

131

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

SENSIBILIDAD A LOS EFECTOS CITOTOXICOS DEL
ARSENITO DE SODIO EN CINCO GRUPOS DE
COMPLEMENTACION DE ANEMIA DE FANCONI

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA DEL ROCIO MONTES DE OCA RUIZ

289699

DIRECTOR DE TESIS: LIBB. DANIEL MENENDEZ RENDON

MEXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

T. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Responsabilidad a los efectos citotóxicos del arsenito de sodio en cinco grupos
de suplementación de Anemia de Fanconi"

Elaborado por María del Rocío Montes de Oca Ruiz

número de cuenta 9650423-1, pasante de la carrera de Biología

Este trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis LIBE. Daniel Menéndez Rendón
Propietario
Propietario Dra. Sara Frias Vázquez
Propietario M. en C. Bertha Molina Alvarez
Colaborante Dr. Emilio Rojas del Castillo
Colaborante Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejter

Daniel Menéndez Rendón
Sara Frias V.
Bertha Molina Alvarez
Emilio Rojas del Castillo
Martha Patricia Ostrosky Shejter

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz
Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

A mi yayo, Diego y Santiago

AGRADECIMIENTOS

A todas y cada una de la personas que estuvieron presentes a lo largo de este trabajo.

A mis compañeros y maestros tanto del laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental como del laboratorio de Citogenética, en especial a los miembros de mi jurado por sus enseñanzas y comentarios.

A todos mi amigos quienes han compartido los buenos y los malos ratos conmigo.

A mi familia por siempre estar ahí.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección del LIBB. Daniel Menéndez Rendón en cotutoría con la M. en C. Berta Molina Alvarez.

INDICE

Resumen	1
CAPITULO 1. Introducción	
<i>Arsénico</i>	
Fisicoquímica del arsénico	2
Distribución en el ambiente y vías de exposición al arsénico	3
Metabolismo del arsénico	5
Efectos, toxicología y mecanismos de carcinogénesis del arsénico	6
a) Genotoxicidad y carcinogenicidad	8
b) Mecanismos de acción	9
<i>Anemia de Fanconi</i>	
Características clínicas	12
a) Anormalidades hematológicas	12
b) Malignizaciones	13
c) Otras anormalidades clínicas	13
Fenotipo celular	14
a) Inestabilidad cromosómica espontánea	14
b) Sensibilidad a agentes formadores de enlaces cruzados	15
c) Mutabilidad	16
d) Sensibilidad al oxígeno	16
e) Linfocinas	17
f) Alteraciones en reparación	17
g) Características del ciclo celular	18
h) Apoptosis y p53	19
Defecto básico	20
Heterogeneidad genética	20
Grupos de complementación	21
<i>p53</i>	
Estructura del gen	25
Estructura de la proteína	26
Mutaciones en p53	28
Funciones de la proteína p53	29
Regulación de p53	31
Relación de la expresión de la proteína p53 y el ciclo celular	32

a) Regulación del punto de monitoreo G1/S	33
b) Regulación del punto de monitoreo G2/M	34
Apoptosis y p53	35
CAPITULO 2. Planteamiento del problema	40
CAPITULO 3. Objetivos e hipótesis	42
CAPITULO 4. Método	43
a) Cultivo de líneas celulares	43
b) Tratamiento con arsenito de sodio	43
c) Análisis de la citotoxicidad	44
d) Cuantificación de proteína por Western blot	45
e) Análisis estadístico	46
f) Análisis de resultados	46
CAPITULO 5. Resultados	48
a) Efectos citotóxicos del arsenito de sodio	48
b) Detección de la proteína p53 en las líneas linfoblastoides tratadas con arsenito de sodio	50
CAPITULO 6. Discusión	63
CAPITULO 7. Conclusiones	74
CAPITULO 8. Perspectivas	76
CAPITULO 9. Referencias	77
CAPITULO 10. Apéndice	85

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Aberraciones cromosómicas presentes en linfocitos de un paciente con anemia de Fanconi.	15
Figura 2.	Porcentaje de pacientes en los grupos de complementación de AF.	24
Figura 3.	Dominios funcionales y regiones de interacción de la proteína p53 humana.	27
Figura 4.	Mecanismo molecular del arresto en G1 y la apoptosis, dependientes de p53.	38
Figura 5.	Cascada génica de la regulación del ciclo celular y la apoptosis.	39
Figura 6.	Método utilizado.	47
Figura 7.	Células de anemia de Fanconi tratadas con diferentes concentraciones de arsenito de sodio durante 24 horas.	53
Figura 8.	Viabilidad celular de las diferentes líneas linfoblastoides.	54
Figura 9.	Expresión basal de la proteína p53 en las diferentes líneas linfoblastoides.	55
Figura 10.	Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide normal.	57
Figura 11.	Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide FA-A.	58
Figura 12.	Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide FA-B.	59
Figura 13.	Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide FA-C.	60
Figura 14.	Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide FA-D.	61
Figura 15.	Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide FA-E.	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Posibles alteraciones en los pacientes con anemia de Fanconi.	14
Tabla 2.	Correlación de las líneas linfoblastoides utilizadas y su grupo de complementación y/o fenotipo celular.	43
Tabla 3.	Viabilidad celular de seis líneas linfoblastoides, tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas, medida por el método de FDA/BrEt.	52
Tabla 4.	Expresión de la proteína p53 en seis líneas linfoblastoides, después de 24 horas de tratamiento con arsenito de sodio.	56

RESUMEN

El arsénico (As) es un contaminante ambiental considerado un carcinógeno humano. Existen evidencias de que inhibe algunos de los mecanismos de reparación, produce daño al DNA y retraso en la proliferación celular de linfocitos humanos, esto probablemente debido a la alteración de la polimerización y despolimerización de los microtúbulos, al daño en el DNA y a modificaciones en la expresión de genes reguladores del ciclo celular como p53, observándose en estos dos parámetros variación en la susceptibilidad individual. Siendo la anemia de Fanconi (AF) un síndrome de inestabilidad cromosómica que presenta respuestas específicas ante ciertos genotóxicos, deficiencias en la capacidad de reparación del daño al DNA, anormalidades en el ciclo celular y predisposición a cáncer, probablemente debido a la delección o inactivación de genes supresores de tumores, se usaron líneas linfoblastoides de cinco grupos de complementación de AF y una línea normal para evaluar la sensibilidad a los efectos del arsenito de sodio a través del análisis de la viabilidad celular por el método de diacetato de fluoresceína-bromuro de etidio y la inmunodetección de la proteína supresora de tumores p53 por Western blot, en cultivos celulares tratados con diferentes concentraciones de As, durante 24 horas.

Los resultados obtenidos indican que el arsénico tiene un efecto citotóxico sobre las distintas líneas linfoblastoides utilizadas disminuyendo la viabilidad de manera inversamente proporcional a la concentración utilizada. También se observó que este metaloide produce modificaciones en la expresión de la proteína p53 dependientes de la línea celular y de la dosis utilizada. Tras la evaluación de ambos parámetros se logró apreciar una sensibilidad diferencial entre las líneas utilizadas, de manera que algunas de ellas se presentan como más sensibles y otras como menos sensibles.

Estos resultados nos permiten proponer que el arsenito de sodio está causando un daño celular, presumiblemente actuando a diferentes niveles, en los cuales podrían encontrarse involucradas las proteínas de anemia de Fanconi tal vez de manera p53 dependiente.

ARSENICO

Los humanos han estado en contacto con los metales casi desde el principio de su existencia. De hecho, uno no podría imaginar la evolución humana sin considerar el importante papel que han jugado éstos en el desarrollo de la humanidad (Rojas, 1999).

Los metales y metaloides son introducidos al ambiente tanto de forma natural como de manera antropogénica. Estos elementos se encuentran prácticamente en todos los organismos vivos donde exhiben una gran cantidad de funciones biológicas. Son ingeridos diariamente por los humanos, a dosis no perjudiciales, como parte de la dieta y en algunos casos son importantes nutricionalmente, además usualmente se encuentran distribuidos en el aire, el suelo y el agua, uno de estos metaloides es el arsénico.

FISICOQUIMICA DEL ARSENICO

El arsénico (As) es un elemento ubicuo, se sitúa en la Tabla Periódica en el grupo 15 antiguamente llamado V bajo el nitrógeno y el fósforo, su número atómico es 33 y su peso atómico 74.9. Está clasificado como elemento de transición o metaloide debido a que comparte diversas propiedades físicas y químicas con elementos metálicos.

Es un elemento natural de color gris metálico, que se encuentra usualmente en la naturaleza combinado con otros elementos como oxígeno, cloro y azufre formando arsénico inorgánico o con carbón (de manera covalente) o hidrógeno constituyendo compuestos orgánicos. La mayoría de estos son polvos blancos o incoloros, inodoros, insípidos y no suelen evaporarse, debido a lo cual es difícil determinar su presencia en el ambiente.

El estado de oxidación de los compuestos arsenicales encontrados en el ambiente es trivalente (III) ó pentavalente (V), mucha de la química de estos compuestos resulta de la fácil conversión entre estos dos estados. Dentro de los compuestos pentavalentes se encuentran los arsenatos, los cuales son las sales del ácido arsénico H_3AsO_4 . Los arsenitos y las sales del ácido arsenioso contienen arsénico trivalente. El As (III) existe en la mayoría de las fuentes naturales de agua como $As(OH)_3$, y es más móvil que el As (V) debido a que es menos fuertemente absorbido en la mayoría de las superficies minerales (EPA, 1999).

El análisis de los efectos tóxicos del arsénico es difícil debido a las diferentes valencias que presenta y a los compuestos que puede formar. La mayoría de los casos de toxicidad humana han sido asociados a exposiciones ante compuestos arsenicales inorgánicos.

DISTRIBUCIÓN EN EL AMBIENTE Y VIAS DE EXPOSICION AL ARSENICO

El As está ampliamente distribuido en la corteza terrestre, ya que forma parte de la ganga (materia mineral) y puede ser liberado al ambiente a través de las emisiones volcánicas y la erosión de depósitos minerales, así como por las actividades humanas. No es degradado en el ambiente aunque si puede ser transformado por acción química o biológica a través de ciertas bacterias, algas y algunas especies de hongos (ATSDR, 1998; EPA, 1999).

Se encuentra en el suelo, el agua y el aire como un contaminante ambiental común (Abernathy, 1999). La mayoría de los compuestos arsenicales pueden disolverse en el agua, la lluvia, la nieve o los desechos industriales y de esta forma llegar a lagos, ríos o mantos acuíferos (ATSDR, 1998), además, bajo altas temperaturas generadas durante la combustión en la industria, es obtenido como bioproducto de la fundición del cobre, el plomo, el zinc y otros metales, en forma de polvo. Este polvo puede ser colectado, purificado y utilizado como preservador de madera o en la fabricación de pesticidas (insecticidas y herbicidas), lo que ha incrementado su dispersión. También puede ser liberado al ambiente a partir de las rocas y minerales en las aguas termales y las plantas de energía geotérmica o a través de la combustión del carbón (Landrigan, 1981).

El compuesto inorgánico más común en el aire es el trióxido de arsénico (As_2O_3), mientras que los arsenatos (AsO_4^{3-}) o arsenitos (AsO_2^-) lo son en el agua, el suelo o la comida. Algunos estudios han mostrado que existen diferencias en la toxicidad ante dichos compuestos, de manera que los compuestos trivalentes son más tóxicos que los pentavalentes, aunque varios metil y fenil derivados son altamente utilizados en la agricultura y por lo tanto deben ser tomados en consideración (ATSDR, 1998).

El arseniuro de galio (GaAs) es otro de los compuestos con importancia en la salud humana, debido a su amplio uso en la fabricación de semiconductores para la industria electrónica. Los datos sobre toxicocinética sugieren que a pesar de que este es

un compuesto poco soluble puede disolverse lentamente y oxidarse para formar trióxido de galio y arsenito. Los efectos tóxicos de este compuesto son atribuidos al arsenito liberado y a las especies de galio que lo conforman (ATSDR, 1998).

Otros de los compuestos o especies del arsénico que se sabe que pueden encontrarse en el agua y la comida consumidos por los humanos son la arsina (AsH_3) y sus derivados metilados, que son gases o líquidos volátiles, encontrados comúnmente en zonas de desechos, con una alta toxicidad. También se pueden encontrar el ácido arsenoso, ácido arsénico, ácido monometilarsónico y dimetilarsínico, la arsenocolina y la arsenobetaina (EPA, 1999).

El As está usualmente en bajas cantidades en el suelo, 5000 ppb; el agua, 2 ppb; el aire, 0.02 - 0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y la comida principalmente de tipo marino (peces y crustáceos), 20 - 140 ppb. De tal manera que la cantidad de arsénico a la que estamos expuestos es aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{día}$, cantidad que en zonas industriales y/o contaminadas se encuentra 100 veces más elevada (ATSDR, 1998).

De hecho el agua en algunos lugares como Argentina (Astolfi, 1981), Chile (Borgoño, 1977), China, Taiwan (Gou, 1994), India (Das, 1994 y 1995; Chowdhury, 2000) y México (Cebrián, 1994) rebasa el límite máximo permisible (50 $\mu\text{g}/\text{L}$ para el agua de bebida), lo que ha resultado en varios casos de hiperqueratosis, hiperpigmentación y cáncer de piel (Tondel, 1999). Problema que en lugares dentro de la República Mexicana como Puebla, Chihuahua, Hidalgo, Morelos, Nuevo León, Coahuila y Durango, se ha vuelto preocupante.

Las principales vías por las que el As puede entrar al cuerpo son oral (>90%), aérea (70-80%) y cutánea (1-2%). Cabe señalar que los niños están expuestos al arsénico a través de las mismas vías que los adultos, además de que este puede cruzar la barrera placentaria y también encontrarse en la leche materna, por lo cual los fetos y los lactantes pueden estar expuestos a este metaloide por vías úricas durante su desarrollo (ATSDR, 1998).

Algunos estudios sugieren que los efectos adversos sobre el desarrollo infantil se deben a la acción directa de los químicos sobre las células en crecimiento. El arsénico produce entonces malformaciones características que incluyen defectos en el cierre de tubo neural y en el desarrollo de los riñones, por lo cual se ha postulado que es un

teratógeno (ATSDR, 1998). Por otro lado, existen hallazgos que relacionan la exposición crónica en lugares como Antofagasta, Chile, con el incremento en el riesgo de muerte fetal e infantil (Hopenhayn-Rich, 2000).

METABOLISMO DEL ARSENICO

En cuanto al metabolismo del compuesto arsenical, la absorción dependerá de su estado físico, por ejemplo, las sales son más solubles en el agua y mejor absorbidas que los óxidos. Algunos experimentos han mostrado que existe una gran absorción a nivel gastrointestinal tanto de los compuestos trivalentes como de los pentavalentes (Tam, 1979).

La distribución del arsénico en el cuerpo humano depende de la duración de la exposición y del compuesto involucrado. El arsénico usualmente se acumula en hígado, riñón, pulmón y corazón, aunque se pueden encontrar pequeñas cantidades en tejido muscular y nervioso, uñas y cabello. Debido a su parecido con el fósforo se deposita en los huesos y los dientes y es retenido en ellos por largo tiempo (Goodman, 1992).

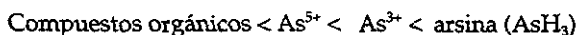
Acerca de su biotransformación en el humano, algunos compuestos pentavalentes son reducidos *in vivo* a la forma trivalente y al parecer, ambas formas son metiladas en el hombre, porque el ácido dimetilarsénico es la forma más común excretada en la orina (Goodman, 1992).

A pesar de que muchos organismos pueden metilar el arsénico, algunos mamíferos, incluidos changos y chimpancés, carecen o presentan una actividad deficiente en la enzima arsenito-metiltransferasa del hígado. Lo cual al parecer indica un polimorfismo génico en esta enzima y una variación en la actividad tejido específica (Aposhian, 1997). Los factores que parecen influir en la metilación del As son las especies a las que se está expuesto, las dosis, las rutas de exposición y el tipo de dieta (Vahter, 1994).

La eliminación del arsénico ocurre por diferentes vías: heces, orina, sudor, leche materna, pelo, uñas y pulmones. Algunas de las formas de arsénico permanecen en el cuerpo por días mientras que otras lo hacen por meses o más. La vida media de la excreción por vía urinaria del arsénico es de tres a cinco días (Goodman, 1992).

EFFECTOS, TOXICOLOGIA Y MECANISMOS DE CARCINOGENESIS DEL ARSENICO

La toxicidad del arsénico está en relación con el grado de eliminación del cuerpo y su acumulación en los tejidos. En general, su toxicidad se incrementa de la siguiente manera (Goodman, 1992):



El arsénico fue usado hace más de 2400 años en Grecia y Roma como agente terapéutico y como veneno. Desde la antigüedad el arsénico inorgánico ha sido considerado como un veneno humano que en grandes dosis (>60,000 ppb) causa la muerte, pero en dosis pequeñas (300 a 30,000 ppb) produce irritación del estómago e intestinos y síntomas como dolor, náuseas, vómito y diarrea. Otros de los efectos que produce son la disminución en la producción de células sanguíneas rojas y blancas, ritmo cardíaco anormal y un mal funcionamiento nervioso (ATSDR, 1998).

Los efectos farmacológicos y toxicológicos (Goodman, 1992) de este metaloide pueden variar según el órgano y el grado de exposición a él, como se indica a continuación:

En tracto gastrointestinal: pequeñas dosis causan hiperemia (congestión sanguínea) esplénica, vesículas bajo la mucosa intestinal, diarrea y una disminución en la proliferación normal celular.

En riñón: la acción del arsénico en los capilares renales, túbulos y glomérulos puede causar un daño renal severo. Al principio, hay proteinuria, diversos grados de necrosis tubular y degeneración. También puede existir oliguria y hematuria (sangre en orina).

En hígado: los compuestos arsenicales producen una infiltración grasa, necrosis central, cirrosis y oclusión del conducto biliar, además de hepatomegalia y fibrosis portal (Santra, 1999).

En piel: a corto plazo puede producirse necrosis. Una ingestión a largo plazo de pequeñas dosis de arsénico inorgánico causa vasodilatación cutánea, hiperqueratosis e hiperpigmentación que eventualmente conllevan a la atrofia y degeneración y

posiblemente al cáncer (Goodman, 1992). Además algunos estudios han mostrado que el signo más frecuente de exposición al arsénico es la lesión a nivel de piel. Los análisis de los diferentes tipos de cánceres producidos han mostrado que existe una diferencia racial, de tal forma, que para los Euroamericanos el carcinoma basal celular es el más común mientras que para los Asiáticos lo es la enfermedad de Bowen, lo cual sugiere una interacción entre el contenido de melanina, la luz ultravioleta y el cáncer inducido por As (Abernathy, 1999).

En Sistema Nervioso: se producen encefalopatías, debilidad muscular en las extremidades seguida de atrofia muscular, lesiones cerebrales, sobretodo vasculares y necrosis hemorrágica (Donofrio, 1987).

En Sistema Cardiovascular: pequeñas dosis producen vasodilatación y edemas. Dosis elevadas provocan dilatación y permeabilidad capilar, transudado de plasma y disminución en el volumen intravascular. Una exposición a largo plazo provoca gangrena en las extremidades, especialmente en los pies, daño al miocardio e hipertensión.

En tejido hemático: los compuestos inorgánicos afectan la médula ósea y la composición celular de la sangre, producen anemia, leucopenia, eosinofilia y un incremento en la vascularización de la médula e impiden la absorción del ácido fólico.

Los signos más comunes de una exposición crónica hacia el arsénico son la debilidad y el dolor muscular, la hiperpigmentación de la piel, la hiperqueratosis y los edemas. Algunos síntomas que pueden crear sospechas acerca de este tipo de exposición son el aliento y la transpiración con olor a ajo, estomatitis, dermatitis, vitiligo y apoplecia. Eventualmente ocurre una cirrosis del hígado debida a la hepatotoxicidad, una disfunción renal, parálisis en las extremidades y alteraciones hematológicas (anemia y leucopenia).

El efecto más característico de una larga exposición por vía oral es el cambio a nivel de piel, el cual incluye el ennegrecimiento, la aparición de verrugas en las manos y la planta de los pies y el cáncer de piel. También se ha reportado que el arsénico predispone a carcinomas de tipo basal-superficial y escamoso e incrementa el riesgo de cáncer de hígado, vejiga, riñón y pulmón, por lo cual el Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS), la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer

(IARC), la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y el Programa Nacional de Toxicología (NTP), lo han declarado un carcinógeno humano (ATSDR, 1998).

A pesar de lo antes mencionado existen reportes acerca de los efectos benéficos del arsénico si se ingieren pequeñas cantidades (10-50 ppb) en la dieta normal. Estudios recientes muestran que las anormalidades en el balance de los metales traza pueden influenciar la salud humana. En los animales algunos signos de la falta de As incluyen la mortalidad perinatal, la fragilidad osmótica de los eritrocitos, la reducción de los niveles de S-adenosilmetionina (SAM) (Zhao, 1997), la alteración en la producción de poliaminas y los efectos en los patrones de metilación. Además se ha reportado que el As protege contra la toxicidad del selenio (Abernathy, 1999). Por otro lado, el arsénico también se ha usado de manera terapéutica en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (APL) como un inductor de la diferenciación de las células de APL *in vivo*, obteniéndose una remisión del 88% de los pacientes tratados con dosis de 0.06-0.17 mg/kg diarios de trióxido de arsénico (Camacho, 2000).

a) Genotoxicidad y carcinogenicidad:

A diferencia de muchos carcinógenos, los compuestos arsenicales no inducen mutaciones en bacterias y son inactivos o resultan débiles en la inducción de mutaciones génicas en una variedad de células de mamíferos (Li, 1991). La exposición al As causa amplificación génica (Lee-Chen, 1992) y daño cromosómico a bajas dosis además de incrementar la mutagénesis de otros agentes, aparentemente al impedir la reparación del DNA (Rossman, 1998).

También se ha visto que el arsenito produce micronúcleos (Ostrosky, 1991; Gonsebatt, 1992; Vega, 1995) y transformación celular morfológica en embriones de hámster Sirio (di Paolo, 1979), además, incrementa el número de intercambios de cromátidas hermanas y de aberraciones cromosómicas numéricas (tetraploidías) en linfocitos humanos tanto tratados *in vitro* como de personas expuestas naturalmente. Estudios recientes mostraron que el arsenito de sodio induce la formación de células aneuploides en linfocitos tratados *in vitro* además de alterar el proceso de polimerización y depolimerización de la tubulina, también *in vitro* (Ramírez, 1997). Además, Vega et al. (1995) mostraron que este mismo compuesto tenía un efecto parecido a la colcemida, induciendo cambios en el número cromosómico de linfocitos humanos.

Por otro lado, también se ha visto que el As produce rompimientos en las cadenas del DNA y entrecruzamientos DNA-proteína en células humanas en cultivo, de manera dosis dependiente (Dong, 1993; Schaumlöffel, 1998; Ramírez, 2000) y en células de hamster chino (Gabel, 1998). Estas interacciones podrían explicar la formación de aberraciones cromosómicas y el intercambio de cromátidas hermanas provocados por el As además de jugar un papel importante en el mecanismo de carcinogenicidad de este metaloide.

Además de los efectos cromosómicos, también se ha visto que el As altera la proliferación celular de individuos expuestos a este metaloide en el agua de bebida así como de linfocitos tratados *in vitro* donde también se vio una inhibición mitótica del tipo dosis-respuesta (Ostrosky-Wegman, 1991; Gonsebatt; 1992 y 1994). Estudios posteriores relacionados con la proliferación celular y su control a través de genes supresores de tumores, mostraron que el gen p53, el cual está involucrado en la regulación de el ciclo celular, la reparación y la apoptosis entre otros procesos, es inducido por el As y que dependiendo del estado funcional en que se encuentre este gen (normal o mutado) será la respuesta ante el daño causado por este metaloide. En este estudio se observó que las líneas celulares cuyo p53 era normal respondían mejor ante el daño con respecto a las células con el gen p53 mutado (Salazar, 1997). Esto último es importante debido a que se ha visto que el gen p53 se encuentra mutado en el 50% de los cánceres y como ya se mencionó anteriormente, el As es considerado un agente carcinogénico, clasificado en el grupo A (con suficiente evidencia en seres humanos) por la IARC (1980), cuya evidencia epidemiológica soporta la idea de una asociación entre la exposición crónica al As y el incremento en el riesgo a presentar cáncer de piel, hígado, vejiga, riñón, prostata y pulmón (Bojián, 1982; Cebrián, 1983; Lee, 1988; Ostrosky, 1991; Bate, 1992 y Chiou, 1995).

b) Mecanismos de acción:

Debido a lo anterior se han propuesto varios mecanismos o vías por los cuales el arsénico puede estar actuando:

A nivel celular, se conoce que altera la fosforilación oxidativa mitocondrial, estimulando la actividad de la ATPasa de estos organelos y la oxidación en la ausencia de fosfato inorgánico (Schiller, 1977), tal vez a través de la sustitución competitiva de éste, en la formación de adenosin trifosfato. Estas evidencias se han visto apoyadas por

algunos estudios en roedores, en los que se ha observado que el arsenito disminuye los niveles hepáticos de ATP (Bianchi, 1982; Chen, 1986).

Por otro lado el arsenito tiene una alta afinidad por los sulfuros, debido a lo cual se cree que su toxicidad está dada por la interacción con grupos tioles pudiendo inhibir las funciones de algunas proteínas y enzimas (e.g. piruvato deshidrogenasa y 2-oxoglutarato deshidrogenasa) al reaccionar con los grupos sulfidrilo (Goodman, 1992; EPA, 1999).

El arsénico presenta una acción inhibitoria en la enzima glutatión reductasa y en los substratos con nicotín-adenin-dinucleótidos los cuales están involucrados en la síntesis de ATP y la fosforilación de otras especies intracelulares, pudiendo desempeñar esta acción un papel importante en el estrés oxidativo y la regulación génica.

