



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

Facultad de Ciencias

**ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES EN LA  
PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN  
CELULAR INDUCIDAS POR EL ARSÉNICO  
EN DOS SISTEMAS EPITELIALES**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS

*P R E S E N T A*

**M. EN C. MARISOL SANDOVAL RÍOS**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ESTHER LÓPEZ-BAYGHEN PATIÑO

MÉXICO, D.F.

2007



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.

**Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de Agosto de 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MARISOL SANDOVAL RÍOS** con número de cuenta 501093642, con la tesis titulada: **"ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR INDUCIDAS POR EL ARSÉNICO EN DOS SISTEMAS EPITELIALES"**, realizada bajo la dirección de la DRA. ESTHER LOPEZ-BAYGHEN PATIÑO.

Presidente:	Dra. Patricia Ostrosky Shejet
Vocal:	Dra. Rocío Alcantara Hernández
Vocal:	Dr. Félix Recillas Targa
Vocal:	Dr. Arturo Ortega Soto
Secretario:	Dra. Ana María Salazar Martínez

De acuerdo con lo anterior, la alumna se apegó a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (29 septiembre de 2006).

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de Octubre de 2007.

Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

**DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO LA  
AUTORA FUE BECARIA  
DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO (DGEP) DE LA UNAM Y DEL CONSEJO  
NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (NO. DE  
REGISTRO 167177)**

**Este trabajo fue realizado en el  
Laboratorio de Regulación Transcripcional en  
Eucariontes del  
Departamento de Genética y Biología Molecular  
del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados,  
del Instituto Politécnico Nacional.  
Bajo la dirección de la  
Dra. Esther López-Bayghen Patiño.**

**ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO GRACIAS AL APOYO  
CONCEDIDO POR CONACYT (PROYECTO 50414)**

## **MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL**

**Dra. PATRICIA OSTROSKY SHEJET**

**Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental  
Instituto De Investigaciones Biomédicas  
UNAM**

**Dr. FÉLIX RECILLAS TARGA**

**Departamento de Biología Molecular  
Instituto De Fisiología Celular  
UNAM**

## **AGRADECIMIENTOS**

\*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Esther, porque son innumerables las experiencias vividas en este maravilloso camino de la ciencia y por todos aquellos sueños compartidos!!

\*Conocerla y contar con su amistad, consejos, asesoramiento y una importante experiencia científica siempre serán de mis mejores momentos. Siempre gracias Dra. Paty, por confiar en este nuestro proyecto!!

\*Contar con el profesionalismo y asesoramiento para obtener los mejores resultados son dos aspectos con los que siempre conté. Por ello, agradezco a los Doctores Félix y Arturo.

\*Saben, con sus enseñanzas y dedicación obtuvimos valiosos resultados que hicieron aún más interesante este proyecto. Especialmente expreso mi agradecimiento al Dr. Moises Morales y a la QFB Montserrat Sordo por compartir conmigo la emoción de cada uno de los resultados obtenidos.

\*Ani, Montse, Doris, Andrea y Yair, siempre lindas personas dispuestas a brindarme su ayuda en el maravilloso laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, UNAM.

\*A mis compañeros y amigos de laboratorio, Maty, Miriam, Irma, Yaneth, Yolis, Lety, Jackie, Balam, Moises y Diego. Por el buen equipo de trabajo que hicimos en todo momento en nuestro laboratorio!!

## **AGRADECIMIENTOS**

\*La importante asistencia técnica de Gerardo Marmolejo nos ha permitido llevar a cabo cada uno de los experimentos, gracias Gersito.

\*Sarai, por toda tu dedicación y constancia en la recolecta de las muestras logramos obtener las celulitas tan delicadas, los queratinocitos. Gracias por tu excelente trabajo.

\*Gaby y Bety, siempre dispuestas a ayudarme en todo momento y por la gran calidad de trabajo que realizan.

\*Por todo el asesoramiento administrativo recibido de Lilia, Dolores, Ma. de Jesús, Lilia, Yolanda y Antonio. Un gran grupo de trabajo del Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

\*Al equipo de trabajo de la Biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud: Imelda, Alberto, Pedro, Arnulfo y José Luís, por su amable y eficiente trabajo.



## **AGRADECIMIENTOS**

\*Y nuestros sueños van por buen camino, juntos cumplimos uno más. De corazón mil gracias papás por siempre estar a mi lado y por anhelar estos momentos tanto como yo!!

\*Meris, Lili y Luis, mis queridos hermanos, gracias por toda su comprensión, cariño y ayuda de todos los días!!

\*Claudia, Gamma, Everardo, René y Alex, siempre amigos. Por seguir compartiendo conmigo todos aquellos momentos que nos hacen crecer como personas.

\*Guille, toda la confianza que me brindas, consejos, una valiosa amistad y aún esas las largas charlas que mantenemos, otra vez se intercalaron en este sueño compartido!!

\*A todas aquellas personas que me dieron sabios consejos y estuvieron siempre dispuestos a ayudarme, gracias.

*“La felicidad es a veces una bendición, pero por lo general es una conquista. A veces nos invade una sensación de tristeza...., pero todo es pasajero, y no deja marcas. Y en el futuro podemos mirar hacia atrás con orgullo y fe”*

*Paulo Coelho.*

**Los resultados del presente trabajo fueron expuestos en los siguientes foros:**

**Primer Congreso Nacional de Transducción de Señales.**

M. Sandoval, E. López-Bayghen. p53 en células epiteliales expuestas al Arsénico:  
Activación de PKB.  
2 al 5 de septiembre. 2007. Veracruz, Ver.

**IV Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia**

Regulación de la proteína p53 en células epiteliales expuestas al arsénico: el papel de la cinasa PKB/AKT  
Mayo 24-25, 2007. León, Guanajuato, México.

**46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology**

Arsenic-induced p53-DNA Binding and Activity in Epithelial Cells  
Diciembre 9-13, 2006. San Diego, CA, USA

**As 2006: International Congress**

Arsenic exposure: p53 induction in epithelial cells and its relationship with cell differentiation and proliferation  
Junio 20-24, UNAM. México, D.F., México

**44<sup>th</sup> Annual Meeting. The American Society for Cell Biology**

Exposure to Arsenic: Modification of Cell Proliferation and Differentiation markers in Primary Human Keratinocytes.  
Dic 4-8, 2004. Washington DC, USA

**XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.**

Análisis de las Alteraciones en la Proliferación y Diferenciación Celular Inducidas por Arsénico en Queratinocitos Humanos  
Noviembre 28-Diciembre 3, 2004, Ixtapa Gro. México

## Símbolos y Abreviaturas

<b>AP-1:</b>	Factor Activador 1
<b>AP-2:</b>	Factor Activador 2
<b>As:</b>	Arsénico
<b>As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:</b>	Trióxido de arsénico
<b>As<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:</b>	Pentóxido de arsénico
<b>AsCl<sub>3</sub>:</b>	Tricloruro de arsénico
<b>ATM:</b>	Cinasa mutada en ataxia telangiectasia
<b>ATR:</b>	Cinasa relacionada con Rad3
<b>Bad:</b>	Proteína proapoptótica de la familia bcl-2
<b>C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>AsNO<sub>3</sub>:</b>	Ácido arsanílico
<b>CAT:</b>	Cloranfenicol-acetil-transferasa
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b>	Calcio
<b>Ca<sub>3</sub>(AsO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>:</b>	Arseniato de calcio
<b>CaCl<sub>2</sub>:</b>	Cloruro de calcio
<b>CBP:</b>	Proteína de unión a proteínas que se unen a elementos de respuesta a cAMP
<b>CDKs:</b>	Cinasas dependientes de ciclinas
<b>Chk1/2:</b>	Cinasa de los puntos de control 1 ó 2
<b>Ci:</b>	Curie
<b>(CK)1-δ:</b>	Cinasa 1d de la caseína
<b>CREB:</b>	Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP
<b>dATP:</b>	Desoxiadenosina trifosfato
<b>DNA-PK:</b>	Cinasa dependiente de DNA
<b>DMA<sup>+5</sup>:</b>	Ácido dimetilarsínico
<b>DTT:</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA:</b>	Ácido etilen-diamino-tetraacético
<b>EGF:</b>	Factor de crecimiento epidermal
<b>EGTA:</b>	Ácido etilen-glicol-bis-(beta-aminoetil-éter)N,N,N,N-tetraacético
<b>GSH:</b>	Glutación reducido
<b>HATs:</b>	Acetiltransferasas de histonas
<b>H<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub>:</b>	Ácido arsénico
<b>HDAC:</b>	Desacetilasas de histonas
<b>HEPES:</b>	Ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-etanosulfónico
<b>Hi:</b>	Involucrina humana
<b>IARC:</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
<b>IGF-I:</b>	Factor de crecimiento I similar a la insulina
<b>IGF-II:</b>	Factor de crecimiento II similar a la insulina
<b>IN:</b>	Índice nuclear
<b>KGF:</b>	Factor de crecimiento de queratinocitos
<b>Lys:</b>	Lisina
<b>MMA<sup>+5</sup>:</b>	Ácido monometilarsínico
<b>MTA2:</b>	Proteína 2 asociada a metástasis

<b>MTT:</b>	(3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)
<b>NaAsO<sub>2</sub>:</b>	Arsenito de sodio
<b>Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>:</b>	Arseniatos de sodio
<b>NP-40:</b>	Nonidet P-40
<b>nt:</b>	Nucleótido
<b>Oct-1/Oct-2:</b>	Proteínas de unión 1 y 2 a octámeros
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>Pb<sub>3</sub>(AsO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>:</b>	Arseniatos de plomo
<b>PCAF:</b>	Factor asociado a CBP/p300
<b>PDK1/2:</b>	cinasa 1 ó 2 dependiente de 3'-fosfoinosítido
<b>PID:</b>	Proteína parecida a la proteína MTA2
<b>PI3K:</b>	Cinasa de la posición 3 del fosfatidil inositol
<b>PKB/Akt:</b>	Proteína cinasa B
<b>PKC:</b>	Proteína cinasa C
<b>PMSF:</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>Poli(dI-dC) :</b>	Poli-desoxiinosina-desoxicitidina
<b>POU:</b>	Factores transcripcionales Pit-Octa-UNC
<b>PVDF:</b>	Polivinilideno di-fluoruro
<b>QHN:</b>	Queratinocitos humanos normales
<b>Rb:</b>	Proteína de retinoblastoma 1
<b>RIPA:</b>	Amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación
<b>SAM:</b>	S-adenosilmetionina
<b>Ser:</b>	Serina
<b>SDS-PAGE:</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio
<b>SFB:</b>	Suero fetal bovino
<b>Skn1a:</b>	Factor octamérico de la piel
<b>Sp1:</b>	Proteína estimuladora 1
<b>TATA:</b>	Secuencia rica en T y A característica de promotores
<b>TEF-1:</b>	Factor de transcripción potenciador 1
<b>TGF β1/2:</b>	Factores de crecimiento transformantes β1 y 2
<b>Thr:</b>	Treonina
<b>Uv:</b>	Ultravioleta

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Zonas de exposición crónica al arsénico en el mundo	7
<b>Figura 2.</b>	Metabolismo del arsénico	8
<b>Figura 3.</b>	Estratos celulares de la epidermis	12
<b>Figura 4.</b>	El NaAsO <sub>2</sub> no causa efectos citotóxicos significativos en células epiteliales humanas	37
<b>Figura 5.</b>	El NaAsO <sub>2</sub> genera efectos genotóxicos en los QHN	39
<b>Figura 6.</b>	El tratamiento con NaAsO <sub>2</sub> induce a p53	40
<b>Figura 7.</b>	Efecto del NaAsO <sub>2</sub> sobre la actividad de unión de la proteína p53 a su secuencia consenso en el DNA	42
<b>Figura 8.</b>	Comparación del complejo p53-DNA en células epiteliales	43
<b>Figura 9.</b>	El NaAsO <sub>2</sub> induce respuestas diferentes sobre el complejo p53-DNA en la línea celular C33-A	45
<b>Figura 10.</b>	Los niveles de la proteína p53 se incrementan en células C33-A tratadas con NaAsO <sub>2</sub>	46
<b>Figura 11.</b>	El NaAsO <sub>2</sub> induce la fosforilación de las cinasas PKB/Akt y GSK-3β en los cultivos secundarios de los QHN	47
<b>Figura 12.</b>	La activación de la vía PI3-K/PKB/Akt promueve la unión de p53 al DNA en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al NaAsO <sub>2</sub>	49
<b>Figura 13.</b>	El NaAsO <sub>2</sub> induce la fosforilación de PKB/Akt en las células C33-A, su activación favorece al complejo p53-DNA a tiempos cortos	50
<b>Figura 14.</b>	La cinasa PKC participa en la inducción de la unión de p53 al DNA en las células C33-A	51

<b>Figura 15.</b>	La exposición prolongada al NaAsO <sub>2</sub> en las células C33-A ocasiona la disminución del complejo p53, así como la pérdida de su funcionalidad	52
<b>Figura 16.</b>	El Ca <sup>2+</sup> favorece la actividad de unión de p53 al DNA	54
<b>Figura 17.</b>	El NaAsO <sub>2</sub> induce cambios relacionados con el proceso de la diferenciación celular en los cultivos secundarios de los QHN	56
<b>Figura 18.</b>	Efecto del NaAsO <sub>2</sub> sobre la proliferación celular de los cultivos secundarios de los QHN	58
<b>Figura 19.</b>	El NaAsO <sub>2</sub> induce la proliferación celular en las células C33-A	61
<b>Figura 20.</b>	Modelo propuesto del efecto del NaAsO <sub>2</sub> en células epiteliales	63

## Índice

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<i>Índice</i> .....	1
<i>Resumen</i> .....	3
<i>Abstract</i> .....	4
<i>Introducción</i> .....	5
<i>El arsénico y sus propiedades</i> .....	5
Distribución ambiental.....	6
Exposición en poblaciones humanas.....	6
Metabolismo del arsénico.....	8
Efectos biológicos del arsénico.....	9
<i>El arsénico y los epitelios</i> .....	12
Características generales de la epidermis.....	12
Factores reguladores de la proliferación y diferenciación epitelial.....	13
La Involucrina Humana, un marcador de diferenciación celular.....	14
Efectos del As en la Piel.....	15
<i>Las respuestas al arsénico: señalización y efectores</i> .....	16
La función de la proteína p53 en los procesos celulares.....	16
Modificaciones post-traduccionales de p53: su activación.....	17
La actividad de unión de p53 al DNA.....	19
Vías de señalización en la regulación transcripcional ejercida por p53.....	20
La cinasa PKB/Akt.....	20
PKC y p53.....	22
Ciclina D1 como un marcador de proliferación epitelial.....	23
<i>Hipótesis</i> .....	26
<i>Objetivos</i> .....	26
<i>Objetivo General:</i> .....	26
<i>Objetivos Particulares:</i> .....	26
Cultivos Celulares.....	29
Evaluación de la Citotoxicidad.....	29
Genotoxicidad y proliferación celular en los cultivos secundarios de los QHN.....	30
Proliferación Celular en los cultivos secundarios de los QHN y las células C33-A.....	31
Inmunodetección en Fase Sólida.....	31
Ensayos de Interacción DNA-proteína.....	32
• Extractos nucleares: Cultivos secundarios de los.....	32
• Oligonucleótidos:.....	33
• Marcaje de oligonucleótidos:.....	33
• Ensayos de Retardamiento y Competencia:.....	34
• Ensayos de Super-retardamiento:.....	34
Plásmidos.....	34
Ensayos de transfección transitoria y ensayos CAT.....	35
Inmunocitoquímica.....	35
<i>Estrategia Experimental</i> .....	37



<i>Resultados</i> .....	38
Efectos del arsenito de sodio (NaAsO <sub>2</sub> ) sobre las células epiteliales .....	38
Los cultivos secundarios de los QHN presentan daño genotóxico al ser expuestos al NaAsO <sub>2</sub> .....	39
El tratamiento con NaAsO <sub>2</sub> incrementa los niveles de la proteína p53 en los cultivos secundarios de los QHN.....	40
El tratamiento con NaAsO <sub>2</sub> incrementa la unión de la proteína p53 (como factor de transcripción) al DNA en los cultivos secundarios de los QHN.....	42
El complejo p53-DNA esta presente en las células C33-A.....	44
La actividad de unión de p53 al DNA es modulada por el NaAsO <sub>2</sub> en las células C33-A .....	45
El tratamiento con NaAsO <sub>2</sub> modula los niveles de la proteína p53 en las células C33-A	47
Activación de la vía de señalización PKB/Akt en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al NaAsO <sub>2</sub> .....	48
Efectos de la vía PI3-K/PKB/Akt en la actividad de unión de la proteína p53 al DNA en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al NaAsO <sub>2</sub> .....	49
El NaAsO <sub>2</sub> activa a la vía PKB/Akt en las células C33-A y su activación regula al complejo p53-DNA de manera dependiente del tiempo .....	50
El papel de PKC en la regulación del complejo p53-DNA en células C33-A expuestas al NaAsO <sub>2</sub> .....	52
La actividad transcripcional de p53 es disminuida en células C33-A expuestas al NaAsO <sub>2</sub> .....	53
El papel del Ca <sup>2+</sup> en la regulación de la actividad de unión de p53 al DNA en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al NaAsO <sub>2</sub> .....	54
El NaAsO <sub>2</sub> en el ambiente de la diferenciación celular de los cultivos secundarios de los QHN .....	56
La tasa de proliferación celular disminuye en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al NaAsO <sub>2</sub> .....	58
El NaAsO <sub>2</sub> promueve la proliferación celular en la línea C33-A .....	61
<i>Discusión</i> .....	65
<i>Conclusiones</i> .....	74
<i>Bibliografía</i> .....	76
<i>Anexos</i> .....	86
ANEXO 1.....	87
ANEXO 2.....	88
ANEXO 3.....	89
ANEXO 4.....	90
ANEXO 5.....	91
Mapas de los plásmidos empleados .....	91
Plásmido reportero p53CAT .....	91
Plásmido reportero que contiene el promotor de ciclina D1 (humano). .....	91

## **Resumen**

La exposición crónica al arsénico inorgánico provoca una serie de alteraciones moleculares en las células eucariontes. Las alteraciones más evidentes se observan en células epiteliales y se han asociado al desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Una serie de mecanismos han sido propuestos para tratar de explicar por qué el arsénico actúa como un agente cancerígeno para el hombre, sin embargo los mecanismos de acción no son los mismos en todos los sistemas y varían dependiendo del tiempo de exposición, las concentraciones del metaloide y del tipo celular en cuestión.

El principal objetivo de este trabajo fue profundizar en los mecanismos que el arsénico utiliza para modular la proliferación y la diferenciación celular en dos sistemas epiteliales, cultivos secundarios de queratinocitos humanos normales y una línea celular epitelial transformada (C33-A). Al analizar varios marcadores celulares como las proteínas ciclina D1, p53 e involucrina humana encontramos que su regulación es modificada en respuesta al arsenito de sodio. La activación de p53, la disminución de ciclina D1 y el incremento de la involucrina humana coinciden con la inducción de la diferenciación en los queratinocitos humanos normales. Por el contrario, en C33-A la exposición al arsenito de sodio indujo a la proteína ciclina D1, la unión de c-myc al DNA y la proliferación celular. Interesantemente los efectos del arsenito de sodio en la activación de p53, como factor de transcripción, fueron modulados de manera diferente dependiendo del tipo celular y del tiempo de exposición al metaloide. Así mismo, el arsenito de sodio ocasionó la activación de la vía de señalización PI3-K/PKB/Akt en ambos tipos celulares, lo que correlacionó con la actividad de unión de p53 al DNA.

De acuerdo con los resultados obtenidos, proponemos que la actividad de unión de p53 al DNA en queratinocitos humanos normales es favorecida por la exposición al arsenito de sodio, desencadenando arresto celular y un proceso de diferenciación. Mientras que en el caso de las células C33-A, que presentan a p53 mutado, se incrementó la proliferación celular en respuesta al tratamiento con arsenito de sodio.

## **Abstract**

Inorganic arsenic is an important environmental contaminant associated with an increased risk of developing human skin cancer. The molecular mechanisms by which arsenic causes epithelial cancers is a central subject for Toxicology, because the molecular bases of these phenomena are not completely understood. Arsenic has been reported to modulate a variety of cellular signaling pathways which affect diverse processes such as cell proliferation, differentiation and apoptosis.

The central objective of this study was to explore the molecular mechanisms involved in arsenic actions over cell proliferation and differentiation in two cellular epithelial systems. Citotoxic effects were evaluated in cultured epidermal keratinocytes and the C33-A cell line. Markers such as cyclin D1, p53 and human involucrin were modulated by arsenic. While p53 was stabilized, cyclin D1 levels decreased and involucrin gene was activated. We also explored the effects of arsenic on the activation of PI3-K/PKB/Akt signalling pathway and its repercussion in the p53 activation in both epithelial systems. Interestingly, p53 activity was modulated by activating this signalling pathway, being this effect dependent on cell-type and exposure time.

We propose that under a normal p53 environment, as found in primary cultured keratinocytes, arsenic induces differentiation and stops cell growth. However, under the influence of a mutant p53 like that found in C33-A carcinoma cells, PI3-K/PKB/Akt signaling drives an increase in cell proliferation.

## ***Introducción***

El estudio de los contaminantes ambientales tiene gran importancia a nivel mundial. Los efectos de estos contaminantes a corto y largo plazo son complejos debido a que la toxicidad varía dependiendo de su interacción con otros agentes tóxicos, de su biotransformación y de los niveles de exposición. El arsénico es uno de los contaminantes ambientales más ampliamente distribuidos. Puede combinarse con otros elementos para formar compuestos arsenicales, orgánicos e inorgánicos, de los cuales estos últimos generalmente son los más tóxicos y predominan en el agua. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que el consumo durante períodos prolongados de agua para beber que contenga una cantidad mayor a 10 µg/L causa arsenicosis, enfermedad crónica que ocasiona dermatopatías, daños en el sistema cardiovascular, neuropatías y cáncer; sin embargo no existe una concentración segura de arsénico (<http://www.who.int>). Así mismo, el arsénico fue el primer metaloide identificado como carcinógeno para el hombre (IARC 1987).

## ***El arsénico y sus propiedades***

El arsénico (As) está clasificado como un elemento de transición metaloide por lo que comparte diversas propiedades físicas y químicas con los elementos metálicos. Sus valencias principales son  $3-, 3+, 5+$ . El As tiene un comportamiento complejo lo que da lugar a múltiples compuestos arsenicales presentes en forma inorgánica y orgánica con estados de oxidación trivalente y pentavalente, siendo estos últimos más estables en la naturaleza (Styblo et al. 1999).

