or reactive oxygen species (ROS), which are molecules containing an unpaired electron in its outer orbital, giving a configuration that generates high instability. Among main ROS are hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radical. The biological effects of ROS are controlled by physiological antioxidant defense mechanisms, which involve processes to avoid over-oxidation at cellular level. ROS are potential carcinogens because they induce mutagenesis, tumor promotion and progression. The permanent modification of genetic material generated by oxidative damage is the first step involved in mutagenesis, carcinogenesis and aging. Metals and metalloids are among the causes of cellular oxidative stress being arsenic one of them which has been associated with generation of various types of malignancies and other diseases. The cellular response to arsenic is dependent of p53 functional status. In addition to cell cycle arrest in the G1 or G2/M phases, it was shown that exposure to arsenic also induces an increase in the S-phase time in wild-type p53 cells. In contrast, p53<sup>-/-</sup> cells show only a subtle increase in the S phase, indicating that the arsenic differentially affects the cell cycle depending on p53 status. Importantly, it has been reported that arsenic induces reactive oxygen species, a process counteracted by p53. To evaluate the participation of p53 in the lengthening of the S phase and the connection between the transient cell cycle arrest and oxidative stress, we evaluated the cell response to arsenic in MCF-7 and H1299 cells, and role of p53 was analyzed as a transcription factor in the regulation of genes involved in ROS reduction and S phase arrest. Herein, we observed that arsenic induced an increase in the population of S phase cells that was dependent on the presence and transcriptional activity of p53. Furthermore, it was shown that arsenic activates p53-dependent transcription of ROS detoxification genes, such as SESN1 and TIGAR, and by an indirect mechanism involving ATF3, genes that could be responsible for the S phase cell cycle arrest, such as CDC25A.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Estrés Oxidativo

La asociación entre el estrés oxidativo y las enfermedades relacionadas a los estilos de vida ha sido ampliamente estudiada. El estrés oxidativo se puede definir como una perturbación del equilibrio entre moléculas pro-oxidantes y antioxidantes, con un desequilibrio a favor de los primeros, de tal modo que esta alteración da lugar a cambios en las biomoléculas y de hecho, a modificaciones funcionales en los sitios donde se localizan. Puede decirse que el estrés oxidativo es, en esencia, el efecto adverso que se produce en la sangre y los tejidos de los seres vivos cuando existe un incremento de la degradación de sus biomoléculas causado por radicales libres de oxígeno. Dicha lesión oxidativa, cuando se produce en moléculas de gran importancia biológica como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, puede conducir a la muerte celular. A medida que aumentan nuestros conocimientos en el campo de los radicales libres, se pone en evidencia su gran implicación en los mecanismos patogénicos de muchas enfermedades, sobre todo en las de tipo crónico. No solamente causa eventos nocivos como peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daño oxidativo al DNA, pero al mismo tiempo, también ocasiona fenómenos de adaptación fisiológica y regulación de la transducción de señales.

## 1.2 Radicales libres

Las causas de las propiedades tóxicas de los radicales libres quedaron al descubierto hasta la publicación de la teoría de los radicales libres y la toxicidad del oxígeno, en 1985 [1]. Desde entonces, ha habido una gran cantidad de reportes referentes a la adaptación de los seres vivos para coexistir con los radicales libres, aún más, para evidenciar el desarrollo de mecanismos reguladores de los cuales, las células obtienen beneficios.

Se considera un radical libre o especie reactiva de oxígeno (ROS) a aquella molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en su orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad [2]. Los radicales libres son usualmente inestables y altamente reactivos debido a que los electrones desapareados tienden a aparearse con otros electrones. Una molécula de oxígeno (O<sub>2</sub>) sufre cuatro reducciones electrónicas cuando es metabolizada *in vivo*. Durante este proceso, se

generan metabolitos de oxígeno reactivo por la excitación secundaria de los electrones al añadir al sistema energía o por la interacción con moléculas de transición. Los metabolitos de oxígeno reactivos producidos de esta manera son más reactivos que la molécula original [2]. Las principales moléculas reactivas del oxígeno se muestran en la tabla 1.

Fórmula química	Especie reactiva de oxígeno
$O_2^-$	Radical superóxido
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
$HO\cdot$	Radical hidroxil
$^1O_2$	Singlete de oxígeno
$HOO\cdot$	Radical Hidroperoxil
$LOOH$	Hidroperóxido alquilado
$LOO\cdot$	Radical peróxido alquilado
$LO\cdot$	Radical alquil
$ClO^-$	Ión hipoclorito
$^{4+}O$	Ión Ferrilo
$Fe^{5+}O$	Ión Periferrilo
$NO\cdot$	Óxido nítrico

Tabla 1. Principales especies reactivas de oxígeno.

Todos los seres vivos que utilizan  $O_2$  para la producción de energía generan ROS por lo que han desarrollado varios mecanismos de defensa antioxidante. Existen diversas fuentes productoras de especies reactivas, de ellas, las mitocondrias constituyen la principal aunque existen otras como los peroxisomas, los leucocitos polimorfonucleares (particularmente durante los procesos inflamatorios), células fagocíticas, entre otras [1].

Los efectos biológicos de las ROS son controlados en los seres vivos por una gama de mecanismos fisiológicos de defensa antioxidante, que involucran a un complejo grupo de procesos, todos encaminados a evitar el exceso de oxidación a nivel celular, que es en

definitiva, el que causa los trastornos. Con el paso del tiempo el proceso se hace crónico y se produce entonces el deterioro de los tejidos, los órganos y luego del organismo completo, con lo que se produce la enfermedad.

Existen diversos sistemas de defensa que participan directamente para tratar de lograr el equilibrio antes mencionado. Dichos sistemas son: enzimas antioxidantes, enzimas que eliminan y/o separan las moléculas que han sido oxidadas y sustancias antioxidantes específicas. Sin embargo, si las ROS o los radicales libres son generados en exceso o en sitios anormales, el balance entre la formación y su eliminación se pierde, resultando en la generación de estrés oxidativo. Como consecuencia, estas moléculas pueden modificar moléculas que participan en procesos fisiológicos celulares, alterando su función y por lo tanto induciendo el desarrollo de enfermedades.

Además, las especies reactivas de oxígeno son reconocidas por presentar un papel dual en el metabolismo celular, tanto benéfico como dañino [1,3,4]. Los efectos benéficos ocurren cuando las ROS se encuentran en cantidades bajas a moderadas que involucran procesos fisiológicos como la defensa contra agentes infecciosos y en la regulación de múltiples sistemas de señalización celular, como la inducción de procesos que favorecen el crecimiento celular [3].

Un gran número de funciones fisiológicas están controladas por vías de señalización sensibles a procesos redox [5]. Éstas comprenden, por ejemplo: (1) producción de NO regulado por redox; (2) producción de ROS por NAD(P)H oxidasa de fagocitos (estallido oxidativo); (3) producción de ROS por NAD(P)H oxidasa en células no fagocíticas; (4) regulación del tono vascular y otras funciones reguladas por NO•; (5) producción de ROS como sensor de cambios en la concentración de oxígeno; (6) regulación redox de la adhesión celular; (7) regulación redox de la respuestas inmune; (8) apoptosis y otros mecanismos de inducción de ROS.

Por otro lado, los efectos nocivos del estrés oxidativo ocurren cuando existe una sobreproducción de ROS por un lado y por el otro, la deficiencia de mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, generadas por un desequilibrio en las reacciones de oxidación/reducción o pro-oxidantes/antioxidantes. Este exceso de ROS (como ya se mencionó) causa oxidación de lípidos, proteínas o DNA inhibiendo su función

normal. Debido a esto, el estrés oxidativo se ha implicado en diferentes enfermedades al igual que en procesos de envejecimiento.

### **1.3 Estrés oxidativo y enfermedad.**

Hay múltiples reportes que asocian el estrés oxidativo con diversas enfermedades, como diabetes, aterosclerosis, inflamación crónica, susceptibilidad a daño por agentes infecciosos, isquemia, cáncer, etc. Estas enfermedades entran dentro de dos categorías. En la primera, la diabetes y el cáncer presentan comúnmente un componente pro-oxidante. En la segunda, el componente principal es un estado oxidativo asociado a procesos inflamatorios, como síndrome metabólico y diabetes mellitus [5].

Las especies reactivas de oxígeno son potenciales carcinógenos debido a que facilitan la mutagénesis, la promoción de tumor y su progresión. Los efectos promotores de crecimiento están relacionados con la modificación de diferentes cascadas de señalización [6].

El estrés oxidativo conduce a un desbalance oxido/reducción encontrado en diferentes tipos de cáncer en comparación con células normales, convirtiéndolo en un agente favorecedor de la proliferación celular [1,7,8]. La modificación permanente del material genético resultado del daño oxidativo, representa el primer paso involucrado en la mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento. La mutación del DNA es un paso crítico en la carcinogénesis, y un nivel elevado de daño oxidativo del DNA se observa en varios tipos de tumores [9–11]. Los efectos antes mencionados dependen en gran medida de la cantidad de especies reactivas que se están generando al interior de la célula, a niveles bajos se favorece la promoción tumoral, en tanto que niveles moderados generan mutagénesis y niveles elevados muerte celular.

Además de las vías de daño directo al DNA, existe evidencia que relaciona la gran producción de ROS por la mitocondria con el daño al DNA. Se han detectado mutaciones en los genes que codifican los complejos mitocondriales de la respiración celular I, III, IV y V en diferentes tipos de cáncer [1,11].

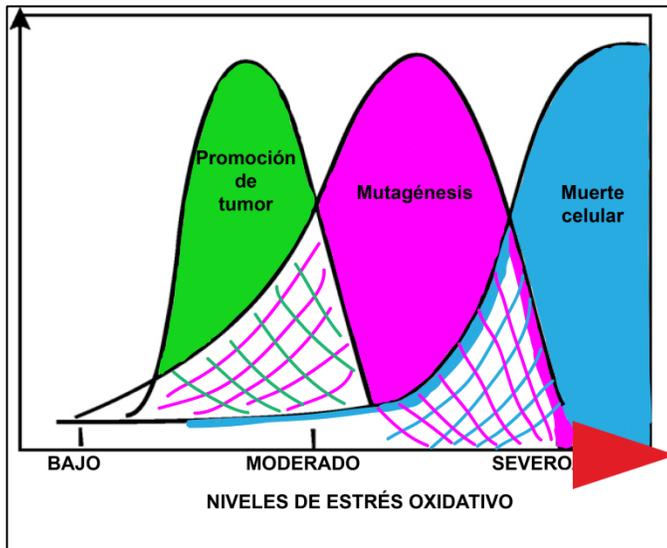
Otro mecanismo dependiente del estrés oxidativo implicado en la carcinogénesis es la peroxidación lipídica, la cual lleva a la producción del malondialdehído (MDA), el cual es una molécula con capacidades mutagénicas y carcinogénicas [12].

Se ha demostrado ampliamente que las ROS interfieren con la expresión de un gran número de genes y con vías de transducción de señales por lo que se les ha involucrado en el desarrollo de cáncer [1,4,8]. Algunos receptores de factores de crecimiento (EGF, PDGF, VEGF) son afectados por ROS y metales carcinógenos como el níquel, arsénico, cobalto y berilio [13]. Se ha reportado el aumento de la expresión de los receptores EGF en cáncer de pulmón y de vías urinarias. PDGF se expresa en células endoteliales, fibroblastos y células mesenquimales; la sobre-expresión de este receptor se ha detectado en cáncer de pulmón y de próstata.

También se ha observado asociación entre oxidantes celulares y la activación del factor de transcripción AP-1 (constituido por un miembro de la familia fos y otro de la familia jun) [4]. Uno de los efectos de la activación de AP-1 es el aumento de proliferación. La expresión de c-fos y c-jun puede ser inducida por varios compuestos, como radicales libres y moléculas no genotóxicas y promotoras de tumor (varios metales, fenobarbital, alcohol, radiación ionizante, etc.) [2,14].

Las ROS parecen poseer un efecto dual en la tumorigénesis y promoción y supresión del cáncer. Las especies reactivas pueden participar en vías de señalización como Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 y en la vía de p38 [8]. Sin embargo, estas vías tienen funciones inversas en la tumorigénesis. La primera se relaciona con la promoción del cáncer, mientras la segunda se asocia con la regulación negativa de la proliferación celular y tumorigénesis, senescencia replicativa e inhibición por contacto. Así, las especies reactivas no deben ser vistas de manera absoluta como factores carcinogénicos o como supresores de tumor.

Como se puede apreciar existen diferentes reportes indicando que existen diferentes vías que se activan en respuesta a ROS y que pueden conducir al desarrollo de cáncer, pero como ya se mencionó este resultado se alcanzará solamente cuando en la célula exista la cantidad adecuada de estrés oxidativo el cual facilitaría la activación de vías proliferativas, y si se sobrepasa este umbral el resultado sería un efecto pro-apoptótico (FIG. 1)



**FIGURA 1.** Efecto dosis-dependiente de los niveles de estrés oxidativo y las diferentes respuestas celulares.

El estrés oxidativo también favorece el desarrollo de otras alteraciones tisulares. Uno de estos procesos incluye un paso importante en el crecimiento de cualquier tumor más allá de unos pocos milímetros que es la generación de los suministros sanguíneos que alimentan a las células malignas [15,16]. La angiogénesis es un proceso de múltiples pasos, que implica la degradación de la membrana basal de las células endoteliales, la migración de las células endoteliales y crecimiento de células del estroma perivascular y capilar. También se ha implicado la producción de ROS con el estrés oxidativo generado en miocitos vasculares y cardíacos que generan lesión cardiovascular. Principalmente se ha implicado la producción de ROS en aterosclerosis, enfermedad isquémica cardíaca, hipertensión, cardiomiopatías, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca [17,18].

Otro proceso patológico en el cual existe una asociación con estrés oxidativo es la artritis reumatoide que es una enfermedad crónica autoinmune de las articulaciones y tejidos alrededor de las articulaciones con infiltración de macrófagos y activación de células T. La patogénesis de esta enfermedad está asociada predominantemente con la formación de radicales libres en el sitio de la inflamación [19].

Otra asociación importante es con diabetes mellitus, en este caso, se ha propuesto que el aumento de estrés oxidativo es una de las principales causas del aumento de hiperglicemia y la causa de las complicaciones de la diabetes. La hiperglicemia estimula la formación de ROS a través de diferentes fuentes como lo son la fosforilación oxidativa, la oxidación de la glucosa, la NAD(P)H oxidasa, lipoxigenasa, citocromo P450 mono-

oxigenasa, la sintasa de óxido nítrico (SON), entre otros [20]. Además, hay múltiples observaciones que asocian los defectos de los islotes  $\beta$  del páncreas con niveles bajos de actividad antioxidante lo que los pone en riesgo de daño inducido por ROS.

El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo debido a su tasa elevada de utilización de oxígeno, su alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados oxidables y la presencia de metales redox-activos (Cu, Fe). El estrés oxidativo incrementa con la edad y así puede ser considerado como un factor causante de enfermedades neurodegenerativas. Entre estas enfermedades encontramos la enfermedad de Alzheimer que muestra un alto daño oxidativo asociado a la acumulación de péptido  $\beta$ amiloide ( $A\beta$ ), el principal constituyente de las placas seniles en el cerebro. La elevada producción de  $A\beta$  como un antioxidante preventivo contra el aumento de la acción del estrés oxidativo sobre las lipoproteínas cerebrales y la neurotoxicidad en el envejecimiento, son postulados como eventos principales para el desarrollo de esta enfermedad [21]. Otra enfermedad del sistema nervioso central es la enfermedad de Parkinson en la cual el efecto del estrés oxidativo es soportado por estudios post-mortem y por estudios que muestran la capacidad del estrés oxidativo para inducir degeneración de las células de la sustancia nigra [22][23].

En resumen, las especies reactivas de oxígeno son productos del metabolismo celular normal que pueden actuar como segundos mensajeros controlando funciones fisiológicas normales, por lo tanto su producción está regulada por mecanismos complejos que incluyen hormonas y citocinas. Además, las ROS participan en varios procesos de oxido-reducción celulares encaminados a mantener la homeostasis “redox”. El estrés oxidativo es un proceso que puede ser un mediador importante de daño a diferentes estructuras celulares y en consecuencia producir estados patológicos y envejecimiento.

#### **1.4 Daño oxidativo a biomoléculas**

Las altas concentraciones de ROS pueden ser importantes mediadores de daño a diferentes estructuras celulares como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas [1]. Por ejemplo, una de las especies reactivas que más se han asociado con daño a la estructura del DNA es el radical hidroxilo que reacciona con todos los componentes del DNA, ocasionando daños a las purinas y pirimidinas al igual que el esqueleto de la desoxi-ribosa [3]. La lesión al DNA más estudiada es la formación de 8-OH-G. Las modificaciones permanentes al

material genético resultantes del daño oxidativo puede representar el primer paso involucrado en la mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento.

El daño oxidativo al DNA puede llevar a inestabilidad genética que puede afectar a las proteínas asociadas a la replicación y reparación del DNA, apoptosis, regulación del ciclo celular, inestabilidad cromosómica y todos ellos conducir al desarrollo del cáncer [10]. La falla al reparar el DNA puede llevar a mutagénesis, citotoxicidad, muerte celular y consecuentemente a producir enfermedad. El daño al DNA puede ser reparado por varios mecanismos, sin embargo, si el daño no es reparado antes de la replicación, se generan dos caminos, primero, hay bloqueo de la síntesis de DNA; segundo, el daño puede ser tolerado y generar la aparición de una mutación. Así, el daño que bloquea la replicación puede llevar a muerte celular, mientras que las que son toleradas causan mutaciones.

En cuanto a las proteínas, los mecanismos involucrados en su oxidación por ROS han sido ampliamente estudiados. Las cadenas laterales de todos los residuos de aminoácidos de las proteínas, en particular la cisteína y la metionina son susceptibles de oxidación por las especies reactivas [24]. La oxidación de los residuos de cisteína puede llevar a la formación reversible de enlaces disulfuro entre los grupos tiol (-SH) y tioles de moléculas de bajo peso molecular en particular GSH (S-glutatiolación). La concentración de los grupos carbonil, generados por diferentes mecanismos, es una buena medida de la oxidación proteica producida por ROS, produciendo así carbonilación de proteínas.

Otro ejemplo de afectación proteica por ROS es la glicosilación avanzada de productos finales (AGEs), que son un tipo de moléculas complejas resultado de una reacción entre carbohidratos y grupos amino libres de proteínas. Los productos intermedios son conocidos, como productos de Amadori, bases de Schiff y productos de Maillard. La mayoría de los AGEs son compuestos reactivos muy inestables [6].

En cuanto a los lípidos, ya se comentó previamente que su peroxidación causa la generación del aldehído MDA que es un producto mutagénico, otro sub-producto de la peroxidación de lípidos es la generación de hidroxinonal que es un mutágeno débil pero que parece ser el principal producto tóxico de la peroxidación de lípidos.

## 1.5 Metales generadores de estrés oxidativo

La exposición humana a ciertos metales resulta en la generación de efectos tóxicos que van desde la mortalidad inmediata a procesos de progresión lenta como la carcinogénesis. Existen varios metales de transición que son esenciales como zinc, hierro, manganeso, cobre y cobalto que son empleados por los sistemas celulares para controlar varias funciones metabólicas y de señalización. Sin embargo, su misma naturaleza los hacen capaces de evadir el control que las células tienen sobre su ingreso, transporte, compartimentalización y su llegada a sus tejidos y células blanco. El desajuste de la fisiología celular ocurre cuando los metales exógenos se unen a moléculas a las cuales no se deberían unir, o cuando desplazan a otros metales de sus acarreadores principales.

El daño generado por los metales puede incluir la modificación oxidativa de los complejos ligando-metal o de las moléculas vecinas que son atacadas por los intermediarios oxidativos de la reacción original. Estos intermediarios reactivos engloban un espectro de radicales oxígeno-carbón o radicales de sulfuro, que se originan a partir del  $O_2$ , peróxido de hidrógeno, lípidos peroxidados, así como modificaciones en aminoácidos, péptidos, proteínas y otros ligando que pueden acarrear a los metales tóxicos. El daño causado por los radicales en las células pueden resultar en un amplio espectro de patologías [1,24].

Existen varios estudios en los que se relaciona la toxicidad inducida por metales y la carcinogénesis enfatizando su participación en la generación de especies reactivas de oxígeno [4,14,24]. La formación de radicales libres mediada por metales pueden causar modificaciones en las bases de DNA, estimular la peroxidación lipídica, cambios en la homeostasis del calcio y sulfidrilos. Solo algunos metales de transición pueden activar al oxígeno y otros sustratos y convertirlos en intermediarios altamente reactivos bajo condiciones fisiológicas. Los principales mecanismos de activación de oxígeno por los metales involucran las reacciones de Fenton/Harber-Weiss y la auto-oxidación [24].

La capacidad tóxica y carcinogénica de los metales se debe a que son capaces de actuar con ligando naturales, incluyendo al DNA y las proteínas nucleares, que llevan a daño estructural y funcional. Este daño puede incluir cambios conformacionales causados directamente por los metales y/o cambios químicos resultado de la actividad oxidativa. En el segundo caso, los metales causan daño indirectamente a través de la formación de radicales libres y otros intermediarios reactivos que se generan por la interacción con  $O_2$ ,

$O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , y/o otros oxidantes exógenos. El espectro del daño oxidativo puede ser puntual o muy amplio, dependiendo de la naturaleza de las especies reactivas generadas.

Entre los metales que han mostrado asociación con enfermedades debido a la generación de estrés oxidativo son principalmente el hierro, níquel, cobre, cromo, cobalto, vanadio, cadmio y arsénico.

### **1.6 Arsénico y estrés oxidativo**

El arsénico (As) es un metaloide que se encuentra ampliamente distribuido sobre la corteza terrestre, puede ser liberado al agua bajo determinadas condiciones y es considerado uno de los tóxicos más significativos del ambiente que existe en forma orgánica e inorgánica. Las principales formas de arsénico inorgánico incluyen el arsenito trivalente y el arsenato pentavalente [25]. Además, está presente en alimentos, agua (principal fuente de consumo en humanos) y sobre la tierra. La concentración de arsenito en agua bebible varía de 0.01 a 3.7 mg/l (1.3-49  $\mu$ M) [9], aunque la concentración máxima permitida por la OMS es de 10  $\mu$ g/l.

El arsénico puede encontrarse en los organismos con diferentes estados, es decir, puede encontrarse en su forma inorgánica u orgánica. Las formas inorgánicas incluyen al arsenito (AsIII) y al arsenato (AsV), además, puede ser metilado y formar ácido monometilarsónico (MMA) y ácido dimetilarsónico (DMA) *in vivo* [26]. Aunque el proceso fue previamente considerado como un mecanismo detoxificante, estudios recientes *in vivo* indican que las formas metiladas del arsénico pueden servir como co-carcinógenos y promotoras de tumor [27–29]. El arsenato es un análogo del fosfato, el cual interfiere con las reacciones de fosforilación y compite con el transporte de los fosfatos. El arsenito puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las proteínas e inhibir muchas rutas metabólicas. Biologicamente, el arsenito trivalente es significativamente más activo que el arsenato pentavalente, incluyendo su capacidad para inducir amplificación génica en células de mamíferos [30–32], en general el arsenato es absorbido y casi completamente reducido a arsenito en la sangre [32].

Por mucho tiempo se ha considerado al arsénico como un compuesto tóxico y carcinogénico. Los estudios epidemiológicos indican que las personas expuestas a altos niveles de arsénico son más propensas a desarrollar cáncer de piel, vejiga, hígado y pulmón [27,32]. Además de sus efectos carcinogénicos, se ha sugerido que la exposición al arsénico

juega un papel importante en la enfermedad del “pie negro”, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares [33–37].

El papel que juega el arsénico como carcinógeno está en gran medida relacionado con su capacidad para generar estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno más relacionadas con mutagénesis y carcinogénesis son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el óxido nítrico. Al respecto, se sabe que durante el metabolismo celular del arsénico se generan radicales libres, por lo que se ha establecido una asociación entre el estrés oxidativo generado por este metal y las diversas enfermedades con las que se ha asociado su exposición. Se ha demostrado que las ROS están directamente involucradas en el daño oxidativo de lípidos, proteínas y DNA en las células expuestas al arsénico, lo cual incluso puede llevar a la muerte celular [32]. Aunado a lo anterior existen reportes que implican al arsénico como causante de daño y muerte celular a través de vías de señalización reguladas por ROS [27].

A concentraciones ambientales no letales (por debajo de 5  $\mu\text{M}$ ), el arsénico puede estimular la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células endoteliales [38]. De hecho, la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  es probablemente la especie reactiva primaria que se produce en respuesta al arsénico en varios tipos celulares la cual conduce a la formación de otras ROS como  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\cdot\text{OH}$ . En presencia de la superóxido dismutasa (SOD),  $\text{O}_2^{\cdot-}$  actúa sobre el oxígeno y  $\text{H}_2\text{O}_2$  para convertirlo espontáneamente en una reacción catalizada por  $\text{Fe}^{2+}$  (reacción de Fenton) en el radical  $\cdot\text{OH}$  altamente reactivo. Se ha sugerido que el arsenito aumenta las especies reactivas a nivel de la ubiquinona de la cadena respiratoria y por lo tanto, las mitocondrias serían el principal sitio de producción de ROS [39].

Se ha asociado al arsénico con el daño a diferentes moléculas celulares, las cuales se han utilizado como biomarcadores de alteraciones celulares por la exposición a este metal, entre ellas se encuentran daño al DNA, peroxidación de lípidos, actividad enzimática redox y la disminución de las defensas antioxidantes.

En cuanto a la peroxidación lipídica hay estudios en los que se asocia al arsénico con la producción de MDA (como resultado de esta modificación lipídica) además de un aumento del glutatión oxidado en muestras de tejidos analizados [12][40] como resultado de exposición prolongada al arsénico.

También hay evidencia que sugiere que la exposición al arsénico induce disminución de los niveles de antioxidantes; por ejemplo, se ha identificado una disminución de antioxidantes en plasma de personas expuestas a este metal en Taiwan [41]. Otro agente antioxidante es el glutatión (GSH) que juega un papel importante en los cambios redox inducidos por el arsénico. Hay tres formas en que el arsénico puede reducir los niveles de GSH; 1) se propone que esta molécula es la donadora del electrón para la conversión de los arsenicales pentavalentes a trivalentes [42], 2) el arsénico tiene una alta afinidad por el glutatión y 3) los radicales libres inducidos por este metal pueden oxidarlo.

Con respecto a la modificación de la actividad enzimática y el arsénico, hay evidencia que señala que las principales enzimas que metabolizan las ROS, SOD, catalasa y GPx ven modificada su actividad por este metal [9]. La exposición al arsénico también puede modificar la actividad de otras enzimas. Una de ellas es la tio-redoxina reductasa que cataliza la reducción de sustratos que contienen grupos disulfuro y juega un papel importante en la respuesta celular contra el estrés oxidativo. El arsénico y en especial el metilarsinoIII causa una reducción dependiente de concentración en la actividad de esta enzima en hepatocitos [26].

Con respecto al daño al DNA y el arsénico, hay evidencia que sugiere que este metal es genotóxico. La exposición al arsénico conduce a varios tipos de daño al DNA. Se ha reportado como promotor de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y también como inductor de hipo o hipermetilación [9,29,32,35,37]. Por ejemplo, se ha visto que el arsénico interfiere con las DNA metiltransferasas, resultando en la inactivación de genes tumor supresores debido a hipermetilación de DNA [43]. Otros estudios sugieren que la transformación maligna inducida por el arsénico está ligada a la hipometilación del DNA posterior a la utilización de la S-adenosil-metionina, lo cual resulta en una expresión génica aberrante incluyendo la de oncogenes [43,44].

Otro mecanismo propuesto de daño al DNA asociado a la exposición al arsénico es la inhibición de la reparación del DNA [45]. El daño al DNA inducido por el arsénico se presenta principalmente en dos formas, la oxidación y la ruptura de las cadenas de DNA. El tratamiento con arsenito aumenta los rompimientos de las cadenas de DNA que es dosis dependiente[46]. En general, los resultados indican que las rupturas a las moléculas de DNA provienen de la excisión de aductos oxidativos de DNA y del entrecruzamiento de

proteínas-DNA [47]. Además, las rupturas de DNA producidas por el arsénico pueden estar relacionadas con la producción de ROS.

El 8-hidroxil- 2'-deoxygunosina (8-OHdG) es considerado uno de los principales productos del daño al DNA inducido por ROS, su aumento se ha detectado en modelos animales y celulares y tejidos humanos expuestos al arsénico [48,49].

### **1.7 Mecanismos antioxidantes**

La exposición a los radicales libres ha llevado a los organismos a desarrollar una serie de mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, entre los que encontramos: 1) mecanismos preventivos, 2) mecanismos de reparación, 3) defensas físicas y 4) defensas antioxidantes. Los mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante incluyen a SOD, glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa. Los antioxidantes no enzimáticos están representados por el ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), carotenoides, flavonoides, entre otros. Bajo condiciones normales, existe un balance entre los pro-oxidantes y antioxidantes, el cual es necesario para la sobrevivencia y salud de los organismos.

Por ejemplo, en el caso del papel protector del glutatión contra el estrés oxidativo, tenemos los siguientes efectos: 1) el glutatión es un cofactor de varias enzimas detoxificantes como la GPx, glutatióntransferasa y otras; 2) GSH participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana celular; 3) GSH disminuye directamente los radicales hidroxilo y los singletes de oxígeno y así detoxificando el peróxido de hidrógeno y lípidos peroxidados, todo esto por la acción catalítica de GPx; y 4) el glutatión es capaz de regenerar los más importantes antioxidantes, como la vitaminas C y E, regresándolas a sus formas activas [1,5,50].

La concentración "basal" de ROS es determinada por el balance entre sus ritmos de producción y los ritmos de eliminación. Es así como cada célula se caracteriza por una concentración particular de electrones (estado redox) almacenados en varios constituyentes celulares, y el estado redox de una célula y su oscilación determina su funcionamiento [51]. El estado redox de la célula es mantenido dentro de un rango muy estrecho bajo condiciones normales, en condiciones patológicas, este estado puede ser alterado a valores altos o bajos, por ejemplo, un cambio de 30 mV se traduce en un cambio de relación de 10

veces entre especies reductoras y oxidantes [51]. Este estado redox es sostenido principalmente por GSH y tio-redoxina (TRX). El glutatión (la pareja 2GSH/GSSG) representa el principal buffer redox celular y es un indicador del ambiente redox celular y puede modificar un número importante de proteínas de señalización que contengan grupos tiol, como receptores, proteín-quinasas y algunos factores de transcripción, las cuales pueden tener funciones anormales debido a la formación de grupos disulfuro mezclados. Cuando GSH y TRX se oxidan, regresan a su estado reducido mediante la GSH reductasa y TRX reductasa y estos dos sistemas están involucrados en procesos de señalización celular [1].