También se ha visto que el As es detoxificado a través de la metilación usando enzimas como la metiltransferasa y la SAM como un donador de grupos metilo (Healy, 1998), por lo que se ha postulado que el posible mecanismo de acción podría ser a través de alteraciones en la metilación de genes supresores de tumores por esta vía. De hecho, se ha visto que el arsenito puede actuar como un carcinógeno al causar hipometilación del DNA lo que conlleva a una mala expresión génica (Zhao, 1997). Al respecto se ha observado que tanto el arsenato como el arsenito causan una hipermetilación en el promotor de p53 y en secuencias CpG a lo largo del genoma (Mass, 1997). Por otro lado, estudios *in vitro* aportan evidencias de que el arsenito disminuye los niveles de SAM causando una hipometilación global en las células del hígado (Zhao, 1997).

Se ha visto que el tratamiento con arsenito disminuye los niveles de glutatión e incrementa la peroxidación de lípidos en el hígado, riñón y corazón de ratas, lo cual produce sustancias dañinas como lípidos hidroperoxidados y especies con electrones no apareados, que dañan el DNA por oxidación o formación de aductos (Ramos, 1995).

Varios estudios han reportado que el As inorgánico afecta los mecanismos de reparación del DNA, tal vez a través de la inhibición de enzimas involucradas en la excisión y en la reparación postreplicativa (Okui, 1986; Lee-Chen, 1992 y 1993). Aunque algunos autores postulan que debido a que se ha visto que ninguna enzima de reparación es sensible a la inhibición por arsenito, se ha postulado que este interfiere con el control de la reparación más que con las enzimas de reparación (Rossman, 1998).

Es por ello que aunque desconocemos la manera exacta en la que el arsénico causa daño al DNA, sí sabemos que existen varias vías involucradas en el proceso de la carcinogénesis mediadas por este metaloide que incluyen, desde la interacción directa con ciertos grupos o elementos del DNA y/o proteínas, hasta la acción indirecta a través de la alteración de diversas enzimas.

ANEMIA DE FANCONI

La anemia de Fanconi fue descrita en 1927 por el Dr. Guido Fanconi como un síndrome que involucra pancitopenia progresiva asociada a anomalías congénitas. Es una enfermedad autosómica recesiva que usualmente se agrupa con los síndromes de inestabilidad cromosómica y predisposición a cáncer como Ataxia Telangiectasia, Xeroderma pigmentoso y Síndrome de Bloom, entre otros (Strathdee, 1992; Joenje, 1995).

Se encuentra en todas las razas y grupos étnicos, con una prevalencia de 1 : 26,000 en individuos blancos a 1 : 476,000 en población negra; en caucásicos se ha estimado que esta enfermedad tiene una frecuencia para homocigotos de 1 en 350,000 y para heterocigotos de 1 en 200 (Alter, 1991 y 1993; Heim, 1992; Strathdee, 1992; Macdougall, 1994; Joenje, 1995). La frecuencia de la AF varía según el grupo étnico o el país, algunos grupos tienen una alta incidencia debido al efecto fundador. La frecuencia de heterocigotos para africanos del Sur de África es de 1 en 100 y para judíos Ashkenazi de 1 en 89, también se ha visto que hay grupos altamente afectados como los Turcos y Saudi-árabes debido a los matrimonios consanguíneos (Auerbach, 1997).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El cuadro clínico es muy variable, algunos de los pacientes muestran severas malformaciones congénitas mientras que otros están libres de ellas (37%) y la pancitopenia, presente en el 90% de los casos, muestra variabilidad en cuanto a la gravedad y la edad de inicio (Esmer, 1999), debido a ello el diagnóstico con base en criterios clínicos es poco confiable, por lo que se utilizan para el diagnóstico la evaluación de rompimientos cromosómicos causados por clastógenos como la mitomicina C (MMC) y el diepoxibutano (DEB) (Strathdee, 1992; Liu, 1994).

a) Anormalidades hematológicas:

La anomalía hematológica más común es la pancitopenia progresiva (baja cuenta de glóbulos rojos, blancos y plaquetas) que se desarrolla entre los cinco y diez años de edad y comienza con una trombocitopenia, seguida de una granulocitopenia y una anemia aplásica. También pueden presentar linfocitosis (por disminución de granulocitos), baja producción de interleucina-6 (IL-6) y sobreproducción del factor de

necrosis tumoral alfa (TNF α). Usualmente la muerte se origina por alteraciones de la médula ósea entre la edad infantil y la adolescencia (Strathdee, 1992; Liu, 1994; Joenje, 1995; Buchwald, 1998).

b) Malignizaciones:

Existe una mayor predisposición a presentar tumores malignos que podría deberse a la delección o inactivación de genes supresores de tumores por pérdida alélica.

Alter (1999) encontró que del 18 al 25% de los pacientes con AF desarrollan cáncer, siendo el tipo más común de malignización (50%) la leucemia mieloide aguda.

En cuanto a los tumores sólidos, podemos encontrar de diversos tipos: hepatomas, carcinosomas hepatocelulares, orofaríngeos, gastrointestinales y tumores ginecológicos. Los tumores líquidos suelen presentarse antes de los 20 años mientras que los tumores sólidos después de los 25 (Zakrzewski, 1980; Strathdee, 1992; Liu, 1994; Joenje, 1995; Buchwald, 1998).

c) Otras anormalidades clínicas:

Los pacientes con AF presentan de manera clásica una gran variedad de malformaciones congénitas. Las características clínicas más comunes son las anormalidades morfométricas como bajo peso al nacer, retardo en el crecimiento, lesiones en la piel (hiperpigmentación, hipopigmentación, manchas café-au-lait), dismorfias faciales (microcefalia, microftalmia y microstomía), alteraciones esqueléticas (ausencia de radio y pulgares) y malformaciones renales, de sistema nervioso central y genitales (tabla 1) (Strathdee, 1992; Liu, 1994; Alter, 1993 y 1994).

Anormalidad	Porcentaje (%)
Bajo peso al nacer	13
Talla baja	62
Anormalidades craneofaciales	28
Alteraciones cardiopulmonares	7
Anormalidades gastrointestinales	4
Malformaciones renales	24
Alteración en miembros superiores	50
Alteración en miembros inferiores	9
Hipogonadismo masculino	40
Hipogonadismo femenino	3
Pigmentación anormal de la piel	51
Retardo mental	13

Tabla 1. Posibles alteraciones en los pacientes con anemia de Fanconi (Modificado de Alter, 1993).

FENOTIPO CELULAR

a) Inestabilidad cromosómica espontánea.

La inestabilidad cromosómica es una característica distintiva en los pacientes con AF. Mediante técnicas citogenéticas se ha visto que los individuos con dicha enfermedad presentan una elevada frecuencia de aberraciones espontáneas tanto *in vivo* en células de médula ósea como *in vitro* en células en cultivo (linfocitos, fibroblastos y linfoblastos) (Schroeder, 1982; Cohen, 1989).

Las aberraciones que se observan predominantemente son los rompimientos cromatídicos, los intercambios, los gaps y las figuras multirradiales que involucran cromosomas no homólogos (Schroeder, 1982; Cohen, 1989) (Figura 1). Otra anomalía es la aparición de linfocitos clonales portadores de marcadores cromosómicos (Huret, 1988). El que el tipo de daño sea predominantemente del tipo cromatídico sugiere que el origen es después de la replicación del DNA, durante las fases S o G2 del ciclo celular. De esta forma se propone que este incremento en la inestabilidad cromosómica espontánea contribuye al alto riesgo a presentar cáncer en los pacientes con AF (Waisfisz, 1999).

b) Sensibilidad a agentes formadores de enlaces cruzados:

El gran número de aberraciones cromosómicas presentes en los pacientes se ve incrementado cuando se utilizan agentes alquilantes bifuncionales como la MMC, el DEB, la mostaza nitrogenada, la ciclofosfamida, el cisplatino y el 8 metoxi-psoralen (8-MOP) con luz ultravioleta, los cuales producen mono y diaductos y ante los que presentan una hipersensibilidad, característica que ha permitido el diagnóstico aún antes de que se desarrolle la anemia (Strathdee, 1992; Liu, 1994; Joenje, 1995; Buchwald, 1998). En un estudio realizado con una muestra de la población mexicana se reportó que la frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas en células de AF varía entre un 10 y un 60 %, mientras que la frecuencia de aberraciones inducidas con 40 ng/ml de MMC se ve incrementada hasta un 300%, resultados que son significativamente diferentes a los que se observan en individuos normales expuestos al mismo tratamiento, cuyos valores oscilan alrededor del 35 % (Frias, 1986).

La sensibilidad de las células de AF en cultivo con respecto a los efectos clastogénicos provocados por los agentes alquilantes bifuncionales es paralela a una marcada susceptibilidad en cuanto a la citotoxicidad, demostrada por la muerte celular (Weksberg, 1979; Ishida, 1982; Wunder, 1983) y la inhibición del crecimiento (Esmer, comunicación personal), ocasionada por agentes como la MMC, el DEB y el 8-MOP activado con luz UV.



Figura 1. Aberraciones cromosómicas presentes en linfocitos de un paciente con anemia de Fanconi después de haber sido tratados con a) DEB [0.1 µg/ml] y b) MMC [20 ng/ml]. Se logran apreciar algunas de las aberraciones más frecuentes como los rompimientos cromatídicos, los fragmentos y las figuras multirradiales.

c) Mutabilidad:

A pesar de la marcada sensibilidad ante los agentes alquilantes bifuncionales, las células de AF son hipomutables para ciertos loci (Strathdee, 1992; Liu, 1994; Joenje, 1995; Buchwald, 1998). Por ejemplo, el exponer células de FA-A y FA-B a 8-MOP + UV produce pocas mutaciones en el locus HPRT y en el locus de la ATPasa de Na/K (Papadopoulos, 1990). Estos resultados son controversiales ya que Vijayalaxmi y colaboradores (1985) encontraron una elevada frecuencia de mutaciones espontáneas en el locus HPRT de linfocitos circulantes.

Por otro lado, se ha visto que las mutaciones espontáneas e inducidas más frecuentes en células normales son mutaciones puntuales, mientras que en las células de AF la mayoría son deleciones. Estas deleciones presumiblemente se originan de rompimientos sitio-específicos (Papadopoulos, 1990) y son incrementadas por la mala fidelidad que se lleva a cabo en la unión de los rompimientos de doble cadena y los eventos de recombinación (Escarceller, 1997; Smith, 1998).

d) Sensibilidad al oxígeno:

Otra característica fenotípica es la sensibilidad *in vitro* a los efectos tóxicos del oxígeno y a otras especies reactivas de este (ROS). Se ha propuesto que las células de AF son hipersensibles al oxígeno debido a que los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con AF crecen mejor en ambientes con 5% de oxígeno que en ambientes con 20% de este gas (Schindler, 1988), también se ha visto que el daño cromosómico correlaciona con la cantidad de este elemento en linfocitos en cultivo (Joenje, 1981). Estas ideas son apoyadas por observaciones en las cuales se muestra que linfocitos normales cultivados en ambientes con elevadas cantidades de oxígeno (40-60%) muestran un daño cromosómico similar al de linfocitos de AF cultivados en ambientes con 20% del mismo (Joenje, 1986).

Muchos agentes alquilantes inducen especies reactivas de oxígeno por lo que la sensibilidad de las células de AF al oxígeno y a este tipo de agentes puede estar dada debido a defectos en la defensa contra ellas, lo cual puede explicar la sensibilidad selectiva de algunas células de AF cuando son cultivadas en 20% de oxígeno y tratadas con MMC en comparación con aquellas cultivadas con 5% de oxígeno y tratadas de la misma manera (Wisfisz, 1999). A este respecto se ha visto que la adición de

antioxidantes y/o enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa producen un efecto en la estabilidad y el crecimiento celular, protegiendo a las células de los agentes clastogénicos (Buchwald, 1998). Se han hecho investigaciones sobre los niveles de este tipo de enzimas presentes en las células de AF, pero los resultados son inconsistentes. Por otro lado, al parecer existe un defecto en el sistema del NF- κ B, el cual está involucrado en la respuesta ante el estrés oxidativo (Buchwald, 1998).

e) Linfocinas:

Se ha propuesto que el fenotipo de los pacientes con AF puede estar dado en cierta medida por las alteraciones a nivel de linfocinas.

Tanto en cultivos de médula ósea como en células mononucleares de sangre periférica de pacientes homocigotos para la AF, se ha encontrado una menor producción de IL-6 y del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). También se ha observado una des-regulación en el TNF α , con un incremento de este factor en el medio y células de FA-A, B, C y D (hasta ocho veces) y en el suero de pacientes tanto homocigotos como heterocigotos (Roselli, 1994).

Por otra parte, varios investigadores han demostrado por distintas metodologías que el fenotipo celular puede corregirse parcialmente a través de estrategias como la adición de IL-6 o anti-TNF α al medio de cultivo (Roselli, 1992; 1994) y/o la cocultivación con células normales y la adición de plasma humano normal (Carnevale, 1985).

f) Alteraciones en reparación:

La hipersensibilidad de las células de AF ante los agentes bifuncionales que producen rompimientos inter e intracatenarios junto con la inestabilidad cromosómica espontánea, proveen evidencias para proponer que el defecto básico involucra algún aspecto de la reparación del DNA, esta hipótesis es bastante controversial debido a los diferentes resultados que se han obtenido. Sasaki (1975) postuló un defecto en la reparación y remoción de los enlaces cruzados intracatenarios, Papadopoulo y colaboradores (1987) observaron únicamente un defecto en la incisión en los enlaces cruzados, mientras que otros autores no encontraron ningún defecto en la reparación de estos enlaces (Fornace, 1979; Kaye, 1980). Es posible que esta variación en los resultados

se deba al uso de distintas líneas celulares y/o grupos de complementación (Strathdee, 1992; Joenje, 1995).

También se ha estudiado la fidelidad de la reparación por excisión, donde se ha encontrado un defecto parcial en la incisión de los enlaces cruzados intercatenarios. Estudios más recientes han revelado la ausencia de una proteína de unión al DNA con especificidad para los enlaces cruzados. Entonces, el defecto puede deberse en parte a la falta de esta proteína de reconocimiento o a la deficiente función del complejo endonucleasa involucrado en el proceso de incisión (Strathdee, 1992; Liu, 1994).

Además, debido a que las células de AF presentan bajos niveles de NAD⁺ y que la reparación dependiente del metabolismo de NAD⁺ también es deficiente, algunos autores han propuesto un defecto en la poli(ADP)-ribosiltransferasa, la cual esta involucrada en el reconocimiento del daño al DNA y más específicamente en los rompimientos de una hebra, aunque existen reportes que contradicen lo anterior (Strathdee, 1992; Buchwald, 1998).

Joenje y Gille han propuesto que en las células de AF un conjunto de proteínas normalmente involucradas en la reparación de enlaces cruzados son específicamente sensibles al daño oxidativo. Entonces, las mutaciones en AF pueden estar haciendo a la maquinaria de reparación hipersensible o pueden incrementar el daño oxidativo ante el cual la reparación es intrínsecamente sensible (Strathdee, 1992).

g) Características del ciclo celular:

Los cultivos primarios de AF presentan un crecimiento escaso debido a un retraso en la progresión de las fases S y G₂ del ciclo celular, Dutrillaux y colaboradores mostraron que el número de mitosis aumenta progresivamente a lo largo de los ciclos en cultivos celulares normales mientras que lo opuesto sucede en los linfocitos de AF, donde el número de mitosis decrece continuamente (Buchwald, 1998), sin embargo las polimerasas α , β y γ y la elongación del DNA se encuentran normales en estas células (Meyn, 1997), por lo que se cree que este retardo es mas bien consecuencia de alteraciones en la reparación o el ciclo celular.

Es posible que este retardo y detención del ciclo se deban a lesiones en el DNA, como los rompimientos de doble hebra generados por la acción del oxígeno o los

clastógenos, a la sobreproducción del TNF, el cual es un importante mediador del estrés oxidativo al ser inducido por el daño al DNA y al tener la capacidad de activar otros genes que intervienen en la proliferación (Liu, 1994) o bien a un defecto en la reparación.

Además la exposición ante agentes alquilantes bifuncionales como la MMC y la radiosensibilidad cromatídica en G2 (causada por la radiación ionizante), inducen aberraciones cromosómicas (rompimientos y rearreglos) y retardo y detención durante las fase S tardía - G2 del ciclo celular, lo cual conlleva a una disminución en la síntesis de DNA y a la muerte celular (Kaiser, 1982; Strathdee, 1992; Liu, 1994). Este arresto en G2 puede ser eliminado al tratar las células con cafeína, que es un inhibidor del punto de monitoreo de G2 (Kruyt, 1996).

h) Apoptosis y p53:

Las investigaciones sobre apoptosis inducida por mutágenos en AF han dado resultados controversiales. Por un lado algunos autores encontraron niveles apoptóticos normales tanto en líneas linfoblastoides (Rey, 1994; Roselli, 1995) como en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con AF (Monti, 1997) utilizando tratamientos como radiación gamma, TNF α con ciclohexamida y MMC, mientras que otros observaron una mayor proporción de apoptosis en diferentes líneas linfoblastoides (A-D) con distintas concentraciones de MMC y DEB (Allen, 1995; Kruyt, 1996).

Otros resultados también controversiales son los obtenidos para el gen p53. Por un lado, Kruyt y colaboradores (1996) observaron que la inducción de p53, un mediador de la apoptosis, sucede desde dosis bajas de MMC en los grupos de complementación A, C y D, mientras que Rosselli y cols. (1995) demostraron que el gen supresor de tumores p53 es escasamente inducido en líneas linfoblastoides de FA-C y FA-D después del tratamiento con rayos X, MMC y luz UV.

También se ha visto que la cafeína inhibe el arresto en G2 y la inducción de p53 en FA-C (Kruyt, 1996). Existen evidencias que sugieren que p53 induce la expresión de FANCC al unirse a una secuencia en su promotor (Liebetrau, 1997).

Así, las alteraciones en la apoptosis parecen ser características de la AF, aunque no se sabe que sucesos la desencadenan ya que podría ser un estímulo metabólico intrínseco o bien una respuesta ante señales externas (Buchwald, 1998).

Las alteraciones a nivel de apoptosis, la vía de p53, la inestabilidad cromosómica y la deficiencia en la reparación de los rompimientos del DNA, pueden modificar la habilidad de las células para sobrevivir ante un daño al DNA y permiten proponer una hipótesis en la cual las proteínas de AF interactúan formando un complejo que puede activar sistemas de protección así como transcribir genes específicos, proteínas y/o factores de crecimiento (Buchwald, 1998). Es por ello que el conocimiento de las interacciones proteína-proteína y DNA-proteína es sumamente importante para dilucidar las funciones de algunos de estos genes y su interacción con el ambiente.

DEFECTO BASICO

Hoy en día se desconoce el defecto básico, sin embargo, la inestabilidad cromosómica espontánea e inducida, por agentes productores de enlaces cruzados, junto con la alta incidencia de cánceres, sugieren que este se encuentra a nivel de la reparación del DNA. Al respecto se han planteado diferentes hipótesis sobre su origen: 1) el defecto se encuentra en la habilidad de las células para reparar el daño al DNA (Poon, 1974; Fujiwara, 1982), lo cual involucra a una proteína defectuosa que reconozca, modifique o repare los enlaces cruzados (Strathdee, 1992), 2) está relacionado con la capacidad de las células para reaccionar ante el estrés oxidativo producido por los agentes formadores de enlaces cruzados, en lo cual intervienen mecanismos de detoxificación y/o remoción de radicales libres o bioproductos del oxígeno (Dallapiccola, 1985; Strathdee, 1992), 3) tiene relación con alteraciones en el transporte a través de la envoltura nuclear de la topoisomerasa -I (Wunder 1981 y 1984), 4) involucra la alteración en la producción y respuesta a citocinas en conexión con las alteraciones de radicales libres en leucocitos de AF y/o la homeostasis en factores de crecimiento (Roselli, 1992) y 5) se han sugerido deficiencias a nivel de la apoptosis y la regulación del ciclo celular.

HETEROGENEIDAD GENETICA

La heterogeneidad genética se define como mutaciones génicas en diferentes loci que dan como resultado un fenotipo similar (Guizar-Vázquez, 1994) y fue descubierta en AF a través de análisis de complementación mediante los cuales se crean híbridos de células somáticas fusionando líneas linfoblastoides de diversos pacientes.

Grupos de complementación:

A partir de los análisis de complementación y la evaluación de la corrección de la fragilidad cromosómica en presencia de MMC o DEB, se ha llegado a la designación de siete grupos de complementación, que reflejan la complejidad de la enfermedad y apoyan la idea de que la sensibilidad, principalmente ante agentes alquilantes bifuncionales, es consecuencia de defectos genéticos (Strathdee, 1992; Liu, 1994). Estos grupos fueron nombrados de la A a la G (Figura 2), siendo que cada uno representa un gen distinto cuya ausencia da como resultado un fenotipo similar (AF).

- **FA-A:** los pacientes muestran alta sensibilidad a la MMC manifestada como una frecuencia elevada de rupturas cromosómicas y una reducción en el índice mitótico, además estas células no recuperan su síntesis de DNA después de exponerlas a 8-MOP + UVA, reducen su actividad de ligasa y su consumo de NAD⁺ después de radiación UV y son deficientes en la reparación de rupturas de doble hebra y enlaces cruzados (Digweed, 1988 y 1989).

El 73.2% de los pacientes corresponden a este grupo (Mathew, 1999). El gen defectuoso fue designado como *FANCA*, se localiza en el cromosoma 16q24.3, comprende 4.3 kb y codifica para una proteína nuclear de 163 KD con un total de 43 exones, la cual no tiene homología con ninguna otra proteína conocida. Se desconoce su función pero se sabe que forma un complejo junto con las proteínas *FANCG*, *FANCC* y *FANCF* cuya ubicación es principalmente nuclear en células normales (Lo Ten Foe, 1996 y D'Andrea, 1996; García-Higuera, 1999; Wikjer, 1999, de Winter, 2000). Cabe mencionar que este complejo no se observa en las células de los grupos de complementación FA-A, B, C, E, F, G y H, lo que sugiere que los productos de estos genes juegan un papel en la formación del complejo, tal vez como proteínas adaptadoras o como enzimas que regulan este ensamblaje (García-Higuera, 2000).

Mediante análisis de mutaciones se ha visto que FA-A es un grupo muy heterogéneo, que presenta deleciones intersticiales, microdeleciones e inserciones a lo largo de todo el gen, que en su mayoría ocurren dentro de secuencias repetitivas codificantes que comúnmente dan como resultado una proteína truncada (ausencia

de uno a 30 exones del gen) (Wikjer, 1999). La mayoría de los pacientes son heterocígos compuestos (dos mutaciones diferentes para el mismo locus) que usualmente muestran un fenotipo poco severo (Auerbach, 1999).

- **FA-B:** pacientes que muestran baja sensibilidad a la MMC por lo que las rupturas cromosómicas y la reducción del índice mitótico son moderadas. La reparación de rupturas de doble hebra es normal, también manifiestan un patrón de síntesis de DNA similar a las células normales, capaz de remover fotolesiones (Digweed, 1988 y 1989). En este grupo se encuentran el 0.3% de los pacientes y se desconoce el gen asociado (Mathew, 1999).
- **FA-C:** los pacientes presentan baja sensibilidad a la MMC y tiene una reparación normal de rupturas de doble hebra (Digweed, 1989).

El 14.5% de los pacientes se encuentra ubicado dentro de este grupo (Mathew, 1999). El gen *FANCC* se localiza en el cromosoma 9q22.3 consta de 14 exones y codifica para una proteína citosólica de 63 KD y 558 aminoácidos, se desconoce su función pero se sabe que interacciona de manera débil y/o regulada con *FANCA/FANCG* para internalizarse en el núcleo interacción que es estabilizada por *FANCF* (Strathdee, 1992; Liu, 1994; Joenje, 1995; Lo Ten Foe, 1996 y D'Andrea, 1996; García-Higuera, 1999, de Winter, 2000).

El análisis de mutaciones en FA-C ha dado a conocer una correlación fenotípica importante. La mutación en el exón 1 es una delección de una guanina en la posición 322 (delG322) del gen, que da como resultado un fenotipo leve de la enfermedad, mientras que la mutación en el exón 4, que es una sustitución de una adenina por un timina (IVS4+4 A>T), resulta en un cuadro clínico severo asociado a la aparición temprana de anormalidades hematológicas y baja sobrevivencia (Yamashita, 1996). Esta mutación ha sido encontrada únicamente en judíos Ashkenazi y descendientes de esta población en donde hay una frecuencia de heterocigotos del uno por ciento (Auerbach, 1997).

- **FA-D:** los pacientes de este grupo de complementación muestran alta sensibilidad a la MMC (Digweed, 1989).

El 1.3% de los pacientes se encuentra en este grupo (Mathew, 1999). El gen *FANCD* se localiza en el cromosoma 3p22-26 (Lo Ten Foe, 1996 y D'Andrea, 1996), consta de 43 exones y codifica para una proteína de 1472 aminoácidos. Las bases de datos muestran que esta proteína tiene homologías con una proteína de *Arabidopsis thaliana*. La sobreexpresión de *FANCD* causa una rápida muerte celular, posiblemente por apoptosis, lo que podría sugerir su papel como modulador de la respuesta apoptótica con respecto a los agentes formadores de enlaces cruzados (Timmers, 1999).

- **FA-E:** las células de este grupo presentan hipersensibilidad a la MMC (Joenje *et al.*, 1995). El 2.1% de los pacientes corresponden a este grupo (Mathew, 1999). El gen *FANCE* fue mapeado y se localiza en el cromosoma 6p21.2-21.3 (Waisfisz, 1999), comprende 10 exones y codifica para una proteína de 536 aminoácidos que contiene dos senales de localización nuclear (de Winter, 2000), aún se desconoce su función.
- **FA-F:** corresponde al 2.6% de los pacientes (Mathew, 1999). El gen *FANCF* se localiza en el cromosoma 11p15, carece de intrones y codifica para un polipéptido de 374 aminoácidos, que tiene homología con la proteína de unión de RNA, ROM de los procariontas (de Winter, 2000). Esta proteína ayuda a la formación y la estabilización del complejo formado entre los transcritos de RNA (RNA I y RNA II) durante la replicación del plasmido ColE1. El RNA II sirve como primer para la síntesis de DNA y el RNA I es complementario a este (Eguchi, 1990 y 1991). Se ha reportado que esta proteína forma parte del complejo FANCA, FANCC, FANCG (de Winter, 2000).
- **FA-G:** el 6% de los pacientes se encuentran dentro de este grupo (Mathew, 1999). El gen *FANCG* se localiza en el cromosoma 9p13, presenta homología con el gen *XRCC9*, el cual complementa la sensibilidad a MMC en la mutante UV40 del hamster chino y que se sospecha está involucrado en la reparación post-replicativa del DNA o en los puntos de monitoreo del ciclo celular (de Winter, 1998). La proteína de este gen se localiza tanto en citoplasma como en núcleo y forma un complejo con FANCA, FANCC y FANCF (Waisfisz, 1999).