Los compuestos de As inorgánico trivalentes más comunes son el trióxido de arsénico ( $As_2O_3$ ), el arsenito de sodio ( $NaAsO_2$ ) y el tricloruro de arsénico ( $AsCl_3$ ), mientras que los compuestos del As inorgánico pentavalentes son el pentóxido de arsénico ( $As_2O_5$ ), el ácido arsénico ( $H_3AsO_4$ ) y los arseniatos como los de sodio, calcio y plomo ( $Na_2HAsO_4$ ,  $Ca_3(AsO_4)_2$ ,  $Pb_3(AsO_4)_2$ ). Por otra parte, los compuestos del As orgánico son el ácido arsanílico ( $C_6H_8AsNO_3$ ) y sus formas metiladas, el ácido

## ***Introducción***

El estudio de los contaminantes ambientales tiene gran importancia a nivel mundial. Los efectos de estos contaminantes a corto y largo plazo son complejos debido a que la toxicidad varía dependiendo de su interacción con otros agentes tóxicos, de su biotransformación y de los niveles de exposición. El arsénico es uno de los contaminantes ambientales más ampliamente distribuidos. Puede combinarse con otros elementos para formar compuestos arsenicales, orgánicos e inorgánicos, de los cuales estos últimos generalmente son los más tóxicos y predominan en el agua. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que el consumo durante períodos prolongados de agua para beber que contenga una cantidad mayor a 10  $\mu\text{g/L}$  causa arsenicosis, enfermedad crónica que ocasiona dermatopatías, daños en el sistema cardiovascular, neuropatías y cáncer; sin embargo no existe una concentración segura de arsénico (<http://www.who.int>). Así mismo, el arsénico fue el primer metaloide identificado como carcinógeno para el hombre (IARC 1987).

## ***El arsénico y sus propiedades***

El arsénico (As) está clasificado como un elemento de transición metaloide por lo que comparte diversas propiedades físicas y químicas con los elementos metálicos. Sus valencias principales son  $3-, 3+, 5+$ . El As tiene un comportamiento complejo lo que da lugar a múltiples compuestos arsenicales presentes en forma inorgánica y orgánica con estados de oxidación trivalente y pentavalente, siendo estos últimos más estables en la naturaleza (Styblo et al. 1999).

Los compuestos de As inorgánico trivalentes más comunes son el trióxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), el arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) y el tricloruro de arsénico ( $\text{AsCl}_3$ ), mientras que los compuestos del As inorgánico pentavalentes son el pentóxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ), el ácido arsénico ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ) y los arseniatos como los de sodio, calcio y plomo ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$ ,  $\text{Pb}_3(\text{AsO}_4)_2$ ). Por otra parte, los compuestos del As orgánico son el ácido arsanílico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{AsNO}_3$ ) y sus formas metiladas, el ácido

monometilarsónico ( $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ ) y el ácido dimetilarsínico ( $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ ), ambos productos del metabolismo del As (Hughes 2002).

### **Distribución ambiental**

El As es un elemento ampliamente distribuido en la corteza terrestre. De modo natural, el As se encuentra en forma de complejos en ciertas rocas y capas minerales. Al encontrarse en la corteza terrestre puede ser liberado al ambiente como resultado de la actividad volcánica y de la erosión de los depósitos minerales.

El As también se encuentra ampliamente distribuido en el aire donde las concentraciones en sitios lejanos a actividades antropogénicas son de 1-3 ngAs/m<sup>3</sup>, mientras que en áreas industriales emisoras de As, se pueden alcanzar niveles entre 100 y 300 ngAs/m<sup>3</sup>. Las concentraciones en el agua son usualmente menores a 10 µg/L, mientras que en sitios cercanos a minas o contaminados con minerales arsenicales, las concentraciones fluctúan entre 200 y 1000 µg/L. Los niveles de As en el suelo van de 1-40 mg/kg y en las áreas agrícolas se encuentran niveles más altos por la presencia de residuos de plaguicidas arsenicales (WHO 1993).

### **Exposición en poblaciones humanas**

Las principales actividades humanas que emiten As al medio ambiente son los procesos de fundición y refinación de metales no ferrosos (Pb, Zn y Cu), el uso de combustibles fósiles (carbón, combustible, madera) y el uso de agentes conservadores de la madera. Por otra parte, el depósito inadecuado de desechos químicos con grandes cantidades de este metaloide representa otra fuente importante de emisión (Salazar 1994).

Una de las vías de exposición al As inorgánico más tóxica es la ingesta de agua proveniente de subsuelos ricos en depósitos minerales. Esta vía, constituye un problema de salud pública descrito en diversas áreas geográficas como Taiwan

(Tseng et al. 1968), Chile (Cebrian et al. 1983; Buchet and Lauwerys 1988), Argentina (Astolfi 1971) y México (Cebrian et al. 1983), por citar algunas de ellas (Fig. 1). En todas estas regiones se excede la norma en cuanto a las concentraciones de As en el agua para beber ( $10 \mu\text{g/L}$ ) establecida por la OMS (WHO 1993), mientras que las vías de exposición humana al As inorgánico a través del aire y suelo son poco significativas, excepto en los individuos expuestos ocupacionalmente, como es el caso de los mineros.



**Figura 1.** En rojo se indican las principales zonas de exposición crónica al arsénico en el mundo.

### **Problemática en México**

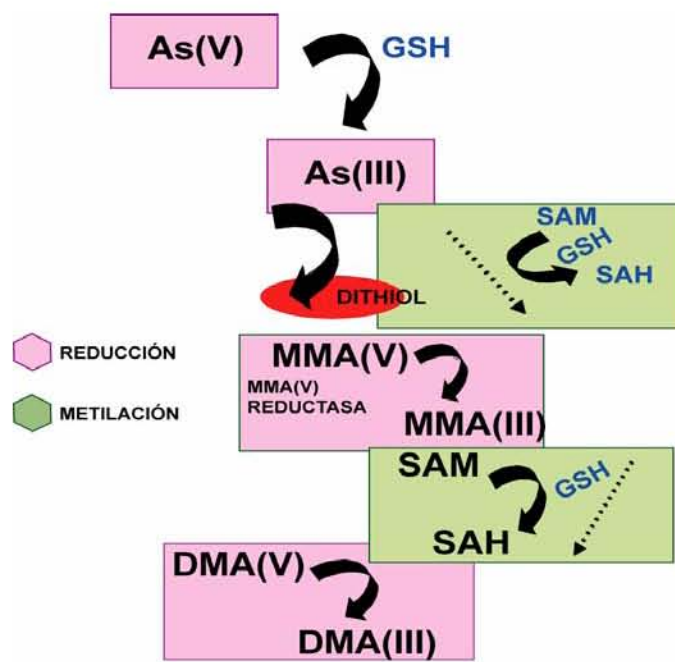
México es uno de los principales productores de As y es de gran importancia hacer notar la existencia de zonas con agua altamente contaminada, en donde el problema de hidroarsenicismo crónico en los habitantes es muy preocupante. Algunas de estas regiones se encuentran en los estados de Chihuahua, Hidalgo, Nuevo León, Coahuila y Durango.

En la Comarca Lagunera, región situada en el centro norte de México, se han detectado acuíferos cuya concentración de arsénico excede los límites establecidos

por las regulaciones. En esta región existen zonas en las que el hidroarsenicismo crónico es endémico y donde incluso han surgido brotes de enfermedades asociadas. Los habitantes de las poblaciones rurales conforman el grupo más vulnerable, ya que en muchas ocasiones tienen como única fuente de abastecimiento el agua envenenada de los acuíferos (Cebrian et al. 1983).

## Metabolismo del arsénico

El metabolismo del As tiene un papel muy importante en la toxicidad. Bird et al., en 1948, propusieron la formación de los compuestos metilados del As en seres vivos (Vega et al. 1995). Sin embargo, fue hasta principios de los 70s que se cuantificaron las especies metiladas de As en la orina de algunos mamíferos, incluyendo al hombre (Braman and Foreback 1973). El metabolismo involucra dos procesos, la reducción del  $\text{As}^{5+}$  a  $\text{As}^{3+}$  y las reacciones de metilación oxidativa que convierten el  $\text{As}^{3+}$  en una especie metilada (Thompson 1993). Los productos finales de la metilación del As inorgánico son el ácido monometilarsónico ( $\text{MMA}^{+5}$ ) y el ácido dimetilarsínico ( $\text{DMA}^{+5}$ ) (Fig. 2). El proceso de metilación se realiza en diferentes tejidos como el pulmón y el riñón, sin embargo, el principal sitio es la fracción citosólica del hígado. La S-adenosilmetionina (SAM) es el principal donador de los grupos metilo y el glutatión reducido (GSH) es el donador de electrones para la reducción de los compuestos arsenicales (Buchet and Lauwerys 1988).



**Figura 2. Metabolismo del arsénico.** SAM, adenosilmetionina; GSH, glutatión reducido (GSH);  $\text{MMA}^{+5}$ , ácido monometilarsónico;  $\text{DMA}^{+5}$ , ácido dimetilarsínico.

SAM es la principal molécula donadora de los grupos metilo en la metilación del arsénico



## Efectos biológicos del arsénico

Ante una exposición crónica al As, hay un gran número de efectos adversos en varios órganos como la piel, el hígado, el pulmón y la vejiga urinaria. Así mismo, se han reportado efectos genotóxicos y carcinogénicos (Cebrian et al. 1983; Lee et al. 1985; Ostrosky-Wegman et al. 1991; Bates et al. 1992), razón por la cual el As ha sido clasificado como un carcinógeno para el hombre por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC 1987). Estudios realizados por Chen et al., en 1985, demostraron que los individuos que se encuentran ocupacionalmente expuestos al As inorgánico por la vía aérea muestran un incremento en la presencia de cáncer de pulmón; mientras que ante una exposición por vía oral, los individuos presentan un aumento en la incidencia de cáncer de piel, de vejiga, de riñón, de hígado y de pulmón (Chen et al. 1985).

Hasta el momento no se ha demostrado que el As produzca mutaciones puntuales, sin embargo se ha registrado la presencia de alteraciones cromosomales como aneuploidías, formación de tetraploides y la generación de micronúcleos (Ostrosky-Wegman et al. 1991; Gonsebatt et al. 1992; Vega et al. 1995). Así mismo, el As induce alteraciones clastogénicas (rompimiento de cromosomas, provocando pérdidas o rearrreglos de partes de cromosomas) y actividad aneugénica (ganancia o pérdida de cromosomas intactos) (Vega et al. 1995).

Existen varios mecanismos propuestos para tratar de explicar el daño inducido por el As al material genético. Por ejemplo, la posible inhibición de una o más enzimas involucradas en la replicación y reparación del DNA (Li and Rossman 1989; Dong and Luo 1993); la inhibición del reensamble de las cadenas rotas de DNA al interactuar con los grupos ditioles (Lynn et al. 1997) y la formación de radicales libres que inducen rupturas en las cadenas del DNA (Yamanaka et al. 1995). Por otra parte, se conoce que el As juega un papel importante en regular la metilación del DNA, siendo uno de sus mecanismos en la inducción de la carcinogénesis. Al respecto, se ha estudiado el grado de metilación del gen p53 y p16 a partir de

muestras de sangre de personas expuestas crónicamente al arsénico. Se encontró un estado de hipermetilación de la región promotora del gen p53 y del gen p16, siendo este efecto dependiente de la dosis. Interesantemente, una parte de las muestras estudiadas, también presentó un estado de hipometilación en el gen p53 con altas concentraciones de As. Al parecer el estado de metilación del DNA está en función del tiempo y grado de exposición al arsénico (Chanda et al. 2006). Así mismo, células de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549, expuestas al arsenito de sodio (0.08-2  $\mu$ M y 30-300  $\mu$ M) presentan hipermetilación en un fragmento del promotor de p53, proponiendo que el mecanismo de carcinogénesis inducida por el As podría ser a través de la alteración de la metilación del DNA de un gen supresor de tumores dependiente de la metiltransferasa y la S-adenosilmetionina (Mass and Wang 1997).

Otro de los estudios en relación al estado de metilación del DNA fué el realizado en pacientes que presentan cáncer de vejiga por exposición crónica al arsénico inorgánico. El estudio se basó en tres genes supresores de tumores, p16 (INK4A), RASSF1A and PRSS3. En todos los casos se observó aproximadamente un 30% de metilación en la región promotora, por lo que se sugiere que el arsénico induce alteraciones epigenéticas, dando como resultado el inicio de la carcinogénesis (Marsit et al. 2006). De acuerdo con los resultados antes mencionados, una de las principales hipótesis que se manejan es que el As al ser metilado durante su metabolismo, puede disminuir los niveles de los grupos metilo intracelulares y de esta manera inducir cambios en la metilación del DNA, participando en el desarrollo de cánceres inducidos por el As.

En cuanto al papel del As sobre la regulación de la expresión génica, estudios recientes han encontrado que el As trivalente estimula la actividad transcripcional del complejo AP-1 en la línea celular HeLa (Cavigelli et al. 1996). En queratinocitos, el arsenato suprime su programación mediante la alteración de los complejos AP-1 y AP-2 (Kachinskas et al. 1997). Así mismo, en queratinocitos en cultivo se encontró que el arsenito de sodio potencia la formación de papilomas al estimular genes que

codifican para factores de crecimiento y la expresión de *c-myc* (Germolec et al. 1997).

En estudios realizados por Ostrosky-Wegman y cols., se reportaron alteraciones en la respuesta proliferativa (inducida por la fitohemaglutinina) de los linfocitos de individuos que se encuentran expuestos al As mediante el agua de bebida. También fue evidente un retraso en la progresión del ciclo celular, al demostrar que la cinética de proliferación de los linfocitos fue más lenta. Resultados similares se han reportado en linfocitos humanos tratados *in vitro* con As (Ostrosky-Wegman et al. 1991; Gonsebatt et al. 1992).

En la Tabla 1, se resumen y comparan algunos de los efectos y alteraciones celulares más comunes causados por el As en diferentes tipos celulares.

Mecanismos	Líneas Celulares / Especies	Efectos	Referencias
Genotoxicidad	Células de embrión de ratón	Aberraciones cromosomales	Rossman et al, 1980
	Linfocitos humanos Linfocitos humanos Fibroblastos humanos Células de pulmón humano Células CHO -K1	Micronúcleos	Ostrosky-Wegman et al, 1997 Jha et al, 1992 Jha et al, 1992 Tozuka et al, 1993 Gurr et al, 1993
Proliferación Celular	Linfocitos humanos Linfocitos humanos Vejiga de rata Riñón de rata Fibroblastos humanos Humanos	Incremento en la proliferación celular Incremento en la proliferación celular Incremento en la proliferación celular Incremento en la proliferación celular Incremento en la expresión de ciclina D1 Keratosis	Ostrosky-Wegman et al, 1991 Gonsebatt et al, 1992 Wanibuchi et al, 1996 Murai et al, 1993 Vogt and Rossman, 2001 Germolec et al, 1997
Promotor de cáncer	Piel de ratón Ratón Rata F344/DuCrj/rata ddY/ratón	Cáncer Tumores Tumores renales Cáncer de vejiga Tumores de pulmón	Rossman et al, 2001 Hughes, 2002 Shirachi et al, 1983 Yamamoto et al, 1995 Yamanaka et al, 1996
Reparación del DNA	Fibroblastos humanos	Inhibición de la reparación de la ruptura de dímeros de timina del DNA	Okui and Fujiwara, 1986
	Células eucariontes	Inhibición de la polimerasa poly-(APD-ribosa)	Berg, 1985
Metilación del DNA	Línea celular de adenocarcinoma A546	Metilación de la región promotora del gen p53	Mass y Wang, 1997
	Muestras de pacientes con cáncer de vejiga	Hipermetilación de los genes p16, RASSF1A y PRSS3	Marsit et al, 2006
	Muestras de sangre de pacientes expuestos al As	Hipometilación e hipermetilación de la región promotora del gen p53	Chanda et al, 2006


Tabla 1. Alteraciones celulares ocasionadas por el arsénico.

## El arsénico y los epitelios

### Características generales de la epidermis

La epidermis es la capa más externa de la piel y es la primera línea de defensa y protección para los organismos multicelulares. Los queratinocitos epidermales son las células responsables de la construcción de las barreras protectoras que caracterizan la función de la epidermis. En la epidermis se pueden distinguir cuatro estratos celulares. El estrato basal con queratinocitos que se encuentran en un estado de proliferación activa, proporcionando un suministro continuo de células nuevas para repoblar la epidermis. Cuando las células migran de este estrato a estratos superiores, pierden la capacidad de dividirse, es entonces cuando en los estratos espinoso y granuloso se inicia la expresión de una serie de genes considerados como marcadores tempranos de la diferenciación de los queratinocitos, tales como la involucrina, la filagrina, la loricrina, la transglutaminasa y ciertas queratinas como K1 y K10. Las células completamente diferenciadas forman la cubierta cornificada, que es el producto de un proceso de entrecruzamiento de estas proteínas fibrilares altamente impermeables (Fig 3). La cubierta cornificada es una estructura altamente resistente a la degradación y tiene como función evitar la desecación, proteger contra los rayos UV y constituir una barrera protectora contra los agentes infecciosos (Eckert et al. 1997; Steinert and Marekov 1997).

Figura 3. Estratos celulares de la epidermis (modificado de Eckert et al. 1997)

	CAPA	MARCADORES
	<b>CORNIFICADA</b>	<b>FILAGRINA</b>
	<b>GRANULOSA</b>	<b>K1, K10, TG-1 PROFILAGRINA LORICRINA</b>
	<b>ESPINOSA</b>	<b>K1, K10, K9 INVOLUCRINA</b>
	<b>BASAL</b>	<b>K5, K14</b>

## **Factores reguladores de la proliferación y diferenciación epitelial**

El proceso de la diferenciación celular de los queratinocitos epidermales es el resultado de la expresión coordinada y finamente regulada de genes que codifican para proteínas estructurales y es atribuible a la acción de diversas combinaciones de factores de transcripción. Algunos de los genes que se expresan durante la diferenciación de los queratinocitos lo hacen de manera coordinada, entre ellos el gen de la loricrina, la filagrina, la cistatina y la involucrina, cuyos productos forman la cubierta cornificada. Estos genes se localizan en el cromosoma 1q21 humano y se han agrupado en una familia multigénica conocida como “Complejo de Diferenciación de los Queratinocitos” (Dale et al. 1985). La expresión de este grupo de genes se activa en los estratos suprabasales de la epidermis, una vez que el proceso de diferenciación ha comenzado. Se sabe, que la alteración en la expresión de alguno de ellos está relacionada con trastornos de la piel como la psoriasis, la hiperqueratosis lamelar (Bernard et al. 1985) y con algunos procesos carcinogénicos (Pei et al. 1996).

El desarrollo y funcionalidad de la epidermis depende del balance adecuado entre las tasas de la proliferación y la diferenciación celular de los queratinocitos epidermales (Eckert et al. 1997). Los factores que regulan su proliferación son considerados como estimuladores de crecimiento, encontrando que los factores de crecimiento similar a la insulina (IGF - I y IGF - II) y los factores de crecimiento epidermal (EGF) aumentan la migración y proliferación de los queratinocitos. Asimismo el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) estimula tanto la proliferación como la diferenciación de los mismos. Por otro lado, los factores de crecimiento transformantes (TGF  $\beta$ 1 y 2) suprimen la proliferación celular, dando paso a la diferenciación celular. Los glucocorticoides como la hidrocortisona, son potenciadores de la diferenciación celular de los queratinocitos (Eckert et al. 1997; Gniadecki 1998).

## **La Involucrina Humana, un marcador de diferenciación celular**

El gen de la involucrina humana (Hi) es activado tempranamente durante la diferenciación de los queratinocitos epidermales, codifica para una proteína estructural de 68 kDa, la cual es fundamental para la formación de la cubierta cornificada de los epitelios estratificados. Su expresión es exclusiva de los queratinocitos epidermales (Pavelic et al. 1996).

El gen Hi está constituido por aproximadamente 6000 pares de bases (pb); de éstos cerca de 3338 pb constituyen la región codificadora del gen. Esta región está formada por dos exones de 2107 nucleótidos y 43 nucleótidos respectivamente, separados por un intrón de 1188 pb. La región no codificadora 5' está compuesta de 2456 nucleótidos; en esta región se encuentra la caja TATA y todos los elementos que le confieren a este gen su expresión específica de tejido y de estrato. Funcionalmente, la región reguladora contiene tres elementos relevantes, un promotor íntimamente ligado al funcionamiento de un potenciador muy cercano y dependiente de AP-1, una región denominada silenciador transcripcional y finalmente un elemento potenciador distal que media la respuesta a calcio ( $Ca^{2+}$ ) y la actividad transcripcional epitelial para este gen (Carroll et al. 1993; Crish et al. 1993; Welter et al. 1995; Lopez-Bayghen et al. 1996).

Hablando específicamente del silenciador transcripcional de la región reguladora del gen de Hi, existe una serie de estudios que demuestran la interacción de diversos factores de transcripción que regulan la expresión de este gen de forma dependiente y asociada al proceso de la diferenciación celular de los queratinocitos. Se han estudiado ampliamente aquellos eventos moleculares que mantienen reprimido al gen Hi en queratinocitos en multiplicación, demostrando que es un gen que sólo se expresa en células diferenciadas, lo que lo convierte en un marcador temprano de diferenciación celular (Azuara-Liceaga et al. 2004).

## Efectos del As en la Piel

En las poblaciones expuestas crónicamente al As se ha encontrado una mayor incidencia de alteraciones epiteliales dentro de las cuáles destacan:

- Hipocromías, se presentan principalmente sobre las partes no expuestas del cuerpo tales como el tronco, la región glútea y el tercio superior de los muslos. Son características por presentar decoloraciones con apariencia de gotas de lluvia.
- Hiperchromías, están distribuídas de manera similar a las hipocromías. Su característica es la pigmentación café oscuro, también con apariencia de gotas de lluvia.
- Hiperqueratosis palmo-plantar, se presentan en los bordes laterales de las palmas y los dedos, así como en las plantas, arco del pie y cara anterior de los dedos del pie. Se caracteriza por discretas elevaciones corniformes.
- Hiperqueratosis popular, está distribuída en cualquier parte del cuerpo con excepción de las palmas y las plantas. Se caracteriza por placas escamo-queratinosas o parches planos y eritematosos.
- Lesiones ulceradas, cuyas características son compatibles con el diagnóstico de carcinoma epidermoide o basocelular (Yeh 1973).

## **Las respuestas al arsénico: señalización y efectores**

### **La función de la proteína p53 en los procesos celulares**

Durante el desarrollo de los diferentes tipos de cáncer, se han estudiado dos grupos importantes de genes que participan activamente en el proceso de transformación celular, los oncogenes y los genes supresores de tumor. Dentro del grupo de los genes supresores de tumor se encuentra el gen p53, el cual está involucrado en la regulación de la transcripción de genes que arrestan el ciclo celular o controlan la inducción de la apoptosis (el-Deiry et al. 1993).