Los mecanismos de señalización que responden a los cambios tiol/disulfuro involucran: 1) los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B, 2) tirosin-proteín-fosfatasas, 3) cinasas de la familia Src, 4) las vías de señalización de MAPK, JNK y p38, 5) los receptores para insulina con actividad de cinasa, entre otros [5]. Sin embargo, bajo condiciones patológicas, grandes cantidades de ROS pueden conducir a cambios permanentes en la trasducción de señales y expresión génica, típicos de las enfermedades.

Otro proceso celular regulado por el estado redox es el ciclo celular que se caracteriza por fluctuaciones en el ambiente redox, principalmente a través del glutatión [51]. Se ha mostrado que GSH juega un papel importante en el rescate celular de la apoptosis, de hecho, la disminución de este antioxidante se ha relacionado con mayor susceptibilidad para la apoptosis. Generalmente, un ambiente más reducido (mantenido por GSH y TRX) estimula la proliferación y cambios pequeños hacia estados con ambiente levemente oxidativos inician la diferenciación celular [50].

Con respecto a las vías de señalización y ROS, se sabe que estos últimos son utilizados en la inducción y mantenimiento de señales involucradas en el crecimiento celular y diferenciación. Por ejemplo, muchas células generan estados oxidativos leves por un aumento pequeño de ROS cuando son estimuladas por citocinas, factores de crecimiento y hormonas. Esto lleva a asumir que el inicio y la función apropiada de varias señalizaciones descansa sobre la acción de ROS como moléculas señalizadoras pudiendo actuar a diferentes niveles en las cascadas de trasducción de señales. De esta manera, las ROS juegan un papel muy importante como segundos mensajeros [5].

Probablemente uno de los efectos más significativos de los metales y ROS en la señalización celular se ha observado en la vía de MAPK y en la regulación de vías dependientes de la proteína p53 [1,24,37,52].

### 1.8 Regulación del estrés oxidativo por p53

El factor nuclear p53 juega un papel muy importante en la protección celular contra varios mecanismos de daño celular. Debido a su capacidad de regular el ciclo celular o iniciar la apoptosis en células dañadas, se le conoce como supresor de tumor [53]. p53 se activa por radiación UV, hipoxia, radiación gamma, disminución de nucleótidos, estrés oxidativo, entre otros.

Se ha caracterizado a p53 como un factor transcripcional que se une a secuencias específicas de DNA y transactiva la expresión de un gran número de genes con una gran variedad de funciones, entre ellas, arresto del ciclo celular, apoptosis, regulación del metabolismo entre otros (FIG 2) [53].

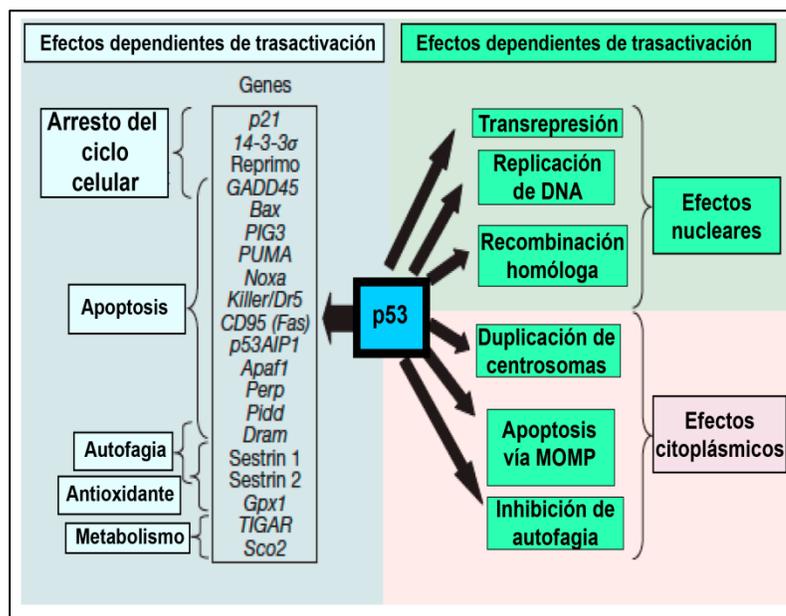


FIGURA 2. Clasificación de las actividades de p53. A la izquierda, genes transactivados por 53 junto con algunos efectos de su activación. A la derecha, efectos independientes de la transactivación de 53. MOMP, permeabilización de la membrana mitocondrial externa.

p53 se encuentra en el centro de numerosas vías de señalización activadas por varios tipos de estrés celular incluyendo daño al DNA por mutágenos exógenos, activación oncogénica, hipoxia, estrés oxidativo, etc., los cuales tienen influencia sobre su abundancia, localización subcelular, modificaciones post-traduccionales y/o interacción de p53 con cofactores. Como resultado de las alteraciones inducidas dependientes del contexto, p53

puede facilitar la adaptación celular a condiciones de estrés, por ejemplo, promoviendo los procesos de reparación del DNA mediante el arresto transitorio del ciclo celular, o estimulando la expresión de enzimas que facilitan la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno. De manera alterna, p53 puede suprimir el potencial oncogénico mediante el arresto irreversible del ciclo celular o al inducir mecanismos de apoptosis (FIG 2) [53,54].

p53 tienen una regulación positiva sobre al menos dos proteínas que participan en la respuesta apoptótica mediada por ROS: la ferredoxin-reductasa (FDXR) y REDD/HIF-1 (*Regulated in Development and DNA Damage responses/Hipoxia Inducible Factor 1*). Además, induce la expresión de p85, la cual puede funcionar como molécula de señalización durante la apoptosis dependiente de p53.

Además de su participación como agente pro-apoptótico en respuesta al estrés oxidativo, se ha reportado que bajo condiciones celulares normales o de bajo estrés, bajas concentraciones de p53 inducen la expresión de genes antioxidantes, mientras que bajo estrés celular severo, altas concentraciones de p53 promueven la expresión de genes que contribuyen a la formación de ROS y apoptosis mediada por p53 [55]. De esta forma, bajo condiciones de estrés oxidativo bajo/normal, p53 parece tener funciones antioxidantes y proteger a las células del daño oxidativo al DNA y aunque este efecto puede depender de la concentración de p53, otros factores celulares pueden participar en la decisión celular final [52].

Se ha reportado que genes antioxidantes regulados directamente por p53 como glutatión peroxidasa 1 (GPX1), SOD 2 mitocondrial y el miembro 1 de la familia de la aldehído deshidrogenasa 4 (ALDH4A1), codifican productos que actúan como antioxidantes. Además, p53 actúa directamente sobre la regulación de las sestrinas, SESN1 y SESN2, que son esenciales para la regeneración de las peroxi-redoxinas oxidadas, que son las enzimas involucradas en la degradación del peróxido de hidrógeno [56]. De esta manera p53 regula negativamente los niveles intracelulares de ROS, reduciendo de esta manera la probabilidad de alteraciones al material genético.

La actividad antioxidante de p53 representa un importante componente de su actividad supresora de tumor, la cual disminuye la probabilidad de alteraciones genéticas y ayuda a la supervivencia y reparación de las células dañadas, además de participar en la regulación de los procesos metabólicos. En este sentido, se identificó recientemente un

blanco de la actividad transcripcional de p53, el cual se conoce como TIGAR que funciona en la regulación de la glucólisis y protege contra el estrés oxidativo. Tiene la capacidad de disminuir la Fru-2,6-P<sub>2</sub>, y de esta forma promueve el cambio de la glucólisis hacia la vía de las pentosas, lo que resulta en la producción de NADPH y nucleótidos que favorece el incremento de glutatión que lleva a la disminución de los niveles de ROS. Es así como TIGAR puede proteger a las células del daño causado por ROS [57]. De esta manera TIGAR posee efectos anti-tumorigénicos ya que reduce la glucólisis, cuando sus niveles son bajos, aumenta la glucólisis que está asociado con efectos tumorigénicos [58].

También se ha mostrado que p53 puede inhibir la actividad de mTORC1 (principal regulador de la síntesis de proteínas y regulador positivo de la proliferación celular) elevando la actividad de AMPK. El mecanismo que se ha propuesto para esta activación se basa en la fosforilación y activación gracias a su unión con SESN1 o SESN2, que son blancos de p53. Las sestrinas son una familia de proteínas conservadas evolutivamente [56,59]. Las células de mamífero expresan a tres miembros de esta familia, Sesn1-3, las cuales causan la disminución de ROS intracelulares y confieren resistencia contra el estrés oxidativo, lo cual lo consiguen al regenerar a las peroxi-redoxinas oxidadas. La expresión de SESN1 y SESN2 es elevada por p53 en respuesta a estrés genotóxico y se ha reportado que están involucradas en la resistencia al estrés oxidativo inducido por p53 *in vitro* e *in vivo* [55,56]. Parece que ambas sestrinas interactúan con la subunidad  $\alpha$ -catalítica de AMPK lo cual contribuye a la fosforilación de ésta e induce su actividad y de esta forma regulan el estrés metabólico. Además se ha mostrado que SESN1/2 tienen efectos supresores de tumor, ya que inhiben la transformación oncogénica al inhibir mTORC1 [59].

Debido a la modulación específica de los niveles celulares de ROS, p53 puede actuar como una espada de doble filo. Las ROS actúan como señales “río arriba” que disparan la activación de p53 y “río abajo” activando factores promotores de apoptosis. Algunos de los blancos transcripcionales de p53 codifican proteínas generadoras de ROS e involucran muerte celular. Sin embargo, otros genes regulados por p53 pueden actuar como antioxidantes. Cuando las células están expuestas a estrés severo generador de daño genotóxico, p53 activa numerosos genes que están involucrados en la generación de ROS, y así llevar a la apoptosis, aún más, las ROS producidas de esta forma pueden activar a más p53 generando una retroalimentación positiva. Si las células están expuestas a estrés leve,

la actividad basal de p53 conduce a la activación de genes antioxidantes, entre los cuales probablemente los más importantes son las sestrinas, de esta forma, bajo condiciones fisiológicas o con estrés moderado p53 actúa como antioxidante a través de la inducción de genes antioxidantes [60].

En conclusión, los genes inducidos por p53 pueden ser clasificados en dos grupos: 1) aquellos inducidos por niveles bajos de estrés que están involucrados con arresto del ciclo celular y efecto antioxidante, y 2) aquellos que son inducidos por niveles altos de p53 y estrés oxidativo, que son generalmente pro-apoptóticos (FIG 3).

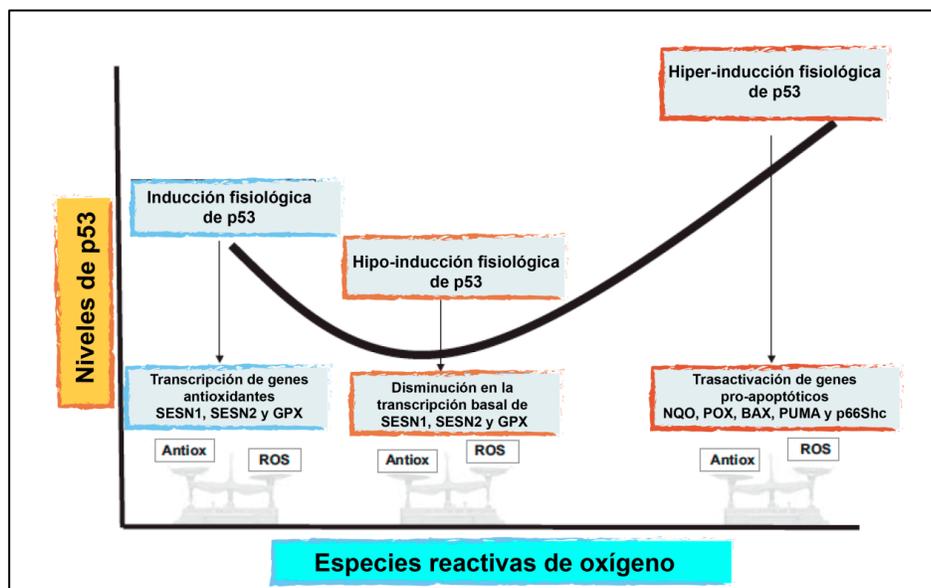


FIGURA 3. p53 una espada de doble filo.

### 1.9 Respuesta celular contra el estrés oxidativo generado por el arsénico

Los mecanismos de acción del arsénico a nivel celular son muy variados y quedan resumidos en la figura 4.

La exposición al arsénico es algo que ocurre a diario debido a su presencia en el ambiente. El arsénico que se encuentra en diferentes formas químicas en el ambiente, causa efectos adversos en la salud, tanto agudos como crónicos, incluyendo cáncer. El metabolismo del arsénico tiene un papel muy importante en su toxicidad. Su metabolismo involucra su reducción al estado trivalente y una metilación oxidativa a su estado pentavalente. Las formas trivalentes, incluyendo las metiladas, tienen propiedades tóxicas

más potentes que las pentavalentes. A nivel bioquímico, el arsénico inorgánico en su estado pentavalente puede reemplazar a los fosfatos en numerosas reacciones. En estado trivalente, el arsénico inorgánico y orgánico (metilado) puede reaccionar con grupos tiol en proteínas e inhibir su actividad. Con relación al cáncer, los mecanismos potenciales incluyen genotoxicidad, metilación alterada de DNA, estrés oxidativo, proliferación celular alterada, co-carcinogénesis y promoción de tumor [45,61].

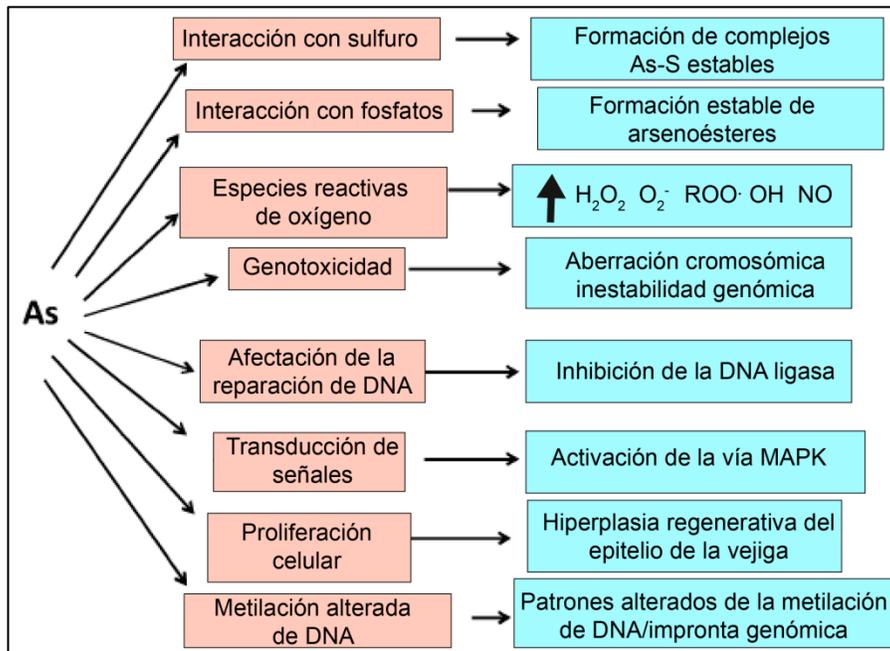


FIGURA 4. Mecanismos de acción del arsénico y ejemplos de los efectos resultados de éstos.

La toxicidad aguda del arsénico está relacionada con su estado de oxidación, en este sentido las formas trivalentes son más tóxicas que las pentavalentes. Las manifestaciones clínicas de la toxicidad aguda en humanos incluyen malestar gastrointestinal, vómito, diarrea, hematuria, anuria, choque, convulsiones, coma y muerte [61].

Diferentes sistemas del organismo son afectados por la exposición crónica. Uno de los datos centrales de la exposición crónica son las lesiones de la piel que se caracterizan por hiperpigmentación, hiperqueratosis e hipopigmentación [62]. Otras manifestaciones crónicas incluyen neuropatía periférica, encefalopatía, hepatomegalia, cirrosis, metabolismo alterado del grupo hemo, depresión de la médula ósea, diabetes y alteraciones renales.

El arresto del ciclo celular y la apoptosis inducida por el arsénico se asocian al aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, a la disminución de los sistemas antioxidantes intracelulares, la inhibición de la reparación del DNA, alteraciones de la metilación del DNA y a una disminución del potencial de membrana mitocondrial acompañado de la liberación de citocromo c y activación de las caspasas. Además, el arsénico afecta componentes de diferentes vías de trasducción de señales que están involucradas en procesos como proliferación celular o apoptosis, entre ellas se encuentran MAPKs, p53, AP-1 y NFκB. Los cambios generados en las vías de señalización son los que se han asociado con el efecto carcinogénico del arsénico.

La respuesta antioxidante es el principal mecanismo de defensa que tienen las células contra la toxicidad provocada por el arsénico. Hay numerosos estudios en los cuales se demuestra que diferentes factores enzimáticos y no enzimáticos protegen a las células mediante la disminución de las ROS [37]. Entre los principales mecanismos celulares antioxidantes que se activan contra el arsénico está el mediado por GSH que modula el estado redox de residuos tiol de las proteínas asociadas al arsénico como factores de transcripción, caspasas y cinasas [63]. El arsénico induce la disminución de otros antioxidantes, tales como SOD, CAT y GPX [63] cuando es una exposición crónica, lo cual contrasta con exposiciones agudas que estimulan el efecto contrario.

Una de las amenazas más serias para la estabilidad genómica son los procesos defectuosos de replicación y reparación. Bajas concentraciones de arsenito aunado a otros mutágenos puede promover la carcinogénesis, probablemente interfiriendo con mecanismos de reparación de DNA, por ejemplo, el arsénico estimula el efecto mutagénico de la radiación UV [41]. Aunque el arsenito inhibe la reparación del DNA, el efecto parece que no es mediado vía la inhibición enzimática sino interfiriendo con su síntesis [64].

Como se ha mencionado, el arsénico puede ocasionar daño al DNA siendo esto un activador de vías de señalización que colectivamente son denominadas como vías de respuesta de daño al DNA. El rasgo más importante de estas vías es la generación de una progresión lenta y/o arresto del ciclo celular, que se genera para permitir la eficiente reparación del DNA antes de su replicación. Si el DNA es replicado con algún daño, se genera una mutación o se pierde debido a rompimiento cromosómico. En este caso, los puntos de control que son vías de trasducción de señales para evitar que haya progresión

del ciclo celular sin antes haber completado la fase previa sin complicaciones, son activados. Estos puntos de control se activan y detienen el ciclo celular en varios puntos si existe algún tipo de daño al DNA. Este daño resulta en la acumulación de p53, que a su vez transactiva a genes como p21 que ayuda al bloqueo de la progresión del ciclo celular antes de la replicación a también causa apoptosis (vía inducción de BAX y la regulación negativa de bcl-2) en células altamente dañadas [65].

### **1.10 p53 y arsénico**

El gen tumor supresor TP53 se ha relacionado con el daño al DNA, alteraciones en el ciclo celular y apoptosis producidas por el arsénico [66]. p53 es crucial para mantener la integridad del genoma a través de la inducción del arresto del ciclo celular, permitiendo la reparación del DNA o la apoptosis si el daño es irreparable [67].

Existen datos contradictorios en cuanto la abundancia de p53 y los efectos del arsenito. La exposición de células humanas a concentraciones en aumento de arsenito (0.1 a 100  $\mu\text{M}$ ) por 24 h resulta en un aumento dosis-dependiente en el nivel de p53, especialmente en células con p53 silvestre [68]. En cambio, la exposición de las células HaCaT a bajos niveles de arsenito (0.01 a 1  $\mu\text{M}$ ) causó una disminución dosis-dependiente en los niveles de p53 [69], aunque la interpretación de este resultado es problemática debido a que p53 en estas células, tiene mutaciones en ambos alelos y normalmente sobre-expresan esta proteína.

El arsenito causa la inducción de p21 que a su vez se une al complejo ciclinaE/Cdk2 e inhibe la fosforilación de pRb, causando un arresto en la G1 del ciclo celular [65], además inhibe a PCNA, causando alteraciones en la síntesis de DNA.

La inactivación de la vía de p53 favorece la inestabilidad cromosómica. En este sentido, el arsenito y más aún los arsenicales metilados trivalentes pueden inhibir a la tiorredoxina reductasa con lo que aumenta la tiorredoxina oxidada que a su vez puede llevar a un mal funcionamiento de p53 y esto llevar a inestabilidad cromosómica [70].

El daño ocasionado al DNA por el arsénico induce un arresto del ciclo celular en la fase G1 y G2/M [27]. El mecanismo exacto no es bien conocido, pero la evidencia indica que el arsénico es capaz de reducir los niveles de los complejos ciclina/CDK al igual que las ciclinas en líneas celulares humanas [27]. Datos recientes indican que p53 está involucrado en el arresto inducido por el arsénico en las fases G1 y G2/M [30,71,72].

En diferentes tipos de líneas celulares, el *status* funcional de p53 determina la respuesta celular al arsénico [46,72–75]. Por ejemplo, Liu et al. reportó que células de mieloma con p53 silvestre son resistentes a apoptosis inducida por arsénico, pero se arrestan en la fase G1, mientras que células que no contienen a p53 funcional eran sensibles al arsénico y se arrestan en G2/M [76]. Resultados similares se han reportado en otras líneas celulares [77,78]. En respuesta al daño al DNA, p53 silvestre se acumula y conduce a un arresto de la fase G1 para reparación del daño al DNA o apoptosis si el daño no es reparado; sin embargo, es bien conocido que el arsenito activa el punto de control de la fase G2 del ciclo celular o induce un arresto mitótico conduciendo a las células a apoptosis. Un rasgo en común de estas células donde el arsenito condiciona estos arrestos G2/M y apoptosis es la pérdida de un p53 funcional [72,73,75,76]. De esta forma se puede sugerir que las células con p53 no funcional tienden a arrestarse en la fase G2/M para posteriormente sufrir apoptosis, en cambio, cuando p53 es totalmente funcional se favorece un arresto temprano en el ciclo celular (fase G1) para reparar el daño generado por el arsénico.

El arresto del ciclo celular (como ya se mencionó) inducido por el arsénico depende de p53 y de los cambios transcripcionales que puedan ocurrir por la expresión de p53, lo cual llevaría a la inhibición de la proliferación celular. Los datos existentes sugieren que las células con p53 funcional utilizan esta vía de señalización para mediar la respuesta de defensa contra el arsénico y así reducir el daño. La desregulación de los puntos de control del ciclo celular dependientes de p53 pueden causar alteraciones como rearrreglo, amplificación o pérdida cromosómicas, eventos que se asocian al cáncer [79]. La alteración de los genes reguladores del ciclo celular dependientes de p53 podrían jugar un papel importante en la toxicidad inducida por el arsénico al igual que en la carcinogénesis.

## **2. ANTECEDENTES**

Como ya se comentó, la principal fuente de exposición al arsénico para los humanos es su ingestión a través de agua que contenga concentraciones elevadas de este metal (>50 µg/l). Se han reportado zonas geográficas en las que el consumo de arsénico excede los límites permitidos, por ejemplo, en Bangladesh, Tailandia, Argentina, Chile y México [62,80,81]. Diversos estudios epidemiológicos relacionan la ingestión del arsénico con el

desarrollo de diferentes tipos de cáncer, entre los que se encuentran los carcinomas de vejiga, pulmón, hígado y piel [41].

Aunado a lo anterior, se sabe que el arsénico a nivel celular ocasiona aumento del estrés oxidativo ya que favorece la producción de ROS, lo cual lleva a diferentes alteraciones a nivel celular, entre las que se encuentran daño al DNA, deficiencia de los mecanismos de reparación de daño a DNA, inestabilidad cromosómica, efecto clastogénico, etc. Este daño se relaciona con la interacción del arsénico con moléculas intracelulares o mediante la modificación de diversas vías de señalización.

Uno de los efectos más notables del arsénico es sobre la viabilidad celular. Se sabe que a concentraciones elevadas el arsénico lleva a la activación de mecanismos proapoptóticos, en cambio cuando las concentraciones son leves a moderadas se activan preferentemente mecanismos que favorecen la detención del ciclo celular para tratar de reparar el daño generado al DNA. En este sentido existen numerosos reportes que indican que las células expuestas al arsénico sufren un arresto en las fases G1 y G2/M dependiendo de la intensidad del daño causado y principalmente del estado de p53, que es al final quién determina el destino celular.

Sin embargo, existen algunos reportes que señalan que el arsénico no solo ocasiona un arresto en estas fases del ciclo celular, sino que también puede causar un arresto en la fase S. En este sentido en nuestro grupo de trabajo Hernández et al. [82] reportaron que en células derivadas de cáncer de vejiga se genera un aumento en el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular dependiente de la dosis, indicando que probablemente las células estaban tratando de reparar el daño al DNA (FIG. 5).

Effects of sodium arsenite treatment (24 h) on the cell cycle of HT1197 cells			
Dose of iAsIII ( $\mu$ M)	Cell cycle phase		
	G1	S	G2/M
0	54 $\pm$ 1.2	31.9 $\pm$ 1.7	14.1 $\pm$ 1.5
1	51.1 $\pm$ 1.2	35.3 $\pm$ 1.1	14.0 $\pm$ 1.0
5	27.55 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	47.8 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	24.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
10	9.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	63.7 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	26.5 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>

FIGURA 5. Efectos de la exposición por 24 h al arsenito de sodio sobre el ciclo celular de la línea celular HT1197.

Además en el mismo reporte indica que el aumento de células en la fase S del ciclo celular se debe a un aumento en la activación de la vía p53. Sin embargo, no se encontró una modificación persistente en los niveles de p21 lo cual sugeriría que el arresto no sucedía a través de la vía de p21 (FIG. 6). Al no haber p21, las células logran pasar el punto de control en la transición G1/S para luego detenerse en la fase S, lo cual sugiere que existen mecanismos dentro de la fase S que pudieran explicar esta detención y que en este reporte no se evaluaron.

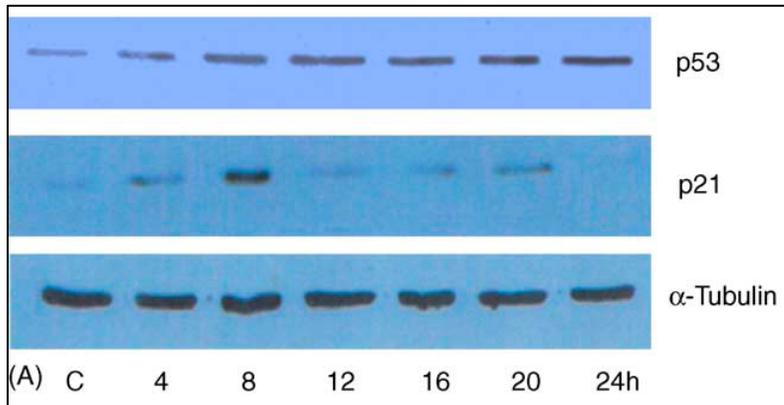


FIGURA 6. Niveles de las proteínas p53 y p21 en células HT1197 tratadas con NaAsO<sub>2</sub> a los tiempos indicados.

Con estos resultados se pudo apreciar que el efecto sobre el ciclo celular depende de la dosis de arsénico y del tiempo de exposición, pero sobre todo, de la capacidad de p53 como regulador de esta respuesta.

Aunado al reporte anterior, en nuestro grupo de trabajo, Rivera González [83] reportó que la exposición de la línea celular MCF-7 (p53<sup>+/+</sup>) al NaAsO<sub>2</sub> induce una detención del ciclo celular en la fase S que se presenta a las 6 y 12 h post-exposición, fenómeno que no se observa cuando la línea celular H1299 (p53<sup>-/-</sup>) es expuesta al mismo tratamiento, evidenciando que el arresto en esta fase se genera a tiempos cortos post-tratamiento y es dependiente de la presencia de p53 (FIG. 7). Además, al utilizar un inhibidor de la actividad transcripcional de p53 (pifitrina- $\alpha$ ), el arresto observado es inhibido, sugiriendo que el efecto del arsénico a nivel de ciclo celular es dependiente de la actividad transcripcional de p53.

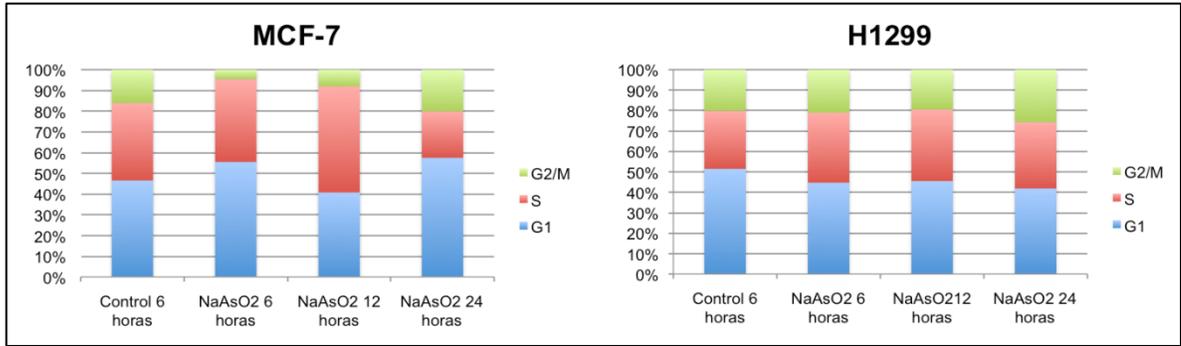


FIGURA 7. Graficas que muestran el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular a los tiempos indicados en respuesta al tratamiento con NaAsO<sub>2</sub>.

Además de los dos reportes previos en los cuales es evidente el arresto en la fase S del ciclo celular dependiente de la actividad transcripcional de p53 en respuesta al estrés inducido por el arsénico, McCollum et al. reportó que concentraciones bajas de arsenito ( $\leq 5 \mu\text{M}$ ), que corresponde a los niveles plasmáticos en pacientes con quimioterapia, genera un desaceleración de la progresión de cada fase del ciclo celular en células U937, incluyendo una detención en la fase S, sin disminuir la viabilidad celular [77].

Por último, Lehmann y McCabe [84] mostraron que en células U937 expuestas a arsenito ( $5 \mu\text{M}$ ) se genera un arresto de la fase S del ciclo celular, además, sugieren que el arresto es debido a una disminución en los niveles de CDC25A, tanto del mensajero como su proteína. Se sabe que esta fosfatasa regula el tránsito durante la fase S del ciclo celular y su disminución condiciona el arresto. Por último, dejan abierta la interrogante sobre cómo o quién genera la regulación de CDC25A.