Con respecto al análisis de mutaciones, se ha visto que este grupo presenta mutaciones del tipo de las deleciones y sustituciones que usualmente dan como resultado un cuadro clínico severo, aunque se ha descrito un grupo de mutaciones

sin sentido que generan un fenotipo menos severo con un número mayor de malformaciones congénitas (Auerbach, 1999).

Datos recientes indican que los productos génicos de AF posiblemente desempeñan un papel en la fidelidad de la unión de los extremos de los rompimientos de doble hebra (Buchwald, 1998).

Además, se ha propuesto con base en análisis de RNAm, que las actividades de al menos tres diferentes genes de AF convergen en un mismo camino el cual está relacionado con la señalización a partir de interferones, susceptibilidad a la apoptosis e inhibición de la proliferación celular (Li, 1997).

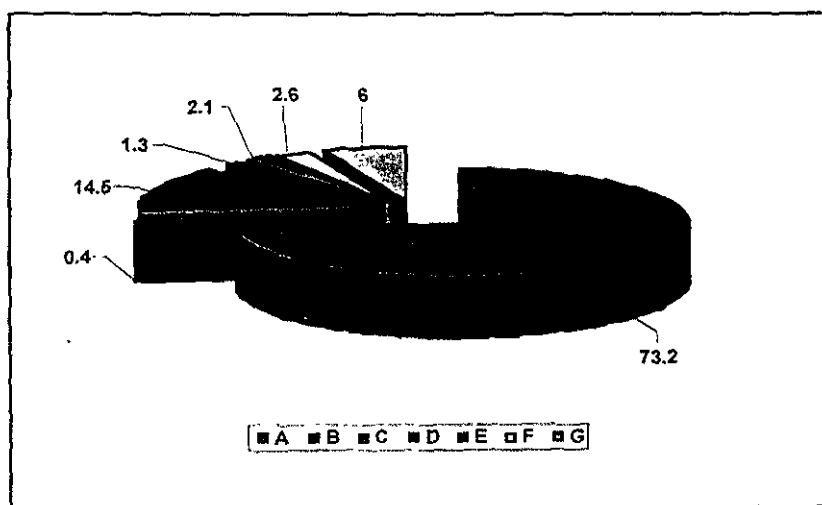


Figura 2. Porcentaje de pacientes reportado para cada grupo de complementación de anemia de Fanconi (Modificado de Mathew, 1999).

p53

Uno de los más importantes genes supresores de tumores es p53. Un supresor de tumores es un gen cuyo producto es necesario para el desarrollo normal celular y cuya pérdida de función causa la formación de un tumor o malignización (Lewin,1997). Daños críticos al DNA asociados con la regulación de los genes supresores de tumores, están implicados en cambios en el crecimiento normal celular. Estos genes pueden participar como barreras físicas contra la clonación y mutación génica e impedir el crecimiento y metástasis de las células que sufren una división incontrolada debido al daño y/o la alteración de su material genético. Uno de los principales genes supresores de tumores es p53, al cual se le considera una de las piezas clave en la regulación de la proliferación celular, la reparación del DNA, la diferenciación y la apoptosis, así como un inductor del arresto celular en G1 y G2/M. Ciertos tumores en órganos blanco del arsénico como vejiga, hígado, pulmón y piel han mostrado tener p53 mutado.

Históricamente, el segundo gen supresor caracterizado fue p53, su proteína fue aislada por primera vez en inmunoprecipitados del antígeno T de células de roedores transformadas por el virus SV40 (Hesketh, 1997). Inicialmente se le propuso como un oncogen, ya que sus niveles se encontraban elevados en estas células y las moléculas de p53 eran capaces de transformar otras células mediante ensayos de transferencia génica, posteriormente se observó que eran las versiones mutadas de este gen las que provocaban dicho efecto y que la proteína silvestre tenía un papel inhibitorio de la transformación celular, estableciéndose así, que p53 era en realidad un gen supresor de tumores (Cooper, 1995).

ESTRUCTURA DEL GEN

El gen supresor de tumores p53 se localiza dentro del genoma humano en el cromosoma 17, banda p13.1, tiene un peso de 53kDa, consta de 11 exones (aproximadamente 20 Kb), diez de los cuales (del 2 al 11) comprenden la región que codifica para una fosfoproteína de 393 aminoácidos, con localización primordialmente nuclear. El RNA mensajero de p53 se expresa en todas las células del cuerpo, siendo en el bazo y el timo donde se presentan los niveles más elevados (Levine, 1993).

La secuencia promotora de p53 está altamente conservada entre los humanos, los ratones y las ratas. En los primeros 100 pb corriente arriba del sitio de inicio de la

transcripción se encuentran varios elementos que causan una fuerte activación transcripcional, estos incluyen un elemento de respuesta a luz UV, uno de respuesta ante el estrés inducido por genotóxicos, un sitio de unión para el factor NF- κ B, una región involucrada en la transactivación del promotor de p53 por sí mismo, un elemento de b-HLH a través del cual p53 es transactivado por elevados niveles de MYC y reprimido por el incremento en los niveles de MAX, entre otros (Hesketh, 1997). P53 carece de secuencias TATA o CAAT pero contiene una secuencia consenso hélice-horquilla-hélice corriente arriba (de -29 a -34 en el humano) del sitio de iniciación.

ESTRUCTURA DE LA PROTEINA

La proteína consta principalmente de tres dominios funcionales (Figura 3) que son:

- 1) el dominio de trans-activación transcripcional, hacia el extremo amino terminal que comprende los aminoácidos 1-42, es de carácter ácido y altamente hidrofóbico. Este dominio presenta los principales sitios de fosforilación para la activación transcripcional de la proteína.
- 2) el dominio de unión al DNA, entre los residuos 120-290, que está implicado en la unión directa al DNA y el reconocimiento de secuencias específicas de nucleótidos (en genes cuya transcripción es promovida por la región amino terminal) a través de dos copias de cualquier región que presente la secuencia consenso 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3'. Estudios con difracción de rayos X mostraron que este dominio se une al DNA a través de una conformación β plegada, formando una especie de sándwich, que actúa como andamio con tres horquillas. La horquilla 1 (LSH: horquilla-lámina-hélice) se une al surco mayor a través de una secuencia Arg, Lys, Cys, Arg, Ala y Arg, la horquilla 2 (L2) se une al surco menor a través de Ser y Arg y la horquilla 3 (LH: horquilla-hélice) se une a la L2 estabilizándola a través de la unión con Arg, Arg y un coordinado tetraédrico de zinc (Haffner, 1995; Hesketh, 1997). Se ha observado que en este dominio se encuentran la mayoría de las mutaciones asociadas a cánceres humanos, incluyendo los sitios calientes conocidos (codones 157, 175, 213, 245, 248, 249, 273, 282) (Haffner, 1995).
- 3) el dominio básico, carboxilo terminal, comprendido entre los aminoácidos 300 a 393. Entre los residuos 319-360 se encuentra una región flexible encargada de la formación de los tetrámeros, estado funcional activo de la proteína p53 que es el dominio de oligomerización. La cristalografía y las resonancias espectroscópicas han sugerido que esta porción está formada por monómeros de una lámina β antiparalela

y una α hélice también antiparalela que se asocian formando un dímero, y que dos dímeros se asocian a lo largo de una hélice-hélice paralela para formar un tetrámero, subunidad que se mantiene unida a través de múltiples interacciones moleculares (Haffner, 1995; Hesketh, 1997). Otro dominio bien definido es el dominio básico, que comprende el extremo carboxilo terminal. En este dominio se encuentran varios residuos que son fosforilados por diversas proteínas cinasas, fosforilación que se ha relacionado con el paso de la forma inactiva a la forma activa de unión y transactivación del DNA (Selivanova y Wiman, 1995; Oren y Prives, 1996).

Funcionalmente, los extremos amino y carboxilo terminales son reemplazables con dominios transactivadores y de oligomerización ajenos, sugiriendo que el dominio de unión al DNA por sí sólo confiere las propiedades supresoras a la proteína (Pietenpol, 1994).

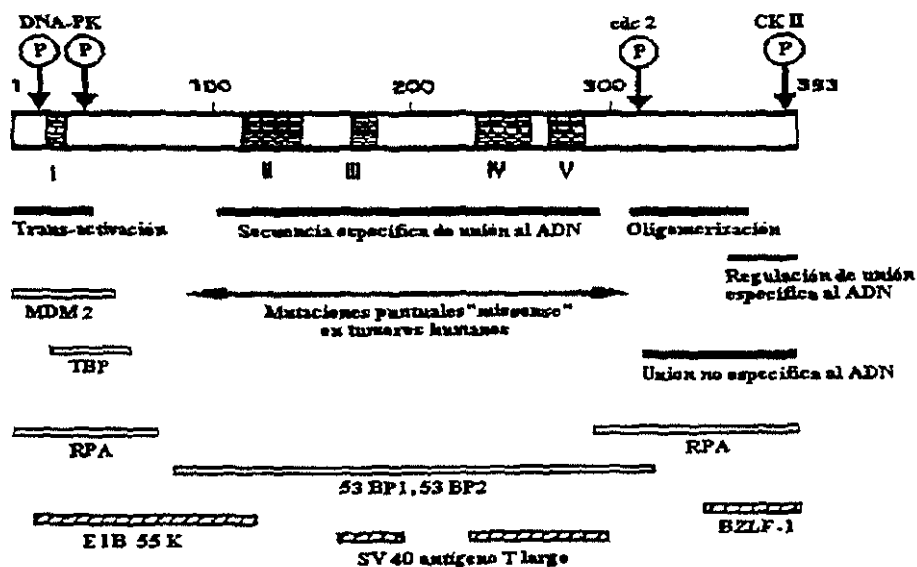


Figura 3. Dominios funcionales y regiones de interacción de la proteína p53 humana. Los dominios funcionales de la proteína son: 1) el dominio de trans-activación, en la porción amino terminal, 2) el dominio de secuencia específica del DNA con dedos de zinc, en la parte central y 3) el dominio de oligomerización y unión no específica al DNA, hacia el extremo carboxilo terminal. Los sitios de fosforilación para la proteína cinasa activada por el DNA (DNA-PK): Ser-15 y Ser-37; p34-cdc2; Ser-315 y CKIII; Ser-392, son indicados. Se muestran las zonas de la proteína p53 que interactúan con proteínas celulares o virales, la proteína de unión a la caja TATA (TBP), la proteína A de replicación (RPA), el producto del oncogen *mdm2*, las proteínas de unión 1 y 2 (ambas de 53 Kda), las proteínas del adenovirus E1B (55KDa), SV40 (antígeno T largo) y Epstein Barr (BZLF1). Los números romanos indican las regiones conservadas de la proteína (Tomado de Selivanova y Wilman, 1995).

MUTACIONES EN p53

Las mutaciones en este gen se presentan con una frecuencia de más del 50% en una gran variedad de tumores y cáncer (Hollstein *et al*, 1991), por ejemplo en el 30-86% de los casos de cáncer de mama, en el 44-61% del cáncer de ovario, en el 60% del de pulmón, en el 10-30% del de cerebro, en el 60% de los pacientes con linfoma de Burkitt, en el 97% de los melanomas y en el 80% de los adenocarcinomas de esófago, entre otros (Hesketh, 1997).

De acuerdo a lo anterior ahora se sabe que la pérdida de este gen predispone al cáncer. Se ha planteado que p53 actúa principalmente mediando la respuesta celular ante un daño al DNA, mediante dos mecanismos, el arresto del ciclo celular y la apoptosis previniendo así, la acumulación de mutaciones potencialmente oncogénicas y la inestabilidad genómica.

Un gran número de mutaciones involucran sustituciones de un solo par de bases pero aproximadamente el 10% del cáncer en humanos está caracterizado por deleciones o inserciones en el gen. Los residuos más frecuentemente mutados son aquellos que tienen que ver con el sitio de unión proteína-DNA y son aquellos que quedan en contacto directo con el DNA o aquellos que tienen un papel estabilizador. Las proteínas mutantes resultantes usualmente pierden la capacidad de unión con otros elementos alterando la capacidad de transactivación de p53 (Hesketh, 1997).

Se han detectado mutaciones somáticas en la mayoría de los exones pero la mayoría pueden incluirse en cuatro dominios altamente conservados en los vertebrados, que involucran los exones 5-10. Las mutaciones se encuentran entre los codones 120 y 290 y cerca del 50 % son mutaciones sin sentido que alteran uno de los cinco codones siguientes: 175, 248, 249, 273 y 282 siendo la consecuencia fenotípica de estas mutaciones la inactivación de la proteína (Magnelli, 1997). Por otro lado, los exones 7 y 8 son los que más frecuentemente presentan mutaciones germinales (Hesketh, 1997).

Con base en lo anterior, las mutaciones en p53 pueden ser 1) del tipo dominante negativo, cuando la proteína mutada anula la acción de la proteína silvestre, 2) cuando la mutación resulta en la pérdida de función del supresor y 3) cuando el resultado es una proteína que funciona como un promotor tumoral. Las mutaciones que producen una proteína anormal que inhibe la función del alelo normal del gen a través de la formación

de complejos proteicos mutante/silvestre se llaman mutantes trans-dominantes (Hesketh, 1997).

FUNCIONES DE LA PROTEINA p53

A nivel biológico, p53 tiene un papel clave en la respuesta celular ante el daño al DNA, ya que juega un papel clave en el mantenimiento y la estabilidad genómica, actividad que se lleva a cabo a través de la regulación de la respuesta celular ante el daño al DNA. P53 es parte de la respuesta al estrés determinando la supervivencia celular, la cual involucra la detención del ciclo celular con la subsecuente reparación del daño al DNA, la muerte celular, a través de la apoptosis o la detención permanente del ciclo la cual finaliza en la necrosis o la diferenciación (Schwartz, 1998).

Actualmente se sabe que la respuesta de p53 ante algún estrés, requiere de la activación de esta proteína, la cual usualmente va acompañada de su estabilización a través de la inhibición de la vía de degradación dependiente de MDM2 y de ubiquitinas, así como de su unión al DNA dañado (Hesketh, 1997). Algunos de los agentes físicos que activan p53 son la radiación gamma y ultravioleta, ciertas sustancias químicas, el estrés oxidativo y la falta de metabolitos, que entre otros efectos producen daño al DNA (Schwartz, 1998).

P53 es un factor transcripcional que regula el ciclo de las células normales al activar la transcripción de varios genes que poseen sitios consenso para p53 y que controlan la progresión a través de las fases del ciclo (Pietenpol, 1994), tal vez debido a la interacción con la maquinaria de transcripción. Se une a una gran variedad de proteínas por lo cual puede funcionar como transactivador y como un potente inhibidor de la transcripción de una amplia variedad de promotores celulares, esto mediante la interacción del dominio amino terminal de p53 con la proteína de unión a la caja TATA (TBP) (Seto *et al.*, 1992).

Wt-p53 posee una secuencia de unión específica al DNA que es fuertemente activada por factores que actúan a nivel del dominio carboxilo terminal y que promueven una mayor afinidad con los sitios consenso del DNA. Esta unión específica requiere de la oligomerización de p53 y de la ayuda de los tetrámeros para juntar sitios de unión en el DNA que se encuentren separados (Hesketh, 1997).

Los primeros 42 aminoácidos de p53 corresponden a la región mínima suficiente para llevar a cabo la función de transactivación, esta función se ve incrementada por la presencia de un elemento GC₃ (GCCCCGGGC) adyacente a la secuencia consenso (Hesketh, 1997). A nivel transactivador p53 incrementa la expresión de genes como p21 waf-1/cip-1, el cual inhibe al antígeno de proliferación nuclear (PCNA), a los complejos de ciclinas-G1/Cdk, a bax, un activador de la apoptosis y a bcl-2, quien promueve la supervivencia celular (Selivanova, 1995; Haffner, 1995). Esta misma función la hace al unirse vía su dominio ácido al amino terminal de MDM2 (gen del doble minuto de roedor 2), complejo que *in vitro* inhibe la transactivación mediada por p53.

P53 también regula la expresión de genes que codifican para productos que median la degradación proteolítica de la matriz extracelular y activa directamente, la transcripción del plasminógeno activador de la inhibición tipo 1 (PAI-1) (Hesketh, 1997).

También se ha visto que p53 tiene la capacidad de reprimir la traducción de ciertos RNAm, incluyendo el suyo, lo cual puede estar mediado por interacciones con elementos del RNA. Algunos de los genes cuya transcripción es reprimida por p53 son: β -actina, Bcl-2, DNA polimerasa α , c-fos, c-jun, c-myc, hsc-70, Mybb, MDR1, el promotor del complejo mayor de histocompatibilidad, IL-6, el antígeno de proliferación nuclear (PCNA), RB1, HPV 16 y 18 y topoisomerasa II α , entre otros (Ullrich, 1992). Cabe señalar que al parecer la supresión atribuible a p53 no requiere de su interacción directa con el DNA, sino que resulta de la asociación de p53 y la proteína celular TBP (proteína de unión TATA), esta última proteína parece ser esencial en la producción de los transcritos de las tres RNA polimerasas en mamíferos, o a la interacción con el factor de unión CCAAT (CBF) (Ginsberg, 1991; Oliner, 1993; Hesketh, 1997).

Además de las capacidades de activación y represión de p53, se ha postulado la idea de que p53 juega un papel importante en la síntesis y reparación del DNA ya que 1) posee capacidad exonucleasa (3' - 5') dependiente de Mg²⁺, actividad que reside en el dominio central y que le permite actuar como una enzima correctora o "lectora de prueba" de la DNA polimerasa (Hesketh, 1997), 2) forma complejos con ácidos nucleicos de una sola hebra y helicasas del DNA, ejerciendo una actividad de reasociación de hebras de DNA (Oliner, 1993), 3) posee una fuerte actividad en el reconocimiento de hebras DNA-DNA y RNA-RNA y 4) la molécula de p53 puede asociarse de manera covalente a una lista de proteínas de crecimiento, por ejemplo,

ERCC3, un factor implicado en la reparación por excisión, por lo que la interacción p53-ERCC3 involucra la reparación directa del DNA (Haffner, 1995).

REGULACIÓN DE p53

P53 participa en muchas funciones celulares como lo son la plasticidad del genoma, la diferenciación, el control del ciclo celular, la reparación del DNA y la muerte celular programada, funciones que deben ser moduladas y/o inhibidas por otras proteínas celulares como MDM2, ATM y el mismo p53 o la interacción con algunos virus en específico.

En tumores con MDM2 amplificado, la sobreexpresión de este gen bloquea eficazmente la habilidad de p53 para suprimir la tumorigénesis, a través de inhibir las funciones transactivacionales de p53, al "esconder" de la maquinaria transcripcional el dominio de activación de p53. MDM2 no sólo libera el bloqueo en la proliferación silenciando a p53 sino que además aumenta la proliferación al estimular un factor de transcripción inducido en fase S llamado E2F1/DP1 (Hesketh, 1997). Un giro a esta hipótesis, son los resultados que indican que MDM2 es un blanco transcripcional de p53, proponiendo una especie de autorregulación de p53 (Oliner, 1993). Un mecanismo alternativo a este, sugiere que p53 asociado a la proteína MDM2, se une a la proteína ribosomal L5 en un complejo ribonucleoproteico que también incluye las subunidades 5 S y 5.8 S del RNAr (Haffner, 1995).

Otra de las formas en las que p53 puede ser inactivado es a través de la asociación con productos de algunos oncogenes, tales como la proteína del antígeno T del virus SV40, la proteína del adenovirus E1B y la proteína E6 del papiloma virus humano (Cooper, 1995). Así, algunos de los mecanismos de neutralización de p53 son las mutaciones en el gen, la degradación mediada por HPV y la amplificación de MDM2 (Oliner, 1993).

Cabe señalar, de manera notoria, que una de las interacciones más interesantes es la de p53 con el gen de uno de los Síndromes de Inestabilidad Cromosómica, Ataxia telangiectasia (AT). Este gen de reciente clonación (ATM) codifica para una proteína quimera que consiste en un dominio "que detecta" el daño al DNA y un dominio en el carboxilo terminal, homólogo a la fosfatidil-inositol cinasa 3 (PI3K), con homología con varios genes de la levadura relacionados con la sensibilidad al daño al DNA inducido

por radiación y/o por otros agentes (Magnelli, 1997). Se ha visto que al tratar células normales con radiación, ATM funciona como cinasa fosforilando a p53 en respuesta al daño celular inducido, desencadenando una cascada génica que involucra tanto la detención del ciclo celular como la reparación del DNA, no solo a través de esta proteína sino a través de proteínas como NBS1 (Síndrome de Nijmegen) y BRCA1 (proteína del cáncer de mama-ovario). Es por ello que las células de pacientes con AT presentan incrementos subóptimos de p53, defectos en la fosforilación de este gen y un escaso arresto celular en G1 después de la exposición a radiación ionizante (Lim, 2000; Zhao, 2000).

Por otra parte, una de las asociaciones protéicas más recientes es la de p53 con el gen supresor de tumores WT1 (tumor de Wilm's), se ha demostrado que la función de cada una de estas proteínas es alterar la habilidad de la otra para reconocer su DNA blanco. A través de la unión con WT1, la habilidad de p53 para transactivar un reportero específico, se ve incrementada (Oliner, 1993).

RELACION DE LA EXPRESION DE p53 Y EL CICLO CELULAR

Varios experimentos han demostrado que p53 está involucrado en diversos puntos del ciclo celular, tanto en la proliferación normal celular como en la respuesta ante el daño al DNA, causado por diversos agentes físicos como las radiaciones o químicos como algunas sustancias o especies reactivas del oxígeno. De aquí que se conozca que dicha proteína puede adoptar dos conformaciones, una asociada a su habilidad para bloquear la progresión a través del ciclo celular, que corresponde al estado silvestre (wt-p53) y la otra asociada a su capacidad para promover la proliferación celular, que corresponde usualmente a los estados mutados y/o parecidos al silvestre, cabe mencionar que se ha visto que las células que presentan asociaciones entre las versiones silvestres y mutadas adoptan la conformación de p53 mutante, por lo que pierden su efecto antiproliferativo y dan pie a la malignización (Ullrich, 1992; Haffner, 1995).

Al respecto, estudios con diversos tipos celulares (células 3T3, células normales, linfocitos T de sangre periférica y fibroblastos diploides) han mostrado que los niveles de la proteína se mantienen relativamente constantes a lo largo de todo el ciclo celular y que la expresión de p53 se ve incrementada cuando las células en arresto son inducidas a

proliferar, observándose un pico máximo en la síntesis tanto de RNAm como de proteína en G1/S, justo antes de la replicación (Ullrich, 1992).

Es por ello que la idea de que p53 es una proteína reguladora de la proliferación es compatible con los datos que se tienen sobre ella, ya que presenta una vida media de 5 a 20 minutos en células normales, tiene localización nuclear, aunque durante un ciclo celular normal es retenida en el citoplasma para subvertir sus efectos antiproliferativos (Haffner, 1995).

Uno de los papeles centrales de p53 es el arresto de las células en la fase G1 del ciclo celular, sirviendo como un determinante de la estabilidad genómica y la supervivencia celular después de la exposición de las células hacia alguna sustancia o agente que dañe el DNA induciendo rompimientos. Se ha observado que aquellas células que carecen de p53 no pueden detenerse en el punto de monitoreo de G1 después de haber sido expuestas a radiación, aunque el punto de G2 se mantiene normal.

Debido a lo anterior se ha propuesto que p53 de alguna manera detecta el daño producido al DNA, provocando el detenimiento de las células en G1 para facilitar la reparación de estas antes de la replicación, si este daño no es reparado satisfactoriamente la célula optara por el camino de la apoptosis (Cooper, 1995), vía que también puede estar mediada por p53 o escapara de dicho control proliferando de manera incontrolada generando una nueva "estirpe celular" con alteraciones a nivel genético.

a) Regulación del punto de monitoreo G1/S:

La manera en que p53 logra la detención del ciclo en G1 es mediante su unión al DNA junto con la transcripción de diversos genes que actuarán como efectores físicos en respuesta al estrés o daño generado a nivel celular. Por una parte, p53 es fosforilado a través de ATM/DNAPK y/o la ciclina CDC2 u otras protein-cinasas para ejercer su acción como factor transcripcional, estimulando su unión a secuencias específicas del DNA (Oliner, 1993), bajo la acción de la ciclina B/CDC2 o la ciclina A/CDK2 p53 se une a los promotores de WAF1 y GADD45, el primero, un regulador de la proliferación normal que se une e inhibe a una variedad de ciclinas/CDK's y el segundo, un elemento involucrado en la reparación del DNA (Hesketh, 1997).

Por un lado, la proteína p21/WAF1 juega un papel crucial en la relación de p53 y la regulación del ciclo celular actuando como uno de los reguladores negativos de las Cdk's. La activación de p53, desencadena la transcripción del gen WAF1/CIP1, cuyo producto (p21) se acumula en el núcleo inhibiendo complejos de Cdk/ciclina (ciclina E/Cdk2, ciclina D/Cdk4), que a su vez son necesarios para la fosforilación de otros sustratos como la familia de proteínas pRb, quien se sabe que en estado hiperfosforilado libera a E2F, un factor de transcripción nuclear de varios genes involucrados en la transición G1/S, mediando así el bloqueo del ciclo celular y por lo tanto el arresto en la proliferación (Figura 5) (Haffner, 1995; Cooper, 1995).