Se ha demostrado que p53 es una proteína clave en el control del ciclo celular. p53 está involucrada en la interrupción del ciclo celular, durante la fase G<sub>1</sub> en respuesta a daño al DNA causado por la exposición a agentes como las radiaciones, sustancias químicas e incluso especies reactivas de oxígeno. Estos agentes producen un incremento en los niveles de la proteína p53 y de su actividad de unión al DNA, lo que coincide con la inhibición del ciclo celular en el borde G<sub>1</sub>/S (punto de control) y la consiguiente inhibición de la síntesis del DNA (Donehower and Bradley 1993). Por otra parte, también se ha demostrado su participación en el punto de control G<sub>2</sub>/M del ciclo celular, la reparación del DNA, la diferenciación celular y la muerte celular programada (Lane and Benchimol 1990; Levine et al. 1991; Greenblatt et al. 1994).

La pérdida de la funcionalidad de p53 se ha determinado como un factor esencial en el desarrollo de muchos tipos de cáncer. La proteína normal presenta una vida media corta y sus niveles basales son bajos. De manera interesante, cuando las células se someten a una variedad de señales de estrés genotóxico, que impactan en los mecanismos que monitorean la replicación del DNA, la segregación de los cromosomas y la división celular, p53 se acumula en el núcleo y es activada como un factor de transcripción que modula la expresión de un gran número de genes, entre los que se encuentran p21, GADD45, MDM2, IGFBP3 y BAX (el-Deiry 1998; Zhao et al. 2000). Los productos de estos genes median el arresto celular en dos puntos de vigilancia, en G<sub>1</sub>,



cerca del borde de la fase S, o en G<sub>2</sub>, antes de la mitosis. Así mismo, la activación de p53 puede desencadenar otras respuestas que incluyen una muerte celular programada y senescencia. Al parecer, el eslabón bioquímico entre p53, el arresto celular y la apoptosis depende del tipo celular (Appella and Anderson 2001).

### **Modificaciones post-traduccionales de p53: su activación**

La proteína p53 es una fosfoproteína compuesta por 393 aminoácidos que tiene un peso molecular de 53 kDa y una localización nuclear esencial para su actividad como factor de transcripción (Smith et al. 1995). Los estudios realizados sobre la activación de la proteína p53 causada por exposición a agentes que inducen daño celular, se han encaminado al conocimiento de las señales que participan. Estas señales se traducen en modificaciones post-traduccionales, las cuales implican eventos de fosforilación, acetilación, metilación y ubiquitinización de p53 (Appella and Anderson 2001). Es evidente que los cambios post-transduccionales que sufre p53 son complejos, al parecer la diferente naturaleza de los distintos tipos de daño al DNA permite activar diferentes cinasas que modifican de manera muy específica los residuos de aminoácidos de la proteína, llevándola a su activación.

En la región amino terminal (N-terminal) de la proteína p53 se han identificado sitios de fosforilación, primordialmente en serina 6, 9, 15, 20, 33, 37, 46 y en treonina 18 y 81, fosforilaciones que pueden ser inducidas por una exposición a la radiación ionizante o luz UV. En la región carboxilo terminal (C-terminal), Ser315 y Ser392 son fosforiladas. Por otra parte, lisina 320, 373 y 382 son acetiladas en respuesta a daño al DNA.

Al parecer, los eventos de fosforilación concuerdan con el elemento causante de daño. Se encontró que ante una exposición a la radiación ionizante el incremento de la fosforilación en Ser6, 9 y 15 fué observado tempranamente (a los 30 min de exposición), en comparación con la exposición a luz UV, en donde el incremento fue más lento, pero se mantuvo por más tiempo. En fibroblastos humanos bajo condiciones de senescencia, se detectó un incremento significativo de la fosforilación en Ser15,

sugiriendo que la fosforilación en este sitio puede ser una de las señales críticas para la activación de p53 (Ferbeyre et al. 2000; Webley et al. 2000). Por otro lado, los aminoácidos Thr18 y Ser20 son fosforilados en células con daño en el DNA y en células de cáncer de mama, que expresan un p53 silvestre (Craig et al. 1999). Continuando con los estudios de fosforilación (Kapoor and Lozano 1998; Blaydes et al. 2001) se determinó que Ser315 y 392 son los primeros sitios fosforilados en respuesta a la exposición a UV. Por otra parte, la acetilación de Lys382 se reportó en células expuestas a radiación ionizante y luz UV (Sakaguchi et al. 1998), mientras que la acetilación de Lys320 es inducida por luz UV. Así mismo, Lys382 y Lys373 son sitios acetilados en respuesta a hipoxia, antimetabolitos e inhibidores del transporte nuclear (Ito et al. 2001).

La cinasa ATM, ha sido reconocida como la primer cinasa que participa en la fosforilación de p53 en Ser15, en respuesta a radiación ionizante (Banin et al. 1998; Canman et al. 1998), mientras que la cinasa ATR que fosforila a p53 en Ser15 y 37 tiene un papel esencial en la activación de p53 en células expuestas a luz UV. Así mismo, la cinasa DNA-PK, además de tener un papel relevante en la reparación del rompimiento de doble cadena del DNA, regula la fosforilación de p53. Ser9 y Thr18 son los aminoácidos fosforilados por la cinasa caseína (CK)1- $\delta$ , al parecer iniciando una cascada de fosforilación que depende de la fosforilación de los residuos Ser6 y Ser15, no descartando la participación de otras cinasas que puedan contribuir a la fosforilación de estos sitios. Dos cinasas con actividad serina/treonina, Chk1 y Chk2 que se encuentran río abajo de las cinasas ATM y ATR, fosforilan a p53 en Ser20 y posiblemente en otros residuos (Chehab et al. 2000; Shieh et al. 2000). Mientras que ATM y Chk2 activan a p53 en respuesta a la radiación ionizante, ATR y Chk1 son requeridas en respuesta a daño inducido por luz UV.

En lo que respecta a la participación de las acetiltransferasas de histonas (HATs), la proteína de unión a CREB, p300/CBP y el factor asociado PCAF promueven la acetilación de p53 en Lys373 y 382 (p300/CBP) y Lys320 (PCAF) (Sakaguchi et al. 1998; Liu et al. 1999). Estas enzimas se unen a p53 y actúan como co-activadores para

la transcripción mediada por p53 (Avantaggiati et al. 1997; Lill et al. 1997). Por otra parte, las desacetilasas de histonas (HDAC1, 2 y 3) interactúan con p53 regulando negativamente su función. Una serie de estudios sugieren que la desacetilación de p53 es uno de los mecanismos que controlan su actividad (Juan et al. 2000). La desacetilación de p53 es mediada por el complejo de desacetilasas de histonas (HDAC1) y la proteína PID, proteína que ha sido identificada como un componente del núcleo remodelador y del complejo HDAC1 (Luo et al. 2000). Estos resultados resaltan la importancia de la acetilación de p53 y sugieren que la desacetilación e interacción con el complejo NuRD asociado a PID/MTA2 pueden jugar un papel importante en la regulación de la actividad de p53.

### **La actividad de unión de p53 al DNA**

Existen una serie de agentes que dañan al DNA (radiaciones UV, hipoxia, agentes carcinógenos) y que activan a p53 mediante su fosforilación, induciendo su estabilización en el núcleo y potenciando su unión al DNA (Koutsodontis et al. 2005). La proteína p53 es un factor de transcripción que reconoce secuencias blanco en el DNA y regula la expresión de un gran número de genes cuyos productos son requeridos para la progresión del ciclo celular, diferenciación, reparación del DNA y apoptosis. La proteína p53 puede ser estructural y funcionalmente dividida en tres regiones esenciales para su actividad: a) una región altamente acídica en el extremo N-terminal, la cual actúa como un dominio trans-activador, entre los aminoácidos 20 y 60, b) una región central, que le confieren el dominio de unión al DNA, entre los aminoácidos 102 y 292, y c) una región C-terminal, que le confiere un dominio de tetramerización entre los aminoácidos 324 y 355, así como su principal señal de transporte nuclear (Ko and Prives 1996).

La proteína p53, en su forma tetramérica, se une al DNA en cuatro diferentes repetidos 5'-RRRC(A/T)-3' (R=purina). Las principales mutaciones en p53 asociadas a tumores han sido caracterizadas en el dominio de unión al DNA y en la región C-terminal, sin embargo es probable que algunas formas mutadas de la proteína

adquieran la capacidad de unirse al DNA de manera inespecífica, teniendo como resultado la trans-activación de una serie de genes que no son el blanco natural de p53 silvestre, lo que podría explicar el potencial tumorigénico *in vivo* observado en algunas formas mutadas de la proteína en diversos tipos de cáncer (Harris and Levine 2005).

La proteína p53 puede regular de forma positiva o negativa la expresión de sus genes blanco. Esta proteína, favorece la transcripción del gen de la creatinina cinasa específica de ratón, el gen MDM2, el gen del receptor del factor de crecimiento epidermal humano y el gen p21, por citar algunos (Hoh et al. 2002). La proteína p53 también puede funcionar como un represor de la transcripción para genes como *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, IL-6 y Rb (Pavelic et al. 1996). Al parecer, la represión ejercida por p53 está mediada por su interacción con factores que se unen a la caja TATA, tales como TBP y TFIIA.

### **Vías de señalización en la regulación transcripcional ejercida por p53**

Una de las preguntas centrales en la regulación transcripcional es quiénes inician las señales que regulan a los factores de transcripción, desencadenando respuestas que, bajo condiciones normales, mantienen la integridad celular. En la regulación transcripcional ejercida por p53 participan diversas cinasas, tales como las cinasas PKB/Akt y PKC, las cuales son reguladas por diversas señales extracelulares.

#### **La cinasa PKB/Akt**

La vía de señalización PI3-K/PKB/Akt participa en la progresión del ciclo celular, en la apoptosis y en la regulación transcripcional (Brazil et al. 2004). La proteína cinasa B también conocida como PKB, Akt, c-Akt o RAC pertenece a una familia de cinasas evolutivamente conservadas en todos los eucariontes que incluye tres miembros: Akt-1/PKB $\alpha$ , Akt-2/PKB $\beta$  y Akt-3/PKB $\gamma$  (Bellacosa et al. 1991; Coffey and Woodgett 1991).

PKB es una cinasa serina/treonina, de un peso molecular de 60 kDa. En el extremo N-terminal tiene un dominio de homología a pleckstrina (PH), en su parte central tiene un dominio cinasa (con una Thr308 en el asa de activación susceptible de ser fosforilada) y en el extremo C-terminal tiene un motivo hidrofóbico (con una Ser473 susceptible de ser fosforilada) (Blume-Jensen and Hunter 2001).

PKB participa en diversas rutas de señalización celular y actúa como transductor de muchas funciones iniciadas por los receptores de factores de crecimiento que activan a la cinasa 3'-fosfatidilinositol (PI3-K). La activación de PI3-K induce, por un mecanismo aún no conocido, la fosforilación de PKB/Akt en Ser473 mediante una cinasa tipo PDK2, cuya identidad se desconoce todavía. Se propone que esta fosforilación induce un cambio conformacional en PKB/Akt, exponiendo su dominio PH, el cual interactúa con los fosfoinosítidos generados por PI3-K (Ptlns(3,4)P<sub>2</sub> y/o Ptlns(3,4,5)P<sub>3</sub>) (Chan et al. 1999; Bellacosa et al. 2005), causando su translocación hacia la membrana plasmática, en donde está localizada la cinasa 1 dependiente de 3'-fosfoinosítido (PDK1). PDK1 fosforila a las diferentes isoformas de PKB/Akt: para el caso de PKB $\alpha$ , la fosforilación se lleva a cabo en Thr308; para PKB $\beta$  en Thr309 y PKB $\gamma$  en Thr305. Una vez activada PKB/Akt es traslocada al citosol y al núcleo, donde actúa sobre sus diversos sustratos.

Otros estudios han demostrado que la estimulación de la actividad de PKB/Akt puede ser originada por factores de crecimiento, lo que sugiere su participación en la progresión del ciclo celular. Las primeras evidencias que demostraron la participación de esta cinasa en el ciclo celular fueron aportadas por un estudio que demostró que la sobre-expresión de PKB $\beta$ /Akt2 acelera la progresión del ciclo celular e induce transformación en fibroblastos de ratón (Cheng et al. 1997). Por otro lado, la participación de la cinasa PKB/Akt durante la fase G<sub>1</sub>-S del ciclo celular fue analizada encontrando que la transición G<sub>1</sub>-S es regulada por la proteína retinoblastoma (pRB), la cual reprime la transcripción de una batería de genes requeridos en fase S para la síntesis del material genético. La proteína pRB es

fosforilada e inactivada por cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que como su nombre lo dice, requieren de ciclinas para su activación. La cinasa CDK4 es particularmente importante para la fosforilación de pRB en la fase G<sub>1</sub> tardía. Las CDKs son así mismo reguladas negativamente por una familia de proteínas inhibidoras que incluyen a p27<sup>KIP1</sup> y a p21<sup>CIP1</sup>. En este sentido, en células T, PKB/Akt está involucrada en la regulación de la fosforilación de pRB, dado que PKB/Akt puede controlar la expresión de p27<sup>KIP1</sup> y p21<sup>CIP1</sup> (Brennan et al. 1997).

## PKC y p53

Las proteínas cinasas C (PKC) son una familia de cinasas serina/treonina que tienen un papel clave en regular múltiples actividades celulares. La familia PKC está constituida por 12 isoformas, las cuales están clasificadas en tres subfamilias de acuerdo con la estructura de su dominio N-terminal que determina su sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> y al diacilglicerol (DAG). Las isoformas clásicas (PKC- $\alpha$ , PKC- $\beta$ I, PKC- $\beta$ II y PKC- $\gamma$ ) son reguladas por Ca<sup>2+</sup> y DAG, las isoformas nuevas (PKC- $\delta$ , PKC- $\epsilon$ , PKC- $\theta$  y PKC- $\eta$ ) que no son reguladas por Ca<sup>2+</sup> y las isoformas atípicas (PKC- $\zeta$ , PKM- $\zeta$  y PKC- $\lambda$ ) que no son reguladas por Ca<sup>2+</sup> y DAG. Todas las isoformas de PKC tienen un dominio de cinasa conservado (KD) que es autoinhibido por el dominio llamado pseudosubstrato (PSE) que bloquea el acceso al sitio activo. Las isoformas clásicas contienen un dominio de unión al DAG y a éster de forbol (C1) y un dominio de unión de grupos fosfatidilserina dependiente de Ca<sup>2+</sup> (C2). La presencia de estos dominios en las isoformas clásicas explica su dependencia al DAG y al Ca<sup>2+</sup> para su activación. Las isoformas nuevas contienen un dominio C1 funcional y un dominio similar a C2, que no contiene los repetidos requeridos para unión a Ca<sup>2+</sup>. Así estas isoformas son independientes del Ca<sup>2+</sup>. Finalmente, las isoformas atípicas no contienen los dominios funcionales C1 y C2, siendo su activación independiente del Ca<sup>2+</sup> y DAG (Poole et al. 2004).

Estudios realizados en los QHN, han demostrado la presencia de las isoformas PKC- $\alpha$ , PKC- $\delta$ , PKC- $\epsilon$ , PKC- $\theta$  y PKC- $\zeta$ . Uno de los aspectos que ha llamado la atención

de esta familia de cinasas es su expresión específica en determinadas capas de la piel, por ejemplo PKC- $\alpha$  ha sido identificada principalmente en las capas espinosa y granular (Verma et al. 2006).

Por otra parte, la participación de PKC como una cinasa esencial en la activación de factores de transcripción que regulan diversos procesos celulares se encuentra en constante estudio. Al respecto, Youmell et al., en 1998, realizaron ensayos *in vitro* que demostraron la fosforilación de la proteína p53 en la región c-terminal (Ser 371) por la cinasa PKC- $\alpha$ . De manera interesante, esta fosforilación correlacionó con el incremento en la actividad de unión de p53 al DNA. Así mismo, ensayos de co-transfección de p53 con PKC- $\alpha$  y PKC- $\zeta$ , confirman el incremento en la transcripción de p53. Sin embargo los estudios *in vivo* hasta el momento no han confirmado una regulación directa en la funcionalidad de p53 por PKC (Youmell et al. 1998).

### **Ciclina D1 como un marcador de proliferación epitelial**

La sobre-expresión de ciclina D1 ha sido detectada en diferentes tipos de cáncer, particularmente en cáncer de mama, donde esta proteína está alterada en más del 50% de todos los casos. Niveles elevados de ciclina D1 acortan el ciclo celular, contribuyendo directamente a la progresión tumoral. La expresión de ciclina D1 es regulada por múltiples señales coordinadas que alteran la transcripción del gen, la traducción del mRNA y la estabilidad de la proteína. La ciclina D1 inicia la progresión del ciclo celular hacia la fase S. El principal papel del par ciclina D1/CDK2 ó CDK4 consiste en promover la fosforilación de la proteína Rb, impedir el reclutamiento de HDAC y finalmente permitir el acceso del complejo E/Cdk2 a sus genes blanco. Un Rb hiperfosforilado no se asocia con E2F, permitiendo entonces la activación transcripcional de los genes de la fase S, como el gen de la ciclina E. La fosforilación de Rb, la activación de E2F y la correspondiente expresión de ciclina E, son probablemente las funciones más importantes del complejo ciclina D1/CDK4 en la regulación del ciclo celular (Dowdy et al. 1993). La pérdida de ciclina D1 puede resultar en la inhibición de la proliferación celular por arresto celular en la fase G<sub>1</sub> (Sherr 2000).

Diferentes evidencias sugieren que PKB/Akt puede regular a ciclina D1 en cada uno de los tres niveles mencionados (producción del transcrito, su estabilidad y la estabilidad de la proteína (Muisse-Helmericks et al. 1998; Gille and Downward 1999; Takuwa et al. 1999). Dada la participación de PKB/Akt es claro que existe una correlación entre esta cinasa y ciclina D1 en el control del ciclo celular en respuesta a ciertos estímulos. De manera interesante, nuevos datos indican la participación de PKB/Akt también en la transición G<sub>2</sub>/M del ciclo celular. Al encontrarse constitutivamente activa la vía PKB/Akt, ésta regula los puntos de vigilancia de la fase G<sub>2</sub>/M, inducidos por daño al DNA. Así mismo, la transición de la fase G<sub>2</sub>/M a la fase G<sub>1</sub> está disminuida en fibroblastos de embriones de ratón en donde está ausente PKB $\alpha$ /Akt1 (Kandel et al. 2002).

La vía PKB/Akt es conocida como una vía anti-apoptótica debido a la fosforilación e inhibición de mediadores pro-apoptóticos, tales como Bad, miembros de la familia FOXO y la cinasa- $\beta$  del inhibidor I $\kappa$ B (IKK- $\beta$ ). Así mismo, se identificó un factor de transcripción pro-apoptótico asociado a la proteína Yes (YAP) como un nuevo sustrato de PKB/Akt (Basu et al. 2003). En presencia de PKB/Akt se activa la fosforilación de YAP en Ser127 *in vivo* y se bloquea la activación transcripcional mediada por YAP de ciertos genes pro-apoptóticos, tales como p73. De esta manera, la fosforilación de YAP por PKB/Akt atenúa el proceso apoptótico. Al parecer, los estudios realizados hasta el momento apoyan de manera importante la participación de la vía de señalización PI3-K/PKB/Akt en diferentes procesos celulares que rigen la expresión genética.

De esta manera, los antecedentes descritos indican que uno de los principales efectos de la exposición al As es el cáncer de piel, apoyando la idea de que el control del proceso de la proliferación celular se encuentra alterado en diferentes tipos celulares, llevando a un proceso de carcinogénesis (Germolec et al. 1997).



Dada la importancia que tiene el conocer los mecanismos moleculares por los cuales el As induce alteraciones biológicas, el principal objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del arsenito de sodio en los procesos de proliferación celular en cultivos secundarios de los queratinocitos humanos y en la línea celular C33-A. La proteína ciclina D1 fué considerada como un marcador importante en la evaluación de la proliferación celular. Por otra parte, investigamos el efecto del arsenito de sodio en el proceso de la diferenciación celular en los cultivos de queratinocitos, evaluando a la proteína involucrina humana como indicador de diferenciación epitelial. En ambos sistemas epiteliales se estudiaron los mecanismos moleculares que regulan la actividad de unión de p53 al DNA, así como el papel de la vía de señalización PI3-K/PKB/Akt en la activación de ésta proteína. La valoración del daño genotóxico producido por el arsénico, así como la exploración de las diferentes piezas claves en ambos sistemas celulares puede constituir una herramienta útil en el pronóstico de cambios neoplásicos epiteliales.

## **Hipótesis**

El tratamiento con arsenito de sodio modula la proliferación celular en los queratinocitos humanos normales y en la línea celular C33-A, efectos determinados por la funcionalidad y la integridad de la proteína p53. Así mismo, el arsenito de sodio es capaz de iniciar eventos de diferenciación celular en los queratinocitos humanos normales.

## **Objetivos**

### **Objetivo General:**

Evaluar y analizar los efectos del arsenito de sodio sobre la proliferación y diferenciación celular utilizando dos sistemas epiteliales: cultivos secundarios de queratinocitos humanos normales y células C33-A.

### **Objetivos Particulares:**

- Evaluar los cambios en la viabilidad celular de los cultivos secundarios de los queratinocitos humanos normales y las células C33-A expuestas al arsenito de sodio, empleando el método 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).
- Determinar la presencia de daño genotóxico en los cultivos secundarios de los queratinocitos humanos normales expuestos al arsenito de sodio (identificación de micronúcleos).
- Determinar el efecto del arsenito de sodio en los niveles de la proteína p53 así como en su actividad de unión al DNA en ambos sistemas epiteliales,

## ***Hipótesis***

El tratamiento con arsenito de sodio modula la proliferación celular en los queratinocitos humanos normales y en la línea celular C33-A, efectos determinados por la funcionalidad y la integridad de la proteína p53. Así mismo, el arsenito de sodio es capaz de iniciar eventos de diferenciación celular en los queratinocitos humanos normales.

## ***Objetivos***

### ***Objetivo General:***

Evaluar y analizar los efectos del arsenito de sodio sobre la proliferación y diferenciación celular utilizando dos sistemas epiteliales: cultivos secundarios de queratinocitos humanos normales y células C33-A.