Dado el incremento de células en la fase S del ciclo celular apreciado en los reportes previos, es probable que el aumento del estrés oxidativo contribuya de manera significativa a la inhibición de la progresión del ciclo celular, de manera dependiente de la actividad transcripcional de p53.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La exposición crónica al arsénico provoca diferentes problemas de salud en personas expuestas, principalmente a través de agua contaminada con este metal, entre los cuales el cáncer en diversos órganos ocupa un lugar importante. Los efectos adversos sobre la salud provocados por la exposición al arsénico están relacionados en gran medida por el

estrés oxidativo debido al aumento de la producción de ROS. El aumento de ROS condiciona la alteración de las biomoléculas celulares, entre ellas, el DNA, lo cual dispara diferentes mecanismos de defensa para tratar de reparar el daño y así evitar la muerte celular. Los mecanismos que se activan son dependientes de diferentes participantes, pero uno de los principales es la activación de las vías reguladas por p53. Sin embargo, los mecanismos de respuesta aún no están bien definidos, en el caso particular de p53, aún no se conocen en su totalidad cuales son los blancos antioxidantes de p53 que participan en la respuesta contra el estrés generado por arsénico, además, tampoco se conocen claramente cuales son los blancos de p53 que pudieran participar en el arresto de la fase S del ciclo celular. El entendimiento de los mecanismos moleculares en respuesta al arsénico podrá dar luz a la cadena de procesos que pudiesen llevar al desarrollo de cáncer u otras enfermedades en personas expuestas a este metal para luego buscar tratamientos adecuados para impedir estos efectos nocivos.

#### **4. HIPÓTESIS**

El tratamiento celular con arsénico ocasionará que p53 regule los efectos producidos por la presencia de este metal de una forma dual, por un lado mediante la regulación de genes que intervienen en las vías metabólicas para la eliminación de las ROS, y por el otro, mediante la regulación del ciclo celular para permitir la reparación del daño al DNA generado por estrés oxidativo.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 General**

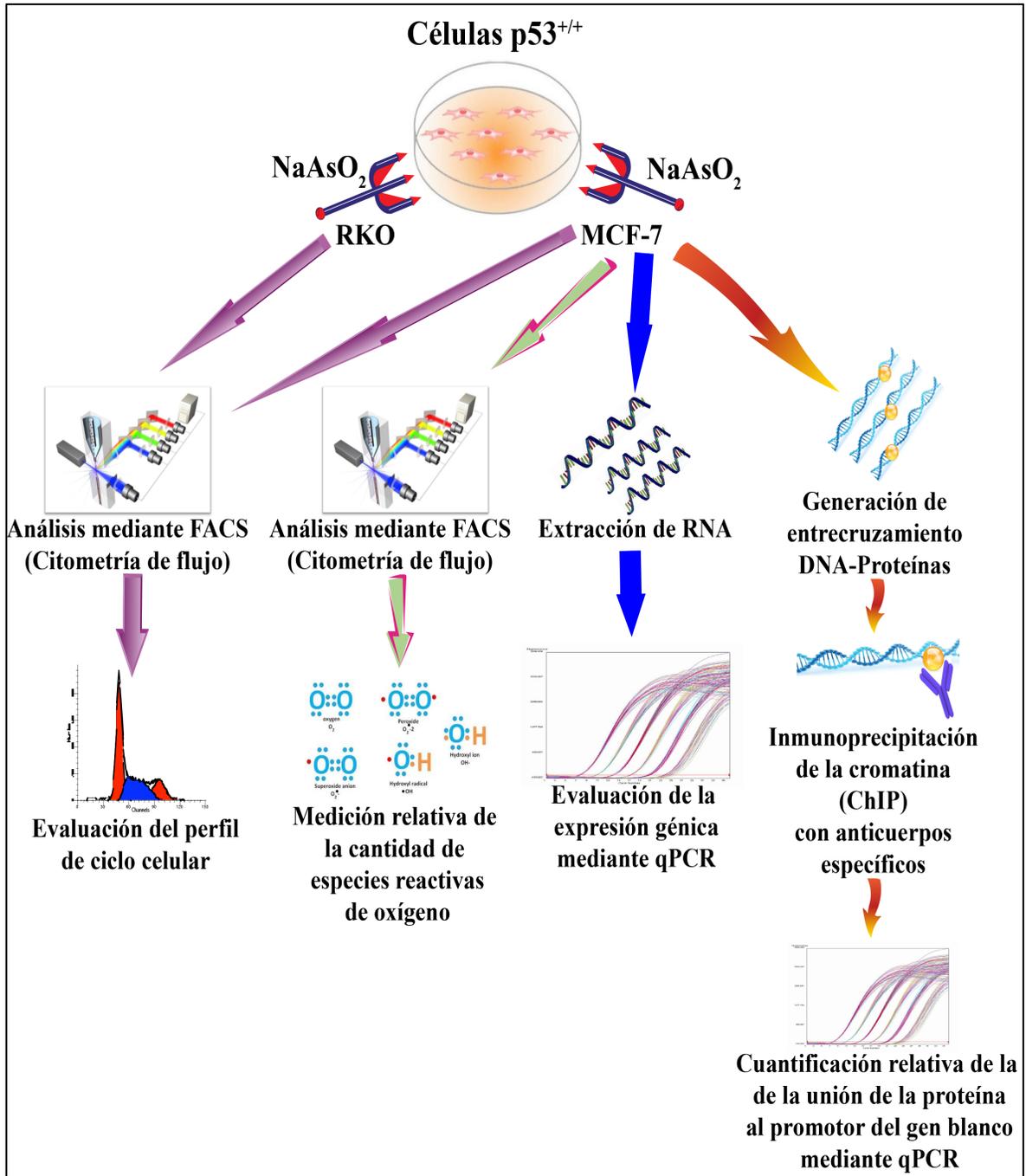
Determinar la participación de p53 en la regulación del ciclo celular en respuesta a las especies reactivas de oxígeno generadas por el tratamiento celular con arsénico.

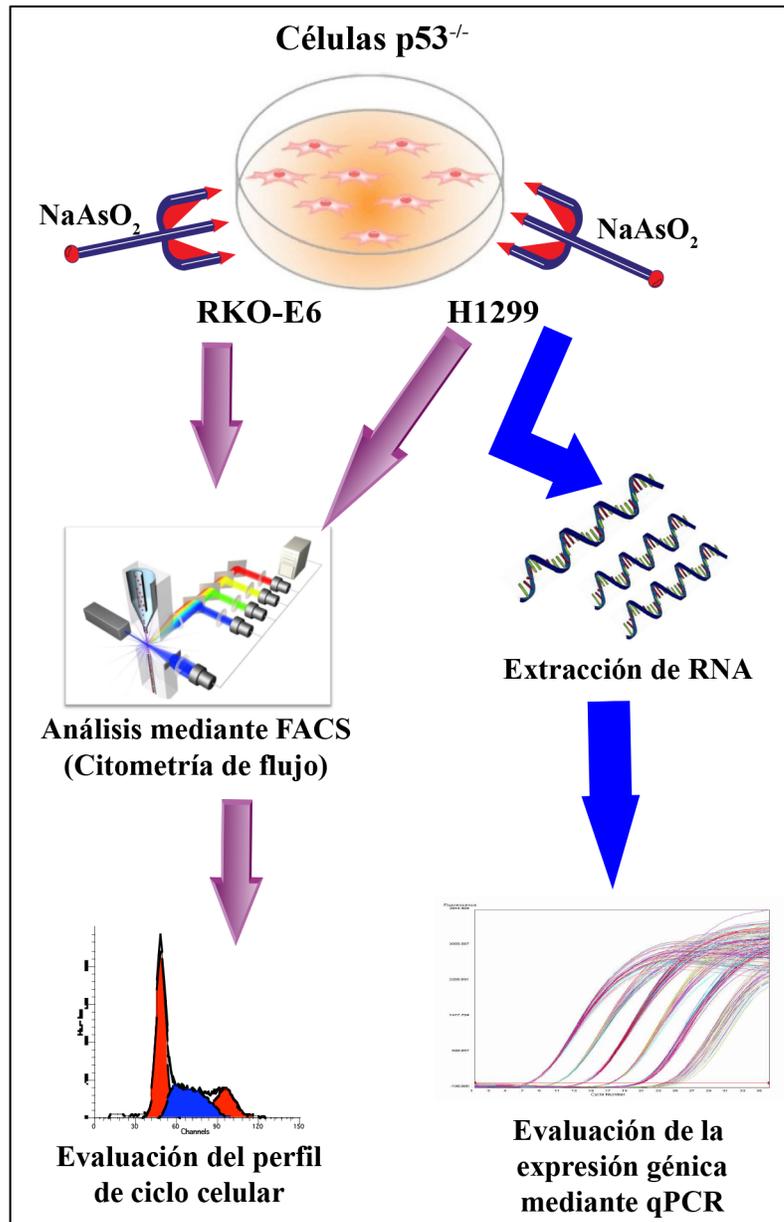
##### **5.2 Específicos**

- Analizar el efecto de las ROS producidas por el NaAsO<sub>2</sub> sobre el ciclo celular en un contexto p53<sup>+/+</sup> y p53<sup>-/-</sup>.

- Analizar la expresión de genes responsivos a p53 que participan en el control de ROS generadas por NaAsO<sub>2</sub>.
- Determinar si p53 se une directamente a los promotores de genes responsivos a esta proteína y que participan en el control de ROS.
- Analizar la expresión de genes responsivos a p53 que participan en el arresto de la fase S del ciclo celular en respuesta al NaAsO<sub>2</sub>.
- Determinar si la proteína p53 se une a los promotores de los genes involucrados en el arresto de la fase S del ciclo celular en respuesta al NaAsO<sub>2</sub>.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Reactivos

Se preparó una solución stock de arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) (Sigma Chemical, MO, EE.UU) disuelto en agua desionizada a una concentración final de 100 mM, se esterilizó por filtración y se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$ . La solución stock se diluyó a concentraciones de trabajo en PBS. Una solución de pifitrina- $\alpha$  (PFT $\alpha$ ) (Sigma Chemical, MO, EE.UU.) en dimetil sulfoxido fue preparada a una concentración de 20 mg/ml, almacenándose a  $-70^\circ\text{C}$ . La catalasa (Sigma Chemical, MO, EE.UU.) se preparó a una concentración final de 40 U / l.

### 7.2 Cultivos celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares, todas ellas obtenidas de ATCC (VA, EE.UU.):

- La línea celular MCF-7 ( $p53^{+/+}$ ) derivada de cáncer de mama humano se cultivó en placas de cultivo en medio mínimo esencial (MEM, Sigma Chemical, MO, EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino al 7%, L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (50 mg/ml) y estreptomicina (50 g/ml).
- La línea celular H1299 ( $p53^{-/-}$ ) derivada de cáncer de pulmón humano se cultivó en placas de cultivo en medio RPMI (Sigma Chemical, MO, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (50 mg/ml) y estreptomicina (50 mg/ml).
- La línea celular RKO ( $p53^{+/+}$ ) derivada de cáncer de colon humano se cultivó en placas de cultivo en medio DMEM (Sigma Chemical, MO, EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino al 7%, L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (50 mg/ml) y estreptomicina (50 mg/ml).
- La línea celular RKO-E6 ( $p53^{+/+}$ ) generada a partir de la línea RKO mediante transfección con el vector pCMV-E6 se cultivó en placas de cultivo en medio DMEM (Sigma Chemical, MO, EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino al 7%, L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (50 mg/ml) y estreptomicina (50 mg/ml).

Todas las líneas celulares se incubaron en una atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  y se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial.

### **7.3 Análisis de ciclo celular**

Para determinar los perfiles de ciclo celular en las líneas MCF-7, H1299, RKO y RKO-E6,  $1 \times 10^6$  células fueron tratadas con 5  $\mu\text{M}$  (MCF-7 y H1299) ó 10  $\mu\text{M}$  (RKO y RKO-E6) de  $\text{NaAsO}_2$ . Las células se cosecharon a diferentes tiempos post-tratamiento 6, 12, 24 y 36 h en el caso de la líneas MCF-7 y H1299 y hasta 72 h en el caso de las células RKO y RKO-E6. Posterior a cada uno de los tratamientos, la monocapa de células se lavó en 2 ocasiones con PBS 1X y se despegó incubando con 1 ml de tripsina por 3 minutos a 37 °C posterior a lo cual se inactivó agregando 1 ml del medio de cultivo correspondiente. Se colectaron las células en tubo y se centrifugaron a 450 g por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se fijan con 1 ml de solución fría de PBS/etanol al 80% durante toda la noche a -20 °C. Para el análisis del ciclo celular, las células fijadas se lavaron dos veces con PBS 1X y se centrifugaron a 700 g durante 3 min. Después de los lavados, las células se incubaron con yoduro de propidio (100 g/ml), RNasa A (1 mg/ml) y PBS durante 1 hora en baño maría a 37 °C. El contenido de DNA se determinó por citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, NC, EE.UU.). Se analizó un mínimo de 20,000 células por muestra. Los datos fueron recogidos y analizados mediante el software ModFit (Modfit Verity Software House, ME, EE.UU.).

Además, en algunos experimentos con la línea celular MCF-7, se llevó a cabo el procedimiento antes descrito pero utilizando co-tratamientos celulares agregando 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  + 30 mM de pifitrina o 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  + 2000 U/ml de catalasa.

### **7.4 Detección de intracelular de ROS**

La detección intracelular de ROS se realizó por medio de un reactivo fluorescente sensible a la oxidación, la 5-(y 6)-carboxi-2',7'-diclorohidrofluorescein-diacetato (carboxi- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) (Sigma Chemical, MO, EE.UU.). El  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  es metabolizado por esterasas no específicas generando el producto no fluorescente, 2',7'-diclorodihidrofluoresceina, el cual, al estar en contacto con ROS se oxida al producto fluorescente, DCF y esta emisión de fluorescencia puede ser cuantificada. En resumen,  $1 \times 10^6$  células MCF-7 ó H1299 se incubaron con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  por 6, 12, 24 y 36 h. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se incubaron con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  a 37 °C durante 30 min. Las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X, se tripsinizaron, y se resuspendieron en PBS. La fluorescencia generada por la carboxi-DCF se detectó por citometría de flujo en equipo

FACSCalibur. Se analizaron 10,000 eventos en cada muestra. Los niveles de ROS se expresaron como una intensidad media de fluorescencia, que fue analizado mediante el software ModFit.

### **7.5 Extracción de RNA total**

El RNA total fue extraído a partir de células MCF-7 y H1299 después del tratamiento con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> + 30 mM pifitrina- $\alpha$  o 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> + 2000 U/ml de catalasa por 6, 12, 24 y 36 h utilizando el método de Trizol (Invitrogen, CA, EE.UU.). Para realizar la extracción de RNA, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X. Después se añadió 1 ml de TRIzol y las células se despegaron con la ayuda de un raspador. Toda la mezcla se transfirió a un tubo para microcentrífuga y se incubó 5 min a temperatura ambiente para favorecer la lisis de las células, después se adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se agitó vigorosamente para homogenizar las fases, se dejó incubando 5 min a temperatura ambiente para luego centrifugar 15 min a 13,000 rpm a 4 °C con el fin de separar la fase orgánica de la acuosa. La fase acuosa se transfirió a un microtubo de 1.5 ml y se añadió 0.5 volúmenes de isopropanol (con respecto a TRIzol empleado) con el fin de precipitar el RNA. Las muestras se incubaron a -20 °C por 20 min, luego se centrifugaron 30 min a 13,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se decantó, y se lavó la pastilla de RNA con 1 ml de etanol al 75%. Se centrifugó durante 10 min a 13,000rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. El botón se resuspendió en 25  $\mu$ l de agua bidestilada desionizada estéril y se le agregaron 3  $\mu$ l de Buffer de DNasa RQ1 (10X, Clontech) y 2  $\mu$ l de DNasa RQ1 (1 U/ $\mu$ l, Clontech). Esta reacción se incubó por 1 h a 37 °C, una vez finalizada la reacción, la DNasa se inactivó añadiendo 3  $\mu$ l de DNasa Stop Solution (Clontech) y se incubó a 65 °C durante 15 min. El RNA extraído se cuantificó mediante espectrofotometría para determinar su concentración y se almacenó a -80 °C.

### **7.6 RT-PCR**

El cDNA se sintetizó a partir de 2  $\mu$ g de RNA total. Para llevar a cabo la retrotranscripción se empleó como “primer” Oligo(dT)15, que hibrida con la región de poli A de los mRNA. Para la reacción de retrotranscripción se agregaron, 1  $\mu$ l de oligo(dT), 5 $\mu$ l de Buffer MMLV RT (5X, Promega), 5  $\mu$ l de una mezcla de dNTPs (25mM), 0.6  $\mu$ l de

RNAsin (Promega, WI, EE.UU.), 1  $\mu$ l de retrotranscriptasa M-MLV (1 u/ $\mu$ l; Promega, WI, EE.UU.) en un volumen final de 25  $\mu$ l. En la reacción de retrotranscripción primero se añadió Oligo (dT) a los 2  $\mu$ g de RNA incubándose por 5 min a 65 °C, para luego incubarlo 5 min a 4 °C. Finalmente se añadió el resto de los componentes de la reacción y se incubó a 42 °C durante 1.5 horas. El cDNA se almacenó a -20 °C.

Para las reacciones de PCR se utilizaron 100ng de cDNA y los oligonucleótidos específicos de cada gen (tabla 2). Todas las reacciones se hicieron bajo las siguientes condiciones, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol del primer correspondiente y 0.1 mM de cada deoxinucleósido trifosfato (dNTPs). Las condiciones de la reacción fueron: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, 35 ciclos: a 1) 95 °C por 45 s, 2) 60 °C por 1 min y 3) 72 °C por 45 s. Y una extensión final de 72 °C durante 10 min.

### **7.7 PCR en tiempo real (qPCR)**

Para las reacciones de RT-PCR en tiempo real se empleó el kit Maxima SYBR Green qPCR (Thermo Scientific, OR, EE.UU.). Para cada reacción de 15  $\mu$ l, 100 ng de cDNA se mezclaron con 7.5  $\mu$ l de la mezcla de reacción 2X de Maxima SYBR Green, 0.7  $\mu$ l de los oligonucleótidos específicos (10 pmol/l) y 4  $\mu$ l de agua desionizada estéril. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo a 95 °C durante 15 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 45 s, y 60 °C durante 1 min. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. Las secuencias de los oligonucleótidos usados se muestran en la tabla 2.

### **7.8 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

La inmunoprecipitación de la cromatina se realizó utilizando el Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Upstate, CA, EE. UU.) a partir de  $1 \times 10^6$  células MCF-7 después de ser tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> por diferentes tiempos. Esta inmunoprecipitación se realizó empleando los anticuerpos específicos anti-p53 (anticuerpo DO-1, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE.UU.), anti-ATF3 (anticuerpo C-17x, Upstate Biotechnology, NY, EE.UU.) o una IgG no específica (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE.UU.).

El ensayo se realizó a las 6, 12 y 24 h post-tratamiento. A cada cultivo se le retiró el medio de cultivo y se aplicaron 2 lavados con PBS 1X, posterior a lo cual se agregó medio MEM con 1% de formaldehído (concentración final), se incubó por 15 min a 37 °C en

atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>, con el propósito de generar un entrecruzamiento entre proteínas y DNA. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS 1X frío que contenía inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 1 mg/ml de aprotinina y 1 mg/ml de pepstatina A). La monocapa de células se despegó con 1 ml de PBS 1X más inhibidores de proteasas con la ayuda de un fragmento de teflón (“gendarme”). Las células se transfirieron a tubo de 1.5 ml se centrifugó 4 min a 2000 rpm a 4 °C, se decantó el sobrenadante y la pastilla celular (“pellet”) se resuspende con 300 µl de buffer de lisis (SDS al 1%, 10 mM de EDTA, 50 mM de Tris pH 8.1, 1 mM PMSF, 1 mg/ml de aprotinina y 1 mg/ml de pepstatina A) y se incubó por 10 min en hielo. Con la ayuda de un sonicador, las muestras se sonicaron durante 15 ciclos compuestos por 30 s de sonicado al 30% de “Cycle Duty” y nivel 3 de “output”, seguido de pausas de 30 s. El sonicado permitió generar fragmentos de cromatina entre 200 y 600 pb. Después, los fragmentos se centrifugaron por 15 min a 13,000 rpm y 4 °C, recuperando el sobrenadante y diluyéndolo 10 veces en buffer de dilución (0.01% de SDS, 1.1% de triton X-100, 1.2 mM de EDTA, 16.7 mM de Tris-HCl pH 8.1, 167 mM de NaCl, 1 mM de PMSF, 1 mg/ml de aprotinina y 1 g/ml de pepstatina A); en este punto se recuperaron 200µl de la muestra y se almacenaron como muestra “Input” a -20 °C. Para disminuir las interacciones no específicas, las muestras fueron pre-aclaradas con 75 µl de proteína A agarosa (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE.UU.) agitándose durante 30 min a 4 °C. Luego la muestra se centrifugó 2 min a 2000 rpm a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un microtubo y se incubó con 5 µg del anticuerpo correspondiente durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, se llevó a cabo la inmunoprecipitación incubando las muestras con 60 µl de proteína A agarosa durante 1 h a 4 °C en agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los inmunocomplejos se precipitaron centrifugando por 2 min a 2000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se descartó y los inmunocomplejos-poteína A-Agarosa se resuspendieron en 1ml de “Low Salt Immune Complex Wash Buffer”, se incubaron por 5 min a 4 °C en agitación, y se precipitaron centrifugando a 2000 rpm por 2 minutos a 4 °C. Este procedimiento se repitió 1 vez con “High Salt Immune Complex Wash Buffer”, 1 vez con “LiCl Immune Complex Wash Buffer” y 2 veces con “TE Buffer”. Una vez que finalizaron los lavados se realizó la liberación de los inmunocomplejos resuspendiendo la muestra en 250µl de “Elution Buffer” (0.1% de EDTA, 0.1M de NaHCO<sub>3</sub>), incubándola 15 min a temperatura ambiente en agitación, se centrifugó 2 min a

2000rpm a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo y la pastilla de proteína A-agarosa se volvió a resuspender en 250µl de “Elution Buffer” repitiendo el proceso anterior, uniendo este sobrenadante con el sobrenadante anterior. Una vez eluido el inmunocomplejo se prosiguió a revertir el entrecruzamiento agregando 20 µl de NaCl 5M e incubando a 65 °C durante 4 h, la reversión del entrecruzamiento también se realizó en las muestras Input. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 1µl de proteinasa K (20mg/ml), 10µl de EDTA (0.5M) y 20µl de TrisHCl (1M, pH 6.5) y se incubó 2 h a 45 °C con el fin de digerir la proteína y dejar únicamente los ácidos nucleicos. Al finalizar la digestión de las proteínas se purificó el DNA mediante una extracción fenólica (fenol/cloroformo/alcohol isoamílico). Una vez que se terminó de purificar, el DNA se precipitó añadiendo 100 µl de NaCl 5M y 2 volúmenes de isopropanol, incubando a -20 °C durante toda la noche. Se centrifugó durante 45 minutos a 13000 rpm a 4 °C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500µl de Etanol al 75%, se centrifugó 15 minutos a 13,000 rpm a 4 °C, se decantó y se dejó secar. El DNA se diluyó en agua bidestilada desionizada estéril y se almacenó a -20 °C. El DNA inmunoprecipitado se analizó por qPCR. Las secuencias de los oligonucleótidos usados se muestran en la tabla 2. El uno por ciento de la muestra (sin anticuerpo añadido) se utilizó como la cromatina de entrada total.

GEN	FORWARD	REVERSE
<b>RT-PCR</b>		
GADD45	TGA CTT TGG AGG AAT TCT CGG	ATG AAT GTG GAT TCG TCA CCA
14-3-3σ	AGA GAC ACA CAG AGT CCG GCA TT	TCC ACC TTC TCC CGG TAC TCA
<b>qPCR</b>		
βactina	GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT T	GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG
p21	AAG CCA TGT GGA CCT GTC A	GGC TTC CTC TTG GAG AAG AT
Killina	ACT CGG CTC GTT TGC	CGT GTT TGG ATG TGG GT
ATF3	GCC ATT GGA GAG CTG TCT TC	GGG CCA TCT GGA ACA TAA GA
CDC25A	TAG ATT CTC CTG GGC CAT TG	GCT GGA GCT ACA CAG GGA AG
SESN1	TTC TGG AGG CAG TTC AAG CA	TGA AGG AAA GGC ATC AGG TC
TIGAR	ACT CAT GCT TTC TCC AGT GAT	TCC TTT CCC GAA GTC TTG AG

SESN2	TGA CTA TGA TTA TGG GGA GGT	AAG AGG TTG TAC ATT CTT CGG
<b>ChIP</b>		
p21	AGA GTA ACA GGC TAA GGC TTA CCT	TGT GGC TCT GAT TGG CTT TCT GGC
Killina	GGT ACC TCT GGG TGC GAG CG	AGA TCT CGT TAT CCT CGC CTC
ATF3	TTC CCA GCC TCA CCT AGT CT	TCT CTC TCC ATA TCA GGA CC
CDC25A-1	CAA AGC TGG GGC TGA GAT AG	ATG CAT TTT GGC ACA CTT GA
CDC25A-2	GAA AAC CAA GCC GAC CTA CA	ATT TTG ATC CCC GCT CTT CT
SESN1	ACA GCC TTT AAA GTG GGG AC	GTA AAT TAT AAG AAG CTG GCG A
SESN2	AAA GGG TCA GAT AAA ACA TGT AA	AAT ATG TTG CCC AGG CTG GT

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para amplificación de regiones génicas específicas.

## 7.9 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism ® v6.0. Los resultados representan la media de al menos tres experimentos independientes; bar ± S.D. Se utilizó la prueba estadística de varianza (test ANOVA) para el análisis de las diferencias entre múltiples grupos (se comparan las condiciones diferentes en todos los tiempos estudiados). Se utilizó la prueba t de Student para determinar la significación estadística de las diferencias en los valores entre dos grupos (análisis entre dos condiciones diferentes para cada tiempo). La significación estadística se definió como valor de  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 La respuesta de freno en el ciclo celular que provoca el tratamiento con $\text{NaAsO}_2$ es dependiente de p53.

Como se mencionó previamente, el ciclo celular se modifica en respuesta a la exposición al arsénico. En múltiples estudios se ha demostrado que las células se pueden arrear en las fases G1, S y G2/M dependiendo del tipo celular, dosis y tiempos de

exposición. Particularmente, en nuestro grupo de trabajo se ha reportado que el ciclo celular sufre un arresto en la fase S por la exposición por periodos cortos al NaAsO<sub>2</sub>, razón por la cual se realizó el análisis del ciclo celular de la línea MCF-7 en respuesta al tratamiento con 5 μM de NaAsO<sub>2</sub> por 6, 12, 24 y 36 h. Los perfiles del ciclo celular se evaluaron en las células teñidas con ioduro de propidio mediante análisis de FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Como se puede apreciar en la figura 8, existe un aumento en el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular a tiempos cortos post-tratamiento (desde las 6 h) alcanzando un pico máximo a las 12h (49 %; p<0.0001) en comparación con las células no tratadas (25 %). Posterior al incremento observado a tiempos cortos, se puede apreciar que hay una disminución considerable en el porcentaje de células en esta fase del ciclo celular, con un 36 % a las 24 h hasta un 12% a las 36 h post-tratamiento. Por último, cabe destacar que las células MCF-7 tratadas por tiempos prolongados con NaAsO<sub>2</sub> (24 y 36 h) presentan un aumento en el porcentaje de células en la fase SubG1 (11 y 44 % respectivamente), lo cual nos indica que las células expuestas a dosis elevadas de arsénico por tiempos prolongados sufren muerte celular.

Como se aprecia, el ciclo celular sufre una detención transitoria en la fase S cuando las células están expuestas a un elemento causante de estrés como el arsénico. Un factor de gran importancia a considerar cuando se habla de regulación de ciclo celular es p53. La línea celular MCF-7 utilizada en este análisis expresa de manera normal la forma silvestre de la proteína p53, que podría participar de manera importante en la detención detectada en la fase S del ciclo celular. Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada por esta característica en estudios que evalúan modificaciones en el ciclo celular generados por el arsénico [85,86].

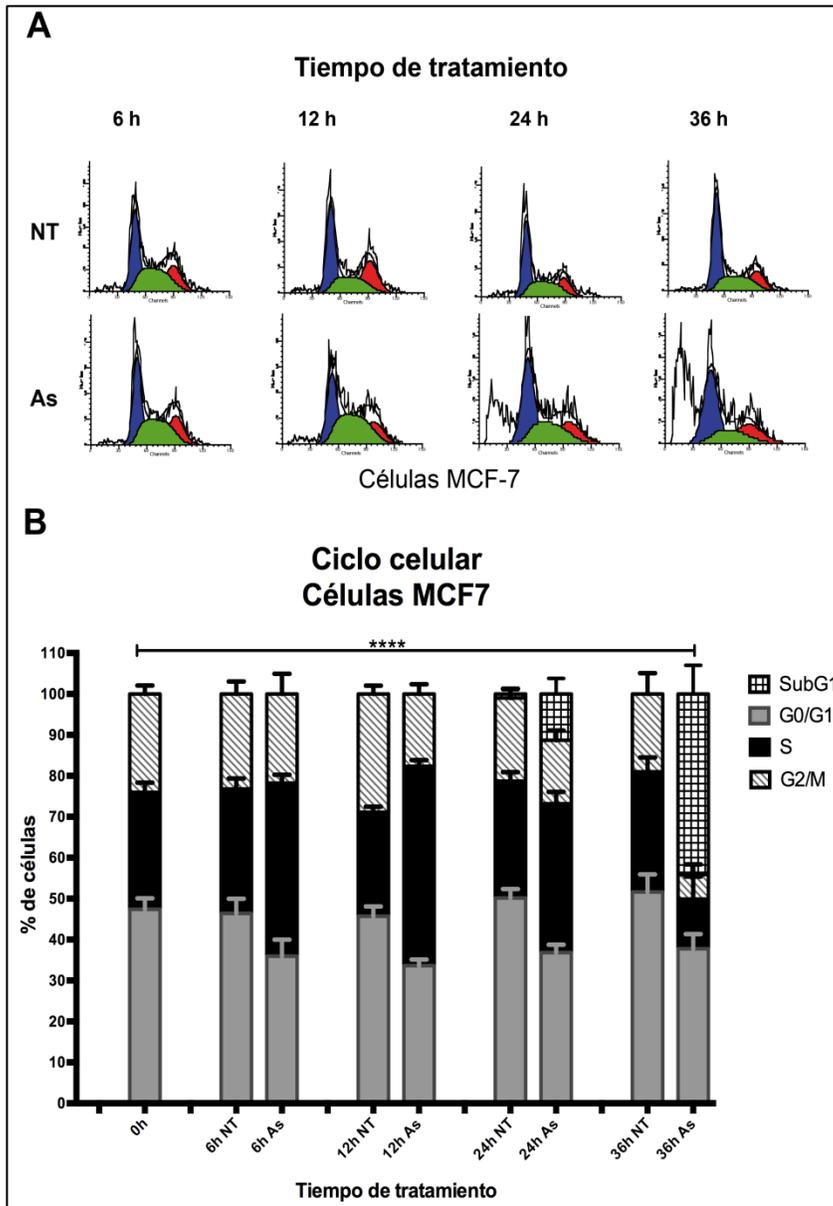


FIGURA 8. Efectos del  $\text{NaAsO}_2$  en el ciclo celular de la línea MCF-7. Perfiles de ciclo celular obtenidos mediante análisis por FACS en células MCF-7 (teñidas con ioduro de propidio) no tratadas o tratadas con  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  a los tiempos indicados (A). Los valores del eje X corresponden al contenido de DNA, y los del eje Y corresponden al número de eventos detectados. B) Gráfica que indica el porcentaje de células detectadas en cada fase del ciclo celular obtenidas por FACS. Los valores son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. Línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA, \*\*\*\*= $p < 0.0001$ . NT, no tratado; As,  $\text{NaAsO}_2$ .