Por otro lado, GADD45 es un gen ubico en las células de mamífero que se ha visto es inducido por el daño al DNA y el estrés. Se ha postulado que GADD45 es transactivado por p53 en respuesta al daño celular asociándose así al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), evitando la replicación del DNA a través de la interacción con los complejos de Cdk's (ciclina D1, E, Cdc2 y Cdk2) mediando el arresto del ciclo celular en G1 y la subsecuente reparación del daño al DNA (Figura 5) (Smith, 1994).

También se ha observado que la supresión de la proliferación es acompañada de un decremento significativo en los niveles de RNAm de genes que intervienen en la fase G1 como lo son: *b-myb*, PCNA y la DNA polimerasa α , cabe mencionar que no ha sido comprobado que esta disminución sea resultado directo de la represión transcripcional. Así, p53 puede funcionar como un modulador transcripcional que promueve o suprime la expresión de otros genes celulares que codifican para proteínas represoras y que a su vez actúan sobre blancos específicos en el proceso de replicación (Ullrich, 1992).

b) Regulación del punto de monitoreo G2/M:

Por otra parte, ha sido aceptado que p53 juega un papel como regulador secundario del arresto en G2, a través de la modulación de la actividad de la *cdc2*, la expresión de *waf1* y la regulación de la ciclina G. La duración del arresto en G2 depende del daño al DNA pero es independiente de p53, aunque se ha visto que las células que expresan el wt-p53 son más eficientes en la reparación, lo que permite inactivar el bloqueo en G2 mucho antes, en comparación con las células que presentan la versión mutada del gen. De esta manera las evidencias indican que p53 afecta la duración del arresto en G2 de dos maneras: por un lado, prolonga el arresto para dar mayor tiempo a

la reparación del daño antes de entrar a mitosis y por otro lado, contribuye a la eficiencia en la reparación lo que acorta este arresto, lo cual depende de la naturaleza y la cantidad de daño así como del tipo celular (Schwartz, 1998). Además también se ha visto que el punto de monitoreo situado en la profase de la meiosis, es parcialmente regulado por p53. Salazar (1998) demostró mediante ensayos *in vitro* de la proteína cinasa p34^{cdc2}, encargada de la fosforilación de la histona H1 para desencadenar el ensamblaje de los cromosomas para el inicio de la mitosis, que las células con p53 funcional se acumulan específicamente en la fase M del ciclo celular, después de haber sufrido un daño al DNA.

Otra de las relaciones que se han propuesto para p53 es la de esta proteína con el citoesqueleto, ya que en fibroblastos embrionarios de ratón que carecen de p53 se ha visto la aparición de múltiples copias de centrosomas (centro organizador de microtúbulos) antes de la mitosis lo que conlleva a una mala segregación de los cromosomas generando inestabilidad genómica y/o alteraciones en la ploidía celular (Fukasawa, 1996), estos mismos resultados se han observado en fibroblastos p53 -/- tratados con inhibidores de formación del huso mitótico, como colcemida o nocodazol, donde las células ignoran la falta del huso y entran a la fase G1, convirtiéndose en células aneuploides o poliploides (Cross, 1995).

Un ejemplo de las posibles alteraciones en los puntos de monitoreo antes mencionados es en pacientes con el Síndrome de Li-Fraumeni, un tipo de cáncer hereditario provocado por la existencia del gen p53 defectuoso. En las células de estos pacientes existe una deficiencia en el punto de monitoreo G1/S, además de alteraciones en la reparación a nivel de G2, lo que se manifiesta por elevadas frecuencias de rompimientos cromatídicos y gaps y el desarrollo de diversas neoplasias (Schwartz, 1998). Lo que pone en evidencia la importancia de fenómenos como la reparación, la detención del ciclo celular y la apoptosis en la estabilidad genómica y el bienestar celular.

APOPTOSIS y p53

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo mediante el cual las células comenten "suicidio". Se caracteriza por la condensación de la cromatina, la fragmentación internucleosómica del DNA por una endonucleasa dependiente de magnesio y la formación de vesículas con contenido celular, entre otros (Hesketh, 1997).

P53 tiene un importante papel en la apoptosis inducida por el daño al DNA. Actualmente se sabe que la señal activadora de este proceso es el rompimiento del DNA, producido ya sea de manera directa por algún agente o indirecta durante la reparación o la replicación (Haffner, 1995).

El detenimiento del ciclo celular, subsecuente al daño al DNA da a la célula un tiempo para reparar previniendo así la transmisión del DNA dañado a las células hijas. Para una célula tumoral en proliferación, la pérdida de p53 debe conllevar a una ventaja selectiva que promueva su multiplicación (Oliner, 1993). De aquí que la presencia de p53 funcional restrinja el desarrollo de tumores al promover la muerte celular de las células neoplásicas. La pérdida en la función de este supresor contribuye entonces a la progresión cancerosa, al permitir el crecimiento celular desregulado (Haffner, 1995). Es por ello, que a pesar de que la supresión de la proliferación y la apoptosis son procesos diferentes, ambos son muy importantes ya que tienen como fin el prevenir la propagación de células cuyo material genético porta alteraciones y/o mutaciones. Además, el papel de p53 en la apoptosis no sólo se limita al daño al DNA sino que también se ha visto que presenta actividad en respuesta a la falta de factores de sobrevivencia hematopoiética (Haffner, 1995).

Existe una amplia relación entre la apoptosis mediada por p53 y el arresto celular en G1. Al respecto, se ha visto que la apoptosis se debe a la omisión de la detención en este punto de monitoreo subsiguiente a la activación de p53, respuesta que puede ser abolida por la IL-6. También se ha propuesto que esta apoptosis puede deberse a la ausencia de pRb funcional en las células, lo que provoca que no haya un paro en G1 y por tanto que la siguiente respuesta sea la vía de la apoptosis. Por ende, el restablecimiento de la actividad de pRb rescata a las células de la muerte celular programada (Haffner, 1995).

Se ha propuesto un mecanismo dual para explicar la apoptosis dada por p53, este modelo asume que la activación de p53 da lugar a dos respuestas paralelas. Por un lado, la inducción de WAF1 y otros genes que mandan a la célula a un arresto en G1 y por el otro, p53 activa la vía apoptótica a través de la inducción de genes como BAX (Haffner, 1995) o mecanismos alternativos (Figura 4).

Tanto la regulación de la proliferación como la apoptosis pueden ser inducidas por una variedad de genes y/o sus productos, tal es el caso de la familia de citocinas

TGF β y el supresor de tumores p53, quienes pueden desempeñar estos papeles a través de la inhibición de otros genes que promueven tanto la proliferación como la supervivencia celular, como es el caso de BCL2, quien para ser regulado se une a su antagonista BAX. Se ha establecido que la manera en que funcionan estas proteínas análogas es formando dímeros, de tal manera que si hay una mayor cantidad de homodímeros de BAX, esta ejercerá su función apoptótica, pero si por el contrario hay más homodímeros de BCL2, este actuará inhibiendo la apoptosis. Cabe señalar que BAX puede ser inducido directamente por p53 o a través de la coexpresión de p53 con el factor de transcripción MYB, mecanismo que indirectamente eleva la transcripción de BAX. Por ejemplo, en ratones p53 (-/-) los niveles de BCL2 están incrementados y los de BAX están reducidos, situación que se ve revertida cuando hay expresión ectópica de p53 (Hesketh, 1997) (Figura 5). Una vía alternativa es la estimulación de componentes mitocondriales por BAX, como el citocromo C, que a su vez induce la activación de caspasas generando así la muerte celular (Shostak, 1999). Las caspasas son una familia de proteasas cisteína-dependientes, aspartato-específicas que pueden ser inducidas por diversas proteínas celulares. Estas enzimas son altamente específicas en su acción, activando o inhibiendo diversas moléculas clave en la célula. Para ejecutar la apoptosis interaccionan con proteínas como la PARP y la DNA-PK involucradas en la reparación, ATM, RB, la laminina B (proteína estructural de la membrana nuclear) y la histona H1, entre otras (Cohen, 1997; Smith, 1999), modificando así procesos como el ciclo celular y la reparación.

Por último cabe mencionar que el papel de p53 en la apoptosis es aún controversial, este y otros puntos sobre las funciones de p53 son fuente de diversos estudios con el fin de poder dilucidar las diversas interacciones entre la célula y/o organismo con el ambiente que le rodea.

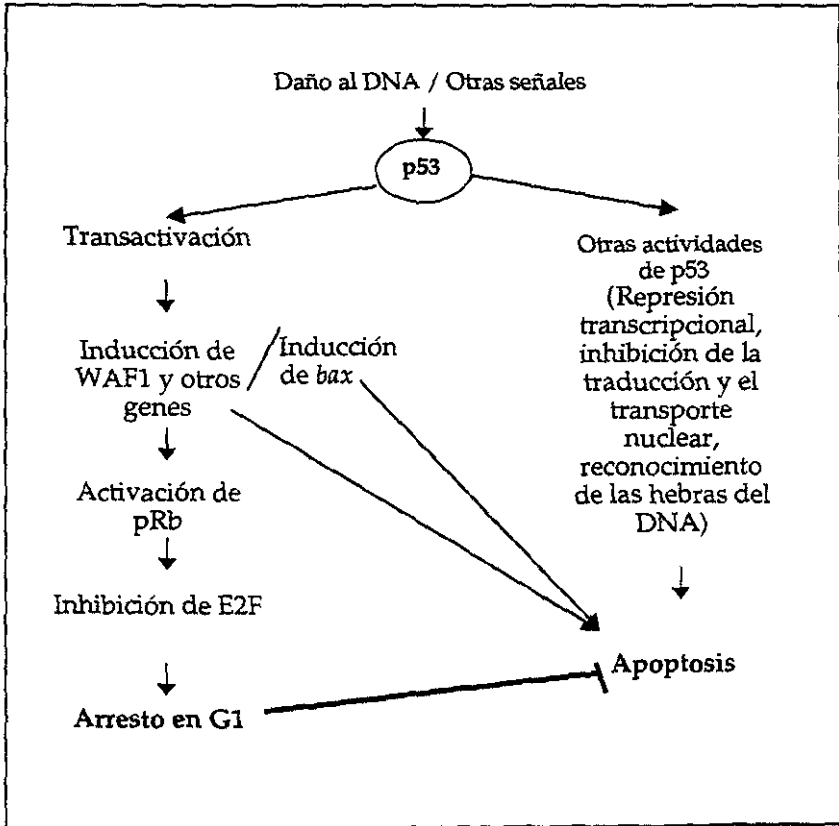


Figura 4. Posible mecanismo molecular del arresto en G1 y la apoptosis, dependientes de p53.

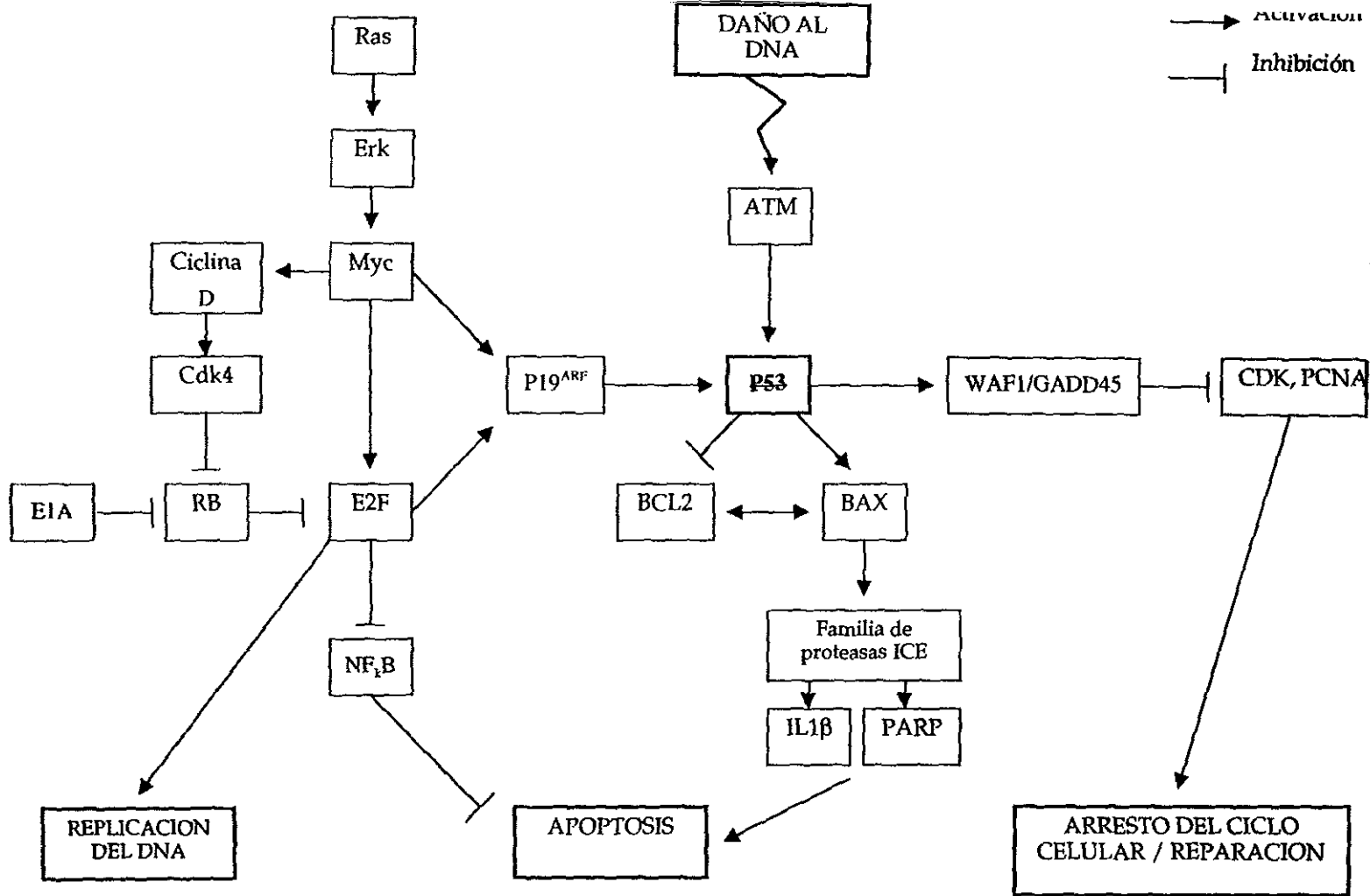


Figura 5. Cascada génica de la regulación del ciclo celular y la apoptosis, en células de mamífero (Modificada de Hesketh, 1997; Wang, 2000)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hidroarsenicismo se ha vuelto un problema alarmante a nivel mundial debido al creciente número de comunidades expuestas a este metaloide y a sus efectos tanto toxicológicos como carcinogénicos, tal es el caso de lugares como Taiwán, Bangladesh, India y México (Ostrosky, 1991; Cebrián, 1994; Gou, 1994; Tondel, 1999; Chowdhury, 2000). Aunque la ingestión no es la única vía de exposición a este metaloide, existen otras como la aérea y la cutánea, puede ser que si sea la más importante debido a la forma masiva de distribución (cantidad de personas que se encuentran involucradas) y al tipo de efectos que pueden observarse. Las principales evidencias sobre la carcinogenicidad de este metaloide provienen de estudios epidemiológicos que corroboran su papel como un inductor de cáncer de piel, hígado y riñón principalmente.

Al respecto se han diseñado diversas estrategias para evaluar los posibles mecanismos a través de los cuales dicho metaloide provoca estos efectos, observándose que algunas de las vías involucradas a nivel celular son el ciclo celular y la reparación. Se sabe que el arsenito de sodio causa amplificación génica (Lee-Chen, 1992) y alteraciones cromosómicas (Ostrosky, 1991; Gonsebatt, 1992; Vega, 1995), además de afectar la proliferación celular de linfocitos tanto de personas naturalmente expuestas como de aquellos tratados *in vitro* (Ostrosky, 1991; Gonsebatt, 1992 y 1994) e inducir la expresión de genes centinela como p53 (Salazar, 1997). Es importante mencionar que algunos de estos estudios (Vega, 1995) han demostrado que existe una diferente susceptibilidad individual en poblaciones expuestas de manera crónica al As con respecto a los posibles efectos de este metaloide, es decir, existen personas que se ven más o menos afectadas por este compuesto. Además, algunos autores han propuesto la inhibición de enzimas involucradas en la reparación postreplicativa (Okui, 1986) o la alteración en el control de esta reparación (Rossman, 1998), procesos que conllevan a la inestabilidad genómica y por tanto al cáncer. Varios mecanismos se han propuesto para explicar los efectos observados, por una parte la inestabilidad genómica podría deberse a la acción de este metaloide sobre procesos clave como la polimerización y despolimerización de los microtúbulos (Ramírez, 1997) y por otra, la integridad celular pudiera involucrar procesos como la función enzimática, la reparación y la modulación y/o regulación de genes específicos. De manera tal que se vuelve interesante el tratar de entender los mecanismos por los cuales se dan estas modificaciones primero a nivel genético y/o individual para luego extrapolarlo a la población en general.

Como ya se mencionó anteriormente, diversas estrategias se han diseñado para estudiar como es que el arsénico es transformado en nuestro cuerpo dando lugar a tan diversos efectos y con tal variabilidad, por lo que este trabajo tiene la finalidad de tratar de entender cómo es que se da la susceptibilidad individual y de qué depende, partiendo de la idea básica de que el hombre, en particular, es un conjunto de genes que interactúan y se expresan de manera distinta dependiendo tanto de la información que contienen como de la interacción con el ambiente, dándonos como resultado el que una persona pueda ser o no afectada por la interacción con carcinógenos ambientales como el arsénico.

Entre los modelos que se utilizan con dicha finalidad y han tomado fuerza en la actualidad, se encuentran los Síndromes de Inestabilidad Cromosómica (SIC), tal es el caso de Xeroderma pigmentosum y Ataxia telangiectasia, enfermedades autosómicas recesivas con inestabilidad cromosómica y predisposición a cáncer que han aportado gran información sobre las vías y cascadas génicas involucradas en la susceptibilidad al cáncer. De esta forma en el presente estudio se utilizó a la anemia de Fanconi, enfermedad clasificada dentro de los SIC, que cursa con las características típicas de estos síndromes, además de presentar sensibilidad a algunos agentes clastogénicos y heterogeneidad genética, lo que permite tener dentro de una misma enfermedad diferentes genes involucrados aunque el resultado fenotípico sea el mismo. Cabe señalar que a pesar de que se desconoce hasta el momento el defecto básico de esta enfermedad, se ha postulado la existencia de alteraciones en las vías de reparación y ciclo celular, vías en las que se encuentra involucrado el gen p53, conocido como el "guardián del genoma" y cuya participación en la estabilidad genómica y celular es bien conocida.

De esta manera, podemos pensar que el que algunas personas se presenten como hiper-reactivas y/o más sensibles con respecto a algunas sustancias puede deberse a la presencia de heterocigosidad para algunos genes, entre ellos los de los SIC y que de esta forma exista variación en las vías que controlan la estabilidad genómica celular, que al final se ven reflejadas en la presencia o ausencia de un cáncer.

OBJETIVOS GENERALES

Determinar la sensibilidad a los efectos citotóxicos del arsenito de sodio en líneas linfoblastoides de cinco grupos de complementación de anemia de Fanconi y una línea normal.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la viabilidad celular, por el método de diacetato de fluoresceína, de las diferentes líneas celulares, después de ser tratadas con arsenito de sodio por 24 horas.

Evaluar los niveles de expresión de la proteína p53, usando un anticuerpo monoclonal específico, en las diferentes líneas celulares, después del tratamiento con arsenito de sodio.

Establecer si existen diferencias en susceptibilidad entre las seis líneas linfoblastoides, en cuanto a los dos parámetros antes mencionados.

HIPOTESIS

Si la anemia de Fanconi presenta *per se* hipersensibilidad a distintos agentes clastogénicos, entonces las líneas linfoblastoides de dicha enfermedad, tratadas con arsenito de sodio, mostrarán una mayor citotoxicidad y una diferente expresión de la proteína p53, en comparación con las líneas linfoblastoides normales, con respecto al daño causado por este metaloide.

METODO

Las líneas linfoblastoides provenientes de linfocitos de pacientes con anemia de Fanconi fueron transformadas con el virus de Epstein Barr para su inmortalización. Las líneas utilizadas fueron FA-A, FA-B, FA-C, FA-D, FA-E y una línea transfectada y corregida con la versión normal del gen (HSC 72OT + FANCA flag pDR2) (Tabla 2). Las primeras cuatro donadas por el Dr. Manuel Buchwald, del Hospital for Sick Children, Toronto Canadá y las dos últimas donadas por el Dr. Hans Joenje de la Vrije Universiet, Amsterdam.

Nombre designado	Línea utilizada
Normal	HSC 72OT + FANCA flag pDR2
FA-A	HSC 72OT
FA-B	HSC 230
FA-C	HSC 536
FA-D	HSC 62N
FA-E	EUFA 130

Tabla 2. Correlación de las líneas linfoblastoides utilizadas con su respectivo grupo de complementación y/o fenotipo celular.

Cultivo de líneas celulares:

Las líneas celulares de anemia de Fanconi junto con la línea linfoblastoide normal, fueron cultivadas con medio RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco) inactivado a 56 °C, 1 % de aminoácidos no esenciales 10 mM (Gibco), 1 % de L-glutamina (Gibco) y 1 % de piruvato de sodio 100mM (Gibco). Posteriormente se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂, hasta alcanzar un crecimiento exponencial.

Tratamiento con arsenito de sodio:

Se preparó una solución stock de arsenito de sodio 1 mM en agua estéril y se hicieron diluciones en medio suplementado para obtener las siguientes concentraciones finales: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25 y 50 µM.

Posteriormente se cultivaron de 1 a 1.5 x 10⁶ células durante 24 horas, después de transcurrido este tiempo, se agregaron las concentraciones deseadas de arsénico a cada línea celular, utilizando un control negativo (sin tratamiento) y un control positivo

de daño al DNA (10 ng/ml MMC) y se dejaron los cultivos por 24 horas más. Este tratamiento se aplicó para la medición de la viabilidad celular por el método de diacetato de fluoresceína - bromuro de etidio, el ensayo de exclusión por azul tripano y la expresión de la proteína p53 (Figura 6). Para cada ensayo se hicieron tres repeticiones independientes.

Análisis de la citotoxicidad:

La viabilidad celular se evaluó al finalizar los tratamientos por los ensayos de diacetato de fluoresceína (FDA)/bromuro de etidio (BrEt) y exclusión con azul tripano (AT).

Para el primer ensayo se usó una solución de FDA/BrEt, preparada como se indica a continuación: 30 μ l de FDA en acetona (5 mg/ml), 200 μ l de BrEt en una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) (200 μ g/ml) y 4.8 ml de PBS (Hartmann y Speit, 1995).

Primeramente, las alícuotas de cada tratamiento se centrifugaron y se lavaron una vez con PBS, el botón se resuspendió en 150 μ l de medio y de esta suspensión se tomaron 10 μ l que se agregaron a 10 μ l de solución de tinción. La mezcla se colocó en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se contaron 100 células en el microscopio de fluorescencia, diferenciando las células vivas (verde fluorescente) de los núcleos de las células muertas (naranja -rojo) (Strauss, 1991). Para cada una de las líneas se hicieron cinco conteos y tres repeticiones independientes.

Para el segundo ensayo se realizó la misma dinámica pero mezclando 10 μ l de AT con 10 μ l de solución de cultivo. Se tomaron 10 μ l de la mezcla, se pusieron en un hematocitómetro y se contaron 100 células en el microscopio óptico, diferenciando las células viables (refringentes y translúcidas) de las muertas (azules y con apariencia rugosa). Esta prueba sólo se utilizó en las curvas para la elección de los tratamientos y el método de evaluación de la citotoxicidad.

Cuantificación de proteína por Western blot:

Después del tratamiento, los cultivos celulares se lavaron con PBS, este último se retiró y se agregó una solución salina amortiguadora de fosfatos [que contenía 1 % de Nonidet P40, 0.5 % de deoxicolato de sodio, 0.1 % SDS, 0.1 % de PMSF (3 mM), 0.1 % de aprotinina (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 0.1 % de ortovanadato de sodio (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y azida de sodio], para lisar las células y así poder separar las proteínas. Esta suspensión se centrifugó durante 30 minutos y se separó el sobrenadante que es el material proteico.

Por medio del método de Lowry se cuantificó la concentración total de proteína en las células, como se explica a continuación: se puso un volumen conocido del lisado total con 5 ml de la solución de Lowry [A (NaOH 0.1N y Na_2CO_3 al 2%); B (Tartrato de sodio y potasio al 2%) y C (Sulfato de cobre al 1%)] y se agregaron 500 μl de reactivo de Folin, se dejó reposar durante 30 minutos y se efectuó la lectura a 625 nm en el espectrofotómetro.

Se realizó una curva de calibración con albúmina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y los valores obtenidos fueron los μg de proteína en los μl de muestra tomada, el volumen total necesario para la electroforesis se calculó dependiendo de los μg de muestra que se deseaban utilizar.

Posteriormente se montó el dispositivo para electroforesis y se prepararon los geles de separación (10%) y alineación (4%) de poliacrilamida - SDS; se calentaron 50 μg de muestra por 5 minutos en una solución amortiguadora de muestra para corrimiento (2 % SDS, 80 mM Tris pH 6.8, 10 % de glicerol, 5 % de 2-betamercaptoetanol y 0.01 % de azul de bromofenol) y luego cada alicuota se puso en un carril del gel de alineación, una vez hecho esto se llevó a cabo la corrida, a 4°C con buffer de corrida y un voltaje inicial de 100 V, durante 100 minutos. Al finalizar esto, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por medio de electrotransferencia durante una hora a baja temperatura. El gel se dejó en una solución de azul de Coomassie y la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche en polvo baja en grasas al 2 % y albúmina sérica (0.5%) en TBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esto el gel se puso en una solución desteñidora y la membrana se lavó tres veces con una solución 1 % de TBS - Tween, luego se agregó 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo anti-p53 y se dejó incubando toda la noche con agitación constante en refrigeración. Como control de la cantidad de proteína corrida en el gel, se incubó la membrana con el anticuerpo para actina. Se repitieron los

lavados. La detección de p53 se hizo con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa en una dilución 1:3000 y para actina se utilizó anticuerpo de cobayo también acoplado a peroxidasa, por una hora. La membrana se volvió a lavar, igual que en los casos anteriores, se reveló mediante el sistema de quimioluminiscencia por el método ECL (Amersham) y se expuso a una placa de rayos X. Para terminar se realizó la densitometría de las bandas con el software Quantity-One de BIO RAD.