### ***Objetivos Particulares:***

- Evaluar los cambios en la viabilidad celular de los cultivos secundarios de los queratinocitos humanos normales y las células C33-A expuestas al arsenito de sodio, empleando el método 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).
- Determinar la presencia de daño genotóxico en los cultivos secundarios de los queratinocitos humanos normales expuestos al arsenito de sodio (identificación de micronúcleos).
- Determinar el efecto del arsenito de sodio en los niveles de la proteína p53 así como en su actividad de unión al DNA en ambos sistemas epiteliales,

mediante inmunodetección en fase sólida y ensayos de interacción proteína-DNA.

- Evaluar la actividad transcripcional de p53 en células C33-A expuestas al arsenito de sodio empleando ensayos funcionales de gen reportero.
- Determinar si el arsenito de sodio es capaz de activar a la cinasa PKB/Akt en ambos sistemas celulares y demostrar si ésta activación es por medio de PI3-K. Así mismo, conocer si la activación de la vía PI3-K/PKB/Akt regula la actividad de unión de p53 al DNA en ambos sistemas celulares expuestos al arsenito de sodio, realizando inmunodetección en fase sólida y ensayos de interacción proteína-DNA.
- Conocer si el  $\text{Ca}^{2+}$  participa en la actividad de unión de p53 al DNA en ambos sistemas celulares expuestos al arsenito de sodio, mediante ensayos de interacción proteína-DNA.
- Determinar si el arsenito de sodio promueve el proceso de la diferenciación celular de los cultivos secundarios de queratinocitos humanos mediante la detección de cambios morfológicos y de los niveles de la proteína involucrina humana por inmunodetección en fase sólida e inmunohistoquímica.
- Evaluar las alteraciones en la proliferación celular en los cultivos secundarios de queratinocitos humanos expuestos al arsenito de sodio mediante la determinación del índice nuclear, los cambios en la tasa de proliferación celular y las alteraciones en la proteína ciclina D1.
- Evaluar las alteraciones en la proliferación celular en la línea celular C33-A expuestas al arsenito de sodio, mediante la determinación de las tasas de proliferación, la actividad transcripcional del promotor de ciclina D1 y los efectos sobre la activación de *c-myc*.

- Proponer un modelo que explique los mecanismos de acción del arsenito de sodio en la modulación de la proliferación y diferenciación celular de los dos sistemas epiteliales empleados en este trabajo.

## **Materiales y Métodos**

### **Cultivos Celulares**

Los cultivos primarios de queratinocitos fueron obtenidos a partir de prepucios de niños recién nacidos se crecieron en medio Keratinocyte-SFM (K-SFM Life Technologies, Inc), con 50 mg/lt de extracto de pituitaria bovina, 5 µg/lt de factor de crecimiento epidermal (EGF), 100 mg/ml penicilina-estreptomina y gentamicina en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. La inducción a un estado de diferenciación celular de los queratinocitos humanos normales (QHN) se realizó con cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub> 2 mM) durante 24 h.

La línea celular C33-A derivada de un adenocarcinoma cervical humano, se creció en un mezcla de medio F-12/D-MEM en la relación 1:1 (v/v) (Life Technologies) con 7% de suero fetal bovino (SFB) (Life Technologies). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, hasta alcanzar una confluencia del 85%. La línea celular HeLa derivada de un adenocarcinoma cervical humano, se creció en medio D-MEM con 10% de suero fetal bovino, y se mantuvo a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

El cultivo primario de células gliales de Bergmann de pollo fue obtenido mediante el método empleado por Ortega y cols. (Ortega et al. 1991). Los cultivos se crecieron en medio Dulbecco modificado por Tagle (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 10% de suero fetal bovino, glutamina (2 mM) y gentamicina (50 µg/ml). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **Evaluación de la Citotoxicidad**

Una vez crecidos los cultivos secundarios de los queratinocitos humanos normales (QHN) y las células C33-A, hasta una confluencia del 85%, se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito de sodio, (0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 5 µM) durante 24 h. La viabilidad celular se determinó por el método MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich Co.) descrito

por Mosmann (Mosmann 1983). Las células fueron sembradas y una vez tratadas con arsenito de sodio por el tiempo especificado, se les adicionó 40  $\mu$ l del reactivo MTT (5 mg/ml), durante 4 h (37 °C). Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en la solución isopropanol:HCl (100  $\mu$ l), para obtener la lisis. Las muestras fueron analizadas a 630 nm, empleando una placa ELISA en un espectrofotómetro Opsys MR (Dynex Technologies). Posteriormente se realizó un nuevo ensayo en donde las células fueron tratadas con arsenito de sodio (1.5  $\mu$ M) a los tiempos 24-72 h empleando el mismo método, 24 h post-tratamiento se realizó cambio de medio.

### **Genotoxicidad y proliferación celular en los cultivos secundarios de los QHN**

La evaluación del daño genotóxico se realizó mediante la técnica de micronúcleos por bloqueo de citocinesis con citocalasina B (Fenech et al. 2003). Esta técnica asegura que el registro de micronúcleos se realice en células que sólo han experimentado un primer ciclo de división celular y que los micronúcleos sólo sean inducidos por el compuesto que se evalúa. La proliferación celular de los cultivos secundarios de los QHN, fue determinada mediante la técnica de índice nuclear (IN), la cual se basa en el conteo del número de veces de la división celular, en donde:

$$\text{IN} = (1(\text{mon}) + 2(\text{bi}) + 3(\text{tri/poli}))/100$$

mon= células mononucleadas

bi= células binucleadas

tri= células trinucleadas

poli=células polinucleadas

Los cultivos secundarios de los QHN, en un estado de confluencia del 85%, fueron tratados con citocalasina B (2 mg/ml) y con diferentes concentraciones de arsenito de sodio (0.5, 1.0, 1.5  $\mu$ M), durante 24 h para determinar el daño genotóxico y 48 h para determinar la proliferación celular. Las células fueron tripsinizadas y fijadas con

600µl de solución fijadora (metanol y ácido acético, 3:1). Posteriormente se centrifugaron por 10 min a 1200rpm, y se resuspendieron en 200 µl de solución fijadora. El resuspendido se depositó en laminillas y se tiñeron con eosina y azul de metileno. La evaluación del daño genotóxico se registró mediante el conteo al microscopio óptico de 1000 células binucleadas, por duplicado, de dos experimentos independientes, analizando en cada una de las células binucleadas la presencia o ausencia de los micronúcleos. Con respecto a la proliferación celular se realizó el conteo al microscopio óptico de 500 células binucleadas, trinucleadas y polinucleadas, por triplicado y de tres experimentos independientes.

### **Proliferación Celular en los cultivos secundarios de los QHN y las células C33-A**

Los cultivos secundarios de los QHN, en un estado de confluencia del 75%, fueron tratados con arsenito de sodio (1.5 µM), durante 0-72 h, la proliferación celular fue evaluada por el método MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich Co.). Para el caso de las células C33-A, en un estado de confluencia del 75%, fueron tratadas con arsenito de sodio (1.5 µM) en medio al 2% de SFB a los tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 h. La evaluación de la proliferación celular se determinó empleando el mismo método.

### **Inmunodetección en Fase Sólida**

Cultivos secundarios de los QHN y células C33-A, en un estado de confluencia del 85%, se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito de sodio (0.1, 0.5, 1.0, y 1.5 µM,) durante 30 min y 24 h. Las células fueron cosechadas y las pastillas obtenidas se resuspendieron en 100 µl de regulador RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EGTA 1 mM, NaCl 158 mM, NaF 25 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM,  $\text{M}_{a2}\text{M}_o\text{O}_4$  1 mM, PMSF 1 mM, Aprotinina 2.5 µg.µl<sup>-1</sup> y Leupeptina 2.5 µg.µl<sup>-1</sup>) para obtener los extractos totales. La concentración de extractos totales fue determinada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Cantidades normalizadas de extractos totales fueron



eluidos en solución de carga (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS 6%, 2-mercaptoetanol 300 mM, azul de bromofenol 0.3% y glicerol 30%). Las muestras se hirvieron durante 5 min y fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% en condiciones desnaturalizantes. Los geles se transfirieron a membranas biológicas PVDF (Polivinilideno di-fluoruro) en cámara húmeda (Bio-Rad). La eficiencia de la transferencia se determinó por tinción de la membrana con rojo de Ponceau. Los sitios irrelevantes se cubrieron por incubación de las membranas a una solución de bloqueo (leche descremada 5%, Tween-20 0.1% en TBS). Posteriormente las membranas se expusieron a los anticuerpos anti-p53 (sc-126), anti-cyclin D1 (sc-717), anti-involucrin (sc-21748), anti-p-AKT (sc-7985), anti-p-GSK-3 $\beta$  (sc-11757) y anti- $\beta$ -actin (sc-32251) según fuese el caso. El exceso de los anticuerpos se eliminó mediante 3 lavados (TBS-Tween-20 0.1%). Las membranas se incubaron con anticuerpos acoplados a peroxidasa y las bandas relevantes se detectaron por autorradiografía, empleando quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

### **Ensayos de Interacción DNA-proteína**

- **Extractos nucleares:** Cultivos secundarios de los QHN y células C33-A, en un estado de confluencia del 85%, fueron expuestos a diferentes concentraciones de arsenito de sodio (0.1, 0.5, 1.0 y 1.5  $\mu$ M,) durante 30 min y 24 h, posteriormente los extractos nucleares se obtuvieron mediante la técnica descrita por Schreiber (Schreiber et al. 1989). Las células se cosecharon utilizando un tampón Tris-Dulbecco (TD) (NaCl 0.7 M, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 mM, Trizma-base 50 mM pH 7.45); las células se congelaron cuando así se requirió en tampón TrisDulbecco-Glicerol 30%. Una vez descongeladas las células, se resuspendieron y se incubaron en solución A (HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM) durante 15 min. Una vez cumplido el tiempo, se les agregó NP40 10%, se agitaron vigorosamente y fueron centrifugadas por 3 min a 12,500rpm. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en solución C (HEPES 10 mM pH 7.9,

NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM), y se agitaron durante 30 min a 4 °C. Finalmente las muestras se centrifugaron para obtener los extractos nucleares, los cuales fueron almacenados a -70 °C hasta su uso en los ensayos de retardamiento.

- **Oligonucleótidos:** los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de interacción proteína-DNA, fueron sintetizados en el sintetizador Applied BioSystema 391 DNA, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav-IPN. Los oligonucleótidos fueron purificados e hibridados para obtener una sonda de DNA de doble cadena. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

OLIGO- NUCLEÓTIDO	SECUENCIAS
<b>p53</b> (Gohler et al. 2002)	5'-CTAGTACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGGACT-3'
<b>Sp1</b>	5'-CTAGATTCGATCGGGGCGGGGCGA-3'
<b>AP-1 (SV40)</b>	5'-CTAGRATAATATGACTAAGCTGTG-3'
<b>c-Myc</b> (Murre et al. 1991)	5'- CTAGGGAAGCAGACCACGTGGTCTGCTTCC -3'

- **Marcaje de oligonucleótidos:** El marcaje de los oligonucleótidos de doble cadena se realizó empleando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Se marcaron 100 ng de DNA en un volumen final de 10 µl, donde se adicionó 1 µl de cada nucleótido (10 mM de dGTP, dTTP, dCTP) y 10 µCi de dATP ( $\alpha\text{P}^{32}$ ), así mismo se adicionó 1µl de solución de marcaje TM 10X (50 mM de NaCl pH 7.6). La mezcla se incubó con 1 U de enzima Klenow (Life

Technologies) por 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se diluyó la sonda marcada a una concentración final de 1 ng/ $\mu$ l.

- **Ensayos de Retardamiento y Competencia:** Una vez obtenidos los extractos nucleares de los cultivos secundarios de los QHN y C33-A, tratados con arsenito de sodio durante 30 min y 24 h, fueron incubados en solución de unión de proteínas BDG 1X (HEPES 12 mM, pH 7.8, glicerol 10%, EDTA 0.05 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, KCl 10 mM, ditiventral 1 mM, espermidina 2 mM) y 0.3-1  $\mu$ g de poly-d(I-C) (Pharmacia Biotech) durante 10 min a 4 °C, posteriormente se agregó 1 ng del oligonucleótido marcado radiactivamente y se incubó por 10 min a 4 °C. Las mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida al 7%, empleando TBE 0.5X (Trizma-Base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM pH 8.45) con un voltaje de 120 V. Los geles se secaron al vacío y se expusieron en placas radiográficas (Kodak Eastman). En el caso de los ensayos de competencias, las mezclas de reacción se preincubaron con concentraciones específicas de oligonucleótidos homólogos y heterólogos fríos antes de agregar el oligonucleótido marcado.
- **Ensayos de Super-retardamiento:** Para los ensayos de super-retardamiento, las mezclas de reacción de los complejos proteína-DNA se incubaron a 4 °C con 5  $\mu$ g del anticuerpo anti-p53 (sc-126) y anti-sox10 (sc-17342) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante 4 h, previo a la electroforesis.

## Plásmidos

La construcción p53CAT contiene la secuencia consenso de unión para p53, presente en la región promotora del gen p21, bajo el control del promotor SV40 y se basa en el uso del gen reportero cloranfenicol acetil transferasa (CAT), fue obtenida en nuestro laboratorio (mapa en anexo 1) (Hernández 2005). La construcción pXP2-CD1, donada amablemente por el Dr. Françoise Thierry (Instituto Pasteur, Paris),

contiene al promotor del gen ciclina D1 humano (Herber et al. 1994), y como gen reportero a luciferasa (mapa en anexo 1).

### **Ensayos de transfección transitoria y ensayos CAT**

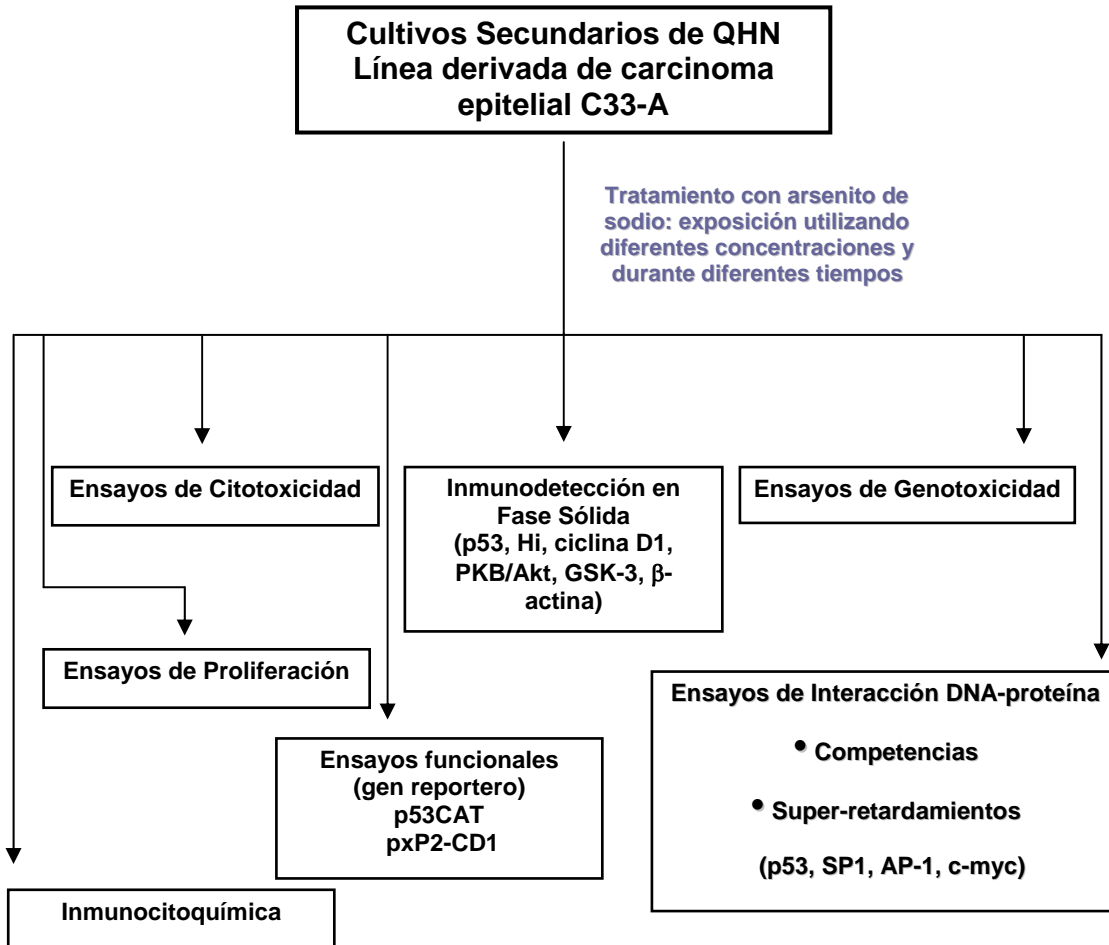
Las células C33-A (sembradas en placas p60), en un estado de confluencia del 75-80%, se transfectaron con 6  $\mu$ g de DNA, empleando para la transfección el método con cloruro de calcio previamente descrito (Thierry et al. 1992). 24 h post-transfección, las células fueron tratadas con arsenito de sodio (1.5  $\mu$ M), wortmanina (100 nM) y LiCl (3 mM), durante 24 h. Las células se cosecharon 48 h post-transfección en tampón TEN (Tris-HCl 40 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM; NaCl 15 mM) y se lisaron empleando 5 ciclos de lisis congelación-descongelación, en Tris-HCl 0.25 M, pH 8.0. La concentración de proteínas se cuantificó utilizando el sistema de detección de proteínas (Bio-Rad) y con base en ello se normalizaron los extractos nucleares entre si. Volúmenes normalizados de los extractos nucleares se incubaron con 0.25  $\mu$ Ci de ( $^{14}$ C) cloranfenicol (50 mCi/mmol) (Amersham Corp) y con 3  $\mu$ l de acetyl-CoA (20 mM) (Sigma). Las reacciones de acetilación se llevaron a cabo a 37 °C durante 16 h. Las muestras se extrajeron con acetato de etilo (J.K. Baker) y se cargaron en placas de cromatografía en capa fina (TLC) (Sigma Chemicals Co.). La cromatografía se realizó utilizando una mezcla de solventes de cloroformo-metanol (97:3). Finalmente, las placas de TLC se cuantificaron para determinar el porcentaje de conversión en cloranfenicol acetilado utilizando el analizador de imágenes Thyphoon (Amersham Pharmacia Biotech).

### **Inmunocitoquímica**

Los cultivos secundarios de los QHN, tratados con arsenito de sodio (1.5  $\mu$ M) durante 24 h, se tiñeron con el anticuerpo anti-involucrina. Los QHN se sembraron en laminillas (22 X 22 mm), las cuales previamente se trataron con poli L-lisina (0.01 mg/ml) y se lavaron con etanol. Las células fueron fijadas con metanol durante 20 min a 20 °C. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se tiñeron con Peroxidasa-

Estreptavidina-Biotina DAB (ImmunoDetector HRP/DAB, BIO SB, Inc, Santa Barbara, CA). El control de inmunotinción se realizó bajo las mismas condiciones, en ausencia de los anticuerpos primarios. Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, las laminillas se trataron con 0.3 % de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) durante 15 min. Las laminillas se trataron con tampones de citrato (10 mM, pH 6.0, BIO SB, Inc, Santa Barbara, CA) durante 30 min y se incubaron con el anticuerpo anti-involucrina (dilución 1:100) durante 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente se enjuagaron en tampón salino Tris (Immuno/DNA Washer, BIO SB, Inc, Santa Barbara CA). Las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario biotina-marcada y peroxidasa-biotina-estreptavidina por 20 min. Como sustrato se empleó 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloride (DAB) al 0.05%, y la obtención de una señal positiva se identificó mediante la presencia de color café, bajo la observación al microscopio de luz. Las laminillas se contratiñeron suavemente con hematoxilina Mayer's, deshidratadas y montadas en medio de montaje Entellan (Merck). Finalmente, las laminillas se examinaron bajo campos de luz Zeiss Axioscope 40 microscopio y empleando el programa Axiovision (Carl Zeiss, Inc. Thornwood, NY), con una magnificación de 40X y 100X.

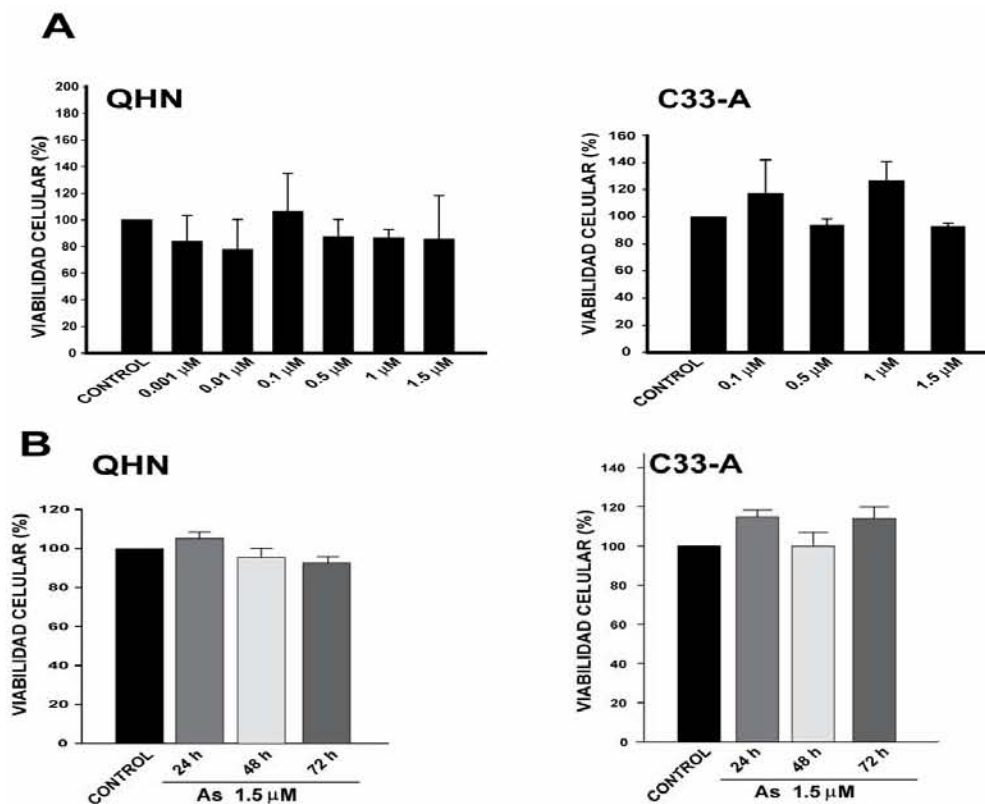
## Estrategia Experimental



## Resultados

### Efectos del arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) sobre las células epiteliales

Los efectos citotóxicos del  $\text{NaAsO}_2$  fueron evaluados por el método MTT mediante una curva dosis-respuesta. De acuerdo con los resultados obtenidos, el  $\text{NaAsO}_2$  no afecta la viabilidad celular de los cultivos secundarios de los QHN ni la viabilidad de las células C33-A cuando es aplicado a las concentraciones señaladas durante 24 h (Fig. 4A).