Para comprobar que la presencia de  $p53^{+/+}$  es importante para esta regulación, se realizó el análisis de ciclo celular mediante FACS en la línea celular H1299 en la cual ambos alelos de  $p53$  están ausentes ( $p53^{-/-}$ ), por lo que su regulación sobre el ciclo celular está completamente abolida. Las células H1299 fueron tratadas con  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  por 6, 12, 24 y 36 h, se fijaron y se tiñeron con ioduro de propidio para ser analizadas por FACS. Como se observa en la figura 9, el tratamiento con arsénico solo generó un pequeño incremento en el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular a las 12 h post-

tratamiento (5 %;  $p < 0.0001$ ), sin embargo, el porcentaje de células en la fase SubG1 aumentó considerablemente desde las 24 h (20 %;  $p < 0.0001$ ) en comparación con lo observado en la línea celular MCF-7 (11 %).

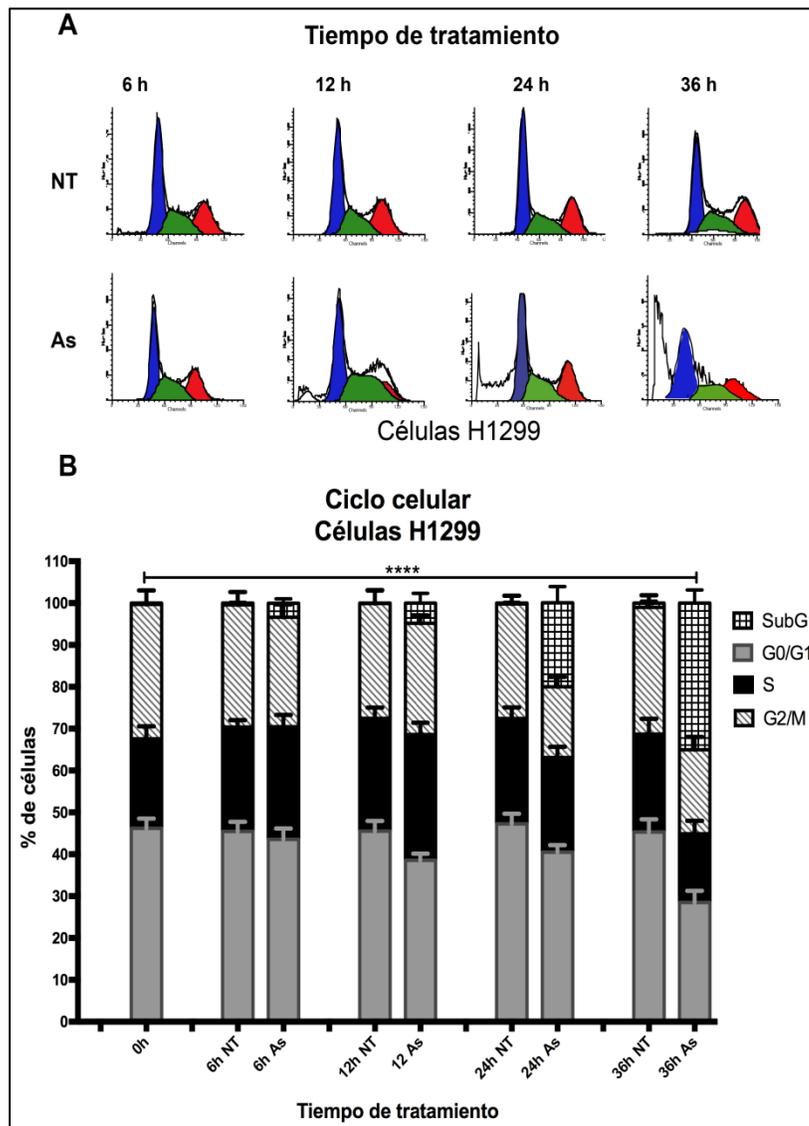


Figura 9. Efectos del  $\text{NaAsO}_2$  en el ciclo celular de la línea H1299 ( $p53^{-/-}$ ). Perfiles de ciclo celular obtenidos mediante análisis por FACS a partir de células H1299 (teñidas con ioduro de propidio) no tratadas o tratadas con  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  a los tiempos indicados (A). Los valores del eje X corresponden al contenido de DNA, y los del eje Y corresponden al número de eventos detectados. B) Gráfica que indica el porcentaje de células detectadas en cada fase del ciclo celular obtenidas por análisis FACS. Los valores son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. Línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA, \*\*\*\*= $p < 0.0001$ . NT, no tratado; As,  $\text{NaAsO}_2$ .

Como se puede apreciar, la presencia de la proteína p53 es fundamental para regular la progresión del ciclo celular a través de la fase S, ya que cuando p53 se encuentra presente (células MCF-7), hay una detención de las células en la fase S a diferencia de las células  $p53^{-/-}$  (células H1299) que no se detienen en esta fase del ciclo. Como consecuencia se observa que las células H1299 se van a muerte celular desde las 12 h posteriores al estrés

generado por el arsénico, fenómeno que se observa en las células MCF-7 solo a tiempos prolongados post-tratamiento (36 h). Estos datos sugieren que cuando se encuentra presente p53, las células probablemente tratan de resolver el daño a nivel de DNA generado por el arsénico y por esto, las células se frenan en esta fase del ciclo celular, y al no conseguirlo, se inicia el proceso de muerte celular.

Los datos anteriores nos permiten asumir la importancia que tiene p53 en la respuesta celular contra el estrés generado por el arsénico, aunque este efecto fue observado en dos líneas celulares con un fondo genético diferente, MCF-7 que deriva de cáncer de mama y H1299 derivadas de cáncer de pulmón, lo cual podría implicar que los datos obtenidos fueran debidos en parte, a las diferencias en el fondo genético.

Para comprobar que el arresto en la fase S del ciclo celular fuera el resultado de la presencia de p53 funcional bajo un mismo contexto genético, se analizó el efecto del NaAsO<sub>2</sub> sobre el ciclo celular en las líneas celulares RKO p53<sup>+/+</sup> (derivada de cáncer de colon) y RKO-E6 p53<sup>+/+</sup>. Ambas líneas celulares expresan de forma nativa y funcional la proteína p53, sin embargo, la línea RKO-E6 expresa la oncoproteína E6 que lleva a p53 a degradación, por lo que sus niveles basales disminuyen de manera significativa [87], logrando una línea celular virtualmente sin p53.

Se realizó análisis por FACS del ciclo celular en las líneas RKO y RKO-E6 (fijadas y teñidas con yoduro de propidio) tratadas con 10 μM de NaAsO<sub>2</sub> por diferentes tiempos desde 3 hasta 72 h.

En el caso de la línea celular RKO, las células fueron tratadas por 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 y 72 h. Como se puede apreciar en los perfiles de ciclo celular (FIG. 10), se observa que hay un aumento significativo en el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular, principalmente a tiempos muy tempranos, a las 3 y 6 h post-tratamiento (44 y 33 % respectivamente; p <0.0001) en comparación con las células no tratadas, que en el mismo periodo presentan un 25 y 17 % de células en esta misma fase del ciclo celular. Posterior a esta fase temprana post-tratamiento, las células arrestadas en la fase S se recuperan reintegrándose a las siguientes fases del ciclo. Cabe destacar que aunque el arresto en la fase S es transitorio, se produce un segundo arresto con periodos de exposición al NaAsO<sub>2</sub> más prolongados, observándose un arresto en la fase G1 que se presenta desde las 24 h y se continúa hasta las 72 h, encontrándose 60 % de células a las 24 h, 62 % a las 36 h, 60 % a

las 48 h y 69 % a las 72 h post-tratamiento. En contraste, cuando las células no son sometidas al estrés causado por el arsénico, el porcentaje de células en la fase G1 durante estos mismos periodos de tiempo son de 52, 44, 49 y 52 % respectivamente, indicando que las células tratan de responder ante este factor de estrés y reparar el posible daño causado al material genético.

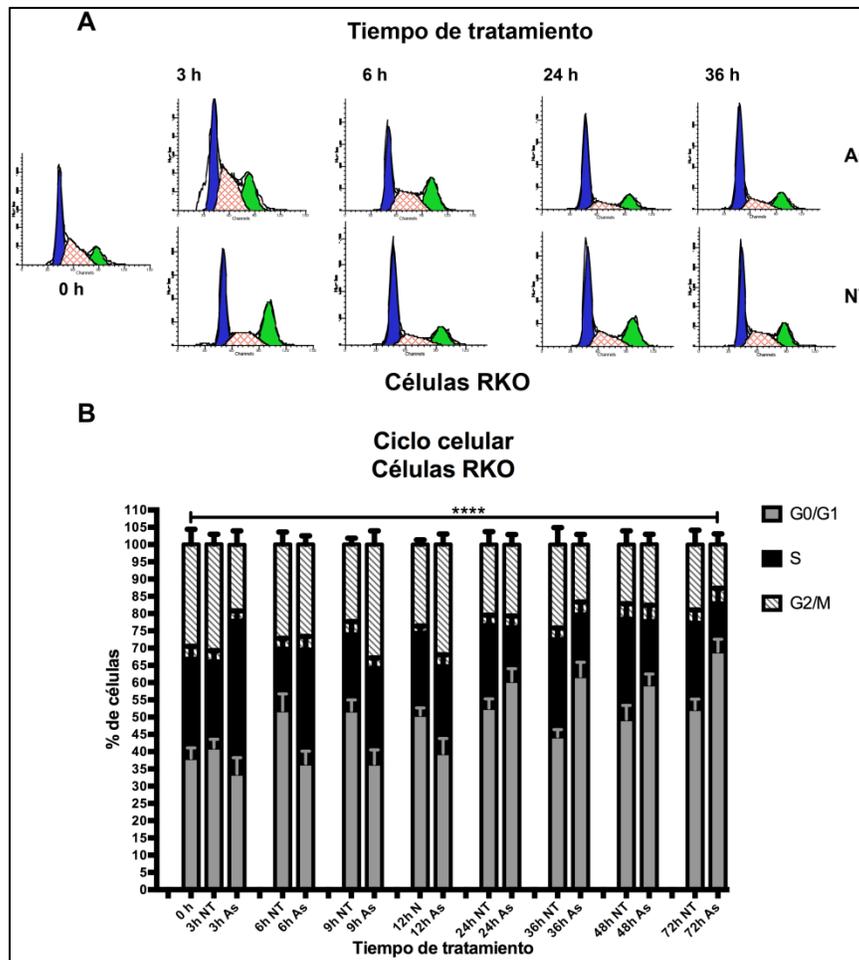


FIGURA 10. Efectos del NaAsO<sub>2</sub> en el ciclo celular de la línea RKO. Perfiles de ciclo celular obtenidos mediante análisis por FACS a partir de células RKO (teñidas con ioduro de propidio) no tratadas o tratadas con 10 μM de NaAsO<sub>2</sub> durante 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 y 72 h (A). Los valores del eje X corresponden al contenido de DNA, y los del eje Y corresponden al número de eventos detectados. B) Gráfica que indica el porcentaje de células detectadas en cada fase del ciclo celular obtenidas por análisis FACS. Los valores son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica el análisis estadístico mediante test ANOVA,

\*\*\*\*= p < 0.0001. NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>

Por otro lado, se llevó a cabo el mismo análisis en un contexto basado en la deficiencia de p53 pero con el mismo fondo genético. Para tal efecto, se realizó análisis de ciclo celular mediante FACS en células RKO-E6 (fijadas y teñidas con ioduro de propidio) tratadas con 10 μM de NaAsO<sub>2</sub> durante 3, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h. Como se observa en la figura 11, no hay ninguna afectación en la progresión del ciclo celular en las células

tratadas con arsénico a ninguno de los tiempos estudiados ya que estas células presentan el mismo patrón de comportamiento que las células no tratadas.

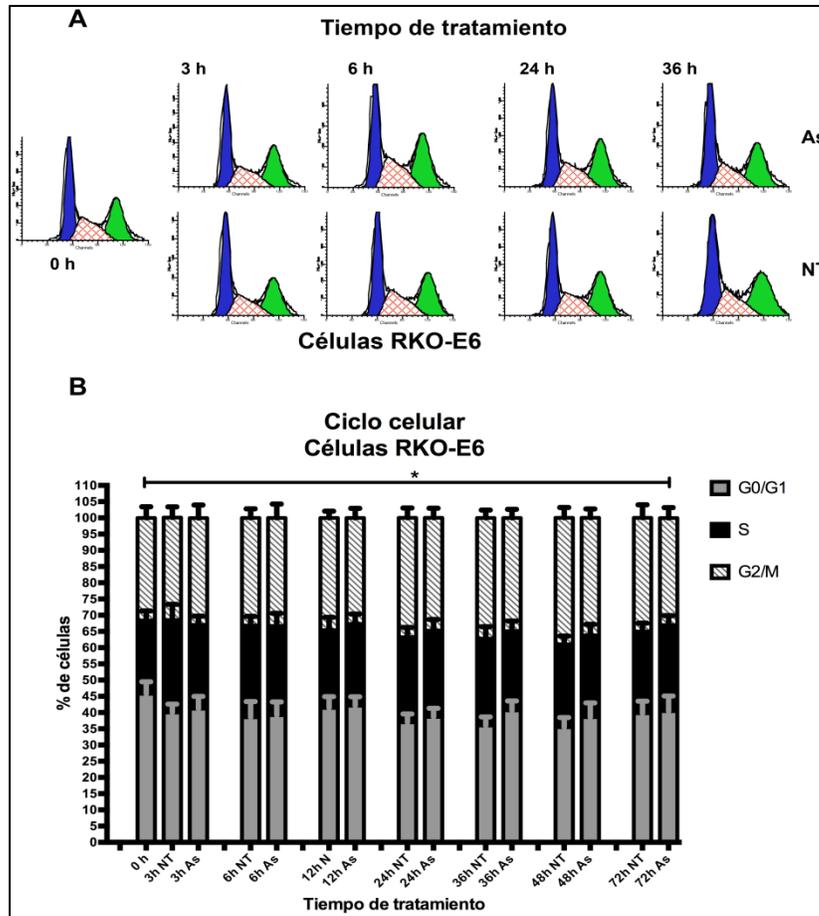


FIGURA 11. Efectos del NaAsO<sub>2</sub> en el ciclo celular de la línea RKO-E6. Perfiles de ciclo celular obtenidos mediante análisis por FACS en células RKO-E6 (teñidas con ioduro de propidio) no tratadas o tratadas con 10 μM de NaAsO<sub>2</sub> durante 3, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h (A). Los valores del eje X corresponden al contenido de DNA, y los del eje Y corresponden al número de eventos detectados. B) Gráfica que indica el porcentaje de células detectadas en cada fase del ciclo celular obtenidas por análisis FACS. Los valores son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA, \*= p < 0.05. NT, no

tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

Los resultados anteriores nos permiten comprobar que independientemente del fondo genético celular (líneas celulares RKO y RKO-E6), la presencia de p53 es indispensable para generar una respuesta contra el estrés generado por la administración de arsénico. Hasta este punto, los resultados sugieren que esta respuesta es la detención de la progresión del ciclo celular, tanto en la fase S (tiempos cortos post-tratamiento) como en la fase G1 (tiempos prolongados post-tratamiento).

Finalmente, una vez que se comprobó que los efectos sobre el ciclo celular son similares sin importar el fondo genético, los siguientes ensayos se llevaron a cabo en las

líneas celulares MCF-7 y H1299, ya que la dosis de NaAsO<sub>2</sub> requerida para observar los efectos en ciclo celular en las líneas RKO y RKO-E6 es demasiado alta.

## **8.2 La actividad de regulador transcripcional de p53 es necesaria para generar el arresto en la fase S del ciclo celular inducido por NaAsO<sub>2</sub>.**

Como se aprecia en los resultados previos, la presencia de p53<sup>+/+</sup> es indispensable para generar el arresto en la fase S del ciclo celular que se observó en las líneas celulares MCF-7 y RKO, por lo que el siguiente paso fue determinar si además de la presencia de p53 se requiere de su actividad como regulador transcripcional.

Para tal propósito, se utilizó el fármaco pifitrina  $\alpha$  que es un compuesto que bloquea selectivamente la actividad transcripcional de p53 [88], de esta forma se determina el efecto sobre el ciclo celular que puede tener p53 si se inhibe su capacidad de regulador transcripcional. En este sentido, las células MCF-7 fueron tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> o co-tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> + 30  $\mu$ M de pifitrina  $\alpha$  durante 6, 12, 24 y 36 h. Las células fueron fijadas, teñidas con yoduro de propidio y analizadas mediante FACS para determinar los perfiles de ciclo celular. En la figura 12 se observa que las células tratadas con NaAsO<sub>2</sub> presentan el arresto en la fase S del ciclo celular que previamente se evidenció desde las 6, 12 y 24 h post-tratamiento (42, 49 y 37 % de células respectivamente). Como se esperaba, el co-tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> + pifitrina  $\alpha$  inhibió la actividad de p53 por lo que el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular disminuyó drásticamente en los mismos tiempos post-tratamiento (6 h-31 %, 12 h-32 % y 24 h-23 %;  $p < 0.0001$ ), alcanzando niveles cercanos a los observados en las células tratadas únicamente con pifitrina  $\alpha$ . Además, es importante hacer notar que las células tratadas con pifitrina  $\alpha$  presentan un aumento importante en el porcentaje de células en la fase subG1 a las 24 y 36 h post-tratamiento (39 y 62 %, respectivamente) en comparación con las células tratadas solamente con arsénico (11 y 44 %, respectivamente), a pesar de que se está inhibiendo la actividad transcripcional de p53.

Con los resultados anteriores se puede afirmar que el arresto en la fase S del ciclo celular en respuesta al estrés generado por el arsénico es dependiente de la actividad transcripcional de p53, además, sugieren que existen genes blanco de p53 que pudieran estar involucrados en el retraso de la muerte celular ocasionada por el arsénico ya que la

ausencia de una proteína p53 funcional genera un aumento en el porcentaje de células en la fase subG1 a tiempos más tempranos post-tratamiento.

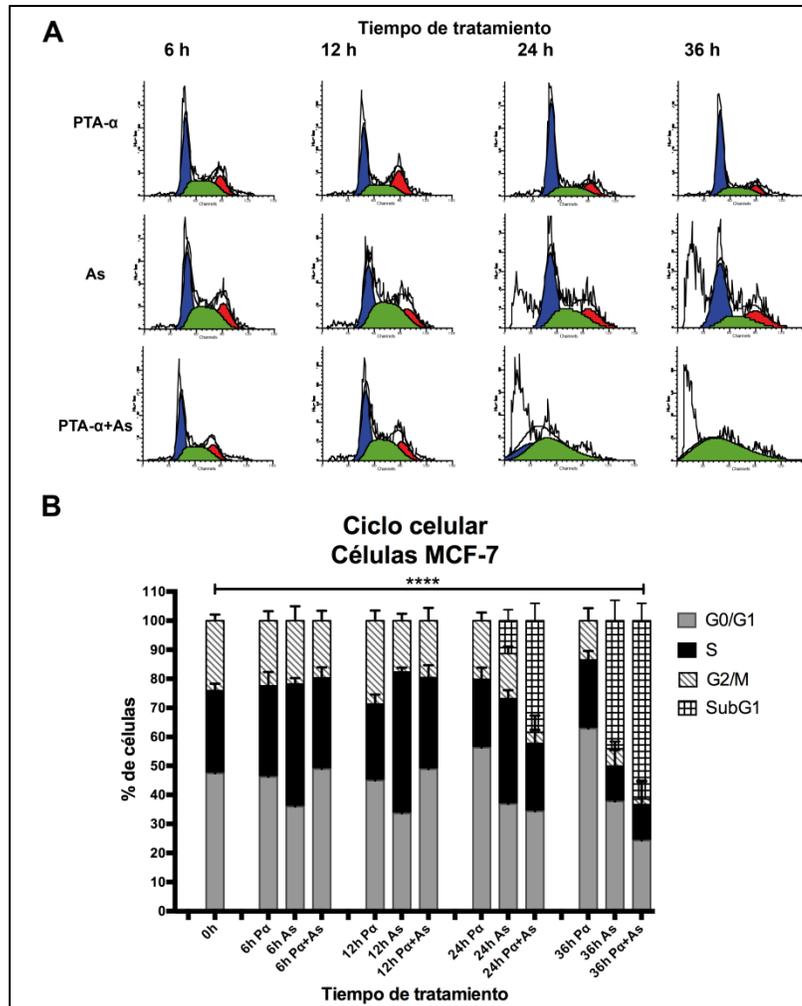


FIGURA 12. Efectos de la inhibición química de la actividad transcripcional de p53 sobre el ciclo celular en respuesta al NaAsO<sub>2</sub>. Perfiles de ciclo celular obtenidos mediante FACS en células MCF-7 (teñidas con ioduro de propidio) tratadas con 30  $\mu$ M de pifitrina  $\alpha$ , 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> o 5  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> + 30  $\mu$ M de pifitrina  $\alpha$  por 6, 12, 24 y 36 h (A). Los valores del eje X corresponden al contenido de DNA, y los del eje Y corresponden al número de eventos detectados. B) Gráfica que indica el porcentaje de células detectadas en cada fase del ciclo celular obtenidas por análisis FACS. Los valores son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA, \*\*\*\*= p <0.0001. PTA- $\alpha$ , pifitrina  $\alpha$ ; As, NaAsO<sub>2</sub>.

### 8.3 p53 protege a las células de la acumulación excesiva de ROS generadas por el arsénico

Como se ha visto hasta este momento, el arsénico ocasiona una respuesta celular dependiente de p53 que trata de proteger contra el daño inducido por este metal. Como es bien sabido, la exposición al arsénico induce la generación intracelular de ROS que en última instancia conduce a generación de estrés oxidativo que puede provocar daño oxidativo del DNA. La célula trata de reparar este daño favoreciendo la detención del ciclo celular y así evitar que exista división celular con mutaciones que podrían llevar al

desarrollo de diferentes enfermedades; cuando el daño no es reparado, el resultado es la muerte celular.

Para evaluar la posible participación de ROS en el arresto de la fase S del ciclo celular, se midieron sus niveles relativos en la línea celular MCF-7 tratada con arsénico. Para tal efecto, se utilizó el reactivo carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA, el cual, al estar en contacto con ROS se oxida emitiendo una fluorescencia que es medida por citometría.

Las células MCF-7 fueron tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h, posteriormente se aplica la carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA e inmediatamente se evaluó la fluorescencia emitida mediante FACS. En la figura 13 se observa que existe un ligero pero constante incremento en los niveles relativos de ROS que alcanza sus máximos niveles entre las 12 y 24 h post-tratamiento (1.5 a 2 veces, respectivamente;  $p < 0.005$ ). Este aumento del estrés oxidativo coincide con el aumento en el porcentaje de células detenidas en la fase S del ciclo celular (FIG. 8), lo que implicaría que las células responden al aumento de ROS con una detención del ciclo celular para tratar de contrarrestar los efectos producidos por el estrés oxidativo, como un posible daño al DNA. Además, el aumento progresivo en los niveles de ROS coincide con el aumento en el porcentaje de células en la fase subG1 (FIG. 8) sugiriendo que existe una relación directa entre el daño generado por estrés oxidativo y la inducción de muerte celular.

Como se mencionó, hay una correlación directa entre el aumento relativo de ROS y el aumento del porcentaje de células en la fase S del ciclo celular. Para determinar que efectivamente se tratara de una relación directa, se utilizó el antioxidante catalasa para revertir el estrés oxidativo generado por el arsénico. Se realizó la evaluación del ciclo celular en células MCF-7 tratadas con NaAsO<sub>2</sub> y catalasa durante 12 h. En la figura 14 se observa que la administración del antioxidante catalasa resulta en la inhibición del arresto en la fase S del ciclo celular observado en las células tratadas con NaAsO<sub>2</sub>, indicando que el aumento de ROS generado por el arsénico podría ser el causante directo de los efectos observados a nivel de ciclo celular.

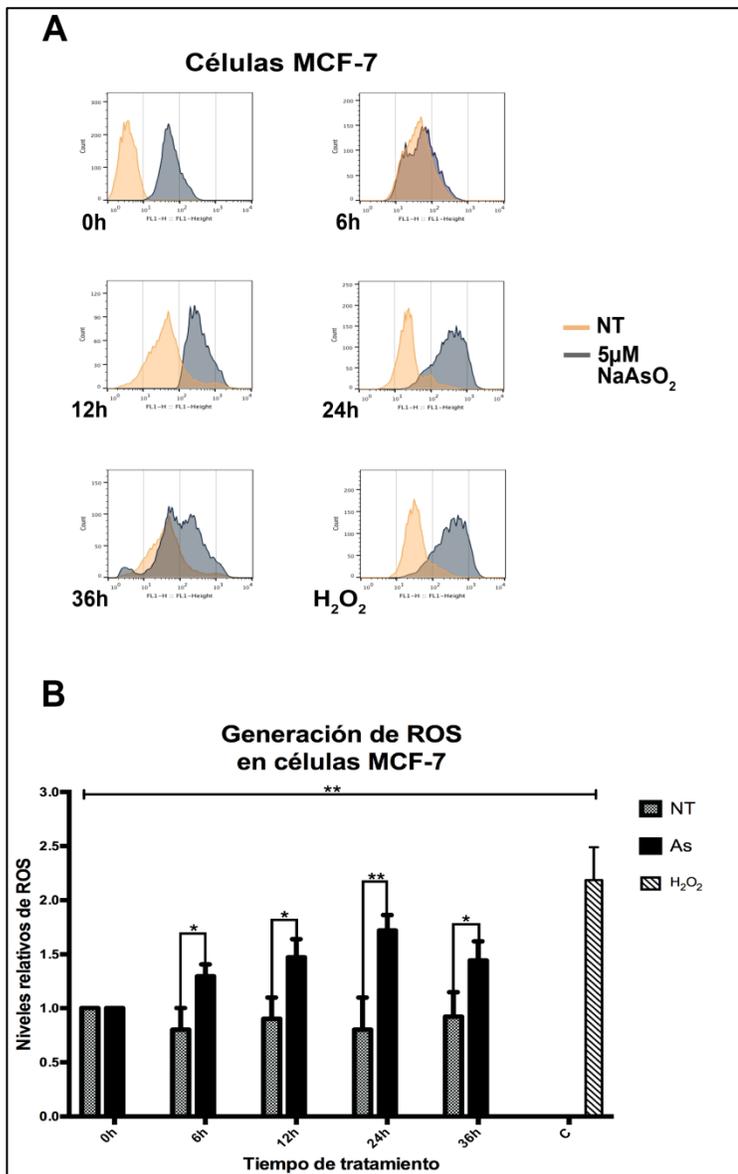


FIGURA 13. Efectos de la exposición al  $\text{NaAsO}_2$  en la generación de ROS en la línea celular MCF-7. A) Histogramas representativos de la fluorescencia relativa generada por la oxidación de carboxi- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  en células MCF-7 no tratadas (histograma anaranjado) o tratadas con  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  (histograma gris) por los tiempos indicados. Como control de producción de ROS se muestra la fluorescencia relativa generada por el tratamiento de las células MCF-7 con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.3% por 1 h. Los perfiles son representativos de 3 ensayos diferentes. B) Gráfica que representa los niveles relativos de ROS generados en la línea celular MCF-7 por la exposición al arsénico. Se muestra el resultado de la fluorescencia promedio detectada por la oxidación de carboxi- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Los niveles relativos de ROS en las células no tratadas se consideraron como los valores basales para cada uno de los tiempos de tratamiento. Los valores son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA, \*\*=  $p < 0.005$ , \*=  $p < 0.05$ . NT, no tratado; As,  $\text{NaAsO}_2$ .

Como se esperaba, la disminución de estrés oxidativo generado por la catalasa condicionó una progresión del ciclo celular similar al observado en las células no tratadas. Sin embargo, como se demostró previamente, la producción de ROS no es el factor más importante para la detención en la fase S del ciclo, ya que la presencia de la proteína p53 es el factor clave para generar dicho arresto y muy probablemente también lo es para responder al estrés oxidativo generado por el arsénico.

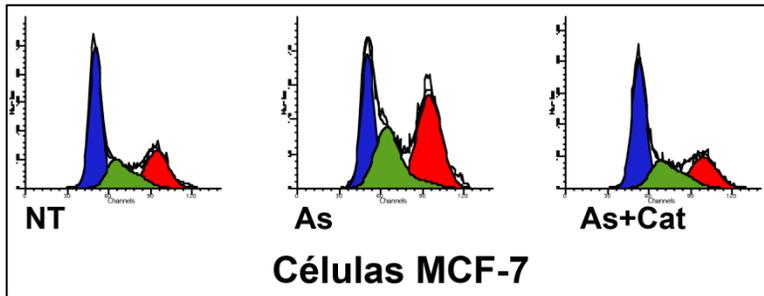


FIGURA 14. Efectos de la inhibición del estrés oxidativo por el antioxidante catalasa en células MCF-7 tratadas con arsénico. Perfiles de ciclo celular obtenidos mediante análisis por FACS a partir de células MCF-7 (teñidas con ioduro de propidio) no tratadas, tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  o 5

$\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  + 2000 U/ml de catalasa por 12 h. Los valores del eje X corresponden al contenido de DNA, y los del eje Y corresponden al número de eventos detectados. Los perfiles son representativos de 3 ensayos diferentes.