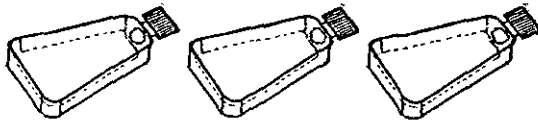
Análisis estadístico:

Después de obtener la citotoxicidad, se comparó el efecto de los diferentes tratamientos de As intralínea e interlínea aplicando el análisis estadístico de F de Tukey para varianzas no homogéneas con una $p < 0.05$.

Análisis de resultados:

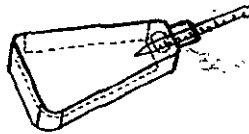
Posteriormente se compararon los resultados de la viabilidad y la expresión de la proteína p53 dentro de una misma línea y entre las diferentes líneas linfoblastoides para ver si existía alguna alteración, dada por la exposición al arsenito de sodio, en mecanismos que involucran el ciclo celular (viabilidad y expresión de ciertos genes) y si estas diferencias mostraban una susceptibilidad individual o diferencia interlínea.

CULTIVOS CELULARES



TRATAMIENTO CON As

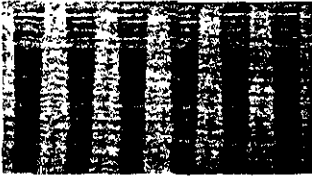
0.001, 0.01, 0.1, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25 y 50 μM



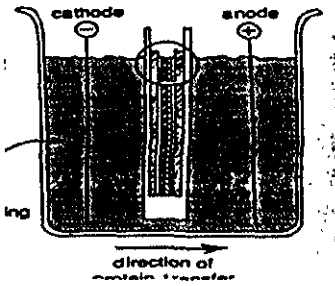
24 horas



Electroforesis



Transferencia



Inmunodetección de p53



Análisis densitométrico

Evaluación de la viabilidad celular



Análisis estadístico (F de Tukey)



Comparación intra e interlínea

Figura 6. Representación gráfica del método utilizado.

RESULTADOS

a) Efecto citotóxico del arsenito de sodio:

Con el objeto de elegir el mejor método para evaluar los efectos citotóxicos del arsenito de sodio y determinar el intervalo de concentraciones en el que se iba a trabajar, se realizaron curvas dosis-respuesta en las diferentes líneas linfoblastoides, utilizando el ensayo de exclusión con azul tripano (AT) y el ensayo de dicetato de fluoresceína-bromuro de etidio (FDA/BrEt).

Después de haber tratado las células correspondientes a los grupos de complementación A, C, D y E, con arsenito de sodio por 24 horas, se observó que el ensayo de FDA/BrEt era el método más sensible debido a que se basa en la integridad nuclear y lisosomal de la célula y su actividad metabólica, mientras que AT sólo evidencia el daño a nivel de membrana celular, debido a lo anterior en experimentos posteriores solo se utilizó FDA/BrEt para evaluar la citotoxicidad producida por el arsénico (Apéndice 1).

Por otra parte, con el fin de ver la relación dosis-efecto y eliminar los tratamientos que pudieran ser citotóxicos, se realizaron curvas de viabilidad tratando las líneas linfoblastoides FA-A, FA-C, FA-D y FA-E, por 24 horas usando las siguientes concentraciones de arsenito de sodio: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 25 y 50 μM . Para este experimento sólo se hizo una repetición y no se aplicó prueba estadística ya que sólo se querían obtener las concentraciones que se iban a utilizar subsecuentemente. Los resultados mostraron que en el intervalo de 0.001 a 1 μM , la viabilidad se mantiene por arriba del 80% y no existen diferencias en la respuesta entre las distintas líneas linfoblastoides, por lo que se decidió utilizar la concentración de 1 μM como única para ese intervalo. Por otro lado, tanto en 25 como en 50 μM el porcentaje de células muertas fue igual o mayor al 80% sin existir diferencia entre los tratamientos, por lo que se eliminó la concentración de 50 μM . Con lo que respecta al intervalo de 1 a 10 μM , se vio que existían variaciones en la disminución de la viabilidad dependientes de la línea celular utilizada y que en algunos casos existía una disminución drástica de este parámetro de una concentración a otra (ya fuera de 1 a 5 μM o de 5 a 10 μM), por lo que para ver con más detalle este decremento en la viabilidad se decidió utilizar tratamientos intermedios a estas concentraciones, los cuales fueron 2.5 y 7.5 μM (Apéndice 1).

Una vez que se establecieron las concentraciones y el método mediante el cual se iban a evaluar los efectos citotóxicos del arsenito de sodio se prosiguió con el tratamiento y evaluación de las seis líneas linfoblastoides: normal, FA-A, FA-B, FA-C, FA-D y FA-E.

La exposición de las líneas celulares de anemia de Fanconi y la línea normal, al arsénico por 24 horas mostró diferentes respuestas citotóxicas, para todos los linfoblastos en general y de manera cualitativa se observaron cambios en dos parámetros: por un lado la morfología celular iba cambiando con respecto a las concentraciones utilizadas, es decir, al inicio las células eran refringentes y turgentes, mientras que al ir aumentando la concentración disminuían su tamaño, la superficie membranal perdía su forma y se llegaba a la crenación en la mayor concentración, mientras que por otro lado, la densidad celular también iba en decremento al aumentar la concentración de arsénico, de manera tal que en las últimas concentraciones utilizadas el número de células por campo en el microscopio era mucho menor con respecto al control (Figura 7). Además, de manera cuantitativa existe en todas las líneas una disminución en la viabilidad con respecto a la concentración de arsenito de sodio de manera inversa, es decir, la viabilidad decrece conforme aumenta la concentración de dicho metaloide. En la Tabla 3 se puede ver que las seis líneas linfoblastoides presentan un comportamiento similar hasta la concentración de 2.5 μM , oscilando la viabilidad entre el 98 y el 92%. A partir de 5 μM , cada una de las líneas comienza a tener una distinta sensibilidad con respecto a los efectos del arsenito de sodio; mientras que FA-C se muestra como la línea más sensible con un cambio significativo en la viabilidad en 5 μM , las demás líneas lo hacen en 7.5 y 10 μM , notándose que AF-B y AF-D son aquellas cuyo comportamiento es similar a la línea normal. También se puede apreciar que el punto en el cual la viabilidad disminuye a menos del 50% (LD_{50}) es diferente en cada línea: para FA-C es en la concentración de 7.5 μM , para FA-A y FA-E es en 10 μM y para FA-B, FA-D y normal en 25 μM . Cabe señalar que en algunas líneas el cambio es tan drástico que ni siquiera se presenta una disminución paulatina de la viabilidad, ni una concentración de arsenito de sodio específica para la LD_{50} , tal es el caso de las líneas normal, C, D y E. De acuerdo a lo anterior, estas diferencias en la sensibilidad pueden describirse según el siguiente gradiente:

$$\text{FA-D} \leq \text{normal} < \text{FA-B} < \text{FA-A} \leq \text{FA-E} < \text{FA-C}$$

Lo anterior con respecto al comportamiento interlínea. Ahora, en lo concerniente al comportamiento intralínea, se observan diferencias significativas (F de Tukey; $p < 0.05$) en la viabilidad, al comparar las células de cada una de las líneas por separado sin y con tratamiento a partir de $5 \mu\text{M}$ (Figura 8).

b) Detección de la proteína p53 en las líneas linfoblastoides tratadas con arsenito de sodio:

Otro parámetro evaluado fue la modulación de la proteína p53. Con el objeto de determinar si el arsenito de sodio tenía algún efecto con respecto a la expresión de los niveles de la proteína p53, las diferentes líneas linfoblastoides fueron cultivadas con dosis de 1, 5, 10 y $25 \mu\text{M}$ de arsenito de sodio por 24 horas, utilizando como control positivo MMC y como control negativo células sin tratamiento, después de lo cual se hizo una evaluación dosis-efecto, utilizando la técnica de Western blot y el análisis por inmunodetección específica para esta proteína.

La expresión basal de la proteína p53 se evaluó mediante la técnica de Western blot a través de anticuerpos monoclonales específicos para p53, encontrándose, cualitativamente, una expresión similar en todas las líneas linfoblastoides aunque al parecer para el caso de FA-A el nivel basal es aparentemente menor y para FA-B existe un estado inducido (Figura 9), cabe señalar que cuando se realiza el análisis densitométrico de las bandas para obtener los valores relativos de expresión proteica, es necesario igualar los niveles basales a 1 para poder comparar de manera cuantitativa .

Los resultados de los tratamientos con las diferentes concentraciones de arsenito de sodio indican que los puntos de inicio y máxima inducción varían según la línea linfoblastoide (Tabla 4) como se explica a continuación: para la línea normal, la inducción a lo largo de todas las concentraciones es baja en general, siendo que el punto de inicio es en $1 \mu\text{M}$ y el nivel máximo alcanzado es en $25 \mu\text{M}$ (Figura 10). Para FA-A el inicio de la inducción se encuentra en $1 \mu\text{M}$ y el punto de máxima inducción en $5 \mu\text{M}$, concentración después de la cual los niveles de la proteína comienzan a decrecer, lo cual correlaciona con los resultados de viabilidad y/o muerte celular a estas dosis (Figura 11). Para FA-B, los niveles de la proteína se mantienen más o menos constantes a lo largo de todas las concentraciones excepto en $10 \mu\text{M}$, donde se ve la máxima inducción (Figura 12). FA-C resulta ser otra vez la línea linfoblastoide más sensible, con los niveles de respuesta más elevados, comenzando la inducción en $1 \mu\text{M}$ y aumentando

progresivamente hasta llegar al punto máximo en 25 μM (Figura 13). FA-D, comienza la inducción en 5 μM , llega al máximo nivel en 10 μM y decae en 25 μM (Figura 14), por último FA-E, presenta el inicio de inducción en 1 μM , llega a la máxima inducción en 10 μM y decrece en 25 μM (Figura 15). Presentándose así una respuesta muy similar a la observada en los ensayos de citotoxicidad.

[As] (μM)	VIABILIDAD (%)					
	NORMAL	FA-A	FA-B	FA-C	FA-D	FA-E
0	100	100	100	100	100	100
1	99.12 \pm 2.8	100 \pm 4.0	100 \pm 1.8	97.65 \pm 1.6	99.59 \pm 1.6	97.90 \pm 1.9
2.5	95.12 \pm 2.7	94.37 \pm 4.3	95.02 \pm 3.0	97.36 \pm 2.8	96.11 \pm 2.8	92.28 \pm 4.0
5	89.13 \pm 5.1 *	86.45 \pm 5.6 *	90.62 \pm 2.6 *	65.91 \pm 11.3 *	94.30 \pm 4.3 *	81.81 \pm 8.6 *
7.5	78.42 \pm 2.7 *	67.02 \pm 8.1 *	76.39 \pm 9.3 *	<u>33.65 \pm 11.1</u> *	88.05 \pm 2.3 *	66.93 \pm 5.1 *
10	62.03 \pm 8.0 *	<u>50.34 \pm 12.8</u> *	59.28 \pm 4.7 *	17.86 \pm 4.1 *	79.22 \pm 5.7 *	<u>37.85 \pm 16.8</u> *
25	<u>13.43 \pm 2.6</u> *	7.84 \pm 2.3 *	<u>2.38 \pm 0.9</u> *	3.38 \pm 1.5 *	<u>9.59 \pm 3.1</u> *	2.53 \pm 1.3 *
MMC	96.32 \pm 5.8	97.19 \pm 4.4	91.34 \pm 3.4	88.03 \pm 5.6	94.79 \pm 1.5	95.65 \pm 2.2

Tabla 3. Viabilidad celular de seis líneas linfoblastoides, tratadas con arsenito de sodio durante 24 horas, medida por el método de FDA/BrEt. Las diferencias intralínea, es decir, entre las concentraciones de arsenito de sodio y su respectivo control, fueron significativas para todas las líneas a partir de 5 μM (*). Por otro lado, se indican en negritas los valores en los cuales el comportamiento de esa línea celular es significativamente diferente al de las demás y con cursivas subrayadas el punto en el que la viabilidad celular es menor o igual al 50%. Promedio de tres repeticiones independientes a las que se les aplicó la prueba de F de Tukey (* $p < 0.05$).

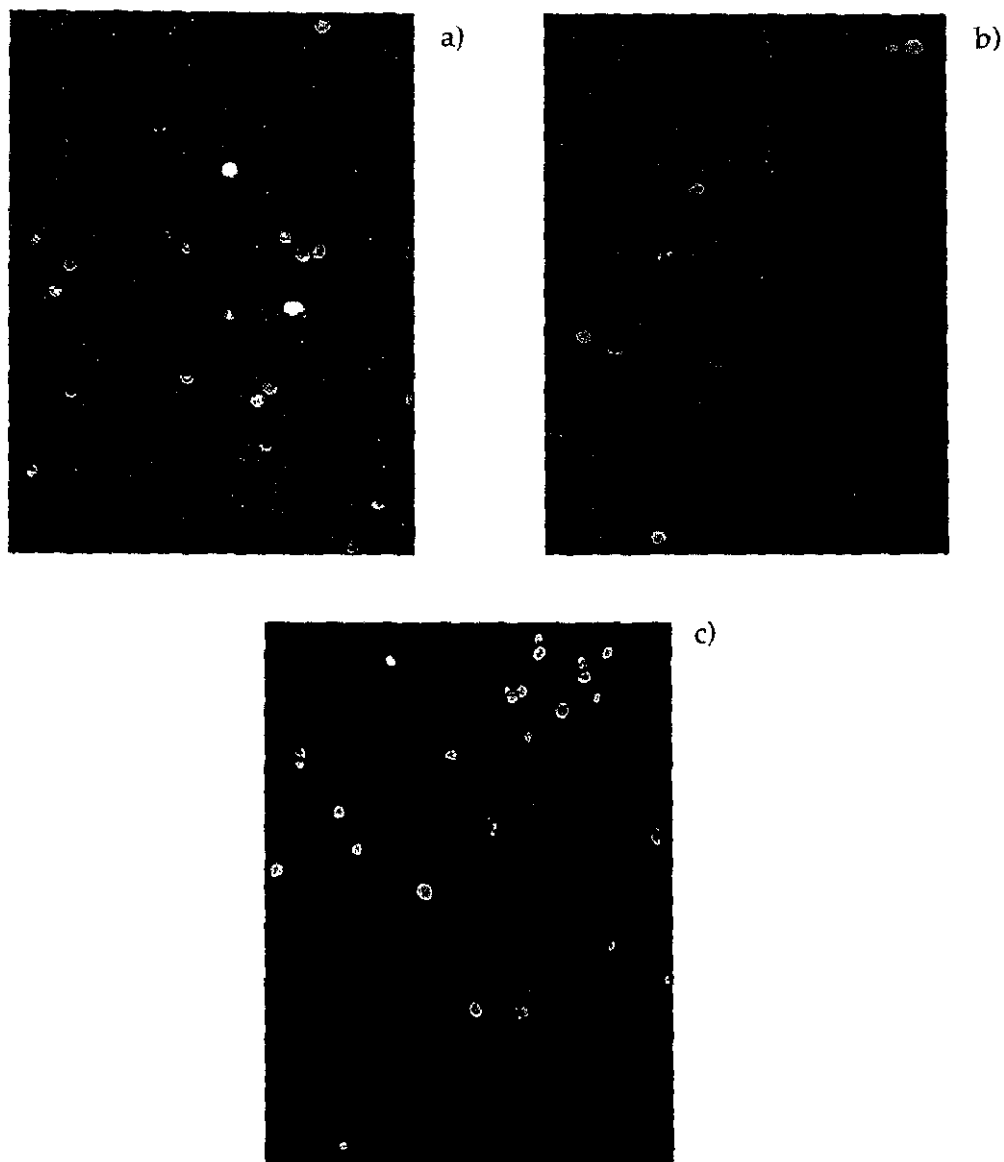


Figura 7. Células de anemia de Fanconi tratadas con diferentes concentraciones de arsenito de sodio durante 24 horas. Se muestran las tomas al microscopio de fluorescencia teñidas con FDA/BrEt, a) control sin tratamiento, b) 5 μ M y c) 25 μ M.

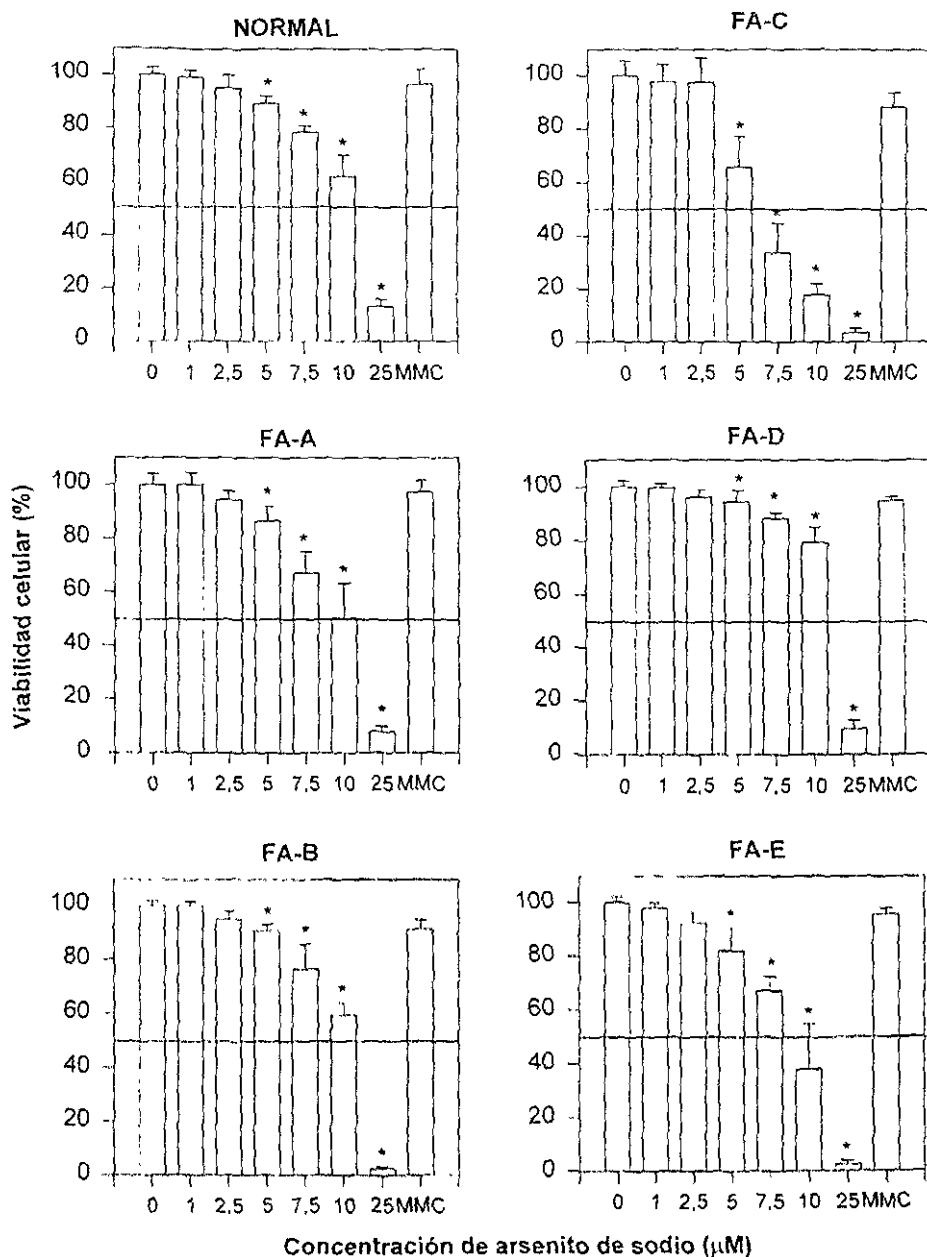


Figura 8. Viabilidad celular de las diferentes líneas linfoblastoides. La viabilidad fue determinada por el ensayo de FDA/BrEt, después de haber tratado las diferentes líneas por 24 horas con las concentraciones indicadas de arsenito de sodio, utilizando como control positivo MMC. Promedio de tres repeticiones independientes donde el tratamiento fue significativo (* $p < 0.05$) a partir de la concentración de 5 μM .

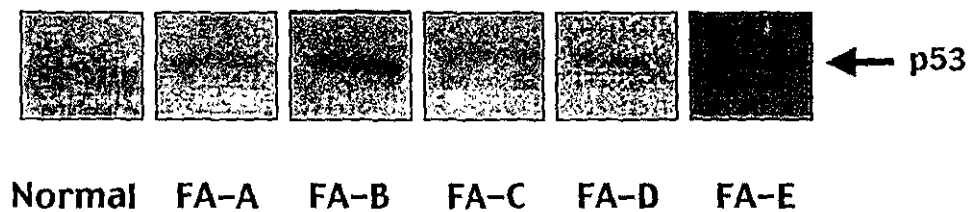


Figura 9. Expresión basal de la proteína p53 en las diferentes líneas linfoblastoides estudiadas. El análisis de la proteína se realizó mediante la técnica de Western blot, utilizando 50 μ g de proteína total.

[As] (μ M)	DENSIDAD OPTICA (Unidades relativas)					
	NORMAL	FA-A	FA-B	FA-C	FA-D	FA-E
0	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.09
1	1.17 ± 0.02	1.28 ± 0.07	1.05 ± 0.03	1.38 ± 0.03	1.05 ± 0.04	1.42 ± 0.04
5	1.45 ± 0.06	1.53 ± 0.09	1.23 ± 0.04	1.85 ± 0.08	1.28 ± 0.09	1.90 ± 0.05
10	1.62 ± 0.06	1.40 ± 0.12	1.57 ± 0.08	2.38 ± 0.09	2.00 ± 0.06	2.23 ± 0.13
25	1.85 ± 0.09	1.19 ± 0.04	1.00 ± 0.1	2.54 ± 0.1	1.68 ± 0.1	1.76 ± 0.1
MMC	1.31 ± 0.04	0.98 ± 0.05	0.98 ± 0.03	1.10 ± 0.04	1.60 ± 0.1	1.15 ± 0.03

Tabla 4. Expresión de la proteína p53 en seis líneas linfoblastoides, después de 24 horas de tratamiento con arsenito de sodio. Se muestran los valores densitométricos en unidades relativas, los cuales representan el promedio de tres repeticiones independientes.

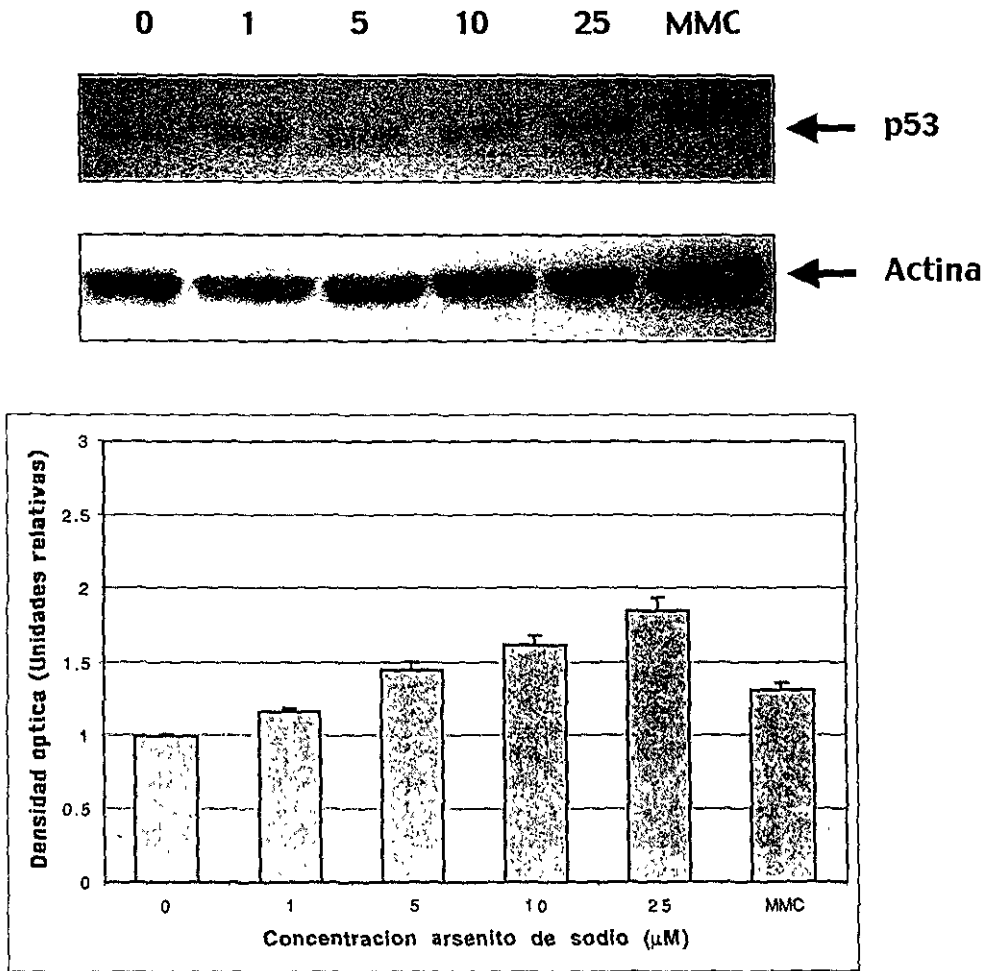


Figura 10. Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide normal. El análisis de la proteína se realizó mediante la técnica de Western blot en cultivos a 24 horas, tratados con las concentraciones indicadas de arsenito de sodio (μM), incluyendo un control negativo (sin tratamiento) y un control positivo (MMC). Se muestran tanto el gel (donde se utilizó como control de corrida actina) como la gráfica del análisis densitométrico, los valores del eje "y" son relativos, representando la media de tres experimentos.