**Figura 4. El  $\text{NaAsO}_2$  no causa efectos citotóxicos significativos en células epiteliales humanas.**

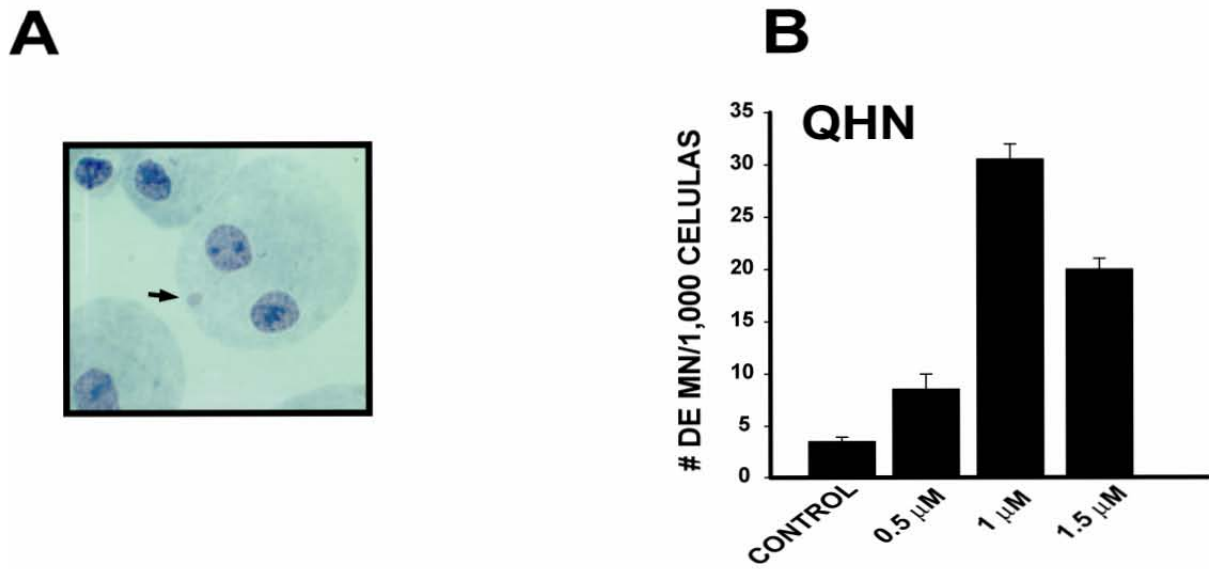
**A.** Cultivos secundarios de los QHN y células C33-A fueron tratadas con concentraciones crecientes de  $\text{NaAsO}_2$  (como se indica) durante 24 h. **B.** Ambos sistemas celulares fueron tratados con 1.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  durante 24 h, posteriormente el medio fue cambiado y la viabilidad celular se determinó a las 48-72 h. La viabilidad celular fue evaluada mediante el método MTT y los resultados se expresan con respecto al control (células no tratadas). Los valores graficados son los promedios  $\pm$  el error estándar (E.E.).

Así mismo, ambos tipos celulares fueron tratados a la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$  durante 24 h, se realizó el cambio de medio (medio de crecimiento sin arsénico) y se evaluó la citotoxicidad desde las 48 h y hasta las 72 h (Fig. 4B). Como se puede observar no hubo un efecto citotóxico, dado que la viabilidad celular no presenta cambios significativos con respecto al control. La prueba estadística *t* de Student, indicó que el porcentaje de viabilidad celular correspondiente al tratamiento con cada una de las concentraciones empleadas no fue significativamente diferente con respecto al control, considerando una  $p < 0.05$ .

### **Los cultivos secundarios de los QHN presentan daño genotóxico al ser expuestos al $\text{NaAsO}_2$**

Existen fuertes evidencias que demuestran la presencia de amplificación génica y la inhibición de algunos mecanismos de reparación del DNA como consecuencia de la exposición crónica al arsénico (Rossman et al. 2004). Por otro lado, en linfocitos humanos fueron encontradas aberraciones cromosomales, tanto numéricas como estructurales y la presencia de micronúcleos (Gonsebatt et al. 1992; Vega et al. 1995). Tomando esto en consideración, evaluamos si en los cultivos secundarios de los QHN, con un estado de confluencia del 85%, el  $\text{NaAsO}_2$  induce daño genotóxico, que puede ser monitoreado mediante la formación de micronúcleos en el citoplasma. El análisis obtenido nos indicó la presencia de micronúcleos a partir de la concentración 0.5 $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  con registro de un aumento significativo con respecto al control (Fig. 5A). Así mismo, los datos estadísticos indicaron que a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  se presentó el mayor número de micronúcleos (Fig. 5B).



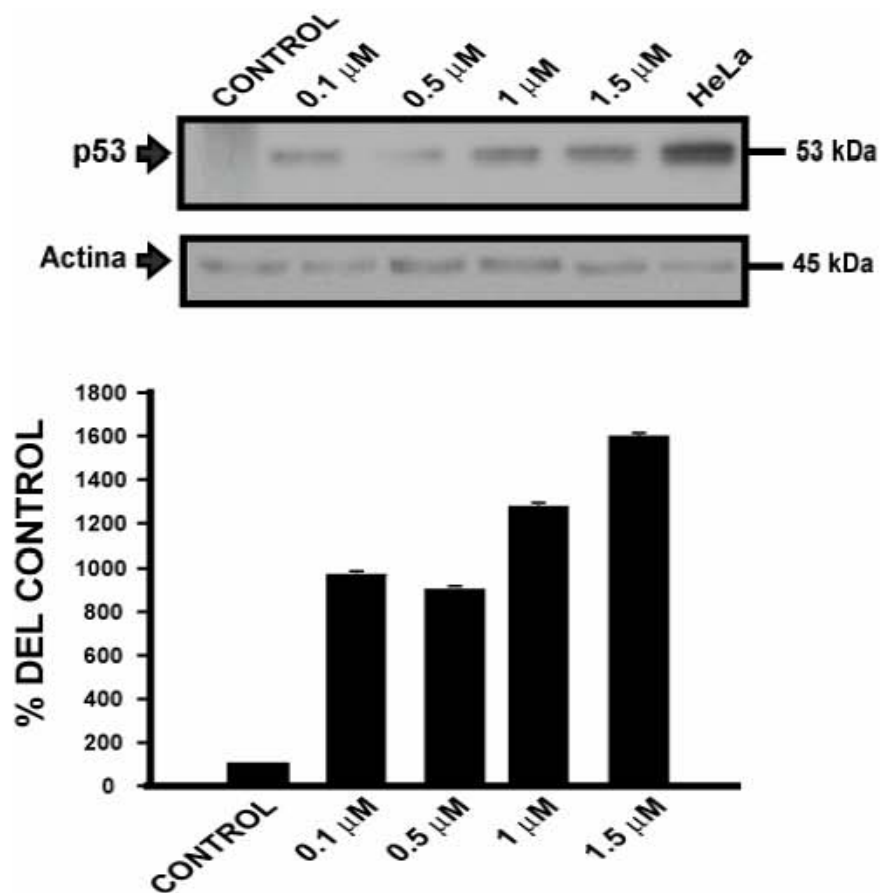


**Figura 5. El NaAsO<sub>2</sub> genera efectos genotóxicos en los QHN.** **A.** Imagen de una célula binucleada que presenta daño celular (micronúcleo en el citoplasma). **B.** Los cultivos secundarios de los QHN fueron expuestos a diferentes concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> y citocalasina B (2 mg/ml) durante 48 h. Los efectos genotóxicos se evaluaron mediante la frecuencia de micronúcleos registrada en 1000 células binucleadas por tratamiento. La gráfica expresa los valores promedio +/-E.E.

### **El tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> incrementa los niveles de la proteína p53 en los cultivos secundarios de los QHN**

Para determinar el efecto del NaAsO<sub>2</sub> en los niveles de la proteína p53, se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida, empleando extractos totales de cultivos secundarios de los QHN expuestos a diferentes concentraciones de NaAsO<sub>2</sub>, durante 24 h y un anticuerpo monoclonal específico para la detección de la proteína p53. El anticuerpo reconoce una banda de 53 kDa, tamaño correspondiente a la proteína p53 (Fig. 6). Como se puede observar, los niveles de la proteína p53 aumentaron en forma dependiente de la dosis aplicada. De manera muy interesante, se observó que a partir de la concentración 0.1 μM de NaAsO<sub>2</sub>, el nivel de la proteína aumentó considerablemente con respecto al control (Fig. 6). Es importante señalar que en el caso particular de los cultivos secundarios de los QHN, los niveles basales de la proteína p53 son bajos, razón por la cual en las células control la proteína no es detectable.

El incremento en los niveles de la proteína p53, debido al  $\text{NaAsO}_2$ , está en relación directa con la presencia de daño celular, lo cual correlaciona con el aumento en el número de micronúcleos, con respecto al control.

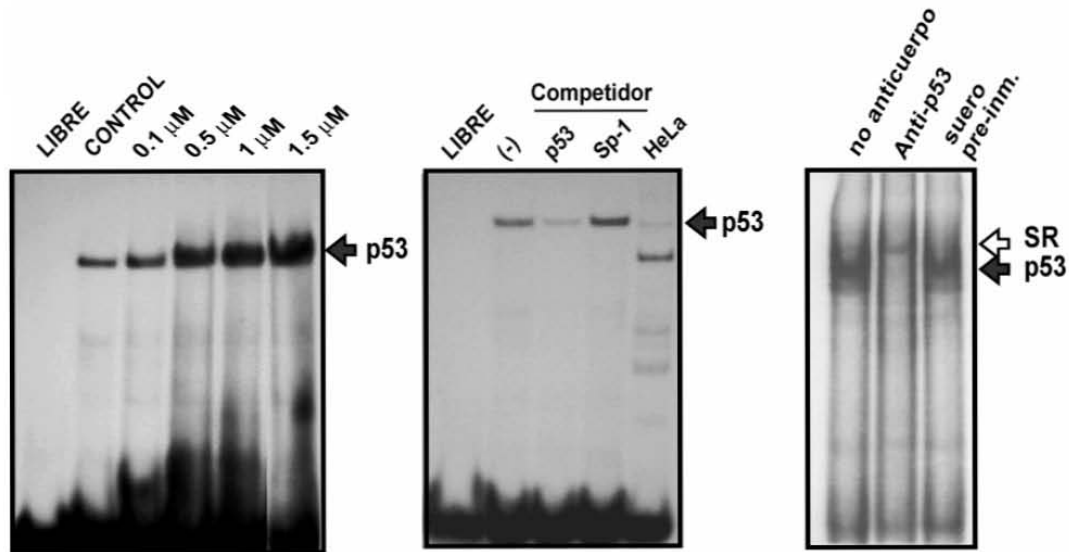


**Figura 6. El tratamiento con  $\text{NaAsO}_2$  induce a p53.** El cambio en los niveles de la proteína p53 fue evaluado en los cultivos secundarios de los QHN expuestos a diferentes concentraciones de arsenito de sodio durante 24 h. Los efectos en los niveles de la proteína fueron analizados por inmunodetección en fase sólida, usando el anticuerpo anti-p53 (sc-126, Santa Cruz Biotech.) en conjunto con la detección de  $\beta$ -actina (sc-32251) como control de referencia, para normalizar los datos. Los extractos totales de HeLa fueron usados como control positivo para el anticuerpo. Los valores graficados, fueron obtenidos mediante densitometría y representan la media de dos experimentos independientes  $\pm$  E.E.

## **El tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> incrementa la unión de la proteína p53 (como factor de transcripción) al DNA en los cultivos secundarios de los QHN**

En condiciones celulares normales, la proteína p53 presenta una vida media corta y los niveles basales se mantienen bajos; sin embargo, esta proteína aumenta sus niveles, se acumula en el núcleo y es activada como un factor de transcripción en respuesta a daño al DNA (Appella and Anderson 2001). Así pues, analizamos el efecto del NaAsO<sub>2</sub> en la actividad de unión de p53 al DNA. Inicialmente, se sintetizó un oligonucleótido con la finalidad de obtener una sonda de DNA de doble cadena, que fue marcada radiactivamente con  $\alpha$ ATP-<sup>32</sup>P y cuya secuencia consenso sería reconocida por el factor de transcripción p53. Se emplearon extractos nucleares de los cultivos secundarios de los QHN expuestos a diferentes concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> durante 24 h para realizar los ensayos de interacción proteína-DNA.

Los resultados obtenidos muestran la formación de un complejo que aumenta claramente con respecto al control (células no tratadas), a medida que se incrementa la concentración de NaAsO<sub>2</sub> empleada para tratar a las células (Fig. 7, panel izquierdo). Como se puede observar, el incremento del complejo es dependiente de la concentración de NaAsO<sub>2</sub>, ya que a la concentración de 1.5  $\mu$ M se detecta el mayor incremento del complejo.



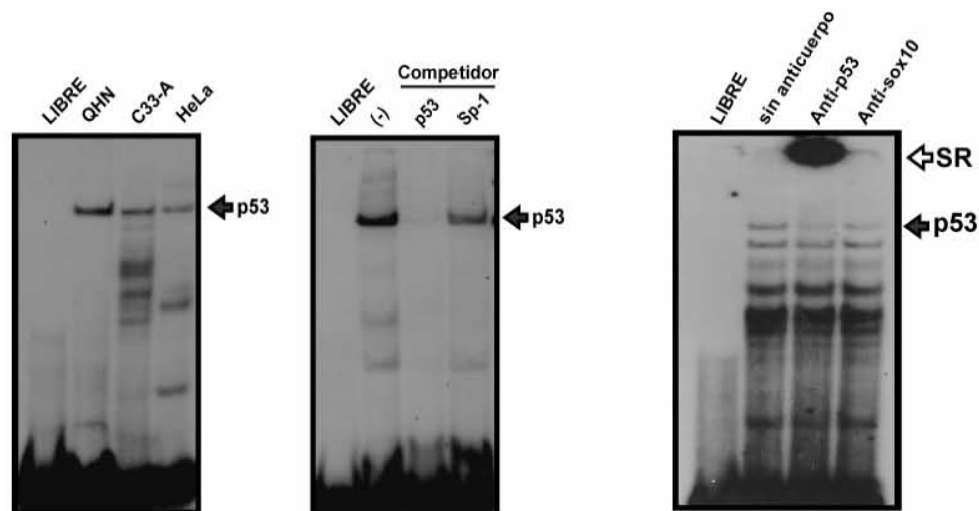
**Figura 7. Efecto del  $\text{NaAsO}_2$  sobre la actividad de unión de la proteína p53 a su secuencia consenso en el DNA.** La unión de p53 a su secuencia consenso se incrementa en extractos nucleares obtenidos de los QHN (panel izquierdo) sometidos a los tratamientos señalados durante 24 h. Los extractos nucleares normalizados entre si mediante la concentración proteica, fueron incubados con el oligonucleótido que contiene la secuencia de unión de p53, marcado radiactivamente (complejo p53-DNA, flecha). En el panel central, se muestran los ensayos de competencia en presencia de un exceso molar de 100 veces del competidor indicado no marcado radiactivamente. Panel derecho, ensayo de super-retardamiento en ausencia o presencia de 1  $\mu\text{g}$  del anticuerpo anti-p53 (sc-126) ó suero preinmune (pre-inm). SR: complejo super-retardado p53. (-) ausencia del competidor.

Para poder establecer la identidad de este complejo se realizaron ensayos de competencia. Se emplearon nuevamente extractos nucleares de los cultivos secundarios de los QHN expuestos al  $\text{NaAsO}_2$  (1.5  $\mu\text{M}$ ) y la sonda de DNA marcada radiactivamente. Se utilizó un exceso molar de 100 veces del competidor p53 no marcado radiactivamente y del oligonucleótido competidor no marcado Sp-1 como competidor heterólogo. En la Fig. 7, panel central, se muestra que al emplear al oligonucleótido p53 como competidor el complejo p53-DNA es abatido, mientras que cuando empleamos al oligonucleótido competidor Sp-1, el complejo se mantiene. Así mismo, se corroboró la especificidad de la interacción de la proteína p53 a la sonda de DNA marcada radiactivamente, empleando un anticuerpo monoclonal que reconoce a p53. Los ensayos de super-retardamiento en gel confirmaron que al emplear el anticuerpo anti-p53 se detecta la presencia de un complejo super-retardado, el cual no está presente en el control, ni cuando se emplea suero

preinmune como control negativo (Fig. 7, panel derecho). De esta manera, se demuestra que el complejo detectado corresponde a la unión de p53, como factor de transcripción, a su secuencia consenso en el DNA.

### El complejo p53-DNA esta presente en las células C33-A

Los resultados obtenidos indican que el NaAsO<sub>2</sub> incrementa los niveles de la proteína p53, y que esto eventualmente, permite potenciar la capacidad de unión de p53 al DNA (aumento total del complejo) con respecto al control. Por lo tanto, en las células C33-A tratadas con NaAsO<sub>2</sub>, exploramos la actividad de unión de p53 al DNA, empleando la misma sonda radiactiva. Como primer punto, se hizo una comparación del complejo p53-DNA entre las líneas epiteliales QHN, C33-A y HeLa. Se obtuvieron extractos nucleares de cada una de las líneas epiteliales y se incubaron con las sonda de DNA. Los resultados obtenidos muestran la presencia del mismo complejo p53-DNA en todas las líneas epiteliales (Fig. 8, panel izquierdo).



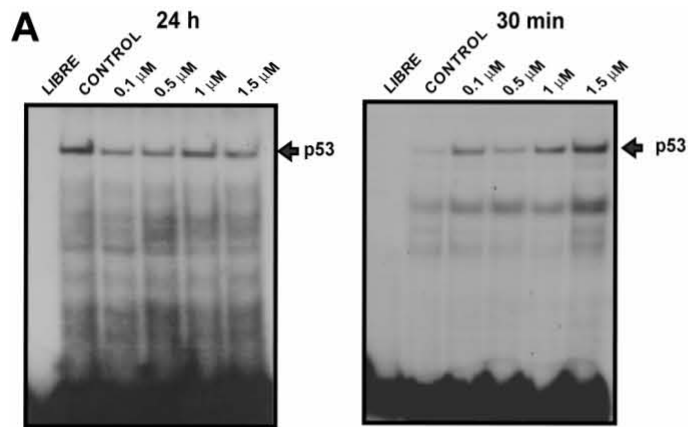
**Figura 8. Comparación del complejo p53-DNA en células epiteliales.** Extractos nucleares de los QHN, C33-A y HeLa fueron empleados para comparar el complejo p53-DNA (panel izquierdo). En el panel central, se realizaron los ensayos de competencia en presencia de un exceso molar de 100 veces del competidor indicado (no marcado). En el panel derecho, ensayo de super-retardamiento en ausencia o presencia de 1 µg del anticuerpo anti-p53 (sc-126) y 1 µg del anticuerpo anti-sox10 (sc-17342). SR: complejo super-retardado p53. (-) ausencia del competidor.

Posteriormente se confirmó la identidad del complejo p53-DNA en las células C33-A mediante los ensayos de competencia. Se obtuvieron los extractos nucleares de las células C33-A, expuestas a 1.5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub>, durante 24 h y la sonda de DNA marcada radiactivamente, en presencia de un exceso molar de 100 veces del competidor p53 no marcado y como control negativo el competidor Sp-1, con el mismo exceso molar. En la Fig. 8, panel central, se muestra que al emplear al oligonucleótido p53 como competidor el complejo p53-DNA es abatido, mientras que cuando empleamos al competidor Sp-1, el complejo se mantiene. La especificidad de la interacción se confirmó usando el mismo anticuerpo monoclonal específico para p53 empleado en los QHN. Los ensayos de super-retardamiento en gel confirmaron la presencia de un complejo super-retardado, el cuál no está presente en el control, ni cuando empleamos el anticuerpo policlonal específico para Sox10 (control negativo, Fig. 8, panel derecho). Estos resultados corroboraron que el complejo p53-DNA corresponde a la interacción del factor p53 con su secuencia consenso.

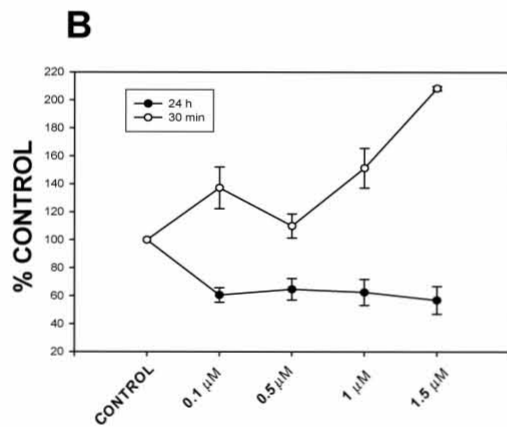
### **La actividad de unión de p53 al DNA es modulada por el NaAsO<sub>2</sub> en las células C33-A**

Las células C33-A fueron expuestas a concentraciones crecientes de NaAsO<sub>2</sub>, durante 30 min y 24 h. Interesantemente, los resultados obtenidos muestran que el complejo p53-DNA disminuye cuando las células son expuestas al NaAsO<sub>2</sub> durante 24 h (Fig. 9A), efecto totalmente opuesto al observado en los cultivos secundarios de los QHN. Cuando las células son expuestas al NaAsO<sub>2</sub> durante 30 min, el complejo p53-DNA es claramente inducido, comportamiento dependiente de la concentración y el tiempo. En la Fig. 9B, se muestra el análisis cuantitativo y comparativo del comportamiento de unión de p53 a su secuencia consenso en el DNA, bajo las condiciones antes descritas. De acuerdo con estos resultados, se podría pensar que la desaparición del complejo p53-DNA a 24 h, pudiera deberse a una posible degradación de los extractos nucleares. Por esta razón, realizamos los ensayos de interacción proteína-DNA con un oligonucleótido que contiene la secuencia

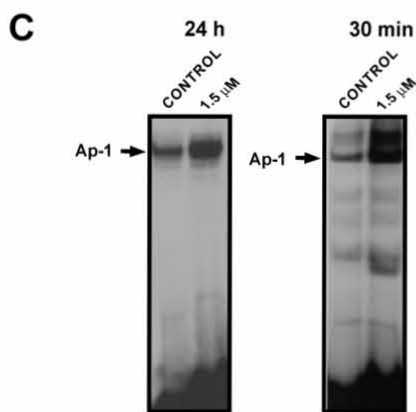
consenso para la unión del factor de transcripción AP-1 (c-Fos/c-Jun) y los mismos extractos nucleares empleados en los ensayos bioquímicos para p53. El efecto del NaAsO<sub>2</sub> sobre el factor AP-1 es claramente diferente, dado que ante una exposición al NaAsO<sub>2</sub>, durante 30 min e incluso 24 h, el complejo AP-1-DNA es inducido (Fig.