Para comprobar que la presencia de p53 es determinante para controlar el estrés oxidativo generado por arsénico, primeramente se midió el valor relativo de ROS en la línea celular p53<sup>-/-</sup> H1299. Estas células fueron tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  durante 6, 12, 24 y 36 h, para posteriormente analizar por FACS la fluorescencia emitida por el compuesto carboxi- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  oxidado. Como se aprecia en la figura 15, se detectó un incremento significativo de ROS a partir de las 12 h post-tratamiento que se continúa hasta las 36 h (6 a 7 veces;  $p < 0.005$ ). Estos resultados indican que esta línea celular p53<sup>-/-</sup> no es capaz de controlar ni disminuir la producción de ROS generada por el arsénico, en comparación con células p53<sup>+/+</sup> (MCF-7) (FIG. 13) en las que solo hay un incremento discreto de éstos niveles.

Por último, hasta este punto los resultados sugieren la posibilidad de que tanto la inducción de muerte celular como el arresto en la fase S del ciclo celular inducidos por el  $\text{NaAsO}_2$  en células p53<sup>+/+</sup>, podrían estar relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno. Además, considerando que el aumento del estrés oxidativo fue menor en las células MCF-7 (p53<sup>+/+</sup>) que en las H1299 (p53<sup>-/-</sup>), los resultados indican que los niveles de ROS generados por este metal podrían ser regulados a través de p53.

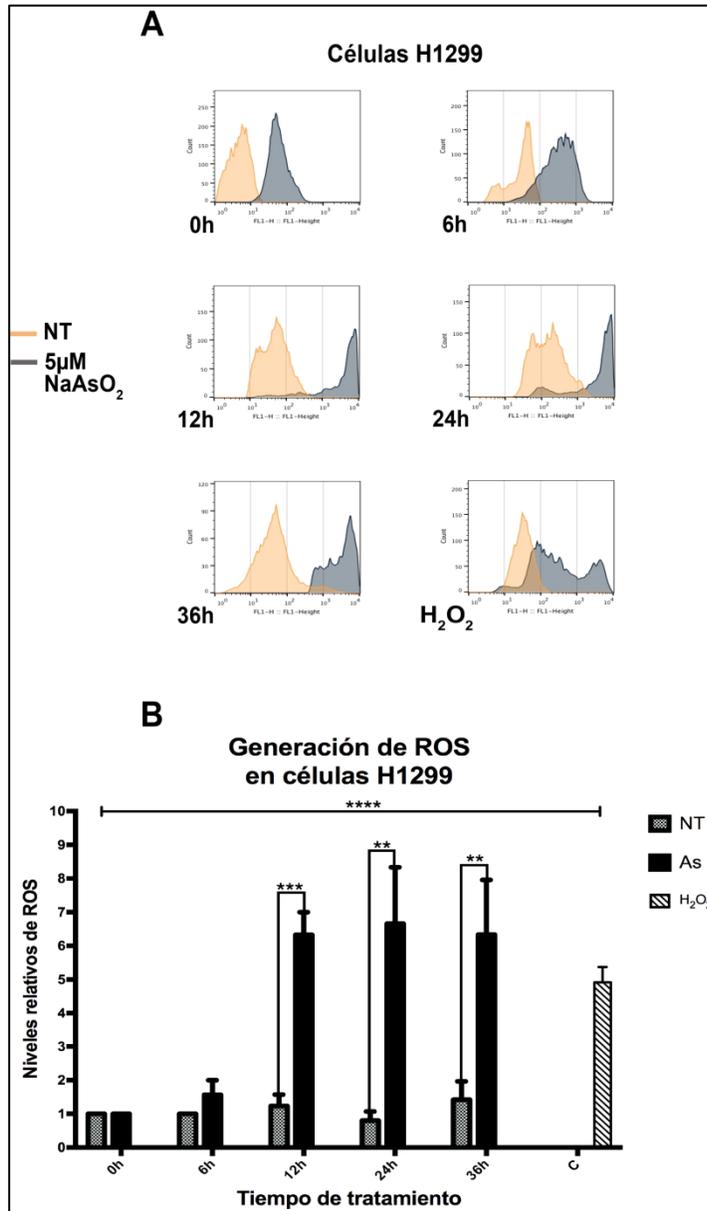


FIGURA 15. Efectos de la exposición al NaAsO<sub>2</sub> en la generación de ROS en la línea celular H1299. A) Histogramas representativos de la fluorescencia relativa generada por la oxidación de carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA en células H1299 no tratadas (histograma anaranjado) o tratadas con 5 µM de NaAsO<sub>2</sub> (histograma gris) por los tiempos indicados. Como control de producción de ROS se muestra la fluorescencia relativa generada por el tratamiento de las células MCF-7 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% por 1 h. Los perfiles son representativos de 3 ensayos independientes. B) Gráfica que representa los niveles relativos de ROS generados en la línea celular H1299 por la exposición al arsénico. Se muestra el resultado de la fluorescencia promedio detectada por la oxidación de carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA. Los niveles relativos de ROS en las células no tratadas se consideraron como los valores basales para cada uno de los tiempos de tratamiento. Los valores son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA, \*\*= p < 0.005, \*= p < 0.05. NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

#### 8.4 p53 es fundamental en la regulación de la expresión de genes responsivos al estrés oxidativo generado por el tratamiento con arsénico.

Se ha reportado que p53 regula la expresión de genes involucrados en la respuesta celular contra el estrés oxidativo [67,89]. Algunos de los genes que participan en la respuesta celular al estrés oxidativo y que son regulados a través de p53 son TIGAR [57] que es un regulador de la apoptosis y glucólisis; y las proteínas de la familia de las sestrinas SESN 1 y SESN 2 [56] que son participantes del sistema de regeneración de peroxiredoxinas que son blanco de las especies reactivas de oxígeno.

Como se mencionó anteriormente, la expresión de TIGAR (*TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*) disminuye los niveles intracelulares de fructosa-2,6-bisfosfato generando la disminución de la glucólisis y una disminución de los niveles de ROS. Estas funciones de TIGAR se correlacionan con su capacidad de protección celular contra la apoptosis asociada a estrés metabólico y ROS [57] [58]. Para determinar la posible participación de TIGAR en la respuesta al estrés oxidativo dependiente de p53, se evaluó el efecto del NaAsO<sub>2</sub> sobre la expresión de TIGAR en células p53<sup>+/+</sup>. En primer lugar se realizó RT-PCR a partir de mRNA obtenido de células MCF-7 tratadas con 5 μM de NaAsO<sub>2</sub> durante 6 y 12 h. En la figura 16 se observa que la expresión de TIGAR aumenta con el tiempo de tratamiento en comparación con las células no tratadas. Mediante el cálculo densitométrico de las bandas observamos que existe un aumento de 2.68 y 3.52 veces de expresión a las 6 y 12 h post-tratamiento (respectivamente), indicando que el estrés generado por el arsénico activa la expresión de este gen de respuesta contra ROS.

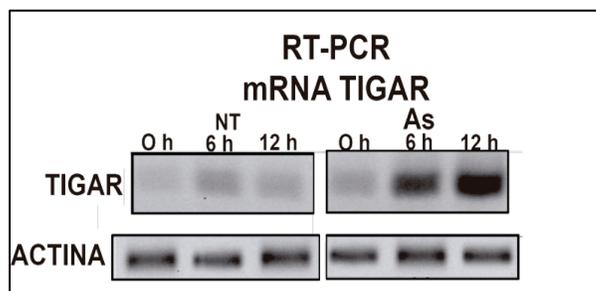


FIGURA 16. El NaAsO<sub>2</sub> estimula la expresión de TIGAR. Los niveles de mRNA de TIGAR fueron evaluados por RT-PCR en células MCF-7 (p53<sup>+/+</sup>) tratadas con 5 μM de NaAsO<sub>2</sub> durante 6 y 12 h. Se muestra el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5 % de las reacciones de RT-PCR del gen TIGAR (superior) y el gen actina (housekeeping; inferior) a los tiempos indicados. NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

Además del análisis anterior que indica claramente que existe un aumento en la expresión de TIGAR a tiempos cortos, se realizó la cuantificación relativa de la expresión de este gen mediante qPCR de mRNA obtenido de células MCF-7 tratadas con 5 μM de

NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h con el fin de hacer un análisis más fino de la expresión del gen en respuesta al estrés oxidativo y durante un mayor periodo de tiempo. En la figura 17 se aprecia que existen dos tiempos de tratamiento en los cuales hay una mayor expresión de TIGAR, que son a las 12 y 24 h siendo cuatro veces mayor en comparación con las células no tratadas.

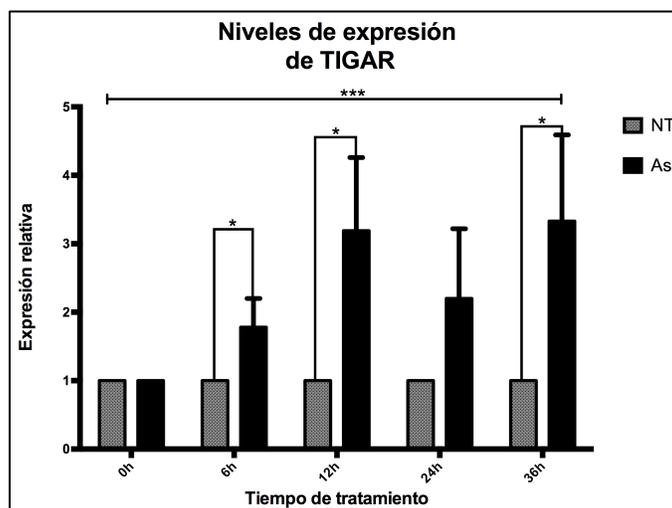


FIGURA 17. El NaAsO<sub>2</sub> induce la activación del gen TIGAR que es responsivo a estrés oxidativo. Se realizó cuantificación relativa de los niveles de expresión de TIGAR en células MCF-7 tratadas con 5 µM de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h mediante qPCR. La expresión fue normalizada con los valores de los niveles de expresión de actina a cada tiempo estudiado. Los niveles de expresión en las células no tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos en la gráfica son indicados como promedios y S.D.

calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante t de student. \*\*\*= p <0.005, \*= p <0.05. NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

Este resultado nos indica que el estrés ocasionado por el arsénico lleva a la expresión de genes que tienen como función disminuir las especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, la expresión aumentada a las 12 h coincide con el mayor porcentaje de células en la fase S del ciclo celular en las células p53<sup>+/+</sup>, aunado a una mayor cantidad de ROS, sugiriendo que al mismo tiempo la célula está activando mecanismos que impiden que el ciclo celular continúe mientras existan activos mecanismos de daño a DNA y activando la sobre-expresión de TIGAR para tratar de reducir el estrés oxidativo, que en comparación con el fondo p53<sup>-/-</sup> (H1299; FIG. 15) pudiese representar una respuesta efectiva en el control de los niveles de ROS.

Además, a tiempos largos de exposición al NaAsO<sub>2</sub> (24 y 36 h) comienza el aumento de la población celular SubG1 indicando que el estrés fue lo suficientemente elevado como para activar procesos de muerte celular, en este sentido, es cuando se observa nuevamente un aumento de la expresión de TIGAR (4 veces a 36 h post-tratamiento),

indicando que este aumento está relacionado con la actividad anti-apoptótica de esta proteína sugiriendo que se activa para evitar la muerte celular.

Por otra parte, otro de los sistemas anti-estrés oxidativo regulados por p53 es el activado por las proteínas sestrinas. Éstas pertenecen a una familia de proteínas conservadas evolutivamente que son inducibles por estrés, como daño a DNA, hipoxia y estrés oxidativo. La mayoría de los vertebrados expresan tres sestrinas (Sesn1-3) [90]. Dos de estos genes, SESN1 y SESN2, son componentes del sistema de regeneración de las peroxiredoxinas en cooperación con la actividad de las sulfi-redoxinas (Srx) que actúan como subunidad de la enzima cisteín-sulfinil-reductasa. Sesn1 y 2 reducen y reactivan las peroxiredoxinas oxidadas, que son blancos de las especies reactivas de oxígeno [56][91]. Se ha reportado que ambos genes son participantes importantes como mecanismos celulares contra el estrés oxidativo. Finalmente, se ha observado que la expresión de estos genes es dependiente de p53 quién las regula transcripcionalmente [55].

Para evaluar la participación, en primer lugar, del gen SESN1 en la respuesta celular mediada por p53 contra el estrés oxidativo, se determinaron los niveles de expresión relativa de SESN1 mediante qPCR a partir de mRNA obtenido de células MCF-7 tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> o co-tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> + 30  $\mu$ M de pifitrina  $\alpha$  (para inhibir la actividad transcripcional de p53) durante 6, 12, 24 y 36 h. El análisis cuantitativo mediante qPCR mostró que los niveles del mRNA de SESN1 en las células tratadas solo con arsénico, aumentaron significativamente en comparación con las células no tratadas durante todos los tiempos post-tratamiento examinados: desde 3 veces a las 6 h, hasta 6 veces a las 12 h, manteniéndose elevados (4 veces) hasta las 36 h (FIG. 18A). En comparación, se observa que los niveles de SESN1, cuando las células son co-tratadas con arsénico + pifitrina, permanecen igual a los niveles observados en células no tratadas durante todos los tiempos estudiados. Los resultados anteriores sugieren que el estrés oxidativo generado por el arsénico causa un aumento en la expresión de SESN1 dependiente de la actividad transcripcional de p53. Además, para demostrar que SESN1 se expresa en respuesta al estrés oxidativo generado por el arsénico, se midió su expresión relativa mediante qPCR a partir de mRNA obtenido de células MCF-7 tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> o co-tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> + 2000 U/ml de catalasa durante 12 y 24 h. Como se observa en la figura 18B, los niveles relativos de SESN1 aumentan hasta 5 veces

cuando las células estuvieron expuestas al arsénico por 12 y 24 h, en cambio, cuando se administra catalasa (enzima que disminuye ROS intracelulares) los niveles de SESN1 permanecen en valores similares a los presentes en células no tratadas, con lo que se demuestra claramente que SESN1 solo se expresa cuando el arsénico genera estrés oxidativo.

Como se demostró en el ensayo anterior, SESN1 depende probablemente de la actividad transcripcional de p53 para que se exprese cuando las células están expuestas a estrés oxidativo. Para corroborar que p53 es esencial para su expresión, se realizó mediante qPCR la cuantificación relativa de los niveles de SESN1 a partir de mRNA extraído de células H1299 (p53<sup>-/-</sup>) tratadas con 5 μM de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h. Como se observa en la figura 18C los niveles relativos de SESN1 no se modifican durante ninguno de los tiempos post-tratamiento estudiados, demostrando que la expresión de este gen en respuesta al estrés oxidativo es dependiente de una proteína p53 transcripcionalmente funcional.

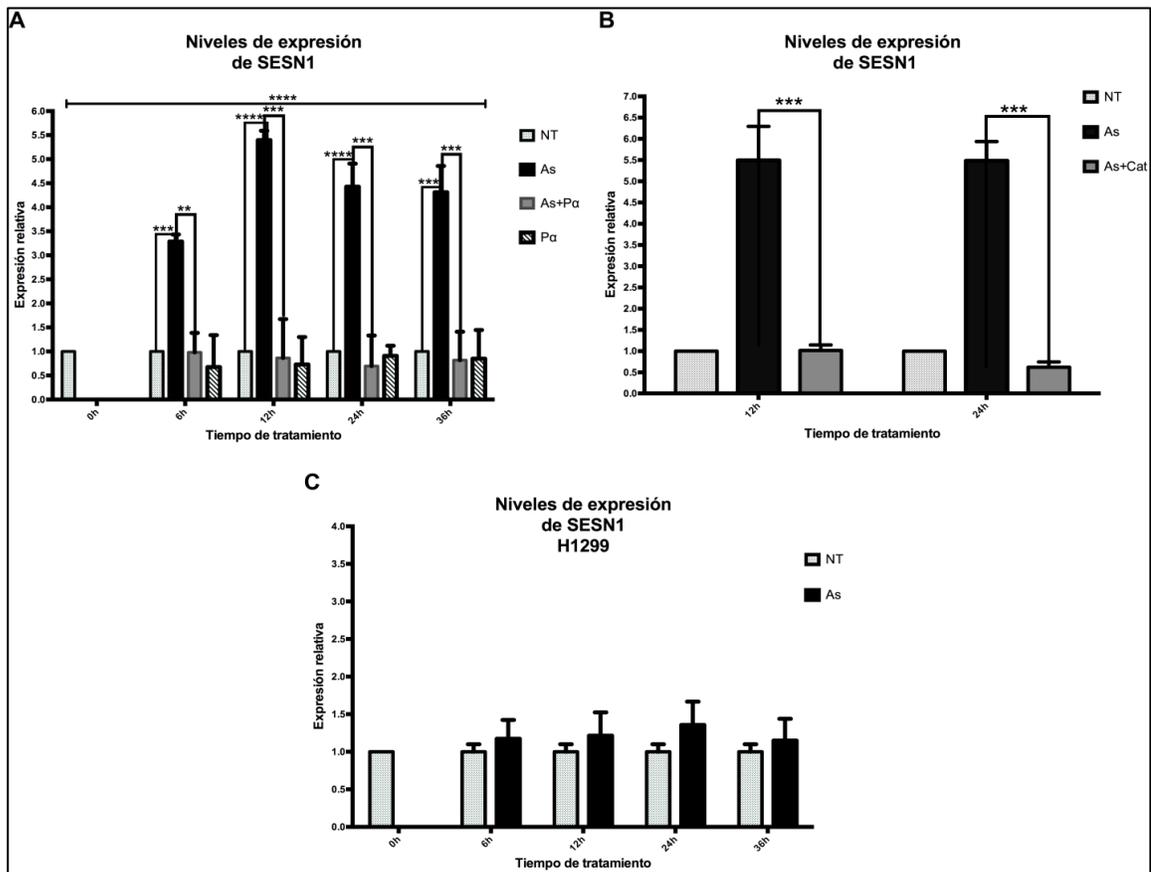


FIGURA 18. El tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> induce la expresión del gen SESN1 responsivo a estrés oxidativo por un mecanismo dependiente de p53. A) Niveles de expresión de SESN1 evaluados por qPCR en células

MCF-7 (p53<sup>+/+</sup>) tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> o co-tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> + 30  $\mu$ M de pifitrina  $\alpha$  durante 6, 12, 24 y 36 h; o B) Niveles de expresión de SESN1 en células MCF-7 tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> o co-tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> + 2000 U/ml de catalasa durante 12 y 24 h. C) Niveles de mRNA de SESN1 evaluados por qPCR en células H1299 (p53<sup>-/-</sup>) sin tratar o tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h. La expresión de SESN1 fue normalizada con los valores de los niveles de expresión de actina en cada tiempo estudiado. Los niveles de expresión en las células no tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos en la gráficas son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante *t* de student. \*\*\*\*= p <0.0001, \*\*\*= p <0.005. NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>; P $\alpha$ , pifitrina  $\alpha$ ; Cat, catalasa.

Por último, se han identificado varios sitios putativos de unión a p53 en el promotor del gen SESN1 [92]. Para determinar si existe una interacción directa de la proteína p53 con la región promotora del gen SESN1 *in vivo* en respuesta al arsénico, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando células MCF-7 sin tratar o tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12 y 24 h. Una vez cumplido el tiempo de tratamiento, se generó entrecruzamiento entre las proteínas y el DNA, posteriormente p53 asociado a la cromatina fue inmunoprecipitado y finalmente se realizó qPCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el fragmento del promotor de SESN1 que contiene los sitios de unión a p53. En la figura 19 se observa que existe un aumento significativo de estos fragmentos a las 6 y 12 h post-tratamiento (4 y 3.5 veces, respectivamente) en comparación con las células no tratadas en los mismos periodos de tiempo. Estos resultados son consistentes con el aumento de expresión de SESN1 en los mismos tiempos de exposición al arsénico. La especificidad del ChIP fue determinada mediante el uso de una IgG no específica y con la cromatina inmunoprecipitada de células H1299 que no presenta p53.

Estos resultados confirman que la proteína p53 activa la transcripción de SESN1 uniéndose directamente a su promotor durante el estrés generado por NaAsO<sub>2</sub>.

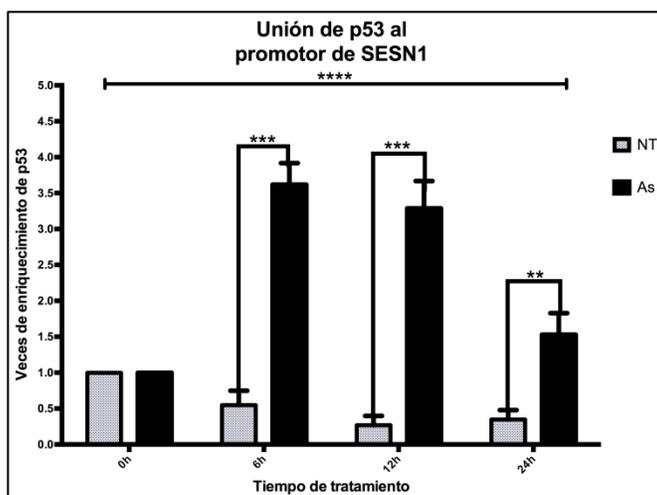


FIGURA 19. p53 se une al promotor de SESN1 activando su expresión. Se realizó ChIP a partir de células MCF-7 no tratadas y tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12 y 24 h utilizando un anticuerpo anti-p53. Los fragmentos de DNA del promotor de SESN1 que contienen los sitios de unión a p53 fueron amplificados a partir del material inmunoprecipitado mediante qPCR y normalizados con el “input” de cada una de las muestras, respectivamente. Los datos en la gráficas son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA y

la línea N-zigzag análisis mediante *t* de student. \*\*\*\*=  $p < 0.0001$ , \*\*\*=  $p < 0.005$ . NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

Con respecto al otro miembro de la familia de las sestrinas, SESN2 también es inducida por diferentes condiciones causantes de estrés celular, entre ellos, el aumento de ROS. Para determinar si esta proteína es un participante de la respuesta al arsénico, se evaluó su expresión relativa en células MCF-7 tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h. En la figura 20 se observa que los niveles de SESN2 se incrementan de manera importante a las 12 h post-tratamiento (11 veces, aproximadamente) coincidiendo con el mayor porcentaje de células en la fase S del ciclo celular y con una cantidad de ROS controlada (FIG. 13). Es de notar que posterior a este gran aumento, la expresión se reduce de manera significativa (4 veces aproximadamente), coincidiendo con la disminución progresiva del número de células en la fase S del ciclo celular y con el mayor aumento de ROS, ambos a tiempos más prolongados.

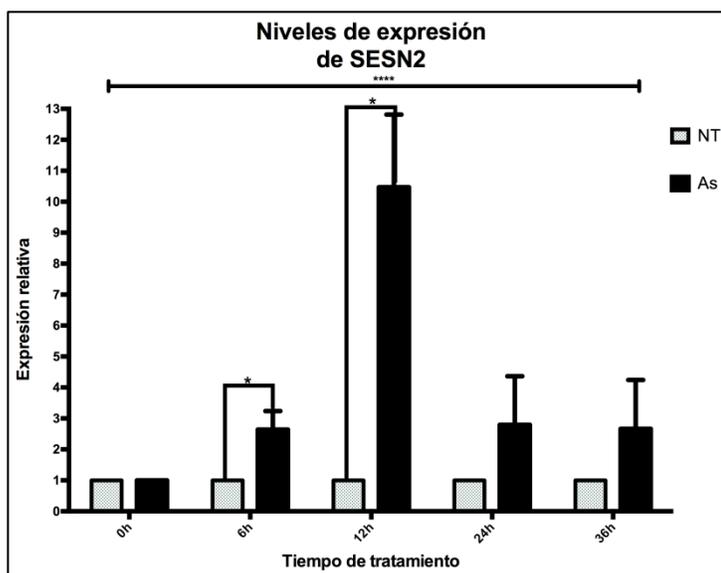


FIGURA 20. El tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> induce la expresión del gen SESN2 responsive a estrés oxidativo en un contexto p53<sup>+/+</sup>. Niveles de expresión de SESN2 evaluados por qPCR en células MCF-7 (p53<sup>+/+</sup>) tratadas con 5 μM de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h. La expresión de SESN2 fue normalizada con los valores de los niveles de expresión de actina en cada tiempo estudiado. Los niveles de expresión en las células no tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos en la gráficas son indicados como promedios y S.D.

calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante *t* de student. \*\*\*\*=  $p < 0.0001$ , \*=  $p < 0.05$ . NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

Para determinar si la expresión de SESN2 es dependiente de p53, se evaluaron sus niveles de expresión en un contexto p53<sup>-/-</sup>, para lo cual se analizaron los niveles de expresión relativa mediante qPCR a partir de mRNA obtenido de células H1299 tratadas con 5 μM de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h. Los niveles de expresión relativa detectados en el contexto carente de p53 demostraron que existe un aumento significativo (28 a 30 veces, aproximadamente) a tiempos largos post-tratamiento (24 y 36 h) contrastando con una expresión de este gen a tiempos cortos post-tratamiento igual a las células no tratadas (FIG. 21).

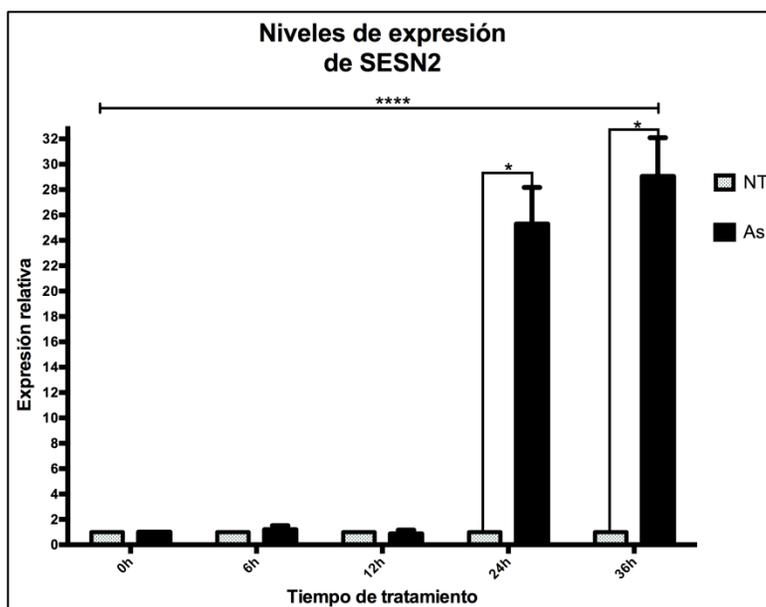


FIGURA 21. El tratamiento con  $\text{NaAsO}_2$  induce la expresión del gen SESN2 responsive a estrés oxidativo en un contexto  $p53^{-/-}$ . Niveles de expresión relativa de SESN2 evaluados por qPCR en células H1299 ( $p53^{-/-}$ ) tratadas con  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  durante 6, 12, 24 y 36 h. La expresión de SESN2 fue normalizada con los valores de los niveles de expresión de actina en cada tiempo estudiado. Los niveles de expresión en las células no tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos en la gráficas son indicados como

promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante  $t$  de student. \*\*\*\*=  $p < 0.0001$ , \*=  $p < 0.05$ . NT, no tratado; As,  $\text{NaAsO}_2$ .

Es de notar que en un contexto  $p53^{-/-}$  el gen SESN2 se induce importantemente a tiempos largos de exposición al arsénico, indicando que su expresión no necesariamente es dependiente de p53. Para comprobar si la expresión de SESN2 es dependiente de p53, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando células MCF-7 sin tratar o tratadas con  $5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  durante 6, 12 y 24 h. Una vez cumplido el tiempo de tratamiento, se generó entrecruzamiento entre las proteínas y el DNA, posteriormente el DNA fue inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-p53 y finalmente se realizó qPCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el fragmento del promotor de SESN2 que contiene los sitios de unión a p53. Los resultados no permitieron observar que existiese una interacción directa de p53 con el promotor de SESN2, por lo que se confirma que la activación de la expresión de SESN2 inducida por el arsénico, no es dependiente de la activación transcripcional de p53, sugiriendo que existen otros mecanismos que la activan.

Los datos anteriores nos permiten entender el comportamiento de dos de los integrantes de la familia de las sestrinas. En el caso de SESN1 se puede apreciar que existe un aumento motivado por el estrés oxidativo generado por el tratamiento con arsénico, principalmente dependiente de su activación transcripcional por p53, en cambio en el caso

de SESN2 existe un aumento en la expresión relativa en ambos contextos celulares, indicando que su expresión es regulada por mecanismos independientes de p53 y que están participando para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por arsénico.

Finalmente, los resultados observados indican que la célula podría poner en marcha mecanismos encaminados a bloquear el estrés oxidativo generado por el arsénico, y que varios de estos mecanismos son regulados directamente a través de p53; además, los mecanismos antes mencionados están estrechamente relacionados con los efectos observados sobre el comportamiento del ciclo celular y su detención en la fase S.

### **8.5 p53 está involucrado en la regulación de genes que participan en la progresión del ciclo celular y cuya expresión es modificada por el tratamiento con arsénico.**

Hasta el momento, los resultados indican que existe una respuesta celular tendiente a proteger a la célula del estrés oxidativo generado por arsénico, uno de los posibles efectos nocivos es el daño a DNA y es por esto que una respuesta temprana es detener el ciclo celular, particularmente en la fase S, por lo que es importante establecer los genes que podrían ser los participantes en esta respuesta y así entender de mejor forma que vías son las activadas para permitirle a la célula reparar los posibles daños al DNA.

Cuando las células son sometidas a un insulto que podría dañar su genoma, existen al menos dos factores que determinan si sufrirán una detención en el ciclo celular o apoptosis. El primero de ellos consiste en generar un arresto en las fases G1 o G2 como resultado de la activación de p21. Durante esta detención del ciclo celular, las células pueden reparar el daño antes de que continúe el ciclo. En este caso p21 juega un papel anti-apoptótico mediante un mecanismo dependiente de p53. El segundo factor está dado por la muerte celular que se produce cuando se revierte el efecto protector de p21 dependiente de p53, uno de los participantes de este desenlace es la proteína Killina la cual acopla el arresto de la fase S del ciclo celular con el proceso de apoptosis [93].