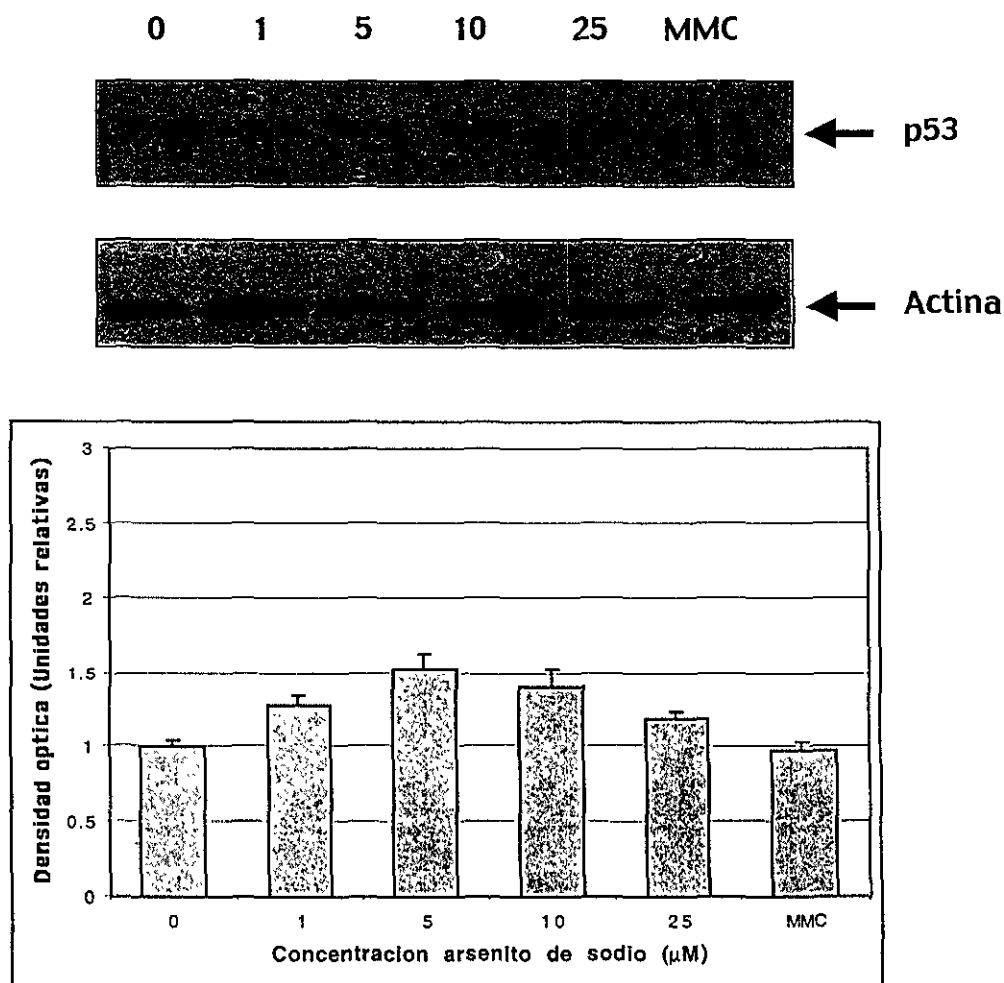


Figura 11. Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide correspondiente al grupo de complementación FA-A. El análisis de la proteína se realizó mediante la técnica de Western blot en cultivos a 24 horas, tratados con las concentraciones indicadas de arsenito de sodio (μM), incluyendo un control negativo (sin tratamiento) y un control positivo (MMC). Se muestran tanto el gel (donde se utilizó como control de corrida actina) como la gráfica del análisis densitométrico, los valores del eje "y" son relativos, representando la media de tres experimentos.

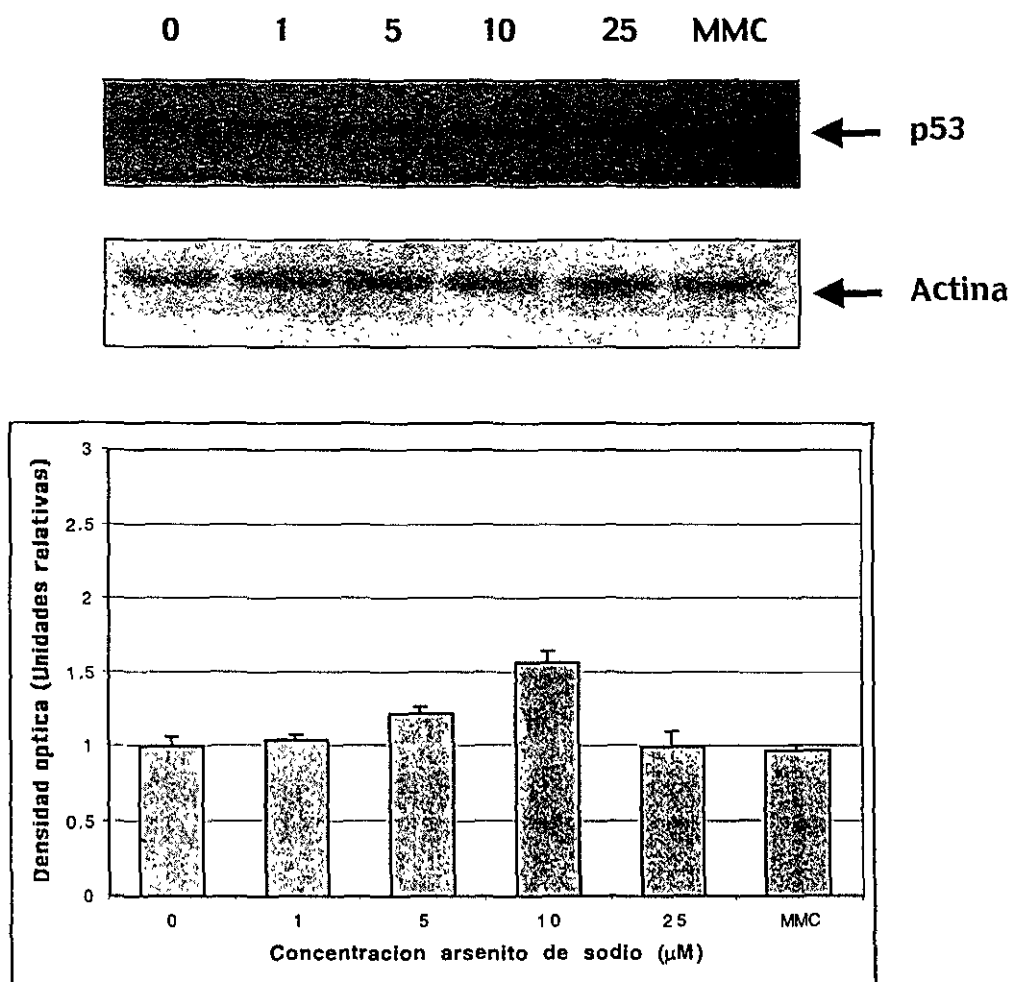


Figura 12. Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblástoide correspondiente al grupo de complementación FA-B. El análisis de la proteína se realizó mediante la técnica de Western blot en cultivos a 24 horas, tratados con las concentraciones indicadas de arsenito de sodio (μM), incluyendo un control negativo (sin tratamiento) y un control positivo (MMC). Se muestran tanto el gel (donde se utilizó como control de corrida actina) como la gráfica del análisis densitométrico, los valores del eje "y" son relativos, representando la media de tres experimentos.

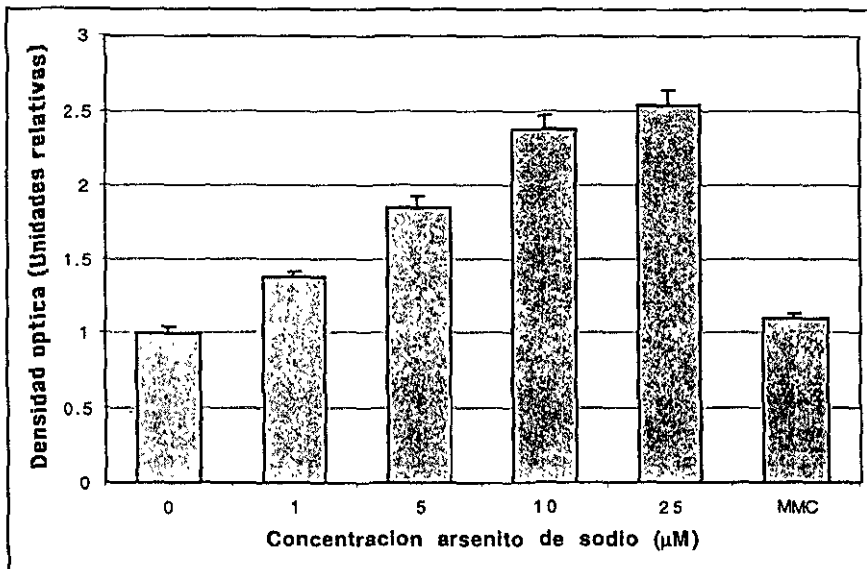
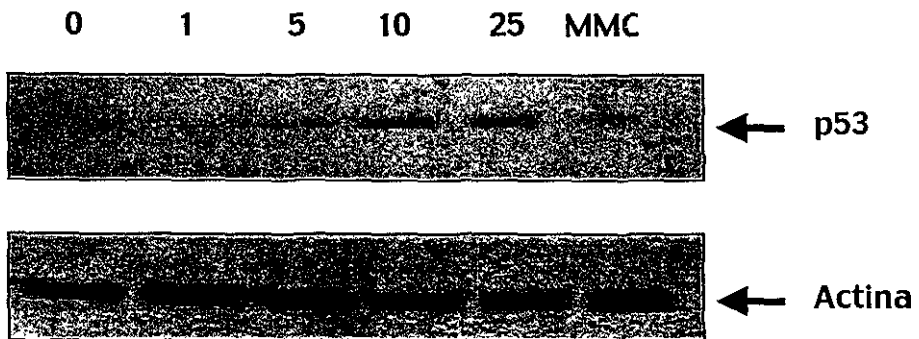


Figura 13. Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide correspondiente al grupo de complementación FA-C. El análisis de la proteína se realizó mediante la técnica de Western blot en cultivos a 24 horas, tratados con las concentraciones indicadas de arsenito de sodio (μM), incluyendo un control negativo (sin tratamiento) y un control positivo (MMC). Se muestran tanto el gel (donde se utilizó como control de corrida actina) como la gráfica del análisis densitométrico, los valores del eje "y" son relativos, representando la media de tres experimentos.

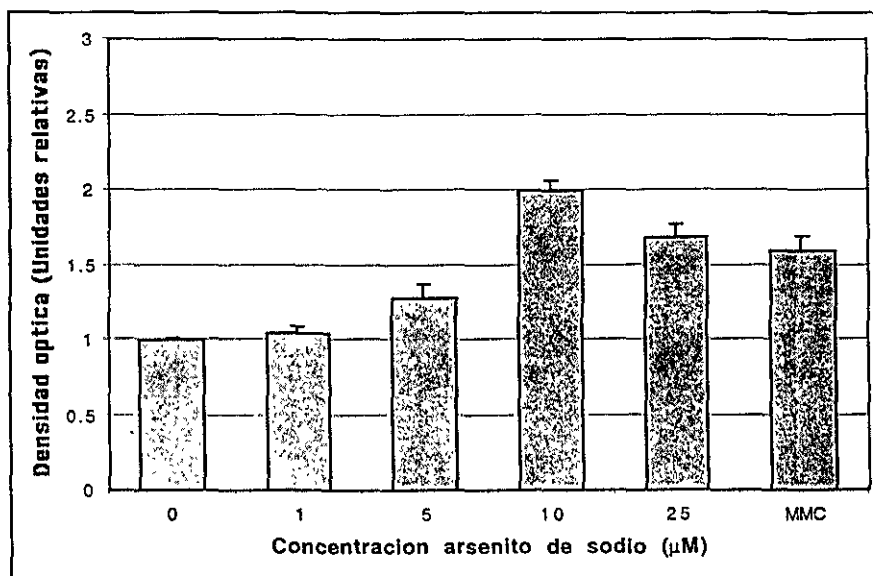
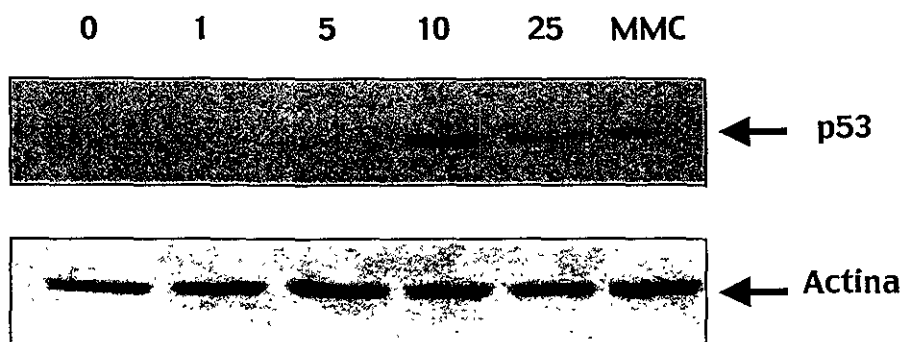


Figura 14. Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide correspondiente al grupo de complementación FA-D. El análisis de la proteína se realizó mediante la técnica de Western blot en cultivos a 24 horas, tratados con las concentraciones indicadas de arsenito de sodio (μM), incluyendo un control negativo (sin tratamiento) y un control positivo (MMC). Se muestran tanto el gel (donde se utilizó como control de corrida actina) como la gráfica del análisis densitométrico, los valores del eje "y" son relativos, representando la media de tres experimentos .

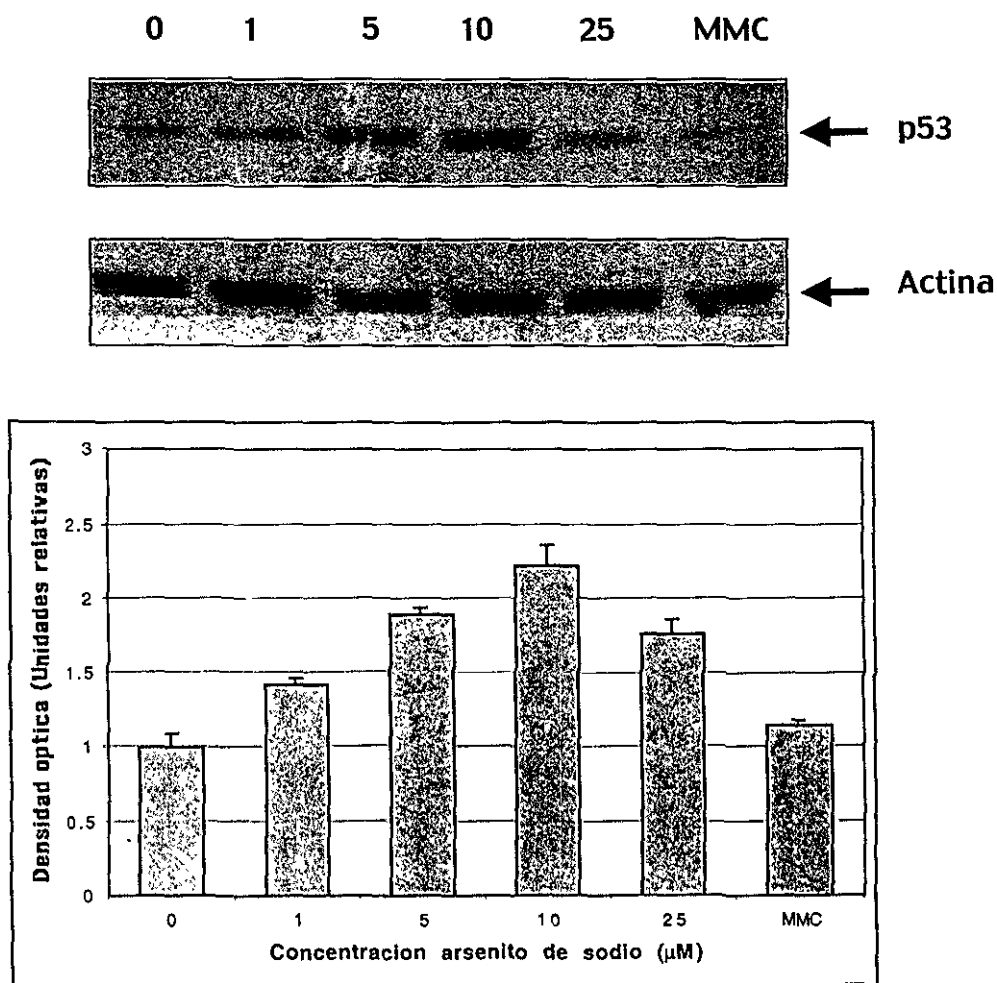


Figura 15. Expresión de la proteína p53 en la línea linfoblastoide correspondiente al grupo de complementación FA-E. El análisis de la proteína se realizó mediante la técnica de Western blot en cultivos a 24 horas, tratados con las concentraciones indicadas de arsenito de sodio (μM), incluyendo un control negativo (sin tratamiento) y un control positivo (MMC). Se muestran tanto el gel (donde se utilizó como control de corrida actina) como la gráfica del análisis densitométrico, los valores del eje "y" son relativos, representando la media de tres experimentos .

DISCUSION

Con el objeto de determinar la sensibilidad de las diferentes líneas linfoblastoides de cinco grupos de complementación de anemia de Fanconi en comparación con una línea normal, se hicieron cultivos celulares los cuales fueron tratados con distintas concentraciones de arsenito de sodio por 24 horas y se analizaron parámetros como la citotoxicidad, medida a través del ensayo de diacetato de fluoresceína - bromuro de etidio y la expresión de los niveles de la proteína p53 a través de la inmunodetección con un anticuerpo monoclonal específico.

Los resultados obtenidos muestran que la respuesta citotóxica inducida por el tratamiento con distintas concentraciones de arsenito de sodio a 24 horas es diferente en las líneas linfoblastoides utilizadas. Todas las líneas celulares fueron afectadas por el arsénico de tal manera que a las mayores concentraciones la citotoxicidad era alrededor del 100% y la densidad celular estaba muy disminuida, lo cual confirma que de alguna manera el As interactúa con la célula produciendo un daño y/o causándole la muerte, tal vez al desencadenar cascadas génicas que involucran el ciclo celular, la reparación y la apoptosis. Sobre este punto hay que señalar que las concentraciones a las que se observaron estos efectos no fueron las mismas para todas las líneas celulares, los grupos de complementación A, E y C se mostraron como los más sensibles, siendo este último aún más sensible que los dos primeros con una LD₅₀ en la concentración de 7.5 µM, mientras que los grupos B, D y normal se comportaron de manera similar tolerando los tratamientos hasta la concentración de 25 µM, que corresponde a su LD₅₀ (Tabla 3). Cabe mencionar que el punto en el que cada línea celular disminuyó su viabilidad al 50% resultó relativo en este estudio, dado que para algunas líneas linfoblastoides se presentaron cambios drásticos de una concentración a otra, a pesar de que esto se trató de prevenir utilizando concentraciones intermedias (Figura 8).

Esta toxicidad causada por el As, puede deberse en primer lugar al efecto de este metaloide sobre la integridad mitocondrial. Se sabe que uno de los mecanismos a través de los cuales el arsénico actúa es al modificar la estructura y el potencial membranal de la mitocondria, alterando los procesos de oxidación (respiración) provocando un decremento en el NADH formado a partir de ATP y generando especies de oxígeno reactivas (Schüller, 1977). Estos cambios provocan la inducción de la apoptosis a través de la activación de enzimas como la caspasa-3 y la liberación del citocromo c (Jing, 1999). Cabe mencionar que se ha observado que la AF es especialmente sensible a estas

especies de oxígeno reactivas, por lo que este daño podría verse potenciado, al menos para algunos de los grupos de complementación.

Esta diferente sensibilidad a agentes xenobióticos como el arsénico entre los grupos de complementación de AF, ha sido observada con otros agentes como la MMC o el DEB (Carreau, 1999), de hecho al comparar líneas normales con linfoblastos de AF, Buchwald (1995) encontró que estos últimos son más sensibles con respecto al control y que además se comportan de manera distinta, la línea HSC62 (FA-D) era cinco veces más sensible con respecto al control, en comparación con la línea HSC230 (FA-B), que lo era 15 veces más y la línea HSC72 (FA-A) que lo era 20 veces más, estas variaciones en el comportamiento celular nos hablan de que los genes alterados en cada grupo pueden estar involucrados en diferentes vías de acción o en la misma vía pero a diferentes niveles.

Otro de los mecanismos a través de los cuales se ha propuesto que el arsenito de sodio ejerce sus efectos sobre la célula es al inhibir el ensamblaje de los microtúbulos y al inducir la despolimerización de la tubulina (Ramírez, 1997), provocando hiperdiploidias y efectos indirectos como la detención mitótica (Liang, 1985) a lo que se agrega su capacidad para formar entrecruzamientos DNA-proteína (Ramírez, 2000), dando lugar a la inestabilidad genómica y a la amplificación o desregulación de genes que desencadenan procesos como la malignización celular y/o la activación de procesos como la detención del ciclo celular para la reparación o llevar como punto final a la apoptosis. Esta hipótesis resulta interesante ya que al realizar este trabajo nos encontramos con algunos hallazgos. De manera cualitativa, se observó al microscopio que a las mayores concentraciones de arsénico como 10 y 25 μM algunas de las células que quedaban aún vivas eran de mayor tamaño que las del control negativo, esto podría estarnos hablando de una falta de citocinesis no así de cariocinesis, lo que por ende resulta en una poliploidía celular. Para probar lo anterior se podrían utilizar ensayos a futuro, como la elaboración del cariotipo de las células a cada concentración para corroborar si efectivamente el número cromosómico está alterado y en que forma o el análisis de la cantidad de DNA por citometría de flujo.

El As alternativamente, podría estar actuando a nivel de la reparación del DNA, ya sea alterando proteínas que detectan el daño o directamente actuando sobre alguna de las enzimas de reparación y/o estar generando situaciones de estrés oxidativo al alterar las funciones de ciertas enzimas involucradas en la detoxificación como la GSH.

Como ya se ha dicho, la AF presenta una sensibilidad específica a agentes alquilantes bifuncionales (MMC, DEB, cisplatino) que se ha demostrado a través principalmente, del estudio de aberraciones cromosómicas y sobrevida celular y escasos ensayos sobre expresión de algunos genes como p53 (Kruyt, 1996). Cabe destacar que se ha postulado que agentes como la MMC y el DEB, ejercen su acción de manera oxido-dependiente a través de la inhibición de algunas enzimas de detoxificación como la catalasa, la manganeso superóxido dismutasa, la GST y la GSH (Korkina, 2000; Pagano, 2000), de manera tal vez similar al arsénico. Al respecto la anemia de Fanconi se presenta como un buen modelo para conocer el tipo de efecto ocasionado por el arsénico, ya que esta mostró ser sensible a los tratamientos. Es por lo anterior, que podrían diseñarse estrategias para ver si el arsénico está actuando de manera parecida a los alquilantes bifuncionales, tal vez a través de la evaluación del tipo de aberraciones cromosómicas a diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento.

En nuestro estudio fue evidente una respuesta diferencial entre las líneas celulares de AF dependiendo del grupo de complementación y de la dosis de arsenito de sodio usada. A las concentraciones más bajas utilizadas dependiendo de la naturaleza del daño y dada la heterogeneidad genética de la enfermedad, cada gen de los diferentes grupos de complementación pudiera estar desempeñando una actividad diferente 1) al detectar por sí mismos el daño, 2) al activar genes implicados directamente en los mecanismos de respuesta ante el daño celular y 3) ser directamente los efectores de la respuesta ante este daño generado por el arsénico, como por ejemplo en los puntos de monitoreo, donde FANCC al parecer tiene relación con la fase de G2, ya que el transfectar la versión corregida de este gen a células de FA-C corrige la acumulación característica de estas en dicha fase después de producido el daño (Kupfer, 1996; Kruyt, 1996).

Además aunado a que estos genes estuvieran actuando en vías separadas, también se ha visto que algunos de ellos forman complejos (FANCA/FANCG/FANCC/FANCF) (D'Andrea, 1996; García-Higuera, 1999) que confieren estabilidad a cada una de las proteínas que los conforman y que permiten la translocación al núcleo con una mayor eficiencia. También es posible que en las concentraciones más elevadas utilizadas, el tipo de respuesta fuera más general en cuanto a las cascadas de detoxificación y reparación involucradas, debido a que la magnitud del daño presente es mayor y por ello la respuesta de la célula ante el daño tal vez más rápida aunque menos eficiente ocasionando así un mayor número de

alteraciones. De esta manera la cantidad de daño que se necesita para poder inducir y obtener una respuesta celular dependerá, en este caso, del grupo de complementación, de las posibles alteraciones y del efecto de estas en el micro y macroambiente celular.

Otro de los efectos que puede inducir el arsénico, es el alterar la proliferación celular (Gonsebatt, 1992) provocando un retraso en la progresión de las fases del ciclo celular. Salazar (1997) encontró que el As induce la expresión de la proteína p53 en diferentes líneas celulares y que las células cuyo p53 es funcional conllevan mejor el daño inducido por este metaloide, es decir, presentan una mayor viabilidad y niveles de p53, lo que se ve reflejado en el control del ciclo celular y la respuesta ante xenobióticos. Como recordaremos la importancia de este guardian del genoma, como se le ha denominado ha p53, es que se encuentra involucrado en la regulación de procesos vitales para la célula como la proliferación, la reparación y la apoptosis. Adicionalmente, este gen resulta de especial interés ya que 1) se ha visto es regulado por ATM, gen de la Ataxia telangiectasia, otro de los SIC, 2) los escasos ensayos que se han realizado en la anemia de Fanconi en relación a la expresión de este con respecto a diferentes agentes han resultado controversiales ya que algunos autores encontraron una ausencia en la inducción de p53 (Roselli, 1995) y otros una notoria inducción (Kupfer, 1996; Kruyt, 1996) y 3) Liebetrau (1997) encontró que *FANCC* contiene dos sitios consenso para este gen, uno en su promotor y otro en la región 3'. Al respecto, se ha observado que las mutaciones cercanas al sitio de unión de p53 en el extremo 3' de *FANCC* dan un fenotipo más severo en los pacientes pertenecientes a este grupo de complementación (Liu, 1994), lo que pudiera deberse a una imposibilidad de interacción entre p53 y *FANCC* o algunas de las otras proteínas de AF y a la alteración de ciertos procesos celulares.