9C) con un comportamiento independiente del tiempo de exposición. El efecto observado en el complejo p53-DNA sugiere un mecanismo específico que regula la disminución de este complejo al exponer a las células C33-A durante periodos largos al NaAsO<sub>2</sub>.

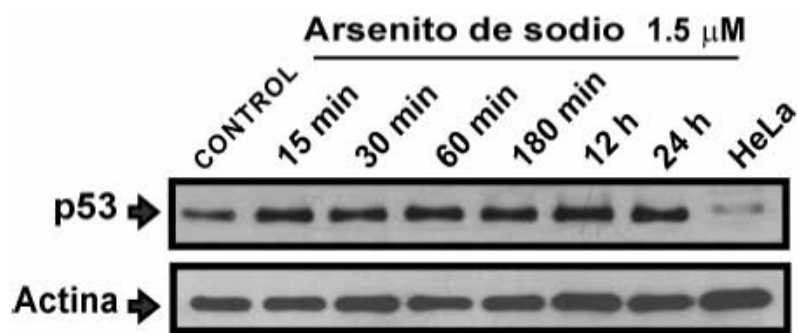


**Figura 9. El NaAsO<sub>2</sub> induce respuestas diferentes sobre el complejo p53-DNA en la línea celular C33-A.** A. Las células C33-A fueron expuestas al NaAsO<sub>2</sub> durante 24 h ó 30 min (concentraciones indicadas). B. Los valores reportados en la gráfica se obtuvieron por densitometría y representan la media de tres experimentos independientes +/- E.E. C. Los mismos extractos nucleares fueron empleados para analizar la unión del factor de transcripción AP-1 a su secuencia consenso en el DNA (oligonucleótido AP-1/SV40, marcado radiactivamente).



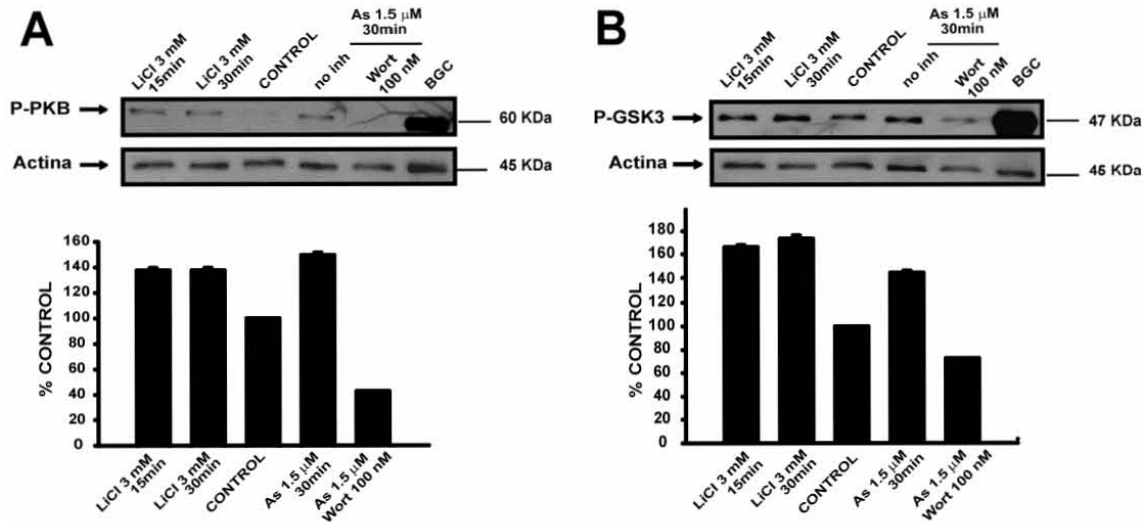
## El tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> modula los niveles de la proteína p53 en las células C33-A

Una vez que determinamos que el complejo p53-DNA es disminuido a las 24 h de exposición al NaAsO<sub>2</sub>, analizamos los niveles de la proteína p53 mediante inmunodetección en fase sólida, empleando extractos totales de células tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (1.5 μM), y durante diferentes tiempos. De esta manera, se corroboraría si el efecto encontrado en los ensayos de interacción proteína-DNA podría deberse a la degradación de la proteína. En la Fig. 10 se muestra que los niveles de p53 se incrementan a partir de los 15 min, con respecto al control, y que este incremento se mantiene hasta las 24 h, no observándose en efecto una degradación proteica. Al parecer existen mecanismos moleculares específicos, que están regulando de manera muy puntual la actividad de unión de p53 a su secuencia consenso en el DNA y que estos mecanismos son diferentes dependiendo del período de exposición.



**Figura 10.** Los niveles de la proteína p53 se incrementan en células C33-A tratadas con NaAsO<sub>2</sub>. Las células tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (1.5 μM) durante diferentes tiempos, se emplearon para obtener extractos totales. Los efectos en los niveles de la proteína p53 fueron analizados por inmunodetección en fase sólida, usando el anticuerpo anti-p53 (sc-126) y β-actina (sc-32251) como control de referencia, para normalizar los datos. Extractos totales de HeLa fueron usados como control positivo.





**Figura 11. El NaAsO<sub>2</sub> induce la fosforilación de las cinasas PKB/Akt y GSK-3β en los cultivos secundarios de los QHN.** **A.** Los cultivos de los QHN tratados con LiCl (3 mM), NaAsO<sub>2</sub> (1.5 μM) y wortmannina (100 nM) durante 30 min, fueron cosechados y utilizados para obtener extractos totales, los cuales fueron analizados mediante inmunodetección en fase sólida para determinar la fosforilación de PKB/Akt y de GSK-3β (en **B**) empleando los anticuerpos anti-p-AKT (sc-7985) y anti-p-GSK-3β (sc-11757) respectivamente. Como control de referencia para normalizar los valores, se detectó anti-β-actina (sc-32251). Como control positivo para los anticuerpos se utilizaron extractos totales de células glia de Bergmann (BGC). Los valores graficados se obtuvieron mediante densitometría y representan la media de dos experimentos independientes +/- E.E.

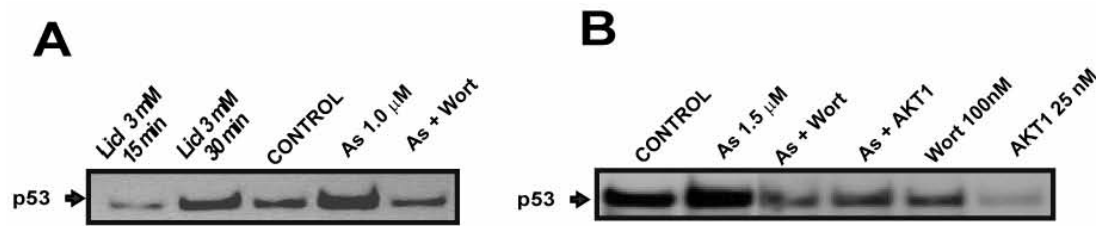
### Activación de la vía de señalización PKB/Akt en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al NaAsO<sub>2</sub>

Múltiples vías de señalización han sido propuestas como importantes caminos para la activación de p53 en diferentes líneas celulares (Appella and Anderson 2001). Por ejemplo, estas vías incluyen la activación de algunas cinasas dependientes del incremento de Ca<sup>2+</sup> como PKC, PKA y PKB. Los estudios que se han desarrollado en torno a la activación de ciertas cinasa por el NaAsO<sub>2</sub> indican por ejemplo, que la cinasa PKB es activada por el NaAsO<sub>2</sub> en queratinocitos humanos y que esta activación está relacionada con la generación de estrés oxidativo y eNOS (Souza et al. 2001). De acuerdo con estos datos, investigamos si bajo las condiciones empleadas, la cinasa PKB/Akt es activada por el NaAsO<sub>2</sub> y si esta activación podría estar involucrada en regular la actividad de unión de p53 al DNA.

Los resultados obtenidos con respecto a la activación de la cinasa PKB/Akt, indican que ante una exposición al  $\text{NaAsO}_2$  en los cultivos secundarios de los QHN se incrementa el estado de fosforilación de la cinasa PKB/Akt, específicamente en el residuo de serina 473 (Fig. 11A). Efecto que sugiere la activación de la cinasa PKB/Akt. Así mismo se estudió la fosforilación de un blanco de PKB/Akt, la cinasa GSK-3 $\beta$ , observando la activación de esta cinasa por el  $\text{NaAsO}_2$  (Fig. 11B). Finalmente se empleó el inhibidor wortmannina para conocer si la activación de las dos cinasas antes mencionadas depende de la activación de la vía PI3-K. Al tratar las células con dicho inhibidor, observamos una drástica inhibición de la fosforilación de ambas cinasas (Fig. 11A y B). De esta manera se confirma que la fosforilación de PKB/Akt y GSK3 $\beta$  es inducida por el  $\text{NaAsO}_2$  y que esta activación es vía PI3-K.

#### **Efectos de la vía PI3-K/PKB/Akt en la actividad de unión de la proteína p53 al DNA en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al $\text{NaAsO}_2$**

Dado que se ha confirmado que el  $\text{NaAsO}_2$  es capaz de activar la vía de señalización PI3-K/PKB/Akt en los cultivos secundarios de los QHN, y que por otra parte, la actividad de unión al DNA de la proteína p53 es incrementada bajo las mismas condiciones, se analizó si esta vía podría estar involucrada en favorecer la actividad de unión de p53 al DNA. Los ensayos de interacción proteína-DNA indicaron que la activación de la vía PI3-K/PKB/Akt es importante en la actividad de unión de p53 al DNA, dado que cuando se emplea el inhibidor de PI3-K (wortmannina 100mM) junto con el  $\text{NaAsO}_2$ , durante 30 min y 24 h, el complejo p53-DNA disminuye con respecto al complejo formado cuando las células sólo son expuestas al  $\text{NaAsO}_2$  (Fig. 12A y B). Por otra parte, se empleó el inhibidor específico para la cinasa PKB/Akt (AKT1 25 nM) encontrando que el complejo p53-DNA es nuevamente disminuído (Fig. 12B). De esta manera se confirma que la activación de la vía PI3K/PKB/Akt favorece la unión de p53 al DNA ante una exposición al  $\text{NaAsO}_2$ . Estos resultados, se corroboraron empleando LiCl (3mM), el cual produce el mismo efecto.



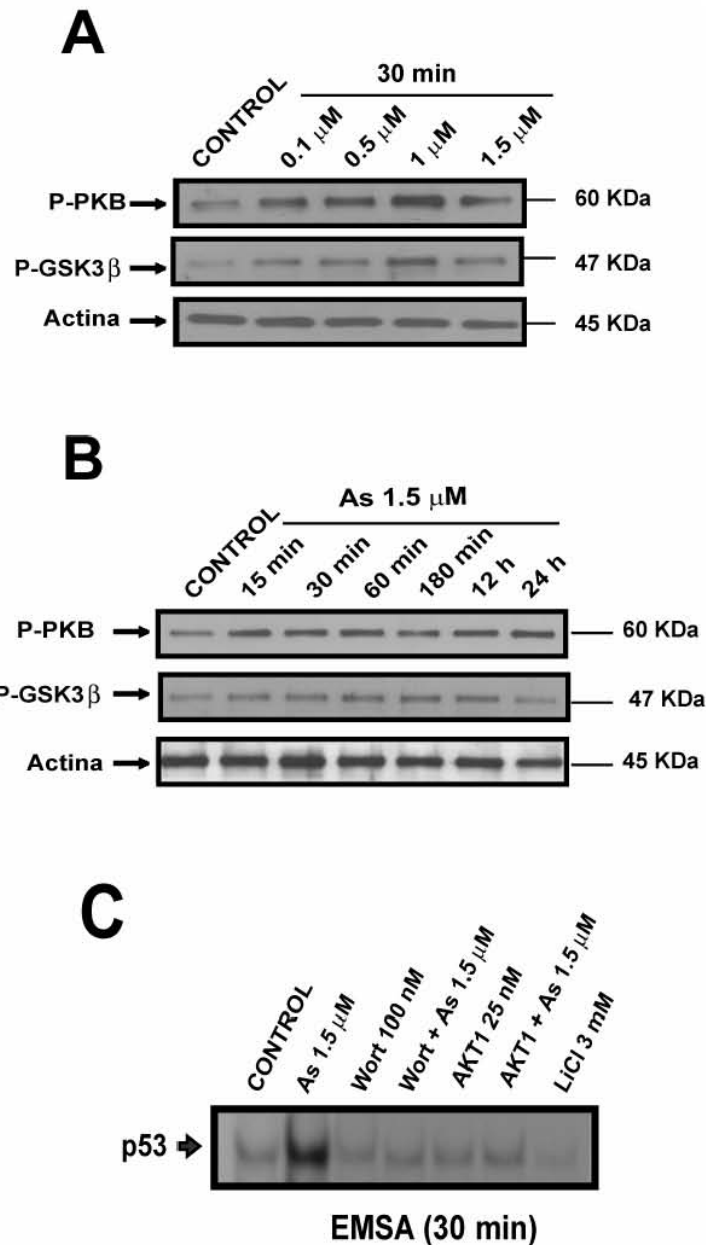
**Figura 12. La activación de la vía PI3-K/PKB/Akt promueve la unión de p53 al DNA en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al NaAsO<sub>2</sub>.** **A.** Los cultivos de los QHN, tratados con LiCl (3 mM), NaAsO<sub>2</sub> (1.5 μM), wortmannina (100 nM) y AKT1 (25 nM) en **B**, durante 30 min y 24 h respectivamente, se emplearon para la obtención de extractos nucleares, los cuales fueron utilizados en los ensayos de interacción proteína-DNA con el oligonucleótido p53 marcado radiactivamente.

### **El NaAsO<sub>2</sub> activa a la vía PKB/Akt en las células C33-A y su activación regula al complejo p53-DNA de manera dependiente del tiempo**

Siguiendo con el análisis, se realizaron una serie de experimentos para demostrar si en las células C33-A expuestas al NaAsO<sub>2</sub> la vía PI3-K/PKB/Akt participa en la regulación de la actividad de unión de p53 al DNA. Los ensayos de inmunodetección en fase sólida confirmaron que, al emplear extractos totales de las células C33-A expuestas a diferentes concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> durante 30 min, se detecta la fosforilación de las cinasas PKB/Akt y GSK-3β (Fig. 13A), siendo evidente desde la concentración 0.1 μM de NaAsO<sub>2</sub> con respecto al control. Posteriormente se determinó si la inducción de la fosforilación era dependiente del tiempo. Los datos indicaron que a tiempos relativamente cortos (15 min) se incrementa la fosforilación de ambas cinasas y que se mantiene hasta las 24 h (Fig. 13B).

Al realizar los ensayos de interacción proteína-DNA, se observó que al emplear extractos nucleares de células C33-A tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (1.5 μM) durante 30 min, el complejo p53-DNA incrementa significativamente con respecto al control. Sin embargo, al emplear los inhibidores wortmannina (100 mM) y AKT 1 (25 nM) en las células tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (1.5 μM), el complejo p53-DNA disminuye

significativamente (Fig. 13C). Estos resultados indican que la activación de la cinasa PKB/Akt es importante para favorecer la actividad de unión de p53 al DNA, pero esta



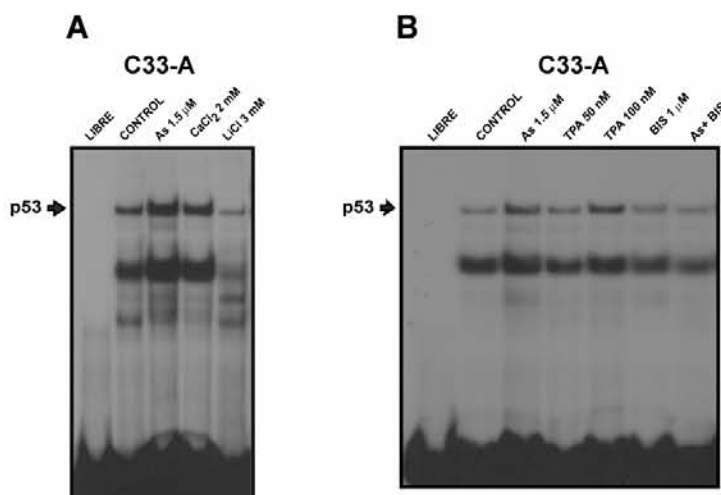
unión sólo es favorecida a tiempos cortos de exposición al NaAsO<sub>2</sub>. Así mismo, el efecto observado depende de la activación de la vía PI3-K, el tratamiento con wortmannina así lo indica.

**Figura 13. El NaAsO<sub>2</sub> induce la fosforilación de PKB/Akt en las células C33-A, su activación favorece al complejo p53-DNA a tiempos cortos.** **A.** Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de NaAsO<sub>2</sub>, durante 30 min. **B.** Las células se expusieron a la concentración de 1.5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> durante los tiempos indicados. Se obtuvieron extractos totales y se determinó la fosforilación de PKB y GSK-3 $\beta$  por inmunodetección en fase sólida, usando los anticuerpos anti-p-AKT (sc-7985) y anti-p-GSK-3 $\beta$  (sc-11757). Como control de referencia para normalizar los valores, se detectó anti- $\beta$ -actina (sc-32251) **C.** El complejo p53-DNA fue analizado bajo condiciones en las que se inhibió la activación de PI3-K y la fosforilación de PKB/Akt (los inhibidores fueron aplicados durante 30 min, antes del tratamiento con NaAsO<sub>2</sub>).

## El papel de PKC en la regulación del complejo p53-DNA en células C33-A expuestas al NaAsO<sub>2</sub>

Una de las cinasa que son activadas en respuesta a un daño celular, es la cinasa PKC $\delta$ . Se ha demostrado que en respuesta a un daño al DNA esta cinasa se fosforila en tirosina (Abbas et al. 2004). Contando con esta información, se exploró si bajo el contexto de una exposición al NaAsO<sub>2</sub> en las células C33-A, algún miembro de la familia PKC participa en la regulación de la unión de p53 al DNA. Inicialmente las células fueron expuestas al NaAsO<sub>2</sub> (1.5  $\mu$ M) y al CaCl<sub>2</sub> (2 mM, activador de la cinasa PKC) durante 30 min. Los ensayos bioquímicos indicaron que el complejo p53-DNA se incrementó con respecto al control (Fig. 14A). Posteriormente se realizaron tratamientos con TPA (100 nM, inductor de PKC), y Bisindoleilmaleimida I, BIS1 (1  $\mu$ M, inhibidor de PKC), durante 30 min. Interesantemente cuando empleamos TPA (100 nM), se observa que el complejo p53-DNA se incrementa considerablemente con respecto al control (Fig. 14B) mientras que cuando empleamos Bis I, el complejo es disminuído. Así mismo, el complejo no se recupera cuando empleamos NaAsO<sub>2</sub> y Bis I. De acuerdo con estos resultados, la activación de PKC favorece la unión de p53 al DNA (incremento del complejo) a tiempos cortos

de exposición al NaAsO<sub>2</sub>.



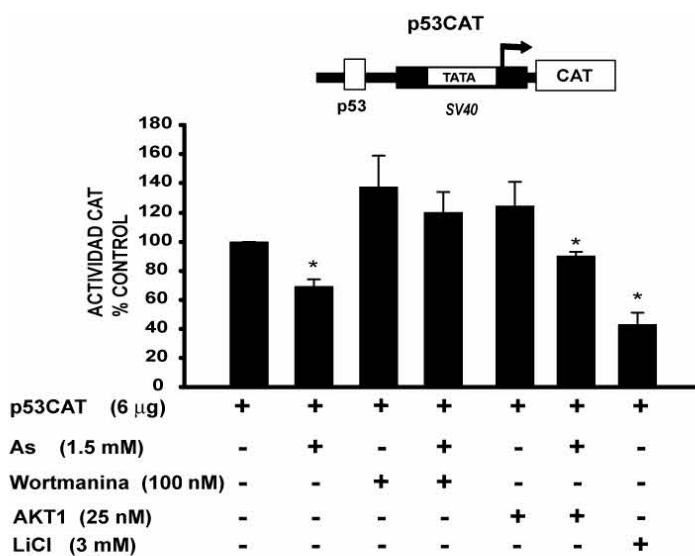
**Figura 14. La cinasa PKC participa en la inducción de la unión de p53 al DNA en las células C33-A.**

**A.** Los extractos nucleares fueron obtenidos a partir de células C33-A tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (1.5  $\mu$ M), con CaCl<sub>2</sub> (2 mM), y con LiCl (3 mM) (aplicados durante 30 min). **B.** Extractos nucleares de C33-A tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (1.5  $\mu$ M), TPA

(50-100 nM) y un inhibidor de PKC, Bisindoleilmaleimide (BIS, 1  $\mu$ M, tratamientos aplicados durante 30 min antes del tratamiento con NaAsO<sub>2</sub>), fueron empleados en los ensayos de interacción proteína-DNA con el oligonucleótido p53 marcado radiactivamente.

## La actividad transcripcional de p53 es disminuida en células C33-A expuestas al NaAsO<sub>2</sub>

Para determinar el papel funcional de la interacción de p53 a su secuencia consenso en el DNA, se utilizó la construcción p53CAT, que contiene la secuencia del promotor del gen p21, controlando al promotor temprano de SV40 y al gen reportero CAT (Hernández 2005). Las células C33-A se trataron con NaAsO<sub>2</sub> (1.5µM), wortmannina (100 nM), AKT 1 (25 nM) y LiCl (3 mM), 24 h post-transfección, incluyendo los inhibidores 30 min antes del arsenito, cuando así se indica. La construcción p53CAT muestra una disminución en su actividad transcripcional cuando las células son tratadas sólo con el NaAsO<sub>2</sub> (Fig. 15), sin embargo cuando se emplearon los inhibidores wortmannina y AKT 1, la construcción p53CAT recuperó su actividad (Fig. 15). Estos datos llevan a pensar que la ausencia de p53 en el núcleo ó la pérdida de afinidad de unión al DNA, inducida durante largos plazos de exposición al NaAsO<sub>2</sub>, disminuye la actividad de la construcción p53CAT. De manera interesante, cuando las células son tratadas con wortmannina y AKT 1, la actividad de la construcción p53CAT es favorecida; al parecer, la permanencia de



p53 en el núcleo se mantiene, conservando su papel como factor de transcripción.