Para identificar los participantes en esta respuesta, se analizó la expresión de genes responsivos a p53 que participan en la regulación de diferentes puntos de control del ciclo celular.

Es importante delimitar el nivel molecular al que sucede este bloqueo en el ciclo celular, y que explicaría el aumento de células en la fase S observado en los resultados previos. Un primer acercamiento fue determinar la probable existencia de un bloqueo al

inicio de la fase G2/M por lo que las células se estarían acumulando en una fase previa (fase S) explicando así el arresto observado. Los genes analizados fueron GADD45 y 14-3-3 $\sigma$  involucrados con la regulación del complejo Cdc2/ciclina B1 y que son fundamentales para el inicio de la fase G2/M.

Para conseguir lo anterior, se evaluaron mediante RT-PCR los niveles de expresión de los genes antes mencionados, utilizando mRNA obtenido de células MCF-7 tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6 y 12 h. Los amplicones se evidenciaron mediante corrimiento electroforético y se realizó densitometría para valorar de manera semicuantitativa la intensidad de las bandas observadas mediante el software GelEval v1.35. En la tabla 3 se muestran los resultados de la expresión de dichos genes.

Gen analizado	No tratadas	6 h	12 h
$\beta$ -Actina	1	1	1
GADD45	1	1.6+/-0.29	1.5+/-0.16
14-3-3 $\sigma$	1	1	1

TABLA. 3. Genes responsivos a p53 que participan de en el control de la progresión del ciclo celular en la fase G2/M. Niveles de expresión relativa de GADD45 y 14-3-3 $\sigma$  evaluados por RT-PCR en células MCF-7 (p53<sup>+/+</sup>) tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6 y 12 h. Se realizó corrimiento electroforético de los productos de PCR en geles de agarosa al 1.5% y se cuantificó la intensidad de las bandas observadas en los geles utilizando el programa GelEval v1.35. La expresión de estos genes fue normalizada con los valores de los niveles de expresión de actina en cada tiempo estudiado. Las niveles de expresión en las células no tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes.

Como se puede apreciar, los niveles de expresión de los genes GADD45 y 14-3-3 $\sigma$  no se ven modificados por el estrés oxidativo producido por los tratamientos con arsénico, y como sugieren los resultados, no hay participación del punto de control G2/M en el aumento del porcentaje de células observado en la fase S.

A continuación se evaluó la expresión de genes regulados por p53 que participan en el punto de control G1/S y que también se ha reportado que permanecen activados durante la fase S. Los primeros genes candidatos en analizarse fueron Killina y p21.

p21<sup>(WAF1/Cip1)</sup> es un mediador dependiente de p53 del arresto en la fase G1 del ciclo celular, cuya función ejerce al unirse e inhibir la actividad de las cinasas dependientes de ciclina (CDK) CDK2 y CDK1 (también conocida como CDC2). Esto convierte a p21 en un factor que participa en el arresto de diferentes fases del ciclo celular, por lo que es un regulador negativo clave del ciclo celular [65].

En el caso de Killina es una proteína de unión al DNA de alta afinidad que es un inhibidor potente de la síntesis de DNA *in vitro* y generadora de un arresto de la fase S del ciclo celular previo a la apoptosis celular *in vivo* [94].

Para determinar si la expresión de estos dos genes se activa en respuesta al arsénico, se midió mediante PCR cuantitativa su expresión relativa a partir de mRNA obtenido de células MCF-7 tratadas con 5µM de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h. Con respecto a p21, en la figura 22 se observa un aumento importante en los niveles de este gen a partir de las 12 h post-tratamiento (7 veces) los cuales van disminuyendo paulatinamente a tiempos más prolongados de exposición. Los resultados obtenidos apuntan en la dirección de la participación de p21 como un agente que regula negativamente el ciclo celular, con lo cual se favorecería la reparación del posible daño al DNA ocasionado por el arsénico, y que se reflejaría en la detención en la fase S del ciclo celular.

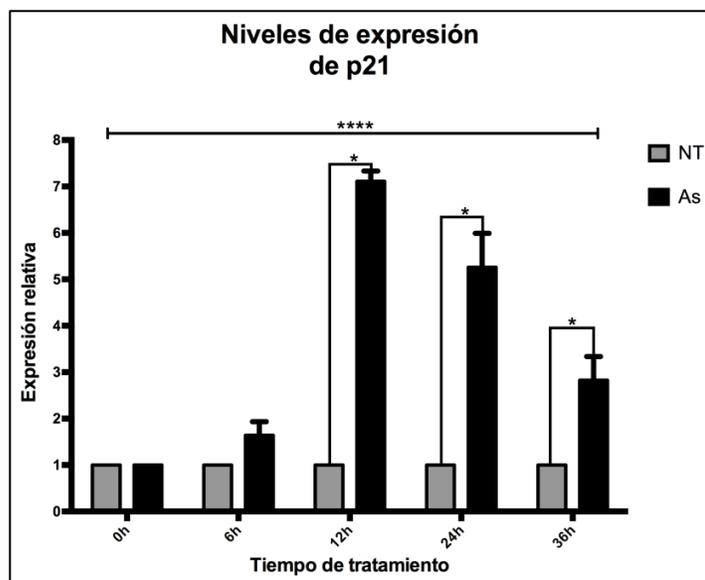


FIGURA 22. El NaAsO<sub>2</sub> induce la activación del gen p21 en respuesta al estrés oxidativo. Se realizó cuantificación relativa del nivel de expresión de p21 en células MCF-7 tratadas con 5 µM de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h mediante qPCR. La expresión fue normalizada con los valores de los niveles de expresión de actina a cada tiempo estudiado. Los niveles de expresión en las células no tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos en la gráfica son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La

línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante t de student. \*\*\*\*= p <0.001, \*= p <0.05. NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

En el caso de Killina se observa un aumento temprano en su expresión ya que a las 6 h post-tratamiento se eleva casi 8 veces en comparación con las células no tratadas. Los niveles de expresión disminuyen de manera importante a partir de este punto. Este resultado sugiere que el gen Killina se activa prontamente cuando las células se encuentran sometidas a este estrés generador de daño al DNA (FIG. 23).

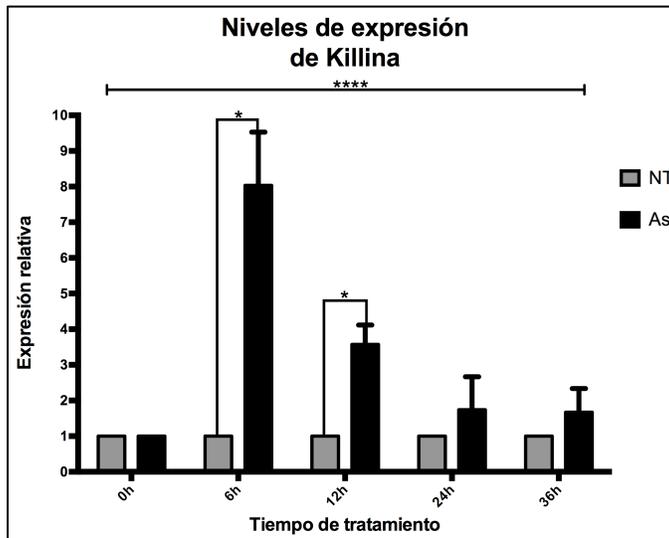


FIGURA 23. El gen Killina se induce tempranamente en respuesta al arsénico. Se realizó cuantificación relativa mediante qPCR del nivel de expresión de Killina en células MCF-7 tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h. La expresión fue normalizada con los valores de los niveles de expresión de actina a cada tiempo estudiado. Las niveles de expresión en las células no tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos en la gráfica son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica

análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante t de student. \*\*\*\*=  $p < 0.001$ , \*=  $p < 0.05$ . NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

Para determinar si el cambio de expresión tanto de p21 como de Killina es producido directamente por 53, se determinó si esta proteína se une al promotor de ambos genes. Para realizar dicha detección se llevó a cabo inmunoprecipitación de la cromatina utilizando un anticuerpo anti-p53 a partir de muestras obtenidas de células MCF-7 tratadas con 5 $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12 y 24 h y finalmente se realizó qPCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el fragmento del promotor de p21 y Killina que contiene los sitios de unión a p53.

En la figura 24 se aprecia que la interacción de p53 con el promotor de p21 se produce principalmente a las 12 h post-tratamiento coincidiendo con el pico de expresión de este gen indicando que su expresión depende de la regulación transcripcional por parte de p53.

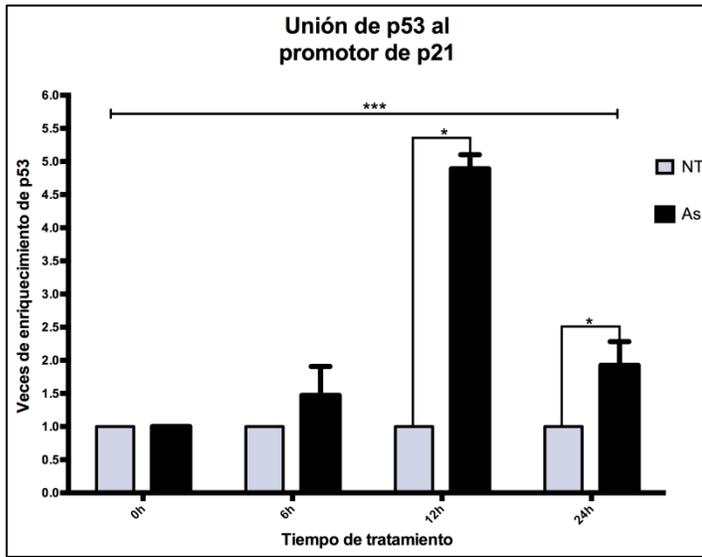


FIGURA 24. p53 activa directamente a p21 en respuesta al arsénico. Se realizó ChIP a partir de células MCF-7 no tratadas y tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12 y 24 h utilizando un anticuerpo anti-p53. Los fragmentos de DNA del promotor de p21 que contienen los sitios de unión a p53 fueron amplificados a partir del material inmunoprecipitado mediante qPCR y normalizados con el input de cada una de las muestras de cada tiempo estudiado, respectivamente. Los datos en la gráficas son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica

análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante *t* de student. \*\*\*=  $p < 0.005$ , \*=  $p < 0.05$ . NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

Al igual que en el caso anterior, también se observa la unión de p53 al promotor de Killina (FIG. 25) que se produce principalmente a las 6 h post- tratamiento coincidiendo también con el punto más alto de expresión de este gen.

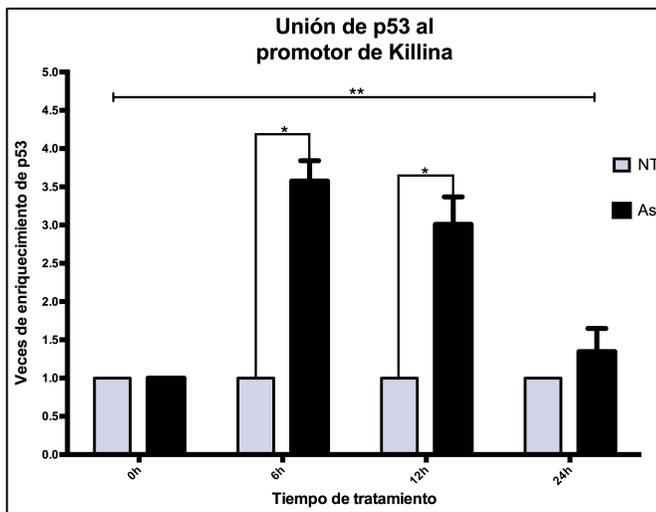


FIGURA 25. p53 activa directamente a Killina en respuesta al arsénico. Se realizó ChIP a partir de células MCF-7 no tratadas y tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12 y 24 h utilizando un anticuerpo anti-p53. Los fragmentos de DNA del promotor de Killina que contienen los sitios de unión a p53 fueron amplificados a partir del material inmunoprecipitado mediante qPCR y normalizados con el input de cada una de las muestras de cada tiempo estudiado, respectivamente. Los datos en la gráficas son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico

mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante *t* de student. \*\*=  $p < 0.005$ , \*=  $p < 0.05$ . NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

En conjunto, estos resultados sugieren que la célula sometida al estrés ocasionado por el arsénico responde mediante la regulación a través de p53 de manera rápida activando la expresión de Killina que está encaminada a activar procesos de apoptosis en caso de que se produzca daño severo al DNA, pero este fenómeno probablemente es revertido por el

efecto protector de p21 cuyos niveles se elevan posterior al aumento de Killina, seguramente inhibiendo los procesos pro-apoptóticos y estimulando al mismo tiempo mecanismos de reparación de daño al DNA. Sin embargo, estos procesos ocurren mayoritariamente en la transición de las fases G1/S favoreciendo un aumento en el porcentaje de células en la fase G1 que no es lo observado en los análisis de ciclo celular, por lo que es necesario buscar otro mecanismo que explique el aumento de células en la fase S.

### **8.6 CDC25A es regulado transcripcionalmente por un mecanismo indirecto dependiente de p53 y que involucra a ATF3 en respuesta al tratamiento con NaAsO<sub>2</sub>.**

Un punto de control de la fase S del ciclo celular bien estudiado es el mediado por la fosforilación y degradación por proteasoma de la fosfatasa de especificidad dual CDC25A [95–97]. La activación de CDC25A favorece que elimine los fosfatos inhibidores del complejo DCCK2/ciclina E permitiendo que esta cinasa facilite la translocación del factor de replicación Cdc45 al origen de replicación, paso esencial para la síntesis de DNA [95,98]; cuando se pasa el punto de control de la fase S, CDC25A se degrada rápidamente. Sin embargo, la activación de CDC25A no pasa por la activación directa de p53. No obstante, se ha reportado que p53 regula negativamente la expresión del gen CDC25A [99], incluso cuando su promotor no contiene secuencias consenso para su unión sugiriendo un mecanismo indirecto.

El análisis *in silico* del promotor CDC25A indica que contiene sitios de unión para diferentes factores de transcripción, varios de ellos regulados por p53 [100]. En su promotor se encuentra un sitio CRE generalmente reconocido por una variedad de miembros de la familia CREB/ATF.

Uno de los miembros de la familia CREB/ATF es el factor activador de la transcripción 3 (ATF3), que es un gen inducible por estrés celular, cuyos niveles de mRNA aumentan de manera importante ante la exposición celular a una variedad de condiciones generadoras de estrés, incluyendo la producción de peróxido de hidrógeno y el contacto con agentes genotóxicos [101], además, es un blanco transcripcional directo de p53 [102].

Para comprobar si el estrés generado por el arsénico induce la expresión del gen ATF3 de forma dependiente de p53, se evaluó la expresión relativa de dicho gen mediante qPCR a partir de mRNA obtenido de células MCF-7 tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> o co-

tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  + 30  $\mu\text{M}$  de pifitrina  $\alpha$  durante 6, 12, 24 y 36 h. El análisis cuantitativo mediante qPCR mostró que los niveles del mRNA de ATF3 en las células tratadas solo con arsénico, aumentaron significativamente en comparación con las células no tratadas durante todos los tiempos post-tratamientos examinados, desde 18 veces a las 6 h hasta aproximadamente 30 veces a las 12 h, manteniéndose elevados (20 veces, aproximadamente) hasta las 24 h, y cayendo drásticamente a las 36 h (4 veces) (FIG. 26). Este comportamiento se correlaciona con el aumento de células en la fase S del ciclo celular a las 12 h, y cuando comienza a aparecer la población subG1 (24 y 36 h post-tratamiento) hay una caída gradual de dichos niveles. En comparación, cuando las células son co-tratadas con arsénico y el inhibidor transcripcional de p53 (pifitrina  $\alpha$ ) se observa que ATF3 no se eleva en la misma proporción durante los tiempos estudiados (FIG. 26). Los resultados anteriores sugieren que el estrés oxidativo generado por el arsénico causa un aumento en la expresión de ATF3 dependiente de la actividad transcripcional de p53.

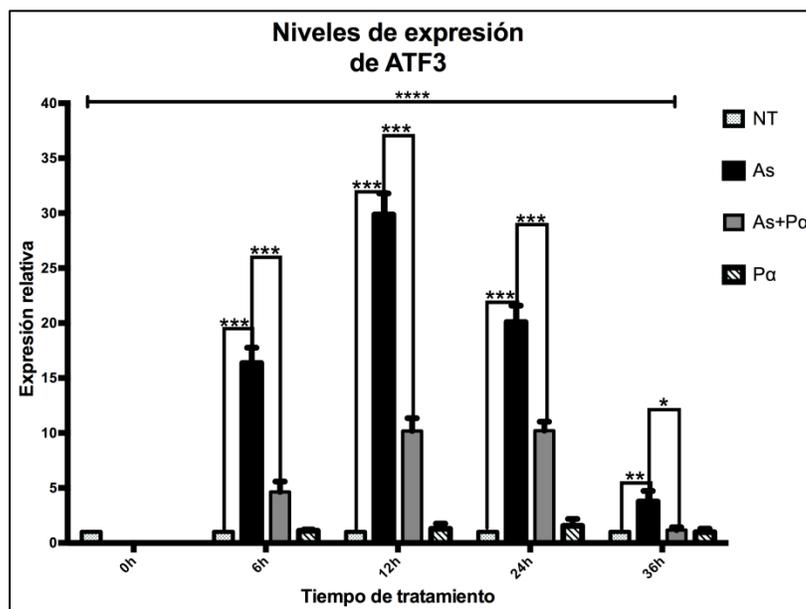


FIGURA 26. El tratamiento con  $\text{NaAsO}_2$  induce la expresión del gen ATF3 responsivo a estrés oxidativo por un mecanismo dependiente de p53. Los niveles de expresión relativa de ATF3 fueron evaluados por qPCR a partir de mRNA obtenido de células MCF-7 ( $p53^{+/+}$ ) tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  o co-tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  + 30  $\mu\text{M}$  de pifitrina  $\alpha$  durante 6, 12, 24 y 36 h. La expresión de ATF3 fue normalizada con los valores de los niveles de expresión de actina en cada tiempo estudiado. Las niveles de expresión en las células no

tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos en la gráficas son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante *t* de student. \*\*\*\*= $p < 0.0001$ , \*\*\*= $p < 0.005$ , \*= $p < 0.5$ . NT, no tratado; As,  $\text{NaAsO}_2$ ; Pa, pifitrina  $\alpha$ .

Para demostrar que ATF3 se expresa en respuesta al estrés oxidativo generado por el arsénico, se comparó su expresión relativa en un ambiente oxidante (células MCF-7

tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$ ) y cuando las células son co-tratadas con arsénico y el agente antioxidante catalasa (5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  + 2000 U/ml de catalasa) durante 12 y 24 h. Como se observa en la figura 27, los niveles relativos de ATF3 aumentan hasta 20 veces cuando las células estuvieron expuestas solo al arsénico a los tiempos estudiados, en cambio, cuando se administra catalasa, los niveles de ATF3 no se incrementan en la misma proporción (solo 4-5 veces), con lo que se demuestra claramente que ATF3 se expresa únicamente cuando el arsénico genera estrés oxidativo.

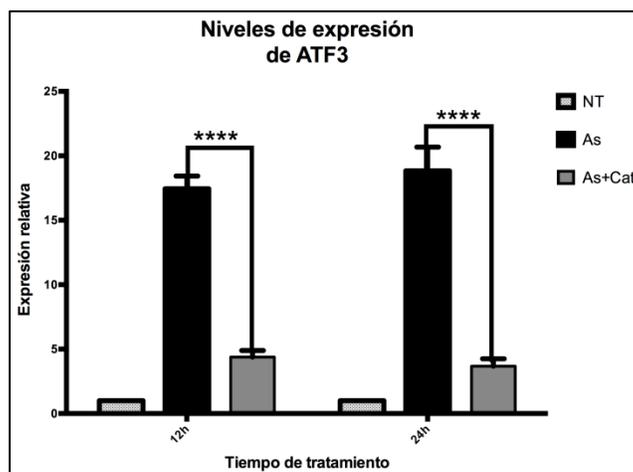


FIGURA 27. ATF3 se expresa en respuesta al estrés oxidativo generado por el arsénico. Los niveles de expresión de ATF3 se midieron mediante qPCR a partir de mRNA obtenido de células MCF-7 tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  o co-tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  + 2000 U/ml de catalasa durante 12 y 24 h. Su expresión fue normalizada con los valores de los niveles de expresión de actina en cada tiempo estudiado. Los niveles de expresión en las células no tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos en la gráficas son indicados como promedios y S.D.

calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea N-zigzag indica análisis estadístico mediante *t* de student. \*\*\*\*= $p < 0.0001$ . NT, no tratado; As,  $\text{NaAsO}_2$ ; Cat, catalasa.

Como lo demostraron los ensayos anteriores, la expresión de ATF3 aparentemente depende de la actividad transcripcional de p53 para que se exprese cuando las células están expuestas a estrés oxidativo. Por último, varios sitios putativos de unión a p53 han sido identificados en el promotor del gen ATF3. Para determinar si existe una interacción directa entre p53 y la región promotora del gen ATF3 *in vivo* en respuesta al arsénico, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando células MCF-7 sin tratar o tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  durante 6, 12 y 24 h. Una vez cumplido el tiempo de tratamiento, se generó entrecruzamiento entre las proteínas y el DNA, posteriormente los fragmentos de unión DNA-p53 fueron inmunoprecipitados y finalmente se realizó qPCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el fragmento del promotor de ATF3 que contiene los sitios de unión a p53. En la figura 28 se observa que existe un aumento significativo de estos fragmentos a las 6 y 12 h post-tratamiento (4 veces,

aproximadamente) en comparación con las células no tratadas en los mismos periodos de tiempo. Estos resultados son consistentes con el aumento de expresión de ATF3 en los mismos tiempos de exposición al arsénico. La especificidad del CHIP fue determinada mediante el uso de una IgG no específica.

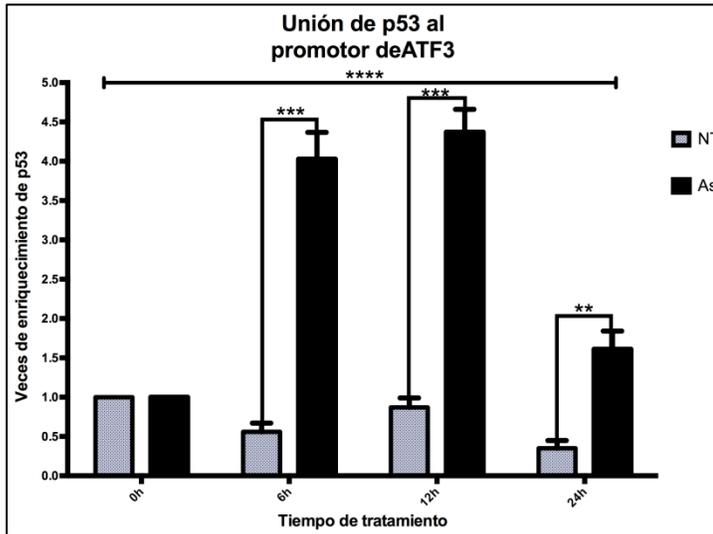


FIGURA 28. p53 se une al promotor de ATF3 activando su expresión. Se realizó CHIP a partir de células MCF-7 no tratadas y tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12 y 24 h utilizando un anticuerpo anti-p53. Los fragmentos de DNA del promotor de ATF3 que contienen los sitios de unión a p53 fueron amplificados a partir del material inmunoprecipitado mediante qPCR y normalizados con el input de cada una de las muestras, respectivamente. Los datos en la gráficas son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea

acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante *t* de student. \*\*\*\*= $p < 0.0001$ , \*\*\*= $p < 0.005$ . NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

Los resultados indican que el medio ambiente intracelular generado por el tratamiento con arsénico, induce la unión de p53 al promotor ATF3 y en consecuencia aumenta sus niveles de mRNA.

Una vez que se produce este aumento, se puede sugerir que ATF3 se une a los sitios CREB/ATF presentes en el promotor de CDC25A y de esta forma regular su expresión. Para comprobar esta posible interacción se realizó la detección de la unión de ATF3 a dos sitios putativos de unión de este factor en el promotor de CDC25A mediante CHIP (aquí denominados como sitio 1 y sitio 2), utilizando células MCF-7 sin tratar o tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12 y 24 h. Una vez cumplido el tiempo de tratamiento los fragmentos de unión DNA-ATF3 fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-ATF3 y finalmente se realizó qPCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el fragmento del promotor de CDC25A que contiene los sitios de unión a ATF3. En la figura 29A y 29B se observa un aumento importante en la cantidad de ATF3 unido al sitio 1 del promotor de CDC25A a las 12 h post-tratamiento (FIG. 29A), mientras que en el sitio 2 del promotor se

evidencia una interacción más temprana (6 h post-tratamiento); la especificidad del CHIP fue determinada mediante el uso de una IgG no específica. Estos resultados sugieren que hay una regulación temprana de la expresión de CDC25A directamente a través de ATF3.

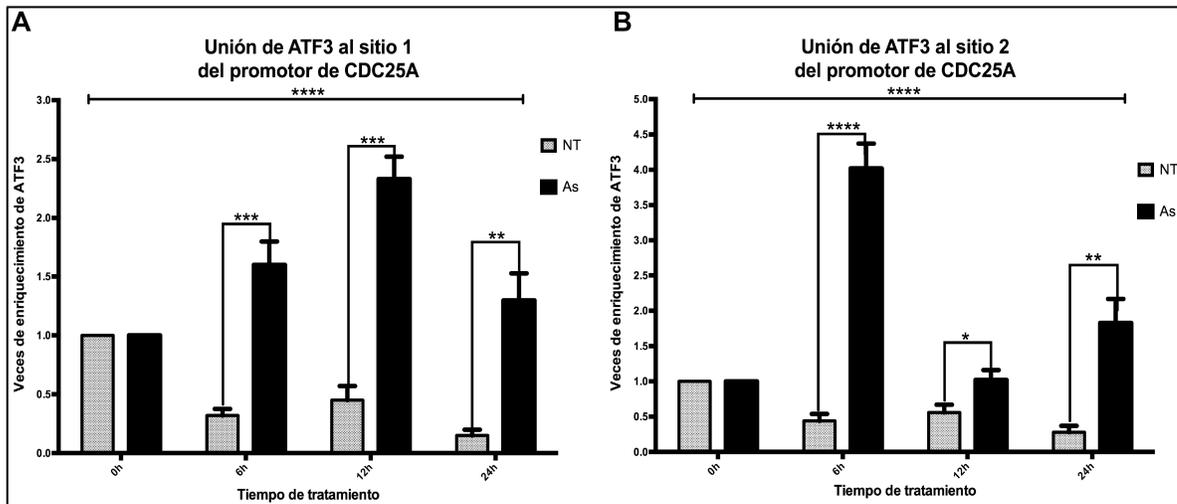


FIGURA 29. Unión de ATF3 al promotor de CDC25A. Se realizó CHIP a partir de células MCF-7 no tratadas y tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12 y 24 h utilizando un anticuerpo anti-p53. Los fragmentos de DNA del promotor de CDC25A que contienen los sitios de unión a ATF3 (sitio 1 [A] y sitio 2 [B]) fueron amplificados a partir del material inmunoprecipitado mediante qPCR y normalizados con el input de cada una de las muestras, respectivamente. Los datos en la gráficas son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante *t* de student. \*\*\*\*=  $p < 0.005$ , \*\*=  $p < 0.005$ , \*=  $p < 0.05$ . NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>.

Una vez comprobado que el factor de transcripción ATF3 se une al promotor de CDC25A y teniendo en cuenta el aumento de células en la fase S del ciclo celular en los primeros tiempos de exposición al arsénico observado en nuestros ensayos, se evaluó el efecto del tratamiento con arsénico sobre la expresión de CDC25A a partir de mRNA obtenido de células MCF-7 tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante 6, 12, 24 y 36 h. Se encontró una disminución gradual de los niveles de mRNA de CDC25A en respuesta al tratamiento con arsénico, siendo significativamente bajos de 12 a 24 h post-tratamiento (una disminución del 30 al 50 %, aproximadamente) (Fig. 30), coincidiendo con los tiempos en los cuales las células se acumulan en mayor proporción en la fase S durante el tratamiento (Fig. 8) sugiriendo que este arresto del ciclo celular es dependiente de CDC25A. Los datos anteriores sugieren que la disminución en los niveles de CDC25A observados son consecuencia directa de la interacción de ATF3 con su promotor, sin embargo, para

corroborar que este efecto es motivado por p53 (aunque de manera indirecta), se inhibió la actividad de regulador transcripcional de esta proteína con el reactivo pifitrina  $\alpha$ . Los resultados mostrados en la figura 30 evidencian que el bloqueo de p53 (células tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> + 30  $\mu$ M pifitrina  $\alpha$ ) elimina la regulación negativa generada por ATF3 ya que los niveles de expresión de CDC25A se incrementan de manera considerable (6 a 7 veces) en comparación con los niveles disminuidos generados solo por el arsénico, resaltando la relevancia de p53 en la respuesta observada al arsénico. Lo anterior sugiere que existe una regulación entre ATF3 y CDC25A mediada a través de p53.

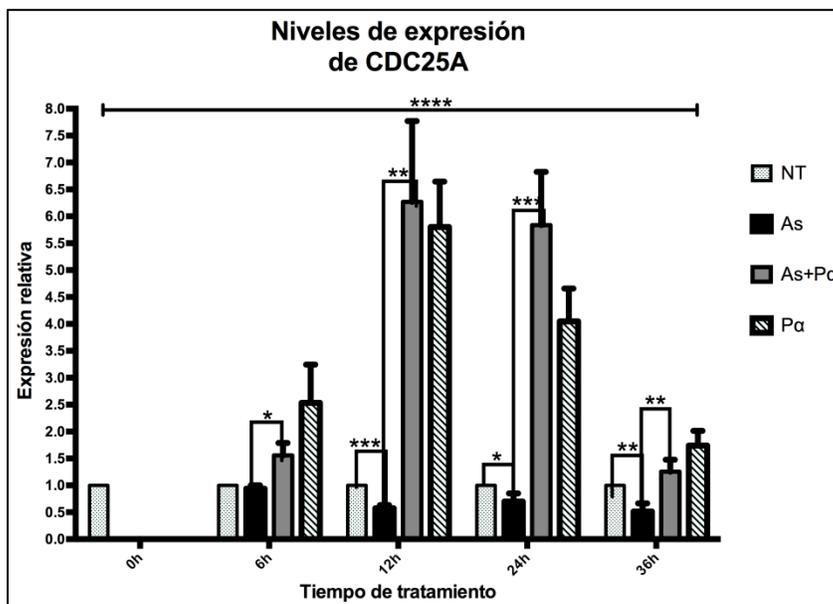


FIGURA 30. El tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> induce la expresión del gen regulador de la fase S del ciclo celular CDC25A dependiente indirectamente de p53. Los niveles de expresión relativa de CDC25A fueron evaluados por qPCR a partir de mRNA obtenido de células MCF-7 (p53<sup>+/+</sup>) tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> o co-tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> + 30  $\mu$ M de pifitrina  $\alpha$  durante 6, 12, 24 y 36 h. La expresión de CDC25A fue normalizada con los valores de los

niveles de expresión de actina en cada tiempo estudiado. Los niveles de expresión en las células no tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos en la gráficas son indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea acotada indica análisis estadístico mediante test ANOVA y la línea N-zigzag análisis mediante *t* de student. \*\*\*\*=  $p < 0.0001$ , \*\*=  $p < 0.005$ , \*= $p < 0.5$ . NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>; P $\alpha$ , pifitrina  $\alpha$ .