Debido a lo anterior y con el afán de conocer la expresión de la proteína p53 en los grupos de complementación A a E de la anemia de Fanconi, se trataron a las células con cuatro diferentes concentraciones de arsenito de sodio (1, 5, 10 y 25 μM) por 24 horas y se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína.

Desde un inicio se encontraron diferencias entre algunas de las líneas de anemia de Fanconi y el grupo control con respecto a los niveles basales de p53, de manera tal que al parecer FA-A presenta una expresión menor y FA-B un estado inducido (Figura 9). Esto podría significar que de alguna manera la interacción entre los genes y/o las proteínas de AF y p53 está alterada. Pudiera ser que para el caso de FA-A, las mutaciones en *FANCA* ocasionen 1) o que no haya interacción entre la proteína de p53 y

la secuencia génica de *FANCA*, tal vez por alteración de sitios consenso aún desconocidos o 2) que la interacción entre ambas proteínas sea inestable o requiera de un mayor número de moléculas para su eficiencia y para el caso de FA-B, tal vez este estado inducido se deba a una interacción continua entre ambas proteínas o a algún tipo de estímulo de naturaleza desconocida que mantenga encendido a p53, claro que para ambos casos es imposible descartar que esta sea la expresión basal normal de cada línea y que las diferencias observadas sean normales.

Aunado a lo anterior, en las seis líneas linfoblastoides se encontró un aumento de la proteína con relación a la exposición al arsénico, este aumento fue totalmente dependiente de la línea celular utilizada. Esta primera aproximación a la relación AF-p53 arroja información importante, ya que el encontrarse una inducción de la proteína en los cinco grupos de complementación nos habla de que este gen es un probable activador de los productos génicos de la anemia de Fanconi, es decir, de alguna manera p53 detecta el daño producido por el arsénico e interactúa con algunos de los genes de AF, seguramente con la finalidad de desencadenar la respuesta celular a través de vías como la reparación, la detoxificación y el ciclo celular, funciones en las que aún se desconoce el papel de los genes de AF. En caso de que la situación hubiese sido contraria, es decir, que p53 fuera un efector de alguno de los genes de AF lo que se hubiera observado serían grupos con inducción y grupos sin inducción, los primeros nos hablarían de una vía totalmente independiente entre AF y p53 y los segundos, de que de alguna manera el producto génico de un grupo de complementación en específico estaría regulando o modulando la expresión de p53 y al faltar este gen la vía hacia p53 estaría nulificada o alterada, tal es el caso de ATM y p53, donde las células homocigotas para el gen de Ataxia telangiectasia no presentan una inducción de p53 (Meyn, 1995). Claro que con los experimentos utilizados no podemos descartar la posibilidad de que la inducción de p53 no involucre directamente a las proteínas de AF.

Como ya se mencionó, los niveles de expresión de p53 fueron diferentes para cada línea linfoblastoide, para algunas de ellas la inducción fue apenas perceptible o muy escasa con respecto al control tal es el caso de FA-B, para otras fue baja como FA-A y FA-D, mientras que para FA-C y FA-E fue totalmente evidente (Figuras 10 a 15). Inclusive, las diferencias en la inducción de p53 entre los grupos de complementación también fue observada, aunque en menor grado, con la MMC. Este tipo de respuesta ya había sido obtenida con otras sustancias, Kruyt y colaboradores (1996) al tratar linfoblastos de AF (A a E) con bajas dosis de MMC, observaron que FA-B resultaba ser

la línea menos sensible y con respuesta similar al control, característica que al parecer es típica de este subtipo ya que se utilizaron dos diferentes líneas linfoblastoides (HSC 230 y VU 178). Adicionalmente Kupfer (1996), encontró que la inducción de p53 era mayor en células de FA-C (0.1 $\mu\text{mol/L}$ MMC) en comparación con las células transfectadas con la versión normal de este gen. Tomando en cuenta los resultados anteriores, podemos decir que la inducción y/o acumulación de p53 mediada por el arsenito de sodio puede estar relacionada y ser alterada por algunos de los genes de AF, ya que el encontrarse ausente alguno de estos predispone a una mayor sensibilidad y por lo tanto a una mayor expresión de p53 o en el caso opuesto, a una disminución en la señal de activación de p53.

El arsénico pudiera también inducir sus efectos a nivel de las fases y/o los puntos de monitoreo del ciclo celular, sitios de control que se ha visto también están alterados en AF, al menos la fase G2/M. De manera tal que las células de AF pudieran escapar a estos puntos de control y entonces generar células mutantes que a largo plazo se volverían malignas o por el contrario, que las células dañadas fueran reconocidas por los elementos de control intracelulares y llevadas a la apoptosis, ambos postulados requieren investigaciones futuras utilizando ensayos para conocer por ejemplo la cantidad de células en cada fase del ciclo celular, para saber si existe una detención en algún punto en específico o la cantidad de células apoptóticas, para saber si hay mayor muerte celular en los cultivos con tratamiento que en aquellos que carecen de este.

Sin embargo, a pesar de que este tipo de estudios no se realizaron durante el desarrollo de este trabajo, si podemos a partir de los resultados sobre citotoxicidad celular y la inducción de p53 hacer una suposición de lo que está sucediendo, dado que estos parámetros aportan información indirecta sobre el ciclo celular y la apoptosis. Al respecto, una posible interpretación de nuestros resultados es que efectivamente había un incremento en la muerte celular (ya sea como resultado del daño a mitocondrias o debido a vías alternativas), de manera tal que al ir aumentando la dosis de arsenito de sodio primero se producía un estado inducido de la proteína p53, lo que correspondería a la detección del daño y al inicio o activación de genes y mecanismos de respuesta, que en algunos casos estos niveles se mantenían sin ningún cambio, lo cual podría hablarnos de que la cantidad de proteína conjuntamente con el daño inducido hasta ese momento eran insuficientes para encender el proceso de apoptosis por completo (línea normal, FA-B, FA-D) (Figuras 10, 12 y 14) o si estos niveles seguían aumentando como resultado de un daño mayor (FA-C y FA-E) (Figuras 13 y 15), resultaría en estabilización de un

mayor número de moléculas proteicas necesarias que en estas condiciones activarían la cascada de muerte celular. Ya en las dosis más altas se observó una disminución en la expresión de la proteína que correlaciona con los resultados cuantitativos de viabilidad (menores al 50%) y cualitativos con el decremento en la densidad celular, lo que nos habla de un menor número de células que pudieran estar provocando la inducción, estos resultados han sido obtenidos por otros autores al realizar curvas de inhibición de crecimiento con distintas líneas de AF y con diferentes concentraciones de MMC (Esmer, en proceso de publicación). Sobre este punto es difícil poder separar en cuanto a las concentraciones utilizadas las funciones de p53, dado que los procesos celulares son totalmente dinámicos, lo que si es claro es que la inducción de p53 involucra eventos de señalización y retroalimentación y el que exista una dosis respuesta podría considerarse como que p53 no ha llegado a su umbral o punto máximo de activación por arriba del cual su inducción y/o respuesta podría ser constante.

Se sabe que la radiación ionizante y muchas sustancias citotóxicas, incluyendo el arsenito de sodio y la MMC, inducen una acumulación en la proteína supresora de tumores p53. Mecánicamente, p53 actúa como un factor de transcripción sobre genes específicos involucrados en diversos procesos, pudiendo jugar un papel en la reparación del DNA 1) directamente a través de su capacidad de unirse a rompimientos en las cadenas del DNA, ya sean sencillos o dobles, catalizando la renaturalización del DNA y la transferencia de cadenas o 2) indirectamente, a través de su activación con el subsecuente arresto del ciclo celular en la fase G1 o G2. Lo que presumiblemente permite un mayor tiempo de reparación antes de pasar a las fases S o M, previniendo la existencia de alteraciones genéticas o si el daño es excesivo mediando la apoptosis celular (Roselli, 1995). A pesar de que se conoce que el daño al DNA *per se* puede desencadenar estos procesos las señales que dan inicio a ellos son aún desconocidas.

En este estudio se evidenció que los productos génicos de la AF interactúan, de manera diferencial con p53 en respuesta al daño ocasionado por la exposición a diferentes dosis de arsenito de sodio. Varios mecanismos pueden ser considerados para explicar estas diferencias en la respuesta de p53: 1) por una parte los genes de AF pueden estar funcionando en la retroalimentación hacia p53 regulando así su activación y/o supresión, 2) podrían estar involucrados a nivel nuclear, de manera tal que el daño al DNA genera una señal que provoca su activación, la cual induce una cascada génica aún desconocida que conlleva a la activación de factores específicos para contrarrestar los efectos citotóxicos de diferentes agentes (como el arsénico) a través de la reparación y

el ciclo celular, esta opción se ve apoyada por la evidencia de la localización principalmente nuclear de las proteínas de AF (FA-A, FA-F y FA-G) y la formación del complejo y 3) podrían estar operando a nivel citoplásmico funcionando como detectores de las sustancias dañinas para evitar los posibles daños causados por estas o como agentes detoxificadores, papel que podría estar jugando FANCC cuya principal localización es citoplasmática.

De hecho estudios recientes han demostrado que FANCC interacciona con la enzima microsomal NADPH citocromo P450 reductasa (RED), resultando en un decremento de la actividad de esta última. La formación del complejo FANCC-RED provoca la disminución del transporte de electrones en la membrana microsomal regulando una de las principales vías de detoxificación celular. Como RED esta involucrada en la activación de algunos xenobióticos a través de CYP esta interacción podría sugerir el papel de FANCC como un regulador de las cascadas de oxidoreducción (Kruyt, 1998). Además a estos experimentos se han agregado evidencias que indican que células HeLa que sobreexpresan las proteínas FANCC y RED se vuelven insensibles ante el tratamiento con MMC, situación que no sucede cuando se sobreexpresan otras proteínas del complejo AF como FANCA y FANCG (Youssofian, 1999), lo cual evidencia el que las diferentes proteínas de AF juegan distintos papeles a nivel celular. Otro estudio reciente demostró la unión de FANCC con la proteína Glutación S-transferasa P1 (GSTP1), incrementando su actividad catalítica y apoptótica (Cumming, 1999). La proteína GST es conocida como una enzima involucrada en la detoxificación intracelular de sustancias tóxicas y carcinogénicas, entre ellas el arsénico y como parte de la vía de defensa antioxidante, de esta manera la información que se tiene hasta el momento indica la relación de FANCC con enzimas involucradas en las fases I y II de la transformación de sustancias mutagénicas y carcinogénicas. Otra vía de acción de FANCC es la de reparación ya que se ha visto interactúa con la proteína Rad 51, involucrada en este proceso (Meyn, 1999). Lo anterior abre una gama de posibilidades ya que en otros SIC como Ataxia telangiectasia y Bloom se han corroborado interacciones con los productos génicos de BRCA1, NBS1, RAD, c-Abl, Chk-2, etc.

Es importante señalar que estudios recientes apuntan hacia la idea de que algunas de las proteínas de AF y/o directamente el complejo interactúan con proteínas como ATM y BRCA1 (García-Higuera, 2001), esto es relevante debido a que BRCA1 es una proteína implicada en la reparación del DNA y ATM es una cinasa que podría estar mediando, a través de la fosforilación, la modificación post-traduccional de

algunas de ellas haciéndolas activas o susceptibles a la interacción con terceras proteínas, esta hipótesis se ve apoyada cuando al precipitar el complejo AF se ve que el peso molecular de este en KDa es muy elevado, lo que indica la participación de varios genes incluidos los de AF, situación que ya se ha observado para el caso de BRCA1, quien se ha visto forma un super complejo con al menos nueve o diez proteínas más formando lo que Wang y colaboradores (2000) han llamado BASC (Complejo de reconocimiento del genoma asociado a BRCA1). Entonces entre las proteínas que están interactuando podría estar p53, de tal manera que en conjunto estarían mediando la detección del daño ocasionado por la entrada de sustancias dañinas a la célula, como el arsenito de sodio y la detención del ciclo celular para la reparación o la salida de la célula vía apoptosis.

A partir de todo lo anterior podemos especular sobre los eventos a ocurrir por ausencia de alguno de los genes de AF:

- 1) **FA-A:** como el gen *FANCA* está ausente su producto proteico no es generado. Se sabe que este forma primero un heterodímero con *FANCG* que les confiere estabilidad, aumentando su vida media y que permite la interacción con *FANCC*, lo cual conlleva a su relocalización a nivel nuclear (García-Higuera, 1999). Debido a esta localización se ha postulado que la función del complejo es la reparación. De esta manera al no haber *FANCA* primero, *FANCG* es sumamente inestable y por lo tanto es degradada y segundo, no hay formación del complejo ni translocación a núcleo. Entonces el daño es reconocido por la célula, p53 trata de activar entre otros genes a *FANCA*, pero al estar ausente este no hay reparación dependiente de esta proteína, en caso de que esta sea su función, ni una señal de retroalimentación que incremente los niveles de p53 por lo que la célula podría no tener un camino claro a seguir, es decir, deberá continuar el ciclo, deberá detenerse y reparar o simplemente morir.
- 2) **FA-B:** el tipo de respuesta que presentó fue el más parecido al grupo control (Figuras 8 y 12), por lo que al parecer el gen *FANCB* no es estrictamente necesario para los procesos de detoxificación y control de daño celular o no está directamente relacionado con p53, ya que aparentemente las células de dicho grupo están pudiendo lidiar con el daño producido por el arsénico seguramente a través o de vías alternativas o de la inducción de p53 mediante la activación de proteínas diferentes a *FANCB*.

- 3) FA-C: al parecer p53 capta la señal de daño y trata de transmitirla a FANCC a través de su unión en los sitios consenso que se encuentran en el promotor y en el extremo 3', para este particular pueden estar sucediendo dos situaciones: A) el gen FANCC puede estar presente pero tener una delección que anule totalmente o la transcripción o la función de su proteína, por lo cual 1) p53 no puede transactivar este gen y ejercer una respuesta FANCC dependiente y 2) debido a la ausencia de esta proteína el complejo AF no es tan estable y se ve mermada su actividad, cualquiera que esta sea y B) el tipo de mutación podría ser puntual alterando los sitios consenso para p53. Se ha propuesto que esta situación es relevante ya que posiblemente la estimulación de la actividad del promotor de FANCC depende del efecto sinérgico de ambos sitios de unión (Liebetrau, 1997), entonces si uno de estos sitios es eliminado la expresión de este gen se ve disminuida. Por otro lado si pensamos en la localización celular de FANCC podríamos proponer un papel dual, al encontrarse en el citoplasma, puede interactuar con proteínas detoxificadoras disminuyendo la interacción de los agentes dañinos, como el arsenito de sodio, con el DNA pero al estar también en núcleo, podría estar mediando de alguna manera el arresto celular y la reparación, ya que se cree está involucrado en el punto de monitoreo de G2. De cualquier forma la ausencia o alteración de este gen hace a las células más sensibles, primero por las vías involucradas y segundo, tal vez debido a la falta de una retroalimentación hacia p53, por lo que esta última se mantiene en estado activo y al no haber reparación recurre a la apoptosis, razón por la cual la viabilidad y la densidad celulares disminuyen tempranamente.
- 4) FA-D: presenta un comportamiento muy peculiar tanto para la viabilidad (Figura 8) como para la expresión de p53 (Figura 14) con respecto a la respuesta ante el daño ocasionado por el arsenito de sodio, al parecer hay una concentración clave que es 10 μM , donde ambos parámetros cambian totalmente, es decir, la viabilidad decae drásticamente y p53 muestra una expresión elevada. Esto puede deberse tal vez a que FANCC no está directamente relacionada con la activación de los mecanismos de defensa ante el daño celular, de manera tal que las células carentes de esta proteína están pudiendo reparar el daño por lo que pueden seguir su ciclo normal, pero llega un punto en donde el daño es demasiado y entran en juego mecanismos de alerta, uno de ellos podría ser p53, entonces este se activa y comienza a mandar a las células muy dañadas a la muerte celular programada.

- 5) FA-E: en nuestro estudio se presenta como una de las líneas más sensibles (Figura 8) y con una inducción clara de p53 (Figura 15), comportándose de manera similar al grupo de complementación C y/o a la proteína FANCC. Debido a esto parece plausible proponer que esta proteína también tiene una relación directa con p53 y como FANCC es posible que este ayudando a la estabilización del complejo o tal vez a su función, ya sea a través del reconocimiento del daño o a través de la reparación, lo que se ve reflejado en que las células están muriendo debido a p53, entre una de las posibles vías.

Podemos concluir diciendo que un número creciente de evidencias indican que la respuesta de las células de mamíferos ante el daño al DNA es bastante compleja, involucrando varias redes o cascadas de transducción de señales que detectan el daño al DNA, activan los mecanismos de reparación y alteran el ciclo celular. Entonces genes como los de AF y la susceptibilidad ante diversos xenobióticos resultan de suma importancia cuando pensamos en el rol que estos genes y/o proteínas desempeñan en cuanto a la predisposición al cáncer, ya que como se ha mencionado, la frecuencia de personas homocigotas para estos genes es muy baja, 1 en 350 000, pero que pasa con las personas que son posibles portadoras (1 en 200), es decir heterocigotas y que por algún agente pudieran adquirir segundas mutaciones en uno de estos genes, existiendo la posibilidad de que algunos de estos estén funcionando como tumores supresores o estén tan relacionados con la estabilidad genómica que su ausencia provoque las alteraciones celulares que conllevan a un proceso neoplásico. Es por ello que resultan de suma importancia los estudios sobre contaminantes potencialmente dañinos ante los cuales un gran número de personas se encuentran expuestas.

CONCLUSIONES

- El arsenito de sodio tiene un efecto citotóxico sobre las líneas linfoblastoides utilizadas, de manera tal que la viabilidad decrece conforme aumenta la concentración de este metaloide. Cabe señalar que el comportamiento observado a este respecto dependerá de la línea celular, existiendo una susceptibilidad diferencial entre las seis líneas utilizadas, estas diferencias pueden describirse según el siguiente gradiente de sensibilidad:

$$FA-D \leq \text{normal} < FA-B < FA-A \leq FA-E < FA-C$$

- Esta toxicidad puede deberse a los efectos ocasionados por el As sobre la respiración mitocondrial, los cuales dan como resultado una disminución en el ATP y NADH intramitocondrial, un incremento en las especies de oxígeno reactivas y la inducción de la apoptosis a través de la activación de diversos genes. Cabe mencionar que las células de AF son hipersensibles ante estas especies de oxígeno reactivas, lo que puede hacerlas más susceptibles al daño causado a través de ellas.
- Otra de las formas en las que el As puede estar generando daño a la célula, es a través de la interacción con diversas proteínas como la tubulina y la formación de entrecruzamientos DNA-proteína lo que puede afectar tanto su expresión como su funcionalidad.
- El tratamiento con diferentes concentraciones de arsenito de sodio es capaz de modificar la expresión de la proteína p53 en las líneas celulares utilizadas, los cambios en esta expresión dependerán tanto de la dosis como de la línea utilizada, observándose que algunos de los grupos de complementación presentan niveles elevados de esta proteína mientras que otros se comportan de manera similar al grupo control, es decir, los cambios son menos notorios y graduales, lo que podría implicar diferentes vías de acción o una misma vía pero a distintos niveles.
- Esta activación diferencial de p53, podría deberse a los efectos del As sobre la metilación de algunas proteínas y a la existencia de un daño a nivel celular, así como a la posible interacción entre p53 y los genes de AF.

- Los resultados de este trabajo corroboran los hallazgos encontrados sobre el efecto del arsénico en cuanto a la toxicidad, el ciclo celular y la inducción de proteínas como p53, lo que nos permite proponer que esta sustancia está actuando sobre las células expuestas causando un daño, presumiblemente a diferentes niveles, que podría traducirse en la inestabilidad genómica que daría como resultado la transformación celular, explicando así los diversos cánceres asociados a exposiciones ambientales crónicas.
- Por otro lado en el presente trabajo se muestra una susceptibilidad diferencial entre las líneas celulares utilizadas, lo que nos permite proponer que las variaciones que se han encontrado en otros estudios sobre los efectos del arsénico (Vega, 1995), pueden deberse al estado en que se encuentran ciertos genes en un individuo y remarcan la importancia de desarrollar marcadores de susceptibilidad.

PERSPECTIVAS

- A pesar de que diversos estudios han demostrado la sensibilidad específica de las células de anemia de Fanconi hacia los agentes alquilantes bifuncionales, en el presente trabajo se observó que algunas de las líneas utilizadas se muestran como sensibles ante los efectos del arsenito de sodio en comparación con la línea normal, lo que abre la posibilidad de estudios futuros enfocados hacia la manera en la que el arsénico está actuando sobre las células, es decir, ¿está actuando directamente sobre el DNA?, ¿qué clase de daño está generando? ¿su efecto es parecido al de agentes como la MMC?, preguntas que pueden abordarse a través de estudios con aberraciones cromosómicas y análisis de las fases del ciclo celular.
- El haber encontrado una respuesta diferencial entre las líneas linfoblastoides utilizadas tanto en el análisis de la citotoxicidad como en la expresión de p53, permite proponer una relación entre al menos algunos de los genes de la anemia de Fanconi, p53 y la estabilidad genómica, lo que en experimentos posteriores podría traducirse en el estudio de las relaciones y/o asociaciones entre estos genes y las vías de señalización involucradas.
- Debido a todo lo anterior resulta interesante la posibilidad de investigar el significado biológico de las relaciones entre estos genes y otros más, con respecto a procesos como la detoxificación, la reparación, el ciclo celular y la apoptosis. Quedando abierto un nuevo camino hacia los estudios de susceptibilidad individual con respecto a la exposición hacia diferentes agentes ambientales.

REFERENCIAS

- Abernathy Ch, Liu Y, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C, Waalkes M. Arsenic: Health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ Health Persp.* 107 (1999) 593-597.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1998. Toxicological profile for arsenic. U.S. Public Health Service. USA. Pp 1-27.
- Allen C, Meyn MS. A low threshold for mutagen-induced apoptosis in Fanconi anemia cells. *Am J Hum Genet.* 57 (1995) A46.
- Alter BP. Fanconi's anaemia and its variability. *British J of Haematology.* 85 (1993) 9-14.
- Alter BP, Knobloch ME, Weinberg RS. Erythropoiesis in Fanconi's Anemia. *Blood.* 78 (1991) 602-608.
- Alter BP. Clinical features of Fanconi's anemia. En: Young NS, Alter BP. *Aplastic anemia: acquired and inherited.* Saunders Philadelphia. Pp 275-309.
- Alter BP. 1999. Clinical features and diagnosis of Fanconi's anemia. En: *Aplastic anemia.* Cambridge University Press, UK.
- Aposhian HV. Enzymatic methylation of arsenic species and other approaches to arsenic toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37 (1997) 397-419.
- Astolfi E, Maccagno A, Garcia-Fernandez JC, Vaccaro R, Stimola R. Relation between arsenic in drinking water and skin cancer. *Biol Trace Elements Res.* 3 (1981) 134-143.
- Auerbach AD, Buchwald M, Joenje H. 1997. Fanconi anemia. En: Vogelstein B y Kinzler KW. *The genetic basis of human cancer.* Mc Graw Hill. Pp 317-332.
- Auerbach AD, Greenbaum J, Batish SD, Levrán O, Giampietro PE, Verlander PC. The Fanconi anemia gene FANCG: spectrum of mutations and comparative phenotypic consequences. 11th International Fanconi anemia scientific symposium (1999).
- Bates MN, Smith AH, Hopenhayn-Rich C. Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am J Epidemiol.* 135 (1992) 462-476.
- Bianchi V. Nucleotide pool unbalance induced in cultured cells by treatments with different chemicals. *Toxicology.* 25 (1982) 13-18.
- Bojián W, Rbert TCh, Sookup SW. Studies of cytogenetic effects of sodium arsenicals on mammalian cells in vitro. *Environ Mutagen.* 4 (1982) 493-498.
- Borgoño JM, Vicent P, Venturino H, Infante A. Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: epidemiological and clinical study before and after the installation of a treatment plant. *Environ Health Perspec.* 19 (1977) 103-105.
- Buchwald M, Moustacchi E. Is Fanconi anemia caused by a defect in the processing on DNA damage?. *Mutat Res.* 408 (1998) 75-90.
- Camacho LH, Soignet SL, Chanel S, Ho R, Heller G, Scheinberg DA, Ellison R, Warrell RP. Leukocytosis and the retinoic acid syndrome in patients with Acute Promyelocytic Leukemia treated with arsenic trioxide. *J Clin Oncol.* 18 (2000) 2620-2625.
- Carnevale A, Frias S. Efecto de la cocultivación y la adición de plasma normal sobre la respuesta a la mitomicina C de los linfocitos de anemia de Fanconi. *Rev Invest Clin.* 37 (1995) 31-34.
- Carreau M, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Joenje H, Buchwald M. Drug sensitivity spectra in Fanconi anemia lymphoblastoid cell lines of defined complementation groups. *Mutat Res.* 435 (1999) 103-109.
- Cebrián ML, Albores A, García-Vargas G, Del Razo LM. 1994. Chronic arsenic poisoning in humans: the case of Mexico. *Arsenic in the Environment, Part II.* John Wiley & Son. USA. Pp 93-100.
- Cebrián ME, Albores A, Aguilar M, Blakely E. Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum Toxicol.* 2 (1983) 121-133.

Chen B, Burt CT, Goering PL, Fowler BA, London RE. In vivo ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of arsenite induced changes in hepatic phosphate levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 139 (1986) 228-234.

Chiou HY, Hsueh YM, Liaw KF, Horng SF, Chiang MH, Pu YS, Lin JS, Huang CH, Chen JC. Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven years follow up study in Taiwan. *Cancer Res.* 55 (1995) 1296-1330.

Chowdhury UK, Biswas BK, Chowdhury TR, Samanta G, Mandal BK, Basu GC, Chanda CR, Lodh D, Saha KC, Mukherjee SK, Roy S, Kabir S, Quamruzzaman Q, Chakraborti D. Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and west Bengal, India. *Environ Health Perspect.* 108 (2000) 393-397.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326 (1997) 1-16.