**Figura 15. La exposición prolongada al NaAsO<sub>2</sub> en las células C33-A ocasiona la disminución del complejo p53, así como la pérdida de su funcionalidad.** En la Fig. 9 se muestra que a las 24 h de tratamiento, el complejo p53-DNA disminuye significativamente en el núcleo. La actividad transcripcional de p53 se

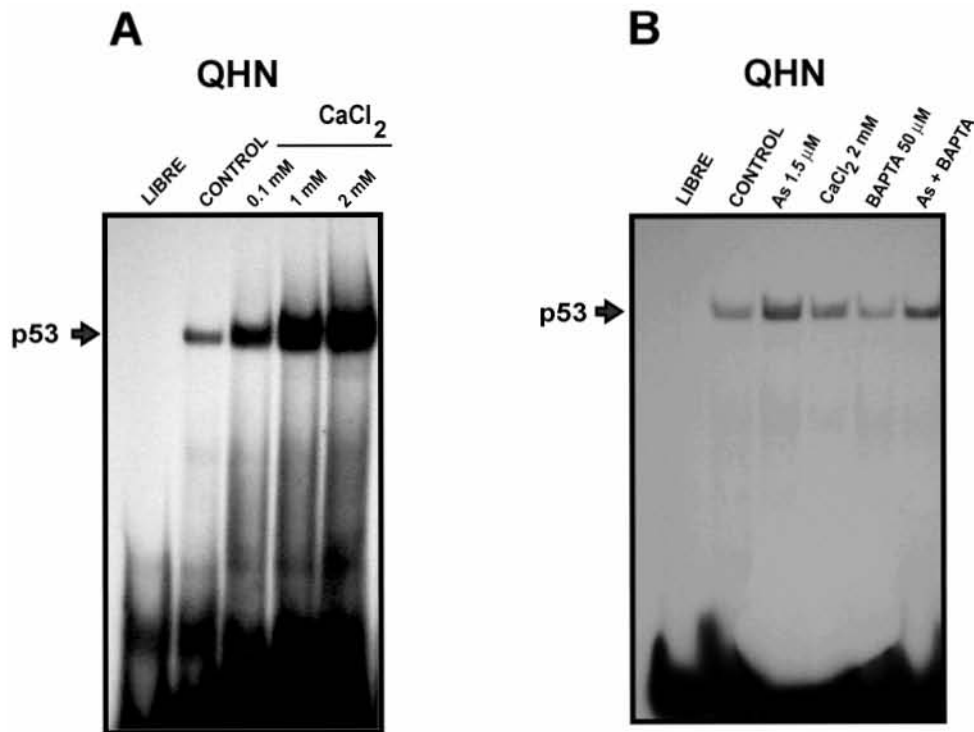
determinó bajo las mismas condiciones (24 h) mediante ensayos funcionales. La construcción p53CAT se transfectó (6µg de DNA plasmídico) en células C33-A con una confluencia del 80% las cuales fueron tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (1.5µM), wortmannina (100 nM) y LiCl (3 mM), 24 h post-transfección. Se cosecharon 24 h post-tratamiento y la actividad CAT se muestra como la actividad relativa de la construcción p53CAT. En todos los casos, los datos se normalizaron por la cantidad de proteína cuantificada en los extractos celulares. Las gráficas se obtuvieron a partir de por lo menos tres experimentos independientes.

## **El papel del $\text{Ca}^{2+}$ en la regulación de la actividad de unión de p53 al DNA en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al $\text{NaAsO}_2$**

Ante una exposición al  $\text{NaAsO}_2$ , los cultivos secundarios de los QHN mostraron un incremento en los niveles de la proteína p53, así como también un incremento en el complejo p53-DNA. Ante tal evidencia, nos preguntamos si este comportamiento está asociado a un arresto celular, como respuesta al daño genotóxico y su posible efecto en los procesos de proliferación y diferenciación epitelial. En el caso específico de la diferenciación celular epitelial, los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en la epidermis tienen un papel importante en la regulación de este proceso (Eckert et al. 1997). En este sentido, algunos estudios han registrado que el arsénico incrementa las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los linfocitos (Goytia-Acevedo et al. 2003), resultado que sirvió como plataforma para explorar si el  $\text{Ca}^{2+}$  podría estar involucrado en la actividad de unión de p53 al DNA en las células epiteliales.

Empleando extractos nucleares de los cultivos secundarios de los QHN expuestos a diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (0.1, 1 y 2 mM) durante 24 h, y la sonda de DNA marcada radiactivamente, se realizaron los ensayos de interacción proteína-DNA. Los resultados obtenidos muestran la formación de un complejo (Fig. 16A), complejo determinado anteriormente (Fig. 7, panel izquierdo), el cual de manera interesante aumentó a medida que se incrementaron la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , con respecto al control. Como se puede observar, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular favorece el incremento del complejo p53-DNA, mismo comportamiento que se presentó cuando se empleó  $\text{NaAsO}_2$ . Continuando con este análisis, las células fueron tratadas con  $\text{NaAsO}_2$  (1.5  $\mu\text{M}$ , durante 30 min),  $\text{CaCl}_2$  (2 mM, durante 30 min) y un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (BAPTA, 50  $\mu\text{M}$ , empleado 45 min antes del tratamiento con  $\text{NaAsO}_2$ ). En la Fig. 16B se muestra que el complejo p53-DNA disminuye cuando las células se tratan con BAPTA, sin embargo al tratar a las células con BAPTA y  $\text{NaAsO}_2$ , el complejo aumenta, es decir no se inhibe el efecto del As sobre el aumento de la afinidad de p53 al DNA. El complejo p53-DNA no se restablece totalmente comparando con el complejo formado cuando sólo se tratan las células con  $\text{NaAsO}_2$ . Los resultados obtenidos revelan que el aumento en los

niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tiene un papel importante en la actividad de unión de p53 al DNA, promoviendo de esta manera mecanismos dirigidos a un estado diferenciado de los cultivos secundarios de los QHN.



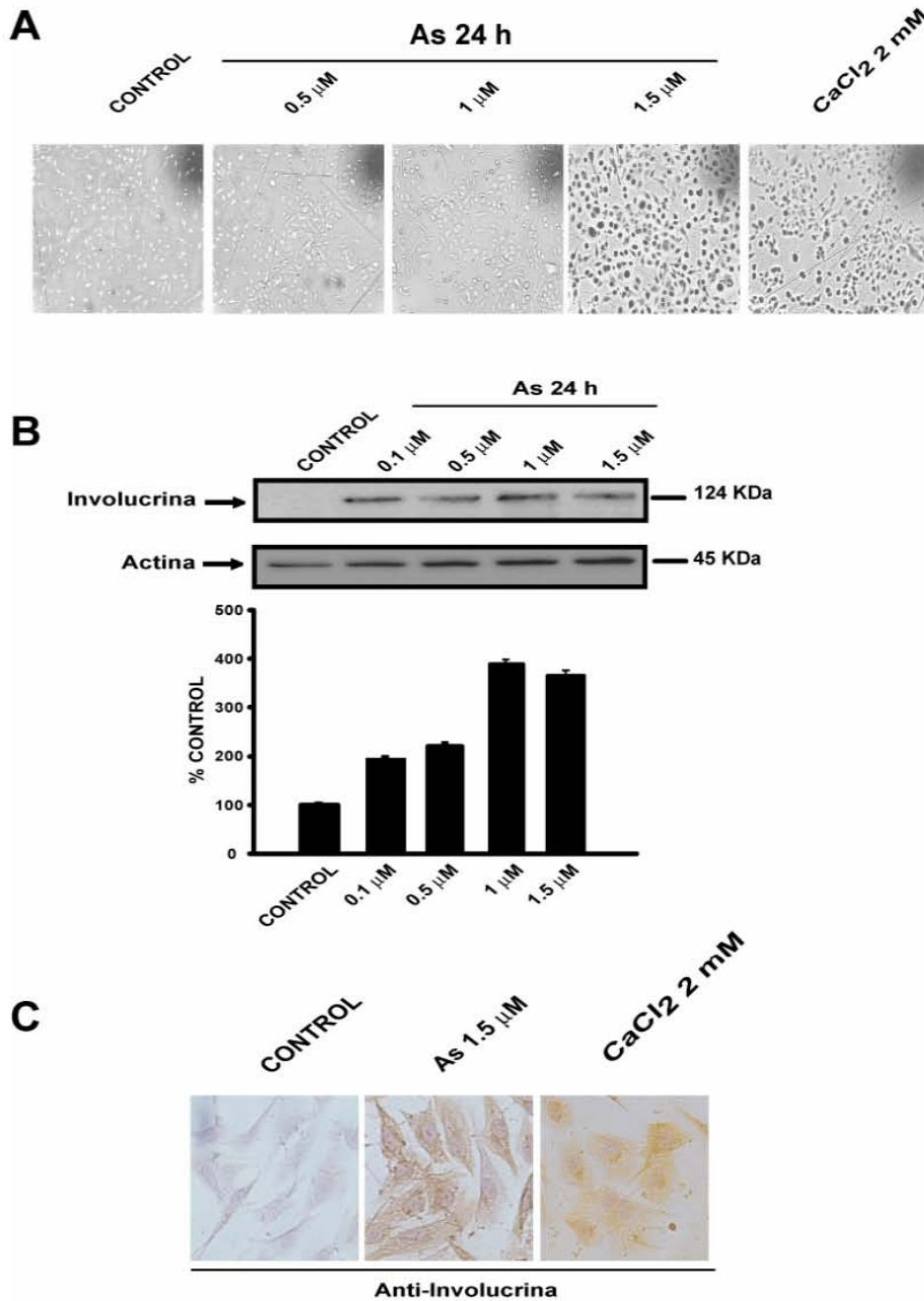
**Figura 16. El  $\text{Ca}^{2+}$  favorece la actividad de unión de p53 al DNA.** **A.** Los cultivos secundarios de los QHN fueron tratados con  $\text{CaCl}_2$  a las concentraciones indicadas, durante 24 h. Los extractos nucleares obtenidos fueron empleados en los ensayos de interacción proteína-DNA con el oligonucleótido p53 marcado radiactivamente. **B.** Extractos nucleares de los QHN tratados con  $\text{NaAsO}_2$  (1.5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) y BAPTA (50  $\mu\text{M}$ ) se probaron con la misma sonda que en A.



## **El NaAsO<sub>2</sub> en el ambiente de la diferenciación celular de los cultivos secundarios de los QHN**

De acuerdo con Eckert et al., en 1997, el desarrollo y funcionalidad de la epidermis depende del balance adecuado entre las tasas de proliferación y diferenciación celular de los QHN. Cuando los QHN inician la diferenciación, la proliferación se detiene y se induce la expresión de genes claves en el proceso de diferenciación celular, garantizando la formación y funcionalidad adecuada de la cubierta cornificada de los epitelios estratificados (Eckert et al. 1997). De manera específica, el gen de Hi es activado en los estratos suprabasales de la epidermis una vez que se ha iniciado el proceso de diferenciación epitelial, razón por la cual es considerado como un marcador esencial del inicio de este proceso.

Apoyándonos en los antecedentes mencionados, surgió el interés de conocer si el NaAsO<sub>2</sub> podría estar conduciendo a eventos de diferenciación celular. Para poder confirmar este planteamiento, averiguamos si el tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> modula los niveles de la proteína Hi, lo cual pudiera correlacionar con el inicio de un estado de diferenciación celular. Se expusieron los cultivos secundarios de los QHN al NaAsO<sub>2</sub> (concentraciones indicadas, durante 24 h); posteriormente las células se observaron al microscopio óptico (40x) y se identificaron los cambios morfológicos (Fig. 17A). Las imágenes muestran que al incrementar las concentraciones de NaAsO<sub>2</sub>, el cambio morfológico que sufren las células se asemeja a los eventos propios de la diferenciación celular en condiciones normales. Así mismo, se empleó un conocido inductor de la diferenciación celular de los QHN, el CaCl<sub>2</sub> (2 mM) como control positivo, pudiendo observar que las células presentan una morfología muy similar a la que se observó en las células que se expusieron a la concentración de 1.5 μM de NaAsO<sub>2</sub>.



**Figura 17. El NaAsO<sub>2</sub> induce cambios relacionados con el proceso de la diferenciación celular en los cultivos secundarios de los QHN.**

**A.** Los cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con el NaAsO<sub>2</sub> en células tratadas con diferentes concentraciones durante 24 h, fueron observados en imágenes al microscopio óptico (40x).

El CaCl<sub>2</sub> (2 mM) se empleó como un inductor de diferenciación celular. **B.** Efecto del NaAsO<sub>2</sub> sobre los niveles de la proteína Hi. Se obtuvieron extractos totales de los QHN tratados con NaAsO<sub>2</sub> (a las concentraciones indicadas) y se sometieron a inmunodetección en fase sólida empleando el anticuerpo anti-involucrina (sc-21748) y  $\beta$ -actina (sc-32251). Los valores graficados se obtuvieron mediante densitometría y representan la media de dos experimentos independientes  $\pm$  E.E. **C.** Detección de Hi mediante inmunocitoquímica. Los QHN se sembraron en cámaras de 8 pozos, las células se trataron como se indica, fijándolas 24 h post-tratamiento. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio óptico (40x).

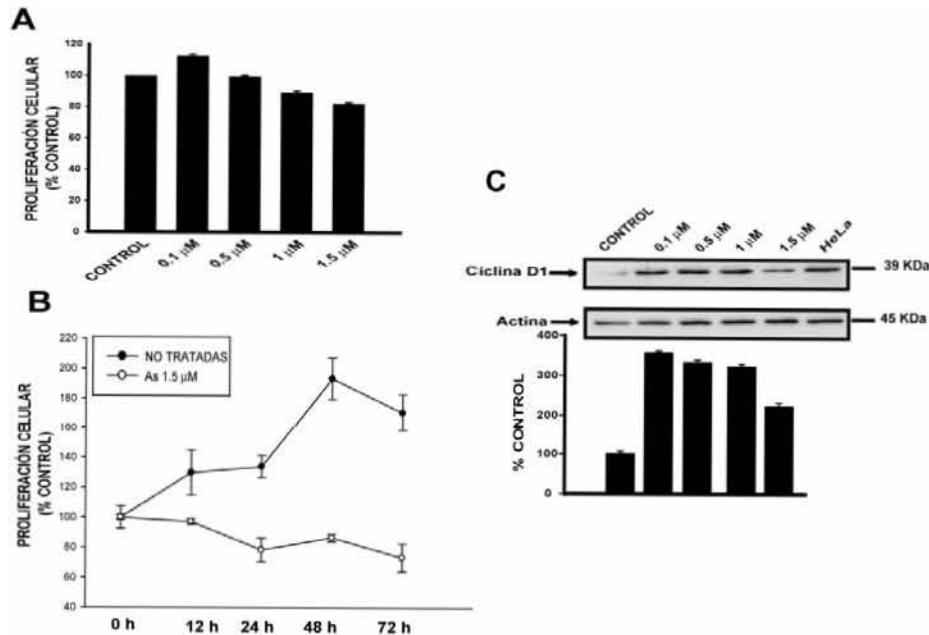
Con respecto a los ensayos de inmunodetección en fase sólida dirigidos contra la proteína Hi, se obtuvieron los extractos totales de cultivos secundarios de los QHN expuestos a diferentes concentraciones de  $\text{NaAsO}_2$ , durante 24 h. El anticuerpo específico reconoció una banda de aproximadamente 124 kDa, relacionada de manera específica con la proteína Hi (Fig. 17B). Así, se observó que a medida que se incrementó la concentración de  $\text{NaAsO}_2$ , los niveles de la proteína aumentaron de manera dosis-respuesta (Fig. 17B). Los ensayos de inmunocitoquímica corroboraron los resultados obtenidos; las imágenes mostradas en la Fig. 17C, confirman el incremento de la proteína Hi en el citoplasma, al tratar a las células con  $\text{NaAsO}_2$  durante 24 h, efecto no observado en las células no tratadas. De igual manera, se presenta la imagen de las células cuando se trataron con  $\text{CaCl}_2$ , durante 24 h. Los resultados obtenidos muestran que el  $\text{NaAsO}_2$  induce el proceso de diferenciación celular de los QHN.

#### **La tasa de proliferación celular disminuye en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al $\text{NaAsO}_2$**

Dado que los eventos de la proliferación y la diferenciación celular de los cultivos secundarios de los QHN son regulados de manera coordinada, se evaluó el estado de la proliferación en estas células, de tal manera que se pudiese conocer el balance entre ambos procesos bajo el  $\text{NaAsO}_2$ . Para determinar el efecto del  $\text{NaAsO}_2$  en la proliferación celular de los cultivos secundarios de los QHN, tratados con las concentraciones ya establecidas durante 24 h, se empleó el índice nuclear (IN). Los datos revelaron que a la concentración de  $0.1 \mu\text{M}$  se presentó un discreto aumento en la proliferación celular con respecto al control, sin embargo a medida que se fueron incrementando las concentraciones de  $\text{NaAsO}_2$  este comportamiento fue diferente, es decir, la proliferación celular paulatinamente disminuyó, encontrando una diferencia significativa a la concentración de  $1.5 \mu\text{M}$  (Fig. 18A).

Dado que a la concentración de  $1.5 \mu\text{M}$  se determinó la mayor disminución de la proliferación celular, se procedió a evaluar nuevamente el estado de proliferación bajo esta misma concentración, pero ahora con diferentes tiempos mediante el

método MTT. Los datos indicaron que a partir de las 12 h el estado proliferativo se mantuvo por debajo del control e interesantemente a las 24 h se presentó una mayor disminución con respecto al control (Fig. 18B). El comportamiento observado indicó una respuesta dependiente del tiempo.



**Figura 18. Efecto del  $\text{NaAsO}_2$  sobre la proliferación celular de los cultivos secundarios de los QHN.** **A.** Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de  $\text{NaAsO}_2$  y citocalasina B (2 mg/ml) durante 48 h. La proliferación celular fue evaluada mediante el método del IN. **B.** Las células fueron tratadas con 1.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$ , durante 0-72 h. La proliferación celular fue evaluada mediante el método MTT. **C.** Efecto del  $\text{NaAsO}_2$  en la proteína ciclina D1. Se obtuvieron extractos totales de los QHN tratados con  $\text{NaAsO}_2$  (a las concentraciones indicadas) y se sometieron a inmunodetección en fase sólida empleando el anticuerpo anti-ciclina D1 (sc-717) y el anticuerpo dirigido contra  $\beta$ -actina (sc-32251). Los valores graficados se obtuvieron mediante densitometría y representan la media de tres experimentos independientes  $\pm$  E.E.

Al respecto, Vega et al., en el 2001, reportaron que al tratar queratinocitos humanos con dosis relativamente bajas de  $\text{NaAsO}_2$  hay un incremento en la proliferación celular y al emplear concentraciones mayores a 0.5 $\mu\text{M}$ , la proliferación es inhibida (Vega et al. 2001). Una de las explicaciones propuestas para tratar de descifrar estos eventos, se basó en la estimulación de la secreción de citocinas, factores estimulantes de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, como resultado de la exposición al arsénico y por otra parte,

estos factores son de gran importancia en la activación de la proliferación celular de los queratinocitos. De esta manera se demostró que la exposición *in vitro* al NaAsO<sub>2</sub>, a dosis bajas, moduló la secreción de citocinas en queratinocitos humanos, es decir, indujo significativamente la secreción de GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-6. Sin embargo, al aumentar las dosis, la secreción de las tres citocinas regresó a sus niveles basales ó fue significativamente reducida.

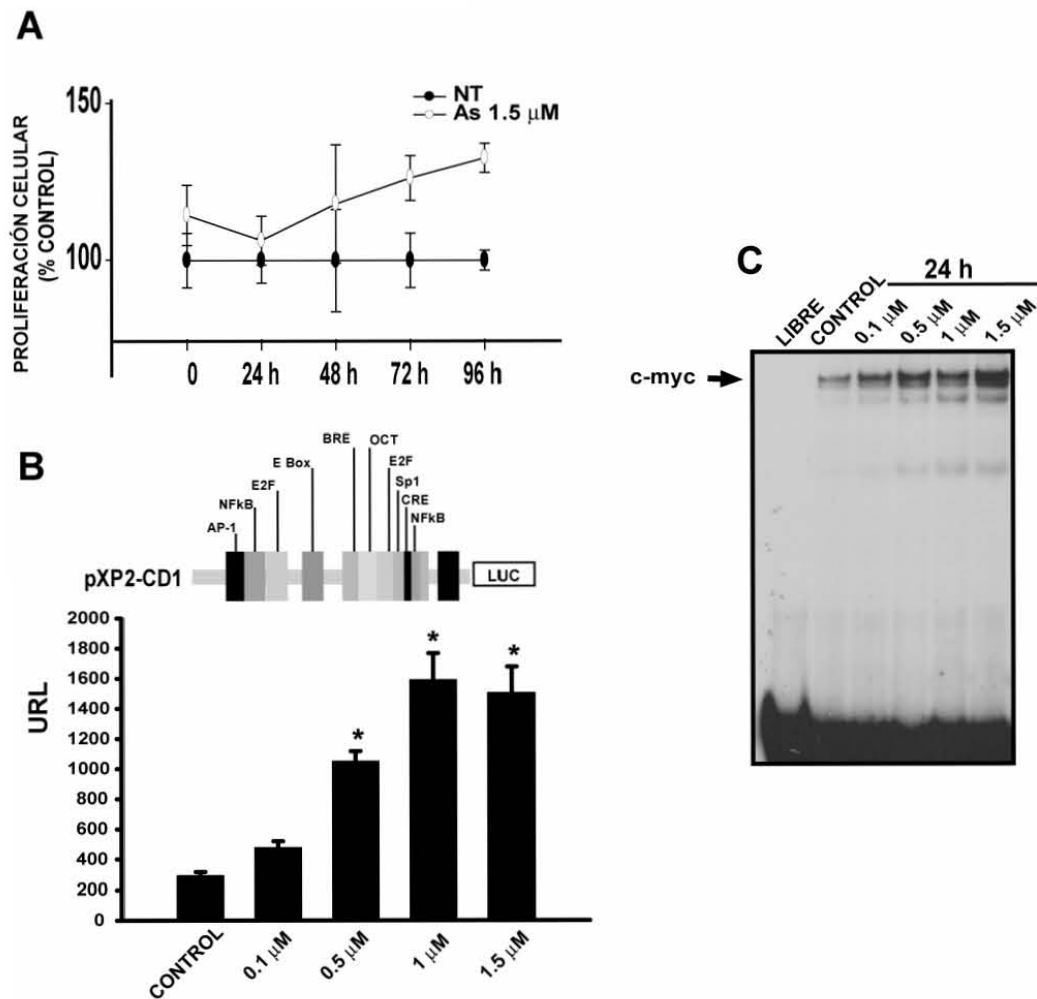
De acuerdo con lo antes mencionado, se sugiere que el NaAsO<sub>2</sub> modula de manera importante factores claves en los procesos de proliferación celular y que esta modulación o respuesta, está en función de las concentraciones de exposición y del tiempo. No descartamos la posibilidad de que se estén llevando a cabo eventos similares, ya que observamos un comportamiento muy similar en cuanto a los cambios en la proliferación celular.