Por último, para demostrar que el efecto sobre la regulación en los niveles de expresión de CDC25A se deben al estrés oxidativo generado por el arsénico, se realizó la cuantificación relativa de expresión de dicho gen cuando las células MCF-7 son co-tratadas con arsénico y la enzima catalasa. Los resultados señalan que cuando el ambiente oxidativo es eliminado del sistema por la catalasa, los niveles de CDC25A son similares a los de células no sometidas a estrés (FIG. 31) haciendo evidente que este gen se activa para frenar el ciclo celular cuando la célula está sometida a condiciones de estrés.

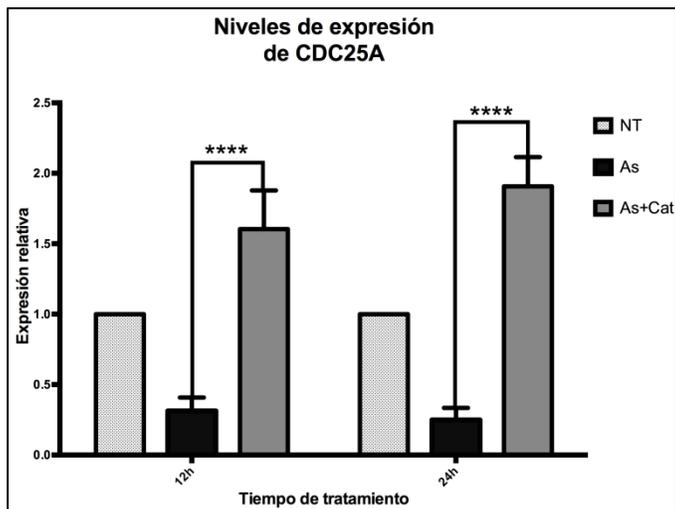


FIGURA 31. CDC25A se expresa en respuesta al estrés oxidativo generado por el arsénico. Los niveles de expresión de CDC25A se midieron mediante qPCR a partir de mRNA obtenido de células MCF-7 tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> o co-tratadas con 5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> + 2000 U/ml de catalasa durante 12 y 24 h. Su expresión fue normalizada con los valores de los niveles de expresión de actina en cada tiempo estudiado. Los niveles de expresión en las células no tratadas se consideran como los valores basales para cada uno de los tratamientos aplicados y se da un valor relativo de 1. Los datos en la gráficas son

indicados como promedios y S.D. calculados a partir de tres ensayos independientes. La línea N-zigzag indica análisis estadístico mediante *t* de student. \*\*\*\*=  $p < 0.0001$ . NT, no tratado; As, NaAsO<sub>2</sub>; Cat, catalasa.

En concordancia con nuestros resultados, Yih et al. [66] reportó cambios en la expresión de varios genes en un microarreglo de cDNA a partir de fibroblastos humanos en respuesta al tratamiento con arsenito de sodio, entre los cuales es se encontraba CDC25A; por otro lado, Lehmann et al. [84] informó que existe una correlación directa entre la progresión lenta de la fase S del ciclo celular y un nivel bajo de expresión de CDC25A en respuesta al tratamiento con arsénico.

Tomando en conjunto estos resultados se sugiere que la detención de la fase S del ciclo celular inducida por el tratamiento con arsénico, es dependiente de la función de p53 que promueve la expresión de factores de transcripción que regulan la expresión y, probablemente, la actividad de CDC25A, ya que en un contexto celular p53  $-/-$ , no se produce ni la detención del ciclo celular en fase S ni la disminución de ROS.

## 9. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de este estudio fueron que el arsénico produce un aumento temprano y transitorio en la proporción de células en la fase S del ciclo celular que es dependiente de la presencia y la actividad transcripcional de p53, y por primera vez se demostró que en respuesta al arsénico, p53 regula transcripcionalmente genes implicados

en la reducción de los niveles de ROS, tales como TIGAR y SESN1; y por un mecanismo indirecto que implica a ATF3, genes que podrían ser responsables de la detención del ciclo celular en fase S, tales como CDC25A.

La formación de especies reactivas de oxígeno debido a la presencia de arsénico es uno de sus mecanismos de toxicidad más estudiados actualmente. Las ROS formadas por el arsénico están involucradas en varios mecanismos de toxicidad generados por este metal, entre ellos, genotoxicidad, modificaciones en la transducción de señales, proliferación celular e inhibición de los mecanismos de reparación de daño al DNA [34].

Las ROS generadas por el arsénico son principalmente el anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno principalmente [9]. Se ha detectado que este tipo de especies reactivas ocasionan daño al DNA, peroxidación lipídica, activación de genes de respuesta al daño al DNA, etc. [9]. Aunque no es directamente mutagénico, su genotoxicidad se ve reflejada por la generación de mutaciones, daño oxidativo al DNA, ruptura de cadenas de DNA, intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas, aneuploidia y micronúcleos [103].

Como se ha mencionado, diferentes tipos de daño al DNA pueden activar vías de señalización encaminadas a responder contra dicho daño. Las vías que se activan tienen como finalidad generar un arresto o un progreso más lento del ciclo celular que es necesario para permitir que el DNA sea reparado y así evitar mutagénesis o apoptosis. Esto se consigue por la activación de puntos de control que activan vías de señalización que previenen que el ciclo avance sin que se hayan completado fases previas de manera correcta. Las principales vías de control que se activan son las dependientes de la proteína p53, que a través de su capacidad de regulador transcripcional, modula la respuesta de sus genes blanco.

A este respecto, existen varios reportes indicando que el arsénico puede causar arresto del ciclo celular en diferentes puntos de control, principalmente en las fases G1 y G2/M [37]. Hay reportes que indican que además de la bien conocida detención en la fase G1 del ciclo celular inducida por el tratamiento de arsénico en células p53<sup>+/+</sup>, este metal también induce un aumento importante en el tiempo de síntesis de DNA; además, se ha observado un aumento sutil en el número de células en diferentes fases del ciclo celular donde p53 no es funcional (células U937) indicando que el tránsito a través de la fase S se

ve afectado por el arsénico, pero con un resultado diferente dependiendo del *status* de p53, ya sea la detención en G1, en G2/M o si el estrés es muy severo, apoptosis [84]. En concordancia con estos informes, en este proyecto se observó una detención en la fase S del ciclo celular en líneas celulares p53<sup>+/+</sup> (MCF-7 y RKO) durante tiempos cortos post-tratamiento, mientras que durante exposiciones prolongadas, las células aparentemente se recuperan continuando su progresión en el ciclo celular, sin embargo, en el caso de las células RKO, éstas sufren un nuevo arresto, acumulándose en la fase G1 y, en el caso de las células MCF-7, a partir de las 24 h post-tratamiento, dirigiéndose a muerte celular (aumento de la población en subG1). Curiosamente, en células H1299 (contexto p53<sup>-/-</sup>) y RKO-E6 (donde E6 elimina a p53) no se produjo un enriquecimiento en alguna fase particular del ciclo celular, aunque en el caso de las células H1299 (no expresan p53 a diferencia de RKO-E6) aparece una población de células en subG1 a tiempos tempranos posteriores al inicio del tratamiento, que corresponde probablemente a células apoptóticas, indicando que p53 es importante para evitar la muerte celular mediante el arresto del ciclo celular. La pre-incubación de las células MCF-7 con el inhibidor selectivo de la actividad transcripcional de p53 pifitrina- $\alpha$  (PTA) [104,105] también inhibió la detención de la fase S inducida por arsénico, lo que demuestra que, además de la presencia de p53, se requiere su función como activador transcripcional para generar esta respuesta.

La detención transitoria de la fase S dependiente de p53 observada en nuestros ensayos sugiere que las células son inducidas a reparar el daño al DNA causado por NaAsO<sub>2</sub>, ya que transitan lentamente a través de la fase S del ciclo celular durante un tiempo corto pos-tratamiento para recuperarse posteriormente [84], mientras que las células que carecen de p53, probablemente, no son capaces de reparar el daño al DNA causado por el arsénico que resulta en apoptosis [76,106].

Por otro lado, se ha demostrado que O<sup>2-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son las principales especies reactivas de oxígeno que se producen en los sistemas celulares expuestos a diferentes concentraciones de arsenito [38,107]. En el contexto p53<sup>+/+</sup> se encontró una correlación en los momentos en los que se detectó mayor cantidad de estrés oxidativo y más células acumuladas en la fase S, lo que sugiere una posible conexión entre estos procesos. Por otra parte, el gran aumento en la cantidad de ROS observada en las células p53<sup>-/-</sup> (H1299), sin que se genere ningún freno en alguna fase particular del ciclo celular, pero dirigiéndose

directamente a muerte celular, indica fuertemente que la detención transitoria de la fase S inducida por  $\text{NaAsO}_2$  es probablemente debida a la producción de ROS y regulada por p53. En este sentido, varios estudios indican que la apoptosis inducida por el trióxido de arsénico está parcialmente relacionado con la formación intracelular de ROS [28,73,108], y por otra parte, el silenciamiento de p53 en células de mieloma resultó en su sensibilización hacia la apoptosis inducida por arsénico [109].

Los cambios en los niveles intracelulares de ROS regulan una amplia variedad de respuestas fisiológicas, que dependen en gran medida del tipo de célula y el nivel de ROS generados [110]. Los niveles altos de ROS conducen a estrés oxidativo, que entre muchos otros efectos inducen una respuesta de p53, inhibición de la proliferación celular, inducción prematura de senescencia o la muerte por apoptosis [110,111], restringiendo así la viabilidad y la proliferación de las células expuestas a un ambiente potencialmente mutagénico. Además de la regulación de los genes que participan en las vías antioxidantes canónicas, existen genes que responden al estrés oxidativo dependientes de p53. En particular, nuestro trabajo analizó la participación de tres genes que cumplen con las características antes mencionadas, que fueron TIGAR [57] y dos miembros de la familia de las sestrinas, SESN1 (PA26) y SESN2 (Hi95) [91,112].

En cuanto a la participación de TIGAR en respuesta al estrés oxidativo generado por el arsénico en células  $p53^{+/+}$ , los resultados indican que su expresión aumenta mayormente en dos puntos en particular. El primero a las 12 h post-tratamiento, coincidiendo con el aumento progresivo de ROS y con el mayor porcentaje de células en la fase S, indicando que se activa en respuesta al estrés oxidativo generando una respuesta antioxidante. A este respecto se sabe que una consecuencia de la activación de TIGAR es favorecer la vía de las pentosas que produce un incremento en los niveles de NADPH llevando a un incremento del glutatión, promoviendo así la eliminación de ROS que favorece la protección celular contra daño oxidativo [57].

El segundo pico de aumento de la expresión de TIGAR se produce a tiempos muy tardíos posteriores a la administración del arsénico (36 h), cuando hay un alto porcentaje de células en la fase subG1 debido, probablemente, a que el daño genotóxico no está siendo reparado y las células se están dirigiendo a apoptosis. Lo anterior sugiere que la expresión de TIGAR se eleva para proteger contra la muerte celular, ya que se ha reportado que posee

efectos anti-apoptóticos dependientes de p53 [57,58,113]. Sin embargo, este efecto no es muy potente ya que hay una gran porcentaje de células en fase subG1.

En conclusión, TIGAR es una proteína inducible por p53 cuya función es proteger contra estrés oxidativo disminuyendo los niveles de ROS y la activación de señales apoptóticas asociadas a ROS.

Con respecto a las sestrinas, se ha reportado que los promotores de SESN1 y SESN2 contienen sitios de unión para p53 [90] sugiriendo que sus efectos son regulados por esta proteína. Nuestros resultados demostraron que existe un aumento en el nivel de mRNA de ambos genes a tiempos tempranos tras la exposición al arsénico (6 a 12 h) en las células MCF-7, correspondiente con la acumulación de células en la fase S, sugiriendo que podrían ser genes blanco de la regulación transcripcional directa por p53, además, el hecho de que la expresión SESN1 y SESN2 alcanza su nivel máximo cuando existe una cantidad controlada de ROS generados por NaAsO<sub>2</sub> sugiere que son activados para permitir que las células resuelvan el daño oxidativo y por ende la detención de la fase S y así evitar la muerte celular por lo menos a tiempos cortos.

Con relación a los niveles de expresión de SESN1 en los primeros tiempos posteriores al tratamiento es evidente que se generan por la unión directa de la proteína p53 su promotor, como lo demuestra la inmunoprecipitación de la cromatina. Estos datos sugieren que una proteína p53 funcional es esencial para generar una respuesta celular contra el estrés oxidativo generado por arsénico, ya que las células que no expresan p53 (células H1299) o las células en las cuales se bloquea la actividad transcripcional de p53 (células MCF-7 tratadas con el inhibidor pifitrina  $\alpha$ ) no son capaces de aumentar el nivel del mRNA de SESN1, lo que lleva a la acumulación intracelular de ROS (hasta 6 a 7 veces) y la muerte celular. Aún más, cuando las células expuestas al arsénico son tratadas con la enzima antioxidante catalasa, al no existir el ambiente pro-oxidante, SESN1 no se activa, demostrando que su expresión depende del ambiente de estrés generado por el arsénico. Lo anterior concuerda con los reportes en los cuales se asocia de manera directa la regulación de SESN1 por p53 en respuesta a diferentes condiciones que generan estrés oxidativo [114,115].

Por otro lado, en el caso de SESN2 también se observa que aumenta sus niveles cuando las células p53<sup>+/+</sup> están siendo sometidas al estrés producido por el arsénico y que

sumándolo al efecto de SESN1 consiguen mantener en niveles bajos las ROS, concordando, además, con el mayor número de células acumuladas en la fase S del ciclo celular. Sin embargo, este aumento en la expresión sólo se observa a las 12 h post-exposición sugiriendo que en este contexto celular se activa para contrarrestar el estrés oxidativo de manera muy temprana. En cambio, cuando se observa su comportamiento en un contexto  $p53^{-/-}$  (H1299), se puede apreciar que sucede todo lo contrario, es decir, se expresa de manera importante a tiempos tardíos post-exposición, a pesar de que el aumento de ROS se produce de manera muy marcada desde las 6 h de tratamiento con arsénico, y este aumento se da cuando las células sufren, aparentemente, apoptosis. Estos resultados sugieren que la activación de SESN2 puede ser o no dependiente de p53, ya que en ambos contextos celulares se observa su expresión, aunque de manera diferencial en cuanto al momento en el que empiezan a subir sus niveles, lo que si podríamos sugerir es que en un contexto  $p53^{+/+}$  se promueve su expresión temprana para una rápida respuesta ante el estrés oxidativo, y en el contexto  $p53^{-/-}$  su expresión podría estar encaminada a activar mecanismos anti-apoptóticos. Lo anterior podía estar soportado por las observaciones realizadas por Saha et al. (2013) [116] quienes refieren que SESN2 integra una vía de señalización formada por SESN2-AKT-mTOR para proteger a las células contra la muerte celular inducida por estrés energético. Además, la regulación generada por SESN2 como antioxidante o como anti-apoptótico, sea o no dependiente de p53 se ha observado en múltiples modelos celulares y se ha relacionado con varios procesos patológicos [90,117,118].

Basado en nuestras observaciones se puede asegurar que entre las respuestas antioxidantes que la célula expuesta al arsénico pone en marcha se encuentran aquellos procesos regulados por p53 que brindan una reacción más rápida y temprana en contra del estrés, los cuales, además, podrían favorecer procesos anti-apoptóticos, ya que en un contexto celular con  $p53^{+/+}$  en el que la actividad de regulador transcripcional se mantiene funcional hay un menor porcentaje de células en la fase subG1; estas respuestas estarían siendo activadas por la expresión de los genes TIGAR, SESN1 y SESN2. Finalmente, esto significaría que p53 activa un mecanismo para disminuir los niveles de ROS, que implica la expresión de los genes antes mencionados, relacionado a la función p53 bien conocida en la

activación de vías que generan la detención de la fase S observada en los primeros tiempos de tratamiento con arsénico.

Como ya se ha mencionado, p53 es un importante regulador de la progresión a través del ciclo celular participando en varios puntos de control. p53 está involucrado en el arresto del ciclo celular en G1, a la entrada de G2 y en la fase tardía de G2. El arresto de la fase G1 es activado principalmente por daño al DNA y en él participan p53 regulando a factores como el inhibidor de cdk p21 [119,120]. En el caso del arresto en las fase G2 y G2 tardía, se consigue cuando se activan las vías ATM/ATR-Chk2/1-p53 [121,122].

En este sentido comenzamos evaluando genes implicados en la regulación del punto de control G2, debido a que reportes previos han implicado la participación de la proteína p21 en este punto de control [93,121], además como se mencionó en la sección de antecedentes, Rivera González [83] encontró que el arsénico modifica la expresión del gen p21.

Entre los blancos de p21 (que a su vez dependen de la regulación a través de p53) en la participación de un arresto de la fase G2 están las proteínas 14-3-3 $\sigma$  y GADD45, ambas involucradas en el bloqueo de la actividad del complejo Cdc2/CiclinaB1 [121], principalmente inhibiendo su fosforilación y posterior activación o impidiendo que el complejo se trasloque a núcleo para estimular la transcripción de genes responsivos.

Nuestros resultados muestran que estos dos genes, no presentan cambios en su perfil de expresión cuando las células son sometidas al estrés generado por arsénico, lo que hasta cierto punto era esperado ya que en nuestro sistema no se aprecia ningún aumento de células en esta fase particular del ciclo celular. Sin embargo, es de destacar que hay numerosos reportes en los que se implica al arsénico como un generador de arresto en la fase G2/M del ciclo celular [72,76,77], fenómeno que no fue detectado en ninguna de las líneas celulares utilizadas, tanto p53<sup>+/+</sup> (MCF-7 y RKO) como p53<sup>-/-</sup> (H1299 ni RKO-E6).

Cuando las células están siendo dañadas por un estímulo (insulto) se activan factores que deciden si las células sufren una detención del crecimiento o apoptosis, por lo que las células pueden ser arrestadas, como ya se comento, en las fases G1 o G2, permitiendo reparar el daño antes de que el ciclo continúe. Uno de los factores importantes que pueden participar del arresto en estos puntos del ciclo celular, es la proteína p21. Esta proteína es considerada como un regulador negativo del ciclo celular y un factor anti-

apoptótico ya que se activa para arrestar el ciclo celular y favorecer que el daño al DNA sea reparado y así favorecer la viabilidad celular [65]. Teniendo en cuenta el aumento de células en la fase S del ciclo celular en respuesta a la exposición temprana al arsénico, y sabiendo que un participante de este fenómeno podría ser p21, se evaluó su expresión dependiente de p53 en la línea celular MCF-7, logrando observar que sus niveles de mRNA aumentan a tiempos cortos post-tratamiento, principalmente cuando las células se encuentran en mayor proporción en esta fase del ciclo celular. Además, también se comprobó que esta activación es dependiente de la unión de p53 al promotor de p21, como lo señala el estudio de ChIP. Estos resultados sugieren que las células expuestas a estrés, en este caso originado por el arsénico, responden activando a un regulador negativo de ciclo celular como lo es p21 para de esta forma generar una ventana de tiempo durante la cual se pueda reparar el daño al DNA ocasionado por el arsénico, y así evitar la muerte celular. Esto no se consigue del todo, ya que a tiempos largos post-exposición comienza un incremento gradual en el número de células observadas en la fase subG1, coincidiendo con la disminución de p21 a tiempos tardíos de tratamiento. Por último, cabe mencionar que p21 participa principalmente en la transición G1-S por lo que no explicaría del todo la detención en la fase S.

Sin embargo, aunque su participación directa en el arresto de la fase S podría no ser crucial (aunque faltaría demostrarlo eliminándolo del sistema) el aumento de su expresión podría estar implicada en su efecto protector sobre la viabilidad celular, en este sentido, podría estar inhibiendo a factores pro-apoptóticos.

Uno de los factores pro-apoptóticos que se encienden de manera rápida ante situaciones de estrés severo generador de genotoxicidad es la proteína Killina [94], la cual fue identificada durante una búsqueda de blancos transcripcionales de p53. La unión de Killina al DNA puede reprimir su síntesis y de esta manera generar un arresto de la fase S del ciclo celular, por lo que se considera que esta proteína es suficiente y necesaria para disparar el arresto del ciclo celular y la subsecuente apoptosis [93]. Con esto en cuenta, se determinaron los niveles de expresión de Killina cuando las células MCF-7 (p53<sup>+/+</sup>) fueron sometidas al estrés generado por el arsénico. Interesantemente, se apreció un aumento rápido de la expresión de este gen ya que sus mayores niveles se producen apenas a las 6 h post-tratamiento que paulatinamente van disminuyendo conforme avanza el tiempo de

exposición. Este incremento de expresión está regulado directamente por la unión de p53 al promotor de Killina que fue confirmado mediante ChIP y cuya interacción solo se lleva a cabo a las 6 h de tratamiento. Esta respuesta pro-apoptótica se dispara de manera rápida en respuesta al estrés generado por el arsénico, y se podría ver reflejado en la detención del ciclo celular en su fase S en células MCF-7 dependiente de p53 que, en este caso, integraría los eventos para llevar a muerte celular, como son la inhibición de la síntesis de DNA [93].

Este mecanismo favorece la muerte celular y es dependiente de p53, sin embargo, los niveles de Killina no permanecen elevados después de las 6 h post-exposición al arsénico sugiriendo que se activan factores que bloquean la actividad de Killina permitiendo que las células intenten reparar el daño al DNA y continúen el ciclo celular. En este sentido, p21 con sus efectos anti-apoptóticos podría apartar a las células de la inhibición de la síntesis de DNA dependiente de Killina; al respecto, hay evidencias que indican que las células deficientes en p21 son más sensibles a la apoptosis inducida por Killina activada por p53 [93].

En conjunto, nuestros resultados sugieren que se ve favorecido un efecto anti-apoptótico generado por la elevación de p21 por un espacio de tiempo más prolongado en comparación con el tiempo corto observado con Killina, ambos dependientes de p53. Sin embargo, es evidente que es necesario detectar no solo los niveles de mRNA de estos dos genes, sino los niveles de proteína ya que su cantidad, localización o permanencia durante todo el tratamiento con arsénico nos aclararían el panorama y nos permitirían generar conclusiones más sólidas con respecto a esta posible regulación, ya que a tiempos largos de tratamiento sí se observa un aumento en el número de células en la fase subG1, favorecido, posiblemente, por la actividad pro-apoptótica de Killina.

Al continuar en la búsqueda de un mecanismo que pudiera explicar el de arresto de la fase S del ciclo celular en respuesta al estrés generado por el arsénico, estudiamos otro regulador del punto de control de la fase S bien caracterizado y es el mediado por la fosforilación y degradación proteosomal de la fosfatasa de especificidad dual CDC25A [95–97]. Cuando CDC25A se encuentra activado, elimina los fosfatos inhibidores del complejo CDK2/ciclinaE permitiendo a esta cinasa mediar el reclutamiento del factor de replicación Cdc45 al origen de replicación esencial para llevar a cabo la síntesis de DNA [95,98]; cuando se pasa el punto de control de la fase S, CDC25A se degrada rápidamente

[95,97]. Teniendo en cuenta el aumento de células en la fase S a tiempos tempranos de exposición al arsénico observado en nuestros ensayos, así como en otros reportes [77], se evaluó el efecto del tratamiento de arsénico sobre la expresión CDC25A y sus mecanismos de regulación. Las células MCF-7 expuestas al arsénico presentaron una disminución gradual en sus niveles de mRNA de CDC25A, encontrándose significativamente bajos después de 12 a 24 h de exposición (aproximadamente 50%), momentos cuando las células expuestas se acumulan en la fase S del ciclo celular. De acuerdo con estos resultados, Yih et al. [66] reportaron cambios en la expresión del gen CDC25A a partir de un microarreglo de cDNA en fibroblastos humanos en respuesta al tratamiento con arsenito de sodio; además, Lehmann et al. [84] reportó que existe correlación entre la progresión lenta a través de la fase S del ciclo celular y un nivel bajo de expresión génica de CDC25A en respuesta a la exposición al arsénico. Sin embargo, el efecto ocasionado al ciclo celular por la disminución en la expresión de CDC25A no se relaciona de manera directa con la regulación transcripcional de p53.

Existen reportes que señalan a p53 como un regulador negativo de la expresión del gen CDC25A [99], incluso cuando su promotor no contiene secuencias consenso para la unión lo que sugiere un mecanismo de regulación indirecto mediado por p53. El análisis *in silico* del promotor de CDC25A indica que contiene sitios de unión para diferentes factores de transcripción, varios de ellos regulados por p53 [100]. Uno de esos sitios en su promotor es el sitio CRE, generalmente reconocido por una variedad de miembros de la familia CREB/ATF. Uno de los miembros de la familia CREB/ATF es el factor activador de la transcripción 3 (ATF3) que es un gen inducible cuyo nivel de mRNA aumenta de manera importante ante la exposición celular a una variedad de señales generadoras de estrés, incluyendo peróxido de hidrógeno y agentes genotóxicos [101], además, es un blanco transcripcional directo y bien estudiado de p53 [102]. En concordancia, nuestros resultados indican que el medio ambiente intracelular pro-oxidante generado por exposición al arsénico, induce la unión de p53 al promotor de ATF3 y en consecuencia aumenta de manera importante su nivel de expresión justo cuando existe un aumento en el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular. Este aumento es dependiente de la actividad transcripcional de p53 ya que cuando se inhibe a este factor con el reactivo pifitrina  $\alpha$ , ATF3 no se expresa en igual proporción; aunado a esto, cuando se elimina el ambiente

oxidante mediante la enzima catalasa, no se genera un incremento significativo de ATF3, demostrando que su expresión es dependiente de un ambiente generador de estrés y regulado por p53.

El nivel elevado de expresión relativa de mRNA de ATF3 conduce a su activación como factor de transcripción, uniéndose a los sitios CRE en sus genes blanco, tales como CDC25A, donde induce la disminución en su nivel de mRNA durante tiempos tempranos posteriores a la exposición y que depende indirectamente de p53. Esta observación se ve reforzada cuando las células MCF-7 fueron cotratadas con arsénico y pifitrina evidenciando que no existe esta disminución en la expresión de CDC25A y por lo tanto no se produce el arresto del ciclo celular; aunado a esto, al eliminar el ambiente oxidante mediante el uso de la enzima catalasa tampoco se disminuye su expresión. Este mecanismo también ha sido reportado como una respuesta al daño del DNA donde la función de CDC25A es bloqueada por la represión transcripcional inducida por ATF3 [100] y debido a esto, siendo también regulado indirectamente por p53.

Tomando en conjunto estos resultados se sugiere que la detención de la fase S inducida por la exposición al arsénico, es dependiente de la función de p53 que promueve la expresión de factores de transcripción (ATF3) que regulan la expresión y, probablemente, la actividad de CDC25A, ya que en un contexto celular  $p53^{-/-}$  o inhibiendo la función transcripcional de p53 (pifitrina  $\alpha$ ) no se produce ni el arresto en la fase S del ciclo celular ni la disminución o control adecuado de ROS.

En la figura 32 se observan los principales hallazgos de este trabajo, donde se puede apreciar que las células dependen de la capacidad de activador transcripcional de p53 para controlar la cantidad de ROS producidos por la exposición al arsénico mediante la regulación directa de SESN1 y como se induce el arresto de la fase S del ciclo celular, que depende de la activación de la vía p53-ATF3-CDC25A.

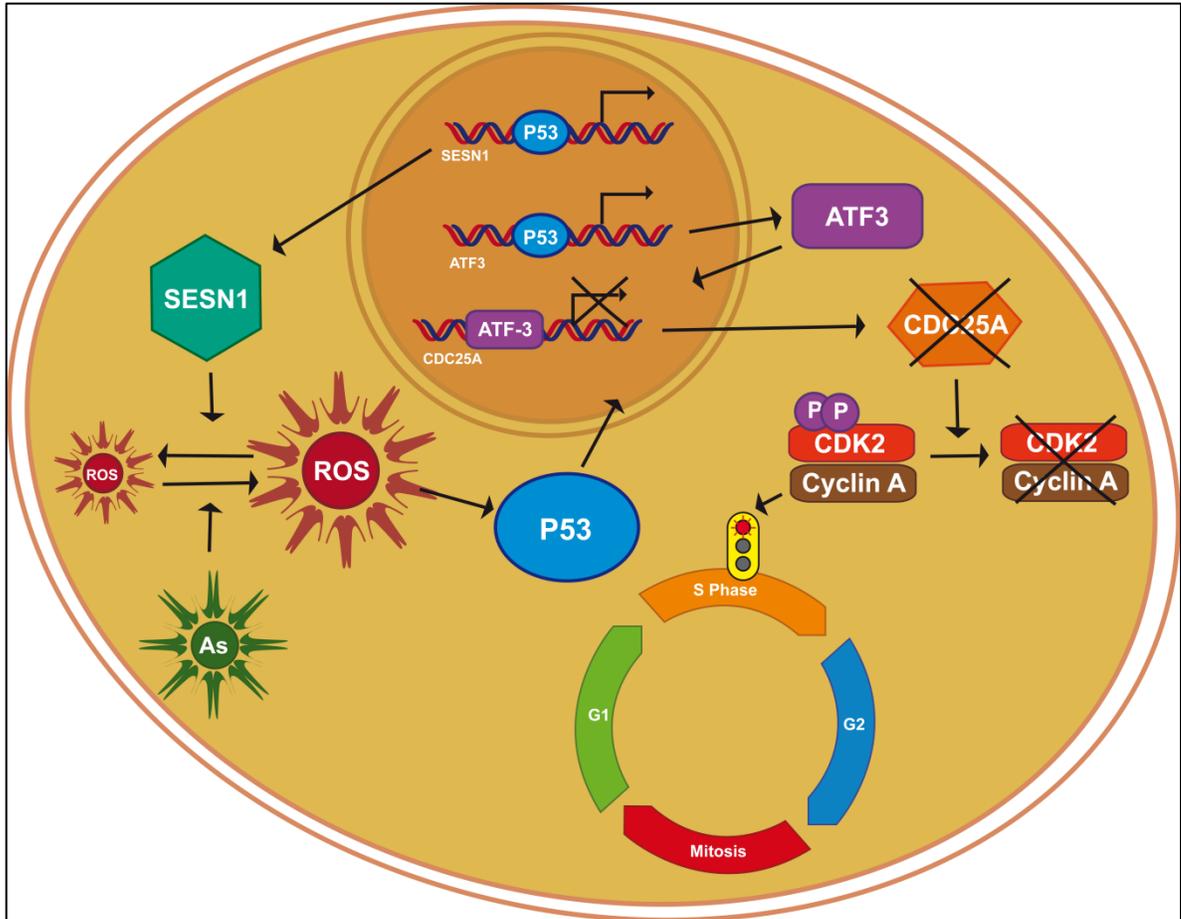


FIGURA 32. Mecanismo general de la respuesta celular a la exposición al arsénico dependiente de p53. Las células  $p53^{+/+}$  responden al estrés oxidativo causado por el arsénico mediante dos vías: 1) se activan mecanismos para contrarrestar el efecto causado por el aumento de ROS; en este sentido, p53 activa directamente la expresión de SESN1 favoreciendo la disminución de ROS y 2) para tratar de reparar el daño al DNA generado por el estrés oxidativo, p53 dirige la generación del arresto en la fase S del ciclo celular dependiente de su activación directa sobre ATF3, quién a su vez regula negativamente la expresión de CDC25A mediante su unión al promotor de esta fosfatasa. La disminución del nivel de CDC25A reduce la desfosforilación del complejo ciclinaA/CDK2 lo que ocasiona el arresto de la fase S.