Cooper GM. 1995. *Oncogenes*. Jones and Bartlett Publishers. USA. Pp 145-322.

Cross SM, Sánchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Reskind WH, Reid BJ. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science.* 267 (1995) 1353-1356.

Cumming RC, Lightfoot J, Yousoufian H, Buchwald M. The FANCC protein interacts with GSTP1 to suppress apoptosis in a factor-dependent hematopoietic cell line. 11th International Fanconi anemia scientific symposium (1999).

Dallapiccola B, Porfirio B, Mokini V, Alimena G, Isacchi G, y Gandini E. Effect of oxidants and antioxidants on chromosomal breakage in Fanconi anemia lymphocytes. *Hum Genet.* 69 (1985) 62-65.

D' Andrea AD. Fanconi anaemia forges a novel pathway. *Nature Genet.* 14 (1996) 240-241.

Das D, Chatterjee A, Mandal B, Samanta G, Chowraborty TR, Sa Chodhury PP, Chanda C, Basu G, Lodh D, Nandi S, Chakraborty T, Mandal S, Bhattacharaya SM, Chakraborty D. Arsenic contamination in ground water in six district of west Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. *Analyst.* 119 (1994) 168-170.

Das D, Chatterjee A, Mandal B, Samanta G, Chakraborty D, Chanda C. Arsenic contamination in ground water in six district of west Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part 2. Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine. Skin scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst.* 120 (1995) 917-924.

de Winter JP, Leveille F, van Berkel CGM, Rooimans MA, van der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater PA, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk JC, Mathew CG, Digweed M, Buchwald M, Joenje H. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet.* 67 (2000) 1306-1308.

de Winter JP, Rooimans MA, van der Weel L, van Berkel CGM, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, Arwert F, Mathew CG, Scheper RJ, Hoatlin ME, Buchwald M, Joenje H. The Fanconi anemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nature genetics.* 24 (2000) 15-16.

de Winter JP, van der Weel L, Groot J, Stone S, Waisfisz Q, Arwert F, Scheper RJ, Kruyt FAE, Hoatlin ME, Joenje H. The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. *Hum Molec Genet.* 9 (2000) 2665-2674.

de Winter, Waisfisz Q, Rooimans MA, van Berkel CGM, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Carrau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk JC, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M, Joenje H. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nature genetics.* 20 (1998) 281-283.

Digweed M, Zawrzewsky-Lodke S, Sperling K. Fanconi's anemia: correlation of genetic complementation group with psoralen/UVA response. *Hum Genet.* 78 (1988) 51-54.

Digweed M, Zawrzewsky-Lodke S, Sperling K. Complementation studies in Fanconi anemia using cell fusion and microinjection of mRNA. Fanconi anemia, clinical, cytogenetic and experimental aspects. TM Schroeder-Kurt, AD Auerbach, G Obe. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. (1989) 236-253.

Di Paolo JA, Casto BC. Quantitative studies on in vitro morphological transformation of Syrian hamster cells by inorganic metal salts. *Cancer Res.* 32 (1979) 1008-1013.

Dong JT, Luo XM. Arsenic-induced DNA-strand breaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. *Mutat Res.* 302 (1993) 97-102.

Donofrio PD, Wilbourn AJ, Albers JW, Rogers L, Salanga V, Greenberg HS. Acute arsenic intoxication presentind as Guillain-Barre-like syndrome. *Muscle Nerve.* 10 (1987) 114-120.

Eguchi Y, Tomizawa J. Complexes formed by complementary RNA stem-loops. Their formations, structures and interaction with ColE1 Rom protein. *J Mol Biol.* 220 (1991) 834-842.

Eguchi Y, Tomizawa J. Complexes formed by complementary RNA stem-loops and its stabilization by a protein: function of ColE1 Rom protein. *Cell* 60 (1990) 199-209.

Escarceller M, Rousset S, Moustacchi E, Papadopoulo D. The fidelity of double strand breaks processing is impaired in complementation groups B and D of Fanconi anemia, a genetic instability syndrome. *Somat Cell Mol Genet.* 23 (1997) 401-411.

Fornace AJ, Little JB, Weichselbaum RR. DNA repair in Fanconi's anemia fibroblast cell strain. *Biochem Biophys Acta.* 561 (1979) 99-109.

Frias S, Carnevale A, Molina B, del Castillo V. Estudio de heterogeneidad genética en anemia de Fanconi por medio de la adición de plasma. *Rev Invest Clin (Mex).* 38 (1986) 269-271.

Fujiwara Y. Defective repair of Mitomycin C crosslinks in Fanconi's anemia and loss in confluent normal human and Xeroderma Pigmentosum cell. *Biochem Biophys Act.* 699 (1982) 217-225.

Fukasawa K, Choi T, Kuriyaman R, Rulong S, Vande Woude GF. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science.* 271 (1996) 1744-1747.

García-Higuera I, Kuang Y, Näf D, Wasik J, D'Andrea A. Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex. *Molec Cell Biol.* 19 (1999) 4866-4873.

García-Higuera I, Kuang Y, Denham J, D'Andrea A. The Fanconi anemia proteins, FANCA and FANCG, stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the FA complex. *Blood.* In press.

Gebel T, Birkenkamp P, Luthin S, Dunkelberg H. Arsenic (III), but not antimony, induces DNA-protein crosslinks. *Anticancer Res.* 18 (1998) 4253-4257.

Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M, Oren, M. Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoter. *Proc Natl Acad Sci.* 88 (1991) 9979-9983.

Gonsebatt ME, Vega L, Herrera LA, Montero R, Rojas E, Cebrián M, Ostrosky-Wegman P. Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutat Res.* 283 (1992) 91-95.

Gonsebatt ME, Montero R, Vega L, García-Vargas G, Del Razo LM, Albores A, Cebrián M, Ostrosky-Wegman P. Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutat Res.* 313 (1994) 293-299.

Goodman A. et al. 1992. Arsenic. In: *The pharmacological basis of therapeutics.* McGraw Hill. Singapore. pp 1602-1605.

Gou HW, Chen JC, Greene HL. 1994. Arsenic in drinking water and cancers: a brief descriptive review of Taiwan studies. *Arsenic. Exposure and Health.* Science Reviews Ltd. 40. UK. Pp 129-138.

Guizar-Vázquez J. 1994. *Genética clínica. Manual moderno.* México. 830 p.

Haffner R, Oren M. Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Develop.* 5 (1995) 84-90.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Healy SM, Casarez EA, Ayala-Fierro F, Aposhian H. Enzymatic methylation of arsenic compounds. V. Arsenite methyltransferase activity in tissues of mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 148 (1998) 65-70.

Heim R, Lench N, Swiff M. Heterozygous manifestations in four autosomal recessive human cancer-prone syndromes: Ataxia telangiectasia, Xeroderma pigmentosum, Fanconi anemia, and Bloom syndrome. *Mutat Res.* 284 (1992) 25-36.

Hesketh R. 1997. The oncogene and tumor suppressor gene. Academic Press. UK. Pp 26-30, 34-38, 446-463.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutation in human cancers. *Science.* 253 (1991) 49-53.

Hopenhayn-Rich C, Browning SR, Hertz-Picciotto I, Ferreccio C, Peralta C, Gibb H. Chronic arsenic exposure and risk of infant mortality in two areas of Chile. *Environ Health Perspect.* 108 (2000) 667-673.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human. Some metals and metallic compounds. France. 23 (1980) 39-141.

Jing Y, Chalmers-Redman RM, Tatton WG, Waxman S. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood.* 94 (1999) 2102-2111.

Joenje H, Levitus M, de Winter JP, Oostra AB, Rooimans M, Steltenpool J, Cool N, Grujic I, van Berkel CGM, Pronk JC, Hoatlin M, Arwert F. Diagnosis and subtyping of patients with Fanconi anemia. 11th International Fanconi anemia scientific symposium (1999).

Joenje H, Lo Ten Foe JR, Oostra AB, van Berkel CGM, Rooimans MA, Schroeder-Kurt T, Wegner RD, Gille JJP, Buchwald M, Arwert F. Classification of Fanconi Anemia Patients by complementation analysis: Evidence for a fifth genetic subtype. *Blood* 86 (1995) 2156-2161.

Joenje H, Mathew C, Gluckman E. Fanconi anaemia research: current status and prospects. *Eur J Cancer.* 31 (1995) 268-272.

Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anemia. *Nature.* 290 (1981) 142-143.

Joenje H, Oostra AB. Oxygen-induced cytogenetic instability in normal human lymphocytes. *Hum Genet.* 74 (1986) 438-440.

Kaiser TN, Lojewski A, Dougherty C, Juergens L, Sahar E, Latt SA. Flow cytometric characterization of the response of Fanconi's anemia cells to mitomycin C treatment. *Cytometry.* 2 (1982) 291-297.

Kaye J, Smith CA, Hanawalt PC. DNA repair in human cells containing photoadducts of 8-methoxypsoralen or angelicin. *Cancer Res.* 40 (1980) 696-702.

Korkina LG, Deeva IB, De Biase A, Iaccarino M, Oral R, Warnau M, Pagano G. Redox-dependent toxicity of diepoxybutane and mitomycin C in sea urchin embryogenesis. *Carcinogenesis.* 21 (2000) 213-220.

Kruyt FAE, Dijkmans LM, Van der Berg TK, Joenje H. Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines. *Blood.* 87 (1996) 938-948.

Kruyt FA, Hocino T, Liu JM, Joseph P, Jaiswal AK, Youssoufian H. Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P-450 reductase. *Blood.* 92 (1998) 3050-3056.

Kupfer GM, Näf D, Suliman A, Pulsipher M, D'Andrea AD. The Fanconi anemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex. *Nat Genet.* 17 (1997) 487-490.

Lee-Chen SF, Yu CT, Jan KY. Effect of arsenite on the DNA repair of UV-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis.* 7 (1992) 51-55.

- Lee TC, Tanaka N, Lamb PW, Gilmer TM, Barrett JC. Induction of gene amplification by arsenic. *Science*. 241 (1988) 79-81.
- Lee-Chen SF, Gurr JR, Lin IB, Jan KY. Arsenite enhances DNA strand breaks and cell killing of methyl methanesulfonate treated cells by inhibiting the excision of alkali-labile sites. *Mutat Res*. 294 (1993) 21-28.
- Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem*. 62 (1993) 623-654.
- Lewin B. *Genes*. Oxford University Press. USA. Pp 1131-1166.
- Li JH, Rossman TG. Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in Chinese hamster V79 cells. *Biol Metals*. 4 (1991) 197-200.
- Li Y, Youssoufian H. Mx1 overexpression reveals a common genetic link in four Fanconi anemia complementation groups. *J Clin Invest*. 100 (1997) 2873-2880.
- Liebertrau W, Budde A, Savoia A, Grummt F, Hoehn H. p53 activates Fanconi anemia group C gene expression. *Hum Mol Genet*. 6 (1997) 277-283.
- Lim D, Kim S, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JHJ, Kastan MB. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*. 404 (2000) 613-617.
- Liu JM, Buchwald M, Walsh CE, Young NS. Fanconi anemia and novel strategies for therapy. *Blood*. 84 (1994) 3995-4007.
- Lo Ten Foe JR, Roomians MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Careau M, Callen DF, Savoia A, Cheng NC, Van Berkel CGM, Strunk MHP, Guille JJP, Pals G, Kruyt FAE, Pronk JC, Arwert F, Buchwald M y Joenje H. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nature Genet*. 14 (1996) 320-323.
- Macdougall LG, Greef MC, Rosendorff J, Bernstein R. Fanconi anaemia in black African children. *Am J Med Genet*. 36 (1994) 408-413.
- Magnelli L, Ruggiero M, Chiarugi V. The old and the new in p53 functional regulation. *Biochem Molec Med*. 62 (1997) 3-10.
- Mass MJ, Wang L. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res*. 386 (1997) 263-277.
- Mathew C, Morgan N, Tipping A, Medhurst A, Huber P, Faivre L, Pearson T, Jansen S, de Revel T, Joenje H, EUFAR. Genetic and functional studies in Fanconi anaemia. 11th International Fanconi anemia scientific symposium (1999).
- Meyn MS. Chromosome Instability Syndromes: lessons for carcinogenesis. *En: Genetic Instability and tumorigenesis. Curr Top Microbiol Immunol*. 221 (1997): 72-148.
- Meyn MS, Carreau M, Wang W. Disruption of the murine *FANCC* gene results in abnormal processing of synaptonemal complexes during meiosis I, germ cell apoptosis and impaired fertility. 11th International Fanconi anemia scientific symposium (1999).
- Meyn MS. Ataxia-telangiectasia and cellular responses to DNA damage. *Cancer Res*. 55 (1995) 5991-6001.
- Monti D, Macchioni S, Guido M, Pagano G, Zatterale A, Clazzone R, Cossarizza A, Straface E, Malorni W, Franceschi C. Resistance to apoptosis in Fanconi's anemia, *FEBS Letters*. 409 (1997) 365-369.
- Okui T, Fujiwara Y. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 chinese hamster cells. *Mutat Res*. 172 (1986) 69-76.
- Oliner JD. Discerning the function of p53 by examining its molecular interactions. *BioEssays*. 15 (1993) 703-707.
- Ostrosky-Wegman P, Gonsbatt ME, Montero R, Vega L, Barba L, Espinosa J, Palao A, Cortinas C, García-Vargas G, Del Razo LM, Cebrián M. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat Res*. 250 (1991) 477-482.

- Pagano G. Mitomycin C and diepoxibutane action mechanisms and FANCC protein functions: further insights into the role for oxidative stress in Fanconi's anemia phenotype. *Carcinogenesis*. 21 (2000) 1067-1068.
- Papadopoulou D, Averbek D, Moustacchi E. The fate of 8-methoxy-psoralen-photoinduced DNA interstrands cross-links in Fanconi's anemia cells of defined complementation groups. *Mutat Res*. 184 (1987) 271.
- Pietenpol JA, Tokino T, Thiagalingam S, El-Deiry W, Kinzler KW, Vogelstein B. Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci*. 91 (1994) 1988-2002.
- Poon PK, O' Brien RL, Parker JW. Defective DNA repair in Fanconi's anaemia. *Nature*. 250 (1974) 223-225.
- Ramírez P, Eastmond DA, Laclette JP, Ostrosky-Wegman P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res*. 386 (1997) 291-298.
- Ramírez P, del Razo LM, Gutierrez-Ruiz MC, Gonsbatt ME. Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis*. 21 (2000) 701-706.
- Ramos O, Carrizales L, Yanez L, Mejia J, Batres L, Ortiz D, Diaz-Barriga D. Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissues by mechanism independent of glutathione levels. *Environ Health Persp*. 103 (1995) 85-88.
- Rey JP, Scott R, Muller H. Apoptosis is not involved in the hypersensitivity on Fanconi anemia cells to mitomycin C. *Cancer Genet Cytogenet*. 31 (1994) 67-71.
- Rojas E, Herrera LA, Poirier LA, Ostrosky-Wegman P. Are metals dietary carcinogens? *Mutat Res*. 443 (1999) 157-181.
- Romach EH, Zhao CQ, del Razo LM, Cebrián ME, Waalkes MP. Studies on the mechanisms of arsenic-induced self tolerance developed in liver epithelial cells through continuous low-level arsenite exposure. *Toxicol Sci*. 54 (2000) 500-508.
- Rosselli F, Ridet A, Souss T, Duchaud E, Alapetite C, Moustacchi E. P53-dependent pathway of radio-induced apoptosis is altered in Fanconi anemia. *Oncogene*. 10 (1995) 9-17.
- Roselli F, Sanceau J, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal Lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. I. Involvement of interleukin-6. *Hum Genet* 89 (1992) 42-48.
- Roselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal Lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alpha. *Blood*. 83 (1994) 1216-1225.
- Rossmann TG. 1998. Molecular and genetic toxicology of arsenic. En: *Environmental toxicology: Current developments*. Gordon and Breach Publishers. Netherlands. Pp 171-187.
- Salazar AM, Ostrosky-Wegman P, Menéndez D, Miranda E, García-Carrancá A, Rojas E. Induction of p53 expression by sodium arsenite. *Mutat Res*. 381 (1997) 259-265.
- Salazar AM. 1998. Tesis de Doctorado. Mecanismos moleculares de la alteración proliferativa inducida por el arsénico. Universidad Nacional Autónoma de México. 110p.
- Santra A, Das Gupta J, De BK, Roy B, Guha Mazumder DN. Hepatic manifestations in chronic arsenic toxicity. *Indian J Gastroenterol*. 18 (1999) 152-155.
- Sasaki MS. Is Fanconi's anemia defective in a process essential to the repair of DNA cross-links? *Nature*. 257 (1975) 501.
- Schaumloffel N, Gebel T. Heterogeneity of the DNA damage provokes by antimony and arsenic. *Mutagenesis*. 13 (1998) 281-286.

Schiller CM, Fowler BA, Woods JS. Effects of arsenic on pyruvate dehydrogenase activation. *Environ Health Perspect.* 19 (1977) 205-207.

Schindler D, Hoehn H. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am J Hum Genet.* 43 (1988) 429-435.

Schwartz D, Rotter V. p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Seminars in cancer biology.* 8 (1998) 325-336.

Selivanova G, Wilman KG. P53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv Can Res.* 66 (1995) 143-179.

Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikoshi N, Weinmann R, Levine AJ, Shenk T. Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 889 (1992) 12028-12032.

Shostak LD, Ludlow J, Fisk J, Pursell S, Rimel BJ, Nguyen D, Rosenblatt JD, Planelles V. Roles of p53 and caspases in the induction of cell cycle arrest and apoptosis by HIV-1 vpr. *Exp Cell Res.* 251 (1999) 156-165.

Simeonova PP, Wang S, Toriuma W, Kommineni V, Matheson J, Unimye N, Kayama F, Harki D, Ding M, Vallyathan V, Luster MI. Arsenic mediates cell proliferation and gene expression in the bladder epithelium: association with activating protein-1 transactivation. *Cancer Res.* 60 (2000) 3445-3453.

Smith GC, D'Adda di Fagagna F, Lakin ND, Jackson SP. Cleavage and inactivation of ATM during apoptosis. *Molec Cell Biol.* 19 (1999) 6076-6084.

Smith J, Andrau JC, Kallenbach S, Laquerbe A, Doyen N, Papadoupolo D. Abnormal rearrangements associated with V(D)J recombination in Fanconi anemia. *J Mol Biol.* 281 (1998) 815-825.

Smith ML, Tsuen Chen I, Zhan Q, Bae I, Chen Ch, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science.* 266 (1994) 1376-1379.

Spitz MR, Bondy ML. Genetic susceptibility to cancer. *Cancer.* 72 (1993) 991-995.

Strathdee CA, Buchwald M. Molecular and cellular biology of Fanconi anemia. *Am J Ped Hem Onco.* 14 (1992) 177-185.

Strathdee CA, Duncan AMV, Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nature Genet.* 1 (1992) 196-198.

Timmers C, Hejna J, Reifsteck C, Olsen S, Moses RE, Thayer M, Grompe M. Positional cloning of the Fanconi anemia group D (FANCD) gene. 11th International Fanconi anemia scientific symposium (1999).

Tondel M, Rahman M, Magnuson A, Chowdhury IA, Faruquee MH, Ahmad SA. The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh. *Environ Health Perspect.* 107 (1999) 727-729.

Ullrich SJ, Anderson CW, Mercer WE, Apella E. The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J Biol Chem.* 267 (1992) 15259-15262.

United States Environmental Protection Agency (EPA). 1999. Arsenic in drinking water. National Academy Press. USA.

Vahter M. 1994. Species differences in the metabolism of arsenic. En: Arsenic exposure and health. Chappell WR, Abernathy CO, Cothorn CR, eds. UK. Pp 171-179.

Vega L, Gosebatt ME, Ostrosky-Wegman P. Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutat Res.* 334 (1995) 365-373.

Vijayalaxmi E, Wunder P, Schroeder TM. Spontaneous 6-thioguanine-resistant lymphocytes in Fanconi anemia patients and their heterozygous parents. *Hum Genet.* 70 (1985) 264-270.

Waisfisz Q. 1999. Towards a molecular understanding of the Fanconi anemia defect. *PrintPartners Ipskamp.* Holanda. 164 p.

Waisfisz Q, de Winter JP, Kruijff FAE, de Groot J, van der Weel L, Dijkmans LM, Zhi Y, Arwert F, Scheper RJ, Youssoufian H, Hoatlin ME, Joenje H. A physical

complex of the Fanconi anemia proteins FANCG/XRCC9 and FANCA. *PNAS*. 96 (1999) 10320-10325.

Waisfisz Q, Saar K, Morgan NV, Altay C, Leegwater PA, de Winter JP, Komatsu K, Evans GR, Wegner RD, Reis A, Joenje H, Arwert F, Mathew CG, Pronk JC, Digweed M. The Fanconi anemia group E gene, FANCE, maps to chromosome 6p. *Am J Hum Genet*. 64 (1999) 1400-1405.

Wikjer M, Morgan N, Herterich S, van Berckel C, Tipping A, Gross H, Gille J, Pals G, Savino M, Altay C, Mohan S, Dokal I, Cavenagh J, Marsh J, van Weel M, Ortega J, Schuler D, Samochatova E, Karwacki M, Bekassy A, Abecasis M, Ebell W, Kwee M, de Ravel T, Mathew C. Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur J Hum Genet*. 7 (1999) 52-9.

Wunder E, Burghardt U, Lang B, Hamilton L. Fanconi's anemia: anomaly of enzyme passage through the nuclear membrane? *Hum Genet*. 58 (1981) 149-155.

Wunder E. Further studies on compartmentalization of DNA-topoisomerase-I in Fanconi anemia tissue. *Hum Genet*. 68 (1984) 276-281.

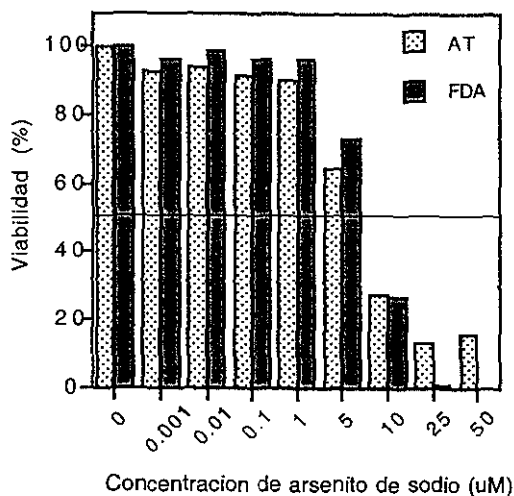
Youssoufian H. Progress on the role of P-450 reductase in the pathogenesis of Fanconi anemia and on protein replacement strategies. 11th International Fanconi anemia scientific symposium (1999).

Zakrzewski S, Sperling K. Genetic heterogeneity of Fanconi's Anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum Genet*. 56 (1980) 81-84.

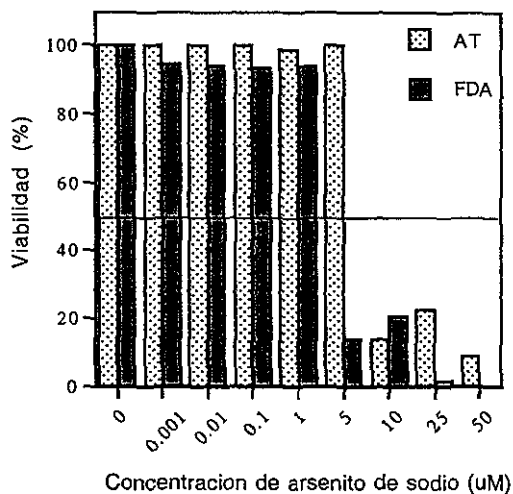
Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coogan TP, Waalkes MP. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci*. 94 (1997) 10907-10912.

Zhao S, Eng Y, Yuan Sh, Lin YT, Hsu H, Lin S, Gerbino E, Song M, Zdzienicka M, Gatti RA, Shay JW, Ziv Y, Shiloh, Y, Lee E. Functional link between Ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature*. 405 (2000) 473-477.

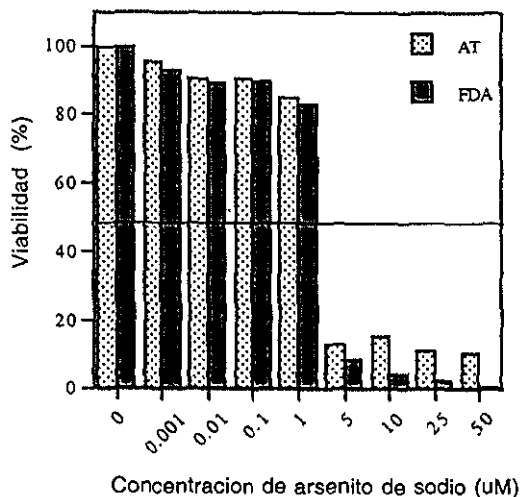
FA-A



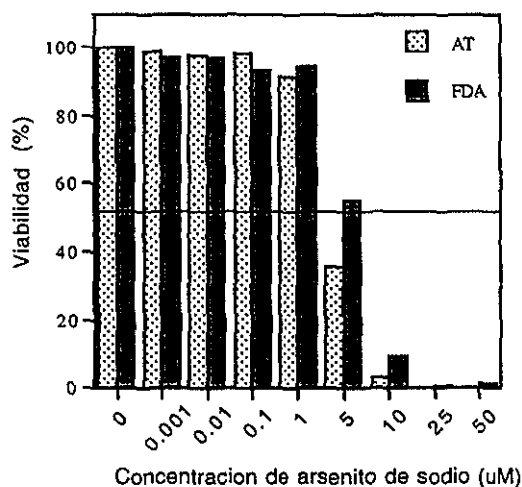
FA-D



FA-C



FA-E



Apendice 1. Curvas de viabilidad de las líneas linfoblastoides FA-A, FA-C, FA-D y FA-E. Las células fueron tratadas por 24 horas con las concentraciones indicadas de arsenito de sodio y evaluadas por los ensayos de azul tripano y diacetato de fluoresceína-bromuro de etido.