En resumen, proponemos que el mecanismo por el cual el arsénico induce a las células MCF-7 a frenar la proliferación y el progreso del ciclo celular con el arresto en la fase S, está vinculado con la producción temprana de ROS que a su vez estimula la actividad de regulador transcripcional de p53, generando la vía de regulación p53-ATF3-CDC25A en respuesta al arsénico.

## 10. CONCLUSIONES

- La proteína p53 es indispensable para producir el arresto en la fase S del ciclo celular en respuesta a las especies reactivas de oxígeno generadas por NaAsO<sub>2</sub>.

- Se demostró que la presencia de NaAsO<sub>2</sub> lleva a la activación transcripcional de los genes responsivos a p53, TIGAR y Sestrina 1 (directamente) y Sestrina 2 (indirectamente), para prevenir el aumento de las especies reactivas de oxígeno.

- La función de activador transcripcional de p53 es indispensable para regular la expresión de genes responsables del arresto de la fase S del ciclo celular, Killin, p21, ATF3 y CDC25A, en respuesta al NaAsO<sub>2</sub>.

- El arresto en la fase S del ciclo celular en respuesta al NaAsO<sub>2</sub> es particularmente generado a través de la vía p53-ATF3-CDC25A.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- [2] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed., Oxford University Press., 1999.
- [3] T.P. Cash, Y. Pan, M.C. Simon, Reactive Oxygen Species and Cellular Oxygen Sensing, *Free Radic Biol Med.* 43 (2007) 1219–1225. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.001.
- [4] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- [5] W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function., *Physiol. Rev.* 82 (2002) 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
- [6] I. Dalle-Donne, Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease, *Clin. Chem.* 52 (2006) 601–623. doi:10.1373/clinchem.2005.061408.
- [7] P.T. Schumacker, Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword, *Cancer Cell.* 10 (2006) 175–176. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.015.
- [8] J.-S. Pan, M.-Z. Hong, J.-L. Ren, Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis., *World J. Gastroenterol.* 15 (2009) 1702–1707. doi:10.3748/wjg.15.1702.
- [9] H. Shi, X. Shi, K.J. Liu, Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis, *Mol. Cell. Biochem.* 255 (2004) 67–78. doi:10.1023/B:MCBI.0000007262.26044.e8.
- [10] M. Dizdaroglu, Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease, *Cancer Lett.* 327 (2012) 26–47. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.016.
- [11] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, (2004) 37–56. <http://centaur.reading.ac.uk/12909/>.
- [12] S. Kwiecien, K. Jasnós, M. Magierowski, Z. Sliwowski, R. Pajdo, P. Jagiellonian, LIPID PEROXIDATION , REACTIVE OXYGEN SPECIES AND ANTIOXIDATIVE FACTORS IN THE PATHOGENESIS OF GASTRIC MUCOSAL LESIONS AND MECHANISM OF PROTECTION AGAINST OXIDATIVE STRESS - INDUCED GASTRIC INJURY, *Journal Physiol. Pharmacol.* (2014) 613–622.
- [13] J. Dreves, M. Medinger, C. Schmidt-Gersbach, R. Weber, C. Unger, Receptor tyrosine kinases: The main targets for new anticancer therapy, *Curr. Drug Targets.* 4 (2003) 113–121.
- [14] B. Palmieri, V. Sblendorio, Oxidative stress detection: what for? Part II., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 11 (2007) 27–54.
- [15] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell.* 144 (2011) 646–674.
- [16] C.C. Woo, A.P. Kumar, G. Sethi, K.H.B. Tan, Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer, *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 443–451. doi:10.1016/j.bcp.2011.09.029.

- [17] H.N. Siti, K. Yusof, J. Kamsiah, The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review), *Vascul. Pharmacol.* (2015). doi:10.1016/j.vph.2015.03.005.
- [18] M. Hristova, M. Penev, Oxidative Stress and Cardiovascular Diseases, *Trakia J. Sci.* 12 (2014) 296–303. doi:10.15547/tjs.2014.03.012.
- [19] K. Bauerová, A. Bezek, Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis, *Gen. Physiol. Biophys.* 18 (1999) 15–20.
- [20] D.M. Niedowicz, D.L. Daleke, The role of oxidative stress in diabetic complications., *Cell Biochem. Biophys.* 43 (2005) 289–330. doi:10.1385/CBB:43:2:289.
- [21] D. a Butterfield, a Castegna, C.M. Lauderback, J. Drake, Evidence that amyloid b-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer’s disease brain contribute to neuronal death, *Neurobiol Aging.* 23 (2002) 655–664.
- [22] S.R. Arancibia, Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia?, *Arch Neurocién.* 12 (2007) 45–54.
- [23] J.K. Andersen, Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?, *Nat. Med.* 10 Suppl (2004) S18–S25. doi:10.1038/nrn1434.
- [24] K.S. Kasprzak, Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis<sup>1,3</sup> 1This article is part of a series of reviews on “Oxidative DNA Damage and Repair.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. 3Guest Editor: Miral D, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 958–967. doi:10.1016/S0891-5849(02)00809-2.
- [25] W.H. Miller, H.M. Schipper, J.S. Lee, J. Singer, S. Waxman, Mechanisms of Action of Arsenic Trioxide Mechanisms of Action of Arsenic Trioxide 1, (2002) 3893–3903.
- [26] H.-J. Sun, B. Rathinasabapathi, B. Wu, J. Luo, L.-P. Pu, L.Q. Ma, Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans., *Environ. Int.* 69 (2014) 148–58. doi:10.1016/j.envint.2014.04.019.
- [27] S. Tapio, B. Grosche, Arsenic in the aetiology of cancer, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 612 (2006) 215–246. doi:10.1016/j.mrrev.2006.02.001.
- [28] S. Zhao, J. Zhang, X. Zhang, X. Dong, X. Sun, Arsenic trioxide induces different gene expression profiles of genes related to growth and apoptosis in glioma cells dependent on the p53 status, *Mol. Biol. Rep.* 35 (2008) 421–429. doi:10.1007/s11033-007-9102-6.
- [29] S. Pazzaglia, M. Mancuso, B. Primerano, S. Rebessi, G. Biozzi, V. Covelli, et al., Genetic events associated with arsenic-induced malignant transformation: Applications of cDNA microarray technology, *Mol. Carcinog.* 30 (2001) 79–87. doi:10.1002/1098-2744(200102)30:2<79::AID-MC1016>3.0.CO;2-F.
- [30] W. Wen, J. Wen, L. Lu, H. Liu, J. Yang, H. Cheng, et al., Metabolites of arsenic and increased DNA damage of p53 gene in arsenic plant workers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254 (2011) 41–47. doi:10.1016/j.taap.2011.04.013.
- [31] F. Chen, X. Shi, Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 105–121. doi:10.1016/S1040-8428(01)00211-6.
- [32] S.M. Cohen, L.L. Arnold, M. Eldan, A.S. Lewis, B.D. Beck, Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment., *Crit. Rev. Toxicol.* 36 (2006) 99–133. doi:Doi 10.1080/10408440500534230.

- [33] C.D. Kozul, K.H. Ely, R.I. Enelow, J.W. Hamilton, Low-dose arsenic compromises the immune response to influenza A infection in vivo, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 1441–1447. doi:10.1289/ehp.0900911.
- [34] M.F. Hughes, B.D. Beck, Y. Chen, A.S. Lewis, D.J. Thomas, Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective, *Toxicol. Sci.* 123 (2011) 305–332. doi:10.1093/toxsci/kfr184.
- [35] A. De Vizcaya-Ruiz, O. Barbier, R. Ruiz-Ramos, M.E. Cebrian, Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic., *Mutat. Res.* 674 (2009) 85–92. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.020.
- [36] A. Navas-Acien, E.K. Silbergeld, R. Pastor-Barriuso, E. Guallar, Arsenic exposure and prevalence of type 2 diabetes in US adults., *JAMA.* 300 (2008) 814–822. doi:10.1001/jama.300.7.814.
- [37] S.J.S. Flora, Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 257–281. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.008.
- [38] F. Liu, and, K.-Y. Jan, DNA Damage in Arsenite- and Cadmium-Treated Bovine Aortic Endothelial Cells, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 55–63. doi:10.1016/j.jemermed.2014.06.025.
- [39] M.J. Hosseini, F. Shaki, M. Ghazi-Khansari, J. Pourahmad, Toxicity of arsenic (III) on isolated liver mitochondria: A new mechanistic approach, *Iran. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 119–136.
- [40] S. Maiti, A.K. Chatterjee, Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency, *Arch. Toxicol.* 75 (2001) 531–537. doi:10.1007/s002040100240.
- [41] M. Yunus, N. Sohel, S.K. Hore, M. Rahman, Arsenic exposure and adverse health effects: A review of recent findings from arsenic and health studies in Matlab, Bangladesh, *Kaohsiung J. Med. Sci.* 27 (2011) 371–376. doi:10.1016/j.kjms.2011.05.012.
- [42] B. Némethi, M.E. Anderson, Z. Gregus, Glutathione synthetase promotes the reduction of arsenate via arsenolysis of glutathione, *Biochimie.* 94 (2012) 1327–1333. doi:10.1016/j.biochi.2012.02.033.
- [43] J.F. Reichard, A. Puga, Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation, *Epigenomics.* 2 (2010) 87–104. doi:10.2217/epi.09.45.Effects.
- [44] C.Q. Zhao, M.R. Young, B. a Diwan, T.P. Coogan, M.P. Waalkes, Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 10907–10912. doi:10.1073/pnas.94.20.10907.
- [45] C. Huang, Q. Ke, M. Costa, X. Shi, Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis, *Mol. Cell. Biochem.* 255 (2004) 57–66. doi:10.1023/B:MCBI.0000007261.04684.78.
- [46] H. Wanibuchi, E.I. Salim, A. Kinoshita, J. Shen, M. Wei, K. Morimura, et al., Understanding arsenic carcinogenicity by the use of animal models, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198 (2004) 366–376. doi:10.1016/j.taap.2003.10.032.
- [47] P. Ramirez, L.M. Del Razo, M.C. Gutierrez-Ruiz, M.E. Gonshebb, Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line., *Carcinogenesis.* 21 (2000) 701–706.
- [48] Y. An, Z. Gao, Z. Wang, S. Yang, J. Liang, Y. Feng, et al., Immunohistochemical analysis of oxidative DNA damage in arsenic-related human skin samples from

- arsenic-contaminated area of China, *Cancer Lett.* 214 (2004) 11–18.  
doi:10.1016/j.canlet.2004.04.005.
- [49] K. Yamanaka, F. Takabayashi, M. Mizoi, Y. An, a Hasegawa, S. Okada, Oral exposure of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in mice leads to an increase in 8-Oxo-2'-deoxyguanosine level, specifically in the target organs for arsenic carcinogenesis., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287 (2001) 66–70. doi:10.1006/bbrc.2001.5551.
- [50] W.C. Burhans, N.H. Heintz, The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 1282–1293.  
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.026.
- [51] F.Q. Schafer, G.R. Buettner, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1191–1212. doi:10.1016/S0891-5849(01)00480-4.
- [52] B. Liu, Y. Chen, D.K. St. Clair, ROS and p53: A versatile partnership, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 1529–1535. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.011.
- [53] D.R. Green, G. Kroemer, Cytoplasmic functions of the tumor suppressor p53, *Nature.* 458 (2009) 1127. doi:10.1038/nature07986.Cytoplasmic.
- [54] D. a. Liebermann, B. Hoffman, D. Vesely, P53 Induced Growth Arrest Versus Apoptosis and Its Modulation By Survival Cytokines, *Cell Cycle.* 6 (2007) 166–170. doi:10.4161/cc.6.2.3789.
- [55] A. a Sablina, A. V Budanov, G. V Ilyinskaya, L.S. Agapova, J.E. Kravchenko, P.M. Chumakov, The antioxidant function of the p53 tumor suppressor., *Nat. Med.* 11 (2005) 1306–1313. doi:10.1038/nm1320.
- [56] A. V Budanov, A.A. Sablina, E. Feinstein, E. V Koonin, P.M. Chumakov, Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD., *Science.* 304 (2004) 596–600. doi:10.1126/science.1095569.
- [57] K. Bensaad, A. Tsuruta, M. a. Selak, M.N.C. Vidal, K. Nakano, R. Bartrons, et al., TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis, *Cell.* 126 (2006) 107–120. doi:10.1016/j.cell.2006.05.036.
- [58] K. Bensaad, E.C. Cheung, K.H. Vousden, Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy., *EMBO J.* 28 (2009) 3015–3026.  
doi:10.1038/emboj.2009.242.
- [59] A. Parmigiani, A. Nourbakhsh, B. Ding, W. Wang, Y.C. Kim, K. Akopiants, et al., Sestrins Inhibit mTORC1 Kinase Activation through the GATOR Complex, *Cell Rep.* 9 (2014) 1281–1291. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.019.
- [60] C. Borrás, M.C. Gómez-Cabrera, J. Viña, The dual role of p53: DNA protection and antioxidant., *Free Radic. Res.* 45 (2011) 643–652.  
doi:10.3109/10715762.2011.571685.
- [61] M.F. Hughes, Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicol. Lett.* 133 (2002) 1–16.
- [62] H. Ahsan, Y. Chen, F. Parvez, L. Zablotska, M. Argos, I. Hussain, et al., Arsenic exposure from drinking water and risk of premalignant skin lesions in Bangladesh: Baseline results from the health effects of arsenic longitudinal study, *Am. J. Epidemiol.* 163 (2006) 1138–1148. doi:10.1093/aje/kwj154.
- [63] R. Chowdhury, R. Chatterjee, A.K. Giri, C. Mandal, K. Chaudhuri, Arsenic-induced cell proliferation is associated with enhanced ROS generation, Erk signaling and

- CyclinA expression, *Toxicol. Lett.* 198 (2010) 263–271.  
doi:10.1016/j.toxlet.2010.07.006.
- [64] H.K. Hamadeh, K.J. Trouba, R.P. Amin, C. a. Afshari, D. Germolec, Coordination of altered DNA repair and damage pathways in arsenite-exposed keratinocytes, *Toxicol. Sci.* 69 (2002) 306–316. doi:10.1093/toxsci/69.2.306.
- [65] T. Abbas, A. Dutta, P21 in *Cancer: Intricate Networks and Multiple Activities.*, *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 400–414. doi:10.1038/nrc2657.
- [66] L.-H. Yih, K. Peck, T.-C. Lee, Changes in gene expression profiles of human fibroblasts in response to sodium arsenite treatment., *Carcinogenesis.* 23 (2002) 867–876.
- [67] B. Vogelstein, D. Lane, a J. Levine, Surfing the p53 network., *Nature.* 408 (2000) 307–310. doi:10.1038/35042675.
- [68] Y. Huang, J. Zhang, K.T. Mchenry, M.M. Kim, W. Zeng, C.C. Dibble, et al., Induction of Cytoplasmic Accumulation of p53: A Mechanism for Low Levels of Arsenic Exposure to Predispose Cells for Malignant Transformation, *Cancer Res.* 68 (2008) 9131–9136. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3025.Induction.
- [69] H.K. Hamadeh, M. Vargas, E. Lee, D.B. Menzel, Arsenic disrupts cellular levels of p53 and mdm2: a potential mechanism of carcinogenesis., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263 (1999) 446–449. doi:10.1006/bbrc.1999.1395.
- [70] S. Lin, W.R. Cullen, D.J. Thomas, Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 924–930. doi:10.1021/tx9900775.
- [71] W. Yan, Y. Zhang, J. Zhang, S. Liu, S.J. Cho, X. Chen, Mutant p53 protein is targeted by arsenic for degradation and plays a role in arsenic-mediated growth suppression, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17478–17486. doi:10.1074/jbc.M111.231639.
- [72] Y. Li, X. Qu, J. Qu, Y. Zhang, J. Liu, Y. Teng, et al., Arsenic trioxide induces apoptosis and G2/M phase arrest by inducing Cbl to inhibit PI3K/Akt signaling and thereby regulate p53 activation, *Cancer Lett.* 284 (2009) 208–215. doi:10.1016/j.canlet.2009.04.035.
- [73] Y.C. Wu, W.Y. Yen, L.H. Yih, Requirement of a functional spindle checkpoint for arsenite-induced apoptosis, *J. Cell. Biochem.* 105 (2008) 678–687. doi:10.1002/jcb.21861.
- [74] W.H. Park, J.G. Seol, E.S. Kim, K. Inhibitor, J.M. Hyun, C.W. Jung, et al., Arsenic Trioxide-mediated Growth Inhibition in MC / CAR Myeloma Cells via Cell Cycle Arrest in Association with Induction of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor , p21 , and Apoptosis Arsenic Trioxide-mediated Growth Inhibition in MC / CAR Myeloma Cells via, *Cancer Res.* 60 (2000) 3065–3071.
- [75] X. Wu, J. Shi, Y. Wu, Y. Tao, J. Hou, X. Meng, et al., Arsenic trioxide-mediated growth inhibition of myeloma cells is associated with an extrinsic or intrinsic signaling pathway through activation of TRAIL or TRAIL receptor 2, *Cancer Biol. Ther.* 10 (2010) 1201–1214. doi:10.4161/cbt.10.11.13669.
- [76] Q. Liu, S. Hilsenbeck, Y. Gazitt, Arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloma cells: p53-dependent g1 or g2/M cell cycle arrest, activation of caspase-8 or caspase-9, and synergy with APO2/TRAIL, *Blood.* 101 (2003) 4078–4087. doi:10.1182/blood-2002-10-3231.
- [77] G. McCollum, P.C. Keng, J.C. States, M.J. McCabe, Arsenite delays progression through each cell cycle phase and induces apoptosis following G2/M arrest in U937

- myeloid leukemia cells., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313 (2005) 877–887. doi:10.1124/jpet.104.080713.
- [78] Y. Jing, J. Dai, R.M. Chalmers-Redman, W.G. Tatton, S. Waxman, Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway., *Blood.* 94 (1999) 2102–2111.
- [79] X. Yu, J.F. Robinson, E. Gribble, S.W. Hong, J.S. Sidhu, E.M. Faustman, Gene expression profiling analysis reveals arsenic-induced cell cycle arrest and apoptosis in p53-proficient and p53-deficient cells through differential gene pathways, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233 (2008) 389–403. doi:10.1016/j.taap.2008.09.016.
- [80] J. Bundschuh, M.I. Litter, F. Parvez, G. Román-Ross, H.B. Nicolli, J.S. Jean, et al., One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries, *Sci. Total Environ.* 429 (2012) 2–35. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.06.024.
- [81] H.A. and F.P. Tyler R. McClintock, Yu Chen, Jochen Bundschuh, John T. Oliver, Julio Navoni, Valentina Olmos, Edda Villaamil Lepori, Arsenic Exposure in Latin America: Biomarkers, Risk Assessments and Related Health Effects, *Sci Total Environment.* 429 (2012) 76–91. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.08.051.
- [82] a. Hernández-Zavala, E. Córdova, L.M. Del Razo, M.E. Cebrián, E. Garrido, Effects of arsenite on cell cycle progression in a human bladder cancer cell line, *Toxicology.* 207 (2005) 49–57. doi:10.1016/j.tox.2004.08.013.
- [83] G.C. Rivera González, ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LA RUTA P53-P21 EN LA RESPUESTA CELULAR A ARSENITO DE SODIO (NaAsO<sub>2</sub>), CINVESTAV-IPN, 2008.
- [84] G.M. Lehmann, M.J. McCabe, Arsenite slows S phase progression via inhibition of cdc25A dual specificity phosphatase gene transcription, *Toxicol. Sci.* 99 (2007) 70–78. doi:10.1093/toxsci/kfm142.
- [85] R. Ruiz-Ramos, L. López-Carrillo, A. Albores, R.U. Hernández-Ramírez, M.E. Cebrian, Sodium arsenite alters cell cycle and MTHFR, MT1/2, and c-Myc protein levels in MCF-7 cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241 (2009) 269–274. doi:10.1016/j.taap.2009.09.006.
- [86] R. Ruiz-Ramos, L. Lopez-Carrillo, A.D. Rios-Perez, A. De Vizcaya-Ruiz, M.E. Cebrian, Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-κB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 674 (2009) 109–115. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.021.
- [87] T.D. Kesis, R.J. Slebos, W.G. Nelson, M.B. Kastan, B.S. Plunkett, S.M. Han, et al., Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 3988–3992.
- [88] R.R. Leker, M. Aharonowiz, N.H. Greig, H. Ovadia, The role of p53-induced apoptosis in cerebral ischemia: Effects of the p53 inhibitor pifithrin ??, *Exp. Neurol.* 187 (2004) 478–486. doi:10.1016/j.expneurol.2004.01.030.
- [89] K.H. Vousden, D.P. Lane, P53 in Health and Disease., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 275–283. doi:10.1038/nrm2147.
- [90] J.H. Lee, A. V. Budanov, M. Karin, Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging, *Cell Metab.* 18 (2013) 792–801. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.018.

- [91] A. V Budanov, T. Shoshani, A. Faerman, E. Zelin, I. Kamer, H. Kalinski, et al., Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability., *Oncogene*. 21 (2002) 6017–6031. doi:10.1038/sj.onc.1205877.
- [92] A. Sablina, A. V Budanov, G. V Ilyinskaya, S. Larissa, J.E. Kravchenko, P.M. Chumakov, The antioxidant function of the p53 tumor suppressor, *Nat Med*. 11 (2005) 1306–1313. doi:10.1038/nm1320.
- [93] Y.-J. Cho, P. Liang, Killin is a p53-regulated nuclear inhibitor of DNA synthesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 5396–5401. doi:10.1073/pnas.0705410105.
- [94] Y.-J. Cho, P. Liang, S-phase-coupled apoptosis in tumor suppression., *Cell. Mol. Life Sci*. 68 (2011) 1883–1896. doi:10.1007/s00018-011-0666-x.
- [95] L. Busino, M. Chiesa, G.F. Draetta, M. Donzelli, Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis., *Oncogene*. 23 (2004) 2050–2056. doi:10.1038/sj.onc.1207394.
- [96] N. Sagata, Molecular biology. Untangling checkpoints., *Science*. 298 (2002) 1905–1907. doi:10.1126/science.1079225.
- [97] H. Zhao, J.L. Watkins, H. Piwnica-Worms, Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 14795–14800. doi:10.1073/pnas.182557299.
- [98] M. Donzelli, G.F. Draetta, Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation., *EMBO Rep*. 4 (2003) 671–677. doi:10.1038/sj.embor.embor887.
- [99] K. Rother, R. Kirschner, K. Sanger, L. Bohlig, J. Mossner, K. Engeland, p53 downregulates expression of the G1/S cell cycle phosphatase Cdc25A., *Oncogene*. 26 (2007) 1949–1953. doi:10.1038/sj.onc.1209989.
- [100] A.R. Demidova, M.Y. Aau, L. Zhuang, Q. Yu, Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control, *J. Biol. Chem*. 284 (2009) 4132–4139. doi:10.1074/jbc.M808118200.
- [101] B.P. Chen, C.D. Wolfgang, T. Hai, Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10., *Mol. Cell. Biol*. 16 (1996) 1157–1168.
- [102] Y. Tanaka, A. Nakamura, M.S. Morioka, S. Inoue, M. Tamamori-Adachi, K. Yamada, et al., Systems analysis of ATF3 in stress response and cancer reveals opposing effects on pro-apoptotic genes in p53 pathway, *PLoS One*. 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0026848.
- [103] T.G. Rossman, Mechanism of arsenic carcinogenesis : an integrated approach, 533 (2003) 37–65. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.07.009.
- [104] Y. Jun-hao, Y. Xiao-mei, C. Chun-hua, H. Qin, Z. Jing, S. Xian-zhong, et al., Pifithrin- $\alpha$  reduces cerebral vasospasm by attenuating apoptosis of endothelial cells in a subarachnoid haemorrhage model of rat, *Chin Med J*. 121 (2008) 414–419.
- [105] X.-H. Lei, D. Zhao, Y.-L. Li, X.-F. Li, X. Sun, W.-Z. Du, et al., Pifithrin- $\alpha$  Enhances the Survival of Transplanted Neural Stem Cells in Stroke Rats by Inhibiting p53 Nuclear Translocation, *CNS Neurosci. Ther*. 19 (2013) 109–116. doi:10.1111/cns.12045.
- [106] I. Louria-Hayon, T. Grossman, R.V. Sionov, O. Alsheich, P.P. Pandolfi, Y. Haupt, The promyelocytic leukemia protein protects p53 from Mdm2-mediated inhibition

- and degradation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 33134–33141. doi:10.1074/jbc.M301264200.
- [107] A. Barchowsky, L.R. Klei, E.J. Dudek, H.M. Swartz, P.E. James, Stimulation of reactive oxygen, but not reactive nitrogen species, in vascular endothelial cells exposed to low levels of arsenite., *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1405–1412.
- [108] Y. Wang, Y. Xu, H. Wang, P. Xue, X. Li, B. Li, et al., Arsenic induces mitochondria-dependent apoptosis by reactive oxygen species generation rather than glutathione depletion in Chang human hepatocytes, *Arch. Toxicol.* 83 (2009) 899–908. doi:10.1007/s00204-009-0451-x.
- [109] F. Kircelli, C. Akay, Y. Gazitt, Arsenic trioxide induces p53-dependent apoptotic signals in myeloma cells with SiRNA-silenced p53: MAP kinase pathway is preferentially activated in cells expressing inactivated p53, *Int. J. Oncol.* 30 (2007) 993–1001.
- [110] J.L. Martindale, N.J. Holbrook, Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival, *J. Cell. Physiol.* 192 (2002) 1–15. doi:10.1002/jcp.10119.
- [111] K. Bensaad, K.H. Vousden, P53: New Roles in Metabolism, *Trends Cell Biol.* 17 (2007) 286–291. doi:10.1016/j.tcb.2007.04.004.
- [112] S. Velasco-Miguel, L. Buckbinder, P. Jean, L. Gelbert, R. Talbott, J. Laidlaw, et al., PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes., *Oncogene.* 18 (1999) 127–137. doi:10.1038/sj.onc.1202274.
- [113] D.R. Green, J.E. Chipuk, p53 and Metabolism: Inside the TIGAR, *Cell.* 126 (2006) 30–32. doi:10.1016/j.cell.2006.06.032.
- [114] N. Hay, p53 Strikes mTORC1 by Employing Sestrins, *Cell Metab.* 8 (2008) 184–185. doi:10.1016/j.cmet.2008.08.010.
- [115] A. V Budanov, Stress-Responsive Sestrins Link p53 with Redox Regulation and Mammalian Target of Rapamycin Signaling., *Antioxid. Redox Signal.* 15 (2011) 1679–1690. doi:10.1089/ars.2010.3530.
- [116] I. Ben-Sahra, B. Dirat, K. Laurent, a Puissant, P. Auberger, a Budanov, et al., Sestrin2 integrates Akt and mTOR signaling to protect cells against energetic stress-induced death, *Cell Death Differ.* 20 (2012) 611–619. doi:10.1038/cdd.2012.157.
- [117] J.H. Lee, A. V Budanov, S. Talukdar, E.J. Park, H. Li, H. Park, et al., Maintenance of metabolic homeostasis by Sestrin 2 and 3, *Cell Metab.* 16 (2013) 311–321. doi:10.1016/j.cmet.2012.08.004.Maintenance.
- [118] J.H. Lee, A. V Budanov, E.J. Park, R. Birse, T.E. Kim, A. Guy, et al., Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies, *Science (80-. ).* 327 (2010) 1223–1228. doi:10.1126/science.1182228.Sestrin.
- [119] J.W. Harper, G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S.J. Elledge, The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases., *Cell.* 75 (1993) 805–816. doi:10.1016/0092-8674(93)90499-G.
- [120] R. Hill, E. Bodzak, M.D. Blough, P.W.K. Lee, p53 binding to the p21 promoter is dependent on the nature of DNA damage, *Cell Cycle.* 7 (2008) 2535–2543. doi:10.4161/cc.7.16.6440.
- [121] W.R. Taylor, G.R. Stark, Regulation of the G2/M transition by p53., *Oncogene.* 20 (2001) 1803–1815. doi:10.1038/sj.onc.1204252.

- [122] R. Mirzayans, B. Andrais, A. Scott, D. Murray, New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: Implications for cancer therapy, *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012). doi:10.1155/2012/170325.

## **12. ANEXOS**

### **12.1 Artículo publicado**

- G. Pozo-Molina, A. Ponciano-Gómez, GC. Rivera-González, A. Hernández-Zavala, E. Garrido. Arsenic-induced S phase cell cycle lengthening is associated with ROS generation, p53 signaling and CDC25A expression. *Chem-Biol. Interact.* 238 (2015) 170-179.