Ya que el efecto del NaAsO<sub>2</sub> en la proliferación celular de los cultivos secundarios de los QHN fue analizado, se apoyó este resultado con la evaluación de un marcador clave en la proliferación celular. Se sabe que la proteína ciclina D1 es una pieza esencial en la progresión del ciclo celular a través de la fase G1, y una vez que las células dejan de proliferar, los niveles de esta proteína disminuyen. Por otro lado, estudios realizados en fibroblastos expuestos al NaAsO<sub>2</sub>, demostraron que la expresión de esta proteína se encontró alterada proponiendo que el NaAsO<sub>2</sub> es capaz de regular proteínas claves del ciclo celular, modulando de esta manera eventos de la proliferación celular. Por tal razón, se evaluaron los niveles de ciclina D1 en los cultivos secundarios de los QHN expuestos al NaAsO<sub>2</sub>. Se obtuvieron los extractos totales de cultivos secundarios de los QHN expuestos a las concentraciones señaladas de NaAsO<sub>2</sub>, durante 24 h y se realizaron los ensayos de inmunodetección en fase sólida dirigidos contra la proteína ciclina D1. El anticuerpo específico para la proteína ciclina D1 reconoció una banda de aproximadamente 39 kDa (Fig. 18C). Los datos indicaron que los niveles de ciclina D1 se incrementan con respecto al control, sin embargo, cuando las células fueron expuestas a la concentración de 1.5  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub>, los niveles de ciclina D1 disminuyen

significativamente, concentración a la cual también se registró una disminución en la proliferación celular (Fig. 18A y B). De esta manera, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que el  $\text{NaAsO}_2$  es capaz de disminuir la proliferación celular de los QHN bajo las condiciones empleadas.

### **El $\text{NaAsO}_2$ promueve la proliferación celular en la línea C33-A**

En virtud de que en los cultivos secundarios de los QHN no se registró un daño basal y dado que las proteínas evaluadas se encuentran en condiciones normales, se demuestra que la proliferación celular disminuye en respuesta al  $\text{NaAsO}_2$ . Por tal motivo, se investigó el efecto del  $\text{NaAsO}_2$  en la proliferación celular de las células C33-A, las cuales tienen a la proteína p53 mutada en el codón 273 (Scheffner et al. 1991). Las células fueron cultivadas en medio al 2% de suero y tratadas con  $1.5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$ , a los tiempos señalados. Como se puede observar, al explorar la proliferación celular mediante MTT, el  $\text{NaAsO}_2$  favoreció el incremento de la proliferación celular y este efecto fue más evidente a partir de las 48 h de exposición (Fig. 19A), efecto que se mantuvo en incremento hasta las 96 h. Así mismo, se realizaron los ensayos funcionales empleando la construcción pXP2-CD1, que contiene al promotor de ciclina D1, en células C33-A tratadas con concentraciones crecientes de  $\text{NaAsO}_2$ , 24 h post-transfección. La actividad transcripcional de la construcción pXP2-CD1 se potenció considerablemente a partir de la concentración de  $0.5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  (Fig. 19B), apoyando de manera importante el hecho de que el  $\text{NaAsO}_2$  incrementa la proliferación celular.

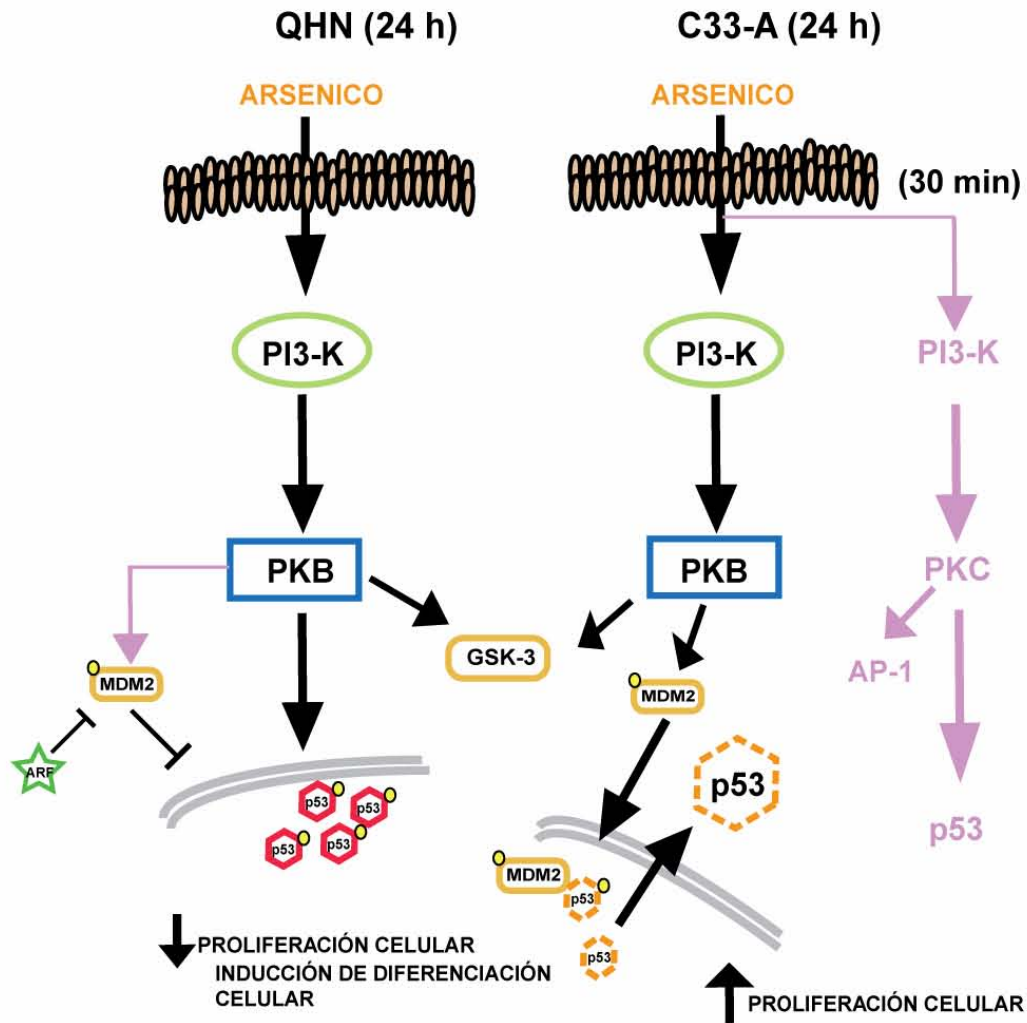


**Figura 19. El NaAsO<sub>2</sub> induce la proliferación celular en las células C33-A.** **A.** Las células fueron sembradas en medio al 2% de suero (privación de suero) y tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (1.5  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. La proliferación fue evaluada mediante el método MTT. Los valores graficados están expresados con respecto a las células no tratadas al tiempo 0, considerados como el 100% y representan la media de cuatro experimentos independientes +/- E.E. **B.** La construcción pXP2-CD1 fue transfectada (6  $\mu$ g de DNA plasmídico) en células C33-A con una confluencia del 80% y tratadas con las concentraciones indicadas de NaAsO<sub>2</sub>, 24 h post-transfección, y cosechadas 24 h post-tratamiento. Las unidades relativas de luciferasa se obtuvieron de tres experimentos independientes. **C.** Las células fueron tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (durante 24 h, a las concentraciones señaladas). Se obtuvieron los extractos nucleares y se emplearon en los ensayos de unión al DNA con el oligonucleótido *c-myc* marcado radiactivamente.

Finalmente, se evaluó uno de los principales factores de transcripción que controlan la expresión del gen ciclina D1 en condiciones de activación mitogénica, el factor *c-myc* (Daksis et al. 1994). Se analizó si el  $\text{NaAsO}_2$  era capaz de incrementar la actividad de unión de *c-myc* a su secuencia consenso en el DNA y de esta manera poderlo correlacionar con el incremento en la actividad transcripcional de la construcción pXP2-CD1. Los ensayos de interacción proteína-DNA fueron realizados empleando extractos nucleares de células C33-A tratadas con  $\text{NaAsO}_2$ , a las concentraciones indicadas, durante 24 h y un oligonucleótido que contiene la secuencia consenso para la unión del factor *c-myc* marcado radiactivamente. En la Fig. 19C, se observa que el complejo *c-myc*-DNA incrementa a partir de la concentración  $0.1 \mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$  con respecto al control y que este comportamiento es dependiente de la dosis. Los datos indican que el  $\text{NaAsO}_2$  favorece la actividad de unión de *c-myc* al DNA, efecto que podría estar directamente relacionado con el incremento en la actividad transcripcional de la construcción pXP2-CD1. De acuerdo con estos resultados, se confirma la inducción de la proliferación celular de las células C33-A bajo la exposición al  $\text{NaAsO}_2$ .

Todos los hallazgos presentados en este estudio indican que el  $\text{NaAsO}_2$  ejerce diferentes efectos en el proceso de la proliferación celular en las dos líneas epiteliales estudiadas. La activación de la vía de señalización IP3-K/PKB/Akt desencadenó una serie de eventos moleculares diferentes sobre la actividad de unión de la proteína p53 a su elemento de respuesta en el DNA, efecto que fue dependiente del estatus de la proteína, la concentración y los tiempos del  $\text{NaAsO}_2$  estudiados (Fig. 20).





**Figura 20. Modelo propuesto del efecto del  $\text{NaAsO}_2$  en células epiteliales.** El  $\text{NaAsO}_2$  activa la vía PI3-K/PKB/Akt en ambos sistemas epiteliales, sin embargo existe una diferencia en la actividad de unión de p53 al DNA. Estos eventos reflejaron una marcada respuesta en el proceso de la proliferación celular en ambos sistemas.

## **Discusión**

El principal objetivo de este estudio fue caracterizar los efectos de un carcinógeno epitelial, el arsénico inorgánico, sobre los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la proliferación y de la diferenciación celular de dos sistemas epiteliales expuestos al NaAsO<sub>2</sub>. Así mismo, el papel de la activación de la proteína p53 en estos eventos y la vía de señalización involucrada en modular la actividad de esta proteína.

Se ha reportado que el arsénico es capaz de inducir efectos citotóxicos en diversas líneas celulares, por ejemplo en fibroblastos (Trouba et al. 1999; Lee et al. 2004), linfocitos (Sordo et al. 2001), hepatocitos (Petrick et al. 2000) e incluso en queratinocitos humanos normales (Bae et al. 2001). Estos estudios indicaron que a las concentraciones entre 1 y 10  $\mu\text{M}$  de arsénico, la viabilidad celular es afectada significativamente. Por otra parte, estudios realizados por Salazar et al., en 1997 reportaron que el efecto del arsénico en la viabilidad celular muestra variaciones en las respuestas citotóxicas, cuando se comparan las líneas HeLa, C33-A, Jurkat y LCL-EBV. Las células C-33A y Jurkat presentaron mayor sensibilidad al tratamiento, mientras que, HeLa y LCL-EBV fueron sensibles a dosis mayores de 10  $\mu\text{M}$  de NaAsO<sub>2</sub> (Salazar et al. 1997). Estudios realizados por Hamadeh et al., en el 2002, demuestran que al tratar queratinocitos humanos normales de cultivos primarios, con diferentes dosis de NaAsO<sub>2</sub> (0.001-100 $\mu\text{M}$ ) durante 24 h, la viabilidad celular no fue drásticamente afectada utilizando concentraciones “relativamente bajas” (0.001-10 $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, a dosis mayores de 10 $\mu\text{M}$ , detectan una disminución significativa de la viabilidad celular (Hamadeh et al. 2002).

En virtud de estas diferencias y basándonos en el hecho de que en zonas endémicas de exposición al arsénico, la OMS señala un nivel máximo de exposición no mayor a 10  $\mu\text{g/L}$ , iniciamos el análisis de la citotoxicidad en los dos sistemas epiteliales, contemplando una concentración máxima de 1.5  $\mu\text{M}$ . Se evaluó la sensibilidad de los cultivos secundarios de los QHN y las células C33-A a diferentes

concentraciones de  $\text{NaAsO}_2$ , durante 24 h. Los resultados mostraron la ausencia de la citotoxicidad entre las concentraciones  $0.001 - 1.5 \mu\text{M}$ , el porcentaje de viabilidad celular no se vió afectado. Al evaluar la viabilidad celular a la concentración de  $1.5 \mu\text{M}$ , durante diferentes períodos de tiempo, tampoco se observó un efecto citotóxico, corroborando así que aún a períodos mayores a 24 h, la viabilidad celular no se ve comprometida con respecto a las células no tratadas.

Los estudios sobre genotoxicidad demuestran ampliamente que el arsénico incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, así como también la presencia de micronúcleos en linfocitos humanos (Gonsebatt et al. 1992; Vega et al. 1995). Por otra parte, el grupo de trabajo de Ostrosky-Wegman ha reportado daño al DNA *in vitro* e *in vivo*. Siguiendo en este contexto, al evaluar la actividad clastogénica del  $\text{NaAsO}_2$  en los cultivos secundarios de los QHN, se determinó la presencia de daño al DNA. A pesar de no registrar un efecto citotóxico (Figura 1), se registró la presencia de daño genotóxico. El mayor número de micronúcleos se determinó a la concentración de  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$ . Los resultados obtenidos, concuerdan con los reportados en otros sistemas celulares en los que se ha encontrado la presencia de micronúcleos en respuesta al tratamiento con  $\text{NaAsO}_2$ .

Al presentarse un daño al genoma celular, una de las principales respuestas es la activación de una serie de vías de señalización que involucran al gen supresor de tumores p53 (Colman et al. 2000). La proteína p53 es un componente clave en los procesos de carcinogénesis humana, tiene una función importante en la regulación de la proliferación celular, el control del ciclo celular, la reparación del ADN y la muerte celular programada (Lane and Benchimol 1990; Levine et al. 1991; Greenblatt et al. 1994). La proteína p53 usualmente se encuentra en bajos niveles en células normales, sin embargo estímulos que incluyen daño al DNA, como son las especies reactivas de oxígeno y radiaciones ionizantes, son capaces de activar a esta proteína e iniciar los procesos de reparación necesarios para corregir aquellos daños producidos en la célula. En este sentido, se evaluaron los efectos del  $\text{NaAsO}_2$

sobre los niveles de la proteína p53 en los cultivos secundarios de los QHN, los resultados mostraron un incremento de p53 a partir de concentraciones relativamente pequeñas de NaAsO<sub>2</sub> y este incremento se mantuvo en todas las concentraciones empleadas. Estudios previos respaldan estos resultados, se ha reportado un incremento de p53 en linfocitos tratados con NaAsO<sub>2</sub> (Salazar et al. 1997).

Puesto que p53 al ser inducida, se acumula en el núcleo y es activada como un factor de transcripción, ha sido muy interesante el explorar los eventos que se inician ante tal efecto. Al respecto, Donehower and Bradley reportaron en 1993, que en respuesta a daño al DNA la proteína p53 incrementa sus niveles, pero también su actividad de unión al DNA, lo que correlacionó con la inhibición del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> y la consiguiente inhibición de la síntesis del DNA (Donehower and Bradley 1993). En las condiciones utilizadas, el NaAsO<sub>2</sub> incrementa los niveles de p53 y favorece su actividad de unión a una secuencia específica en el DNA, sin embargo este comportamiento fue distinto en relación a la disminución en la tasa de proliferación celular, al comparar ambos sistemas epiteliales. En los cultivos secundarios de los QHN, el complejo p53-DNA se incrementa, lo que indica una estabilidad y activación de la proteína. Este comportamiento podría conducir a la regulación de sus genes blanco como p21 que intervienen directamente en detener la progresión del ciclo en G<sub>1</sub>. Sin embargo, en las células C33-A, el complejo p53-DNA sólo se incrementó a tiempos muy cortos, mientras que a tiempos más largos de exposición al NaAsO<sub>2</sub>, el complejo disminuyó probablemente debido a la pérdida de la afinidad de p53 al DNA ó incluso debido a un mayor exporte nuclear de la proteína.

Consideramos que en un sistema celular normal, como es el caso de los cultivos secundarios de los QHN, los eventos de retroalimentación favorecerán la permanencia de p53 en el núcleo, respondiendo así a las señales de daño al DNA. Sin embargo, en un sistema celular que presenta daño basal y tiene una mutación en p53, la hipótesis que se plantea es que los eventos de retroalimentación son

diferentes y repercuten en la desestabilización de p53, probablemente llevándola a un mayor exporte nuclear y su consecuente degradación. En este estudio, corroboramos que no se trata de una degradación de la proteína, al menos durante las primeras 24 h, dado que los niveles totales de p53 se mantuvieron constantes. Sin embargo, no se descarta el hecho de que en períodos mayores a 24 h, la proteína pudiera ser degradada. Así mismo, los mecanismos que regulan la actividad de unión de p53 al DNA parecen ser dependientes de la integridad y/o permanencia nuclear de la proteína y del tipo celular en cuestión, por lo que el conocer que vías de señalización están implicadas en este mecanismo fue el siguiente paso.

Algunos reportes han mostrado que el arsénico puede activar o inhibir diferentes vías de señalización, repercutiendo en la regulación de la expresión de genes que participan en los eventos de crecimiento, diferenciación celular y apoptosis (Chen et al. 1998; Germolec et al. 1998; Huang et al. 1999). En este sentido fue interesante explorar que vía de señalización podría participar en regular la actividad de unión de p53 al DNA. Los antecedentes más directos fueron los estudios realizados por Souza en el 2001, en donde se demuestra que el arsénico puede inducir la activación de la cinasa PKB/Akt, así como su efector eNOS en cultivos de queratinocitos humanos (Souza et al. 2001). En este sentido, corroboramos que en nuestro sistema el  $\text{NaAsO}_2$  fue capaz de activar a la cinasa PKB/Akt, vía PI3K, además de favorecer la activación de la cinasa GSK3 $\beta$  (un blanco directo de PKB) que participa en diversos procesos celulares, incluyendo transformación, proliferación y diferenciación celular (Nicholson and Anderson 2002). Continuando en este contexto, los resultados obtenidos indican que la cinasa PKB/Akt es una de las cinasas implicadas en regular la actividad de unión de p53 al DNA, dado que su activación favoreció el incremento gradual del complejo p53-DNA en los cultivos secundarios de los QHN, de hecho en este sistema celular se observó el mayor incremento a las 24 h de exposición de  $\text{NaAsO}_2$ , comportamiento totalmente contrario al observado en las células C33-A. Cuando inhibimos la vía, el complejo se disminuye, lo cual lleva a proponer que es necesaria la activación de la vía

PI3K/PKB/Akt para que ejerza un efecto positivo sobre la unión de p53 a sus secuencias blanco en el DNA.

De manera interesante, el efecto del NaAsO<sub>2</sub> sobre la disminución del complejo p53-DNA en la línea celular C33-A a largo plazo, sugiere que un p53 mutado podría ser menos estable al interaccionar con el DNA y por lo tanto ser más susceptible al exporte nuclear, promoviendo su degradación mediada por la proteína mdm2 (“murine double-minute 2”). Una de las principales cuestiones que se encuentran en discusión es el impacto de las mutaciones de p53 y su interacción con mdm2. Se sabe que la región donde mdm2 se une a p53 está desprovista de mutaciones, sin embargo se piensa que aún existen diferencias importantes en la unión de mdm2 a un p53 mutado comparado con un p53 silvestre, que podrían explicar los cambios en cuanto a la permanencia de p53 en el núcleo (Hamadeh et al. 1999). Considerando que en las células C33-A, al ser una línea celular derivada de un adenocarcinoma cervical humano, los niveles de la proteína mdm2 se encuentran elevados, esta condición probablemente favorece el exporte nuclear de p53. De esta manera se propone que en las células C33-A expuestas al NaAsO<sub>2</sub> se estaría favoreciendo la formación del complejo p53-mdm2 y por lo tanto promoviendo la inhibición y degradación de p53.

Por otra parte, una de las respuestas que llamó la atención fue la participación del Ca<sup>2+</sup> sobre el complejo p53-DNA en los cultivos secundarios de los QHN, como se observa el Ca<sup>2+</sup> indujo al complejo. En este punto, fue interesante saber que el NaAsO<sub>2</sub> modula los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular (incremento de Ca<sup>2+</sup>) en otros tipos celulares, por lo que no se descarta la posibilidad de que en este sistema epitelial pudiese darse el mismo efecto, lo cual estaría favoreciendo el inicio de los eventos de la diferenciación celular de los cultivos secundarios de los QHN. Al respecto también se conoce que en la epidermis los gradientes de Ca<sup>2+</sup> tienen un papel muy importante en regular la diferenciación celular. En las capas basales, donde los queratinocitos se encuentran en constante división celular, las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> que se encuentran son relativamente bajas, mientras que en las capas

suprabasales, donde los queratinocitos han iniciado su diferenciación, las concentraciones son altas; por lo que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estimula la diferenciación (Eckert 1989; Younus and Gilchrest 1992).

En nuestro laboratorio se han podido reproducir los eventos que ocurren durante la diferenciación celular al aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de cultivo de 0.1 mM a 2 mM, resultando en un incremento en la expresión de genes considerados como marcadores de diferenciación celular, particularmente la inducción transcripcional del gen de la involucrina humana (Hennings et al. 1980; Azuara-Liceaga et al. 2004). La Hi es una proteína que se induce específicamente en las capas superiores de los epitelios estratificados, y su inducción se restringe estrictamente a los eventos de diferenciación. Además de evidenciar el cambio morfológico que presentaron las células cuando se expusieron los cultivos secundarios de los QHN al  $\text{NaAsO}_2$ , se observó el incremento de la Hi. Esta proteína se detecta en el estrato espinoso de la epidermis, una vez que se ha iniciado el proceso de la diferenciación celular de los QHN, no siendo así en las células proliferantes de la capa basal (Eckert et al. 1993). Una de las contribuciones más importantes que este estudio aporta es la observación de que el  $\text{NaAsO}_2$  podría ser un importante inductor de la diferenciación celular de los QHN.

Los resultados obtenidos señalan que en efecto, el proceso de diferenciación de los cultivos secundarios de los QHN es inducido, por lo que necesariamente exploramos los cambios en la proliferación celular y de esta manera sustentar aún más los resultados. En efecto, la proliferación celular de los QHN disminuye, condición que es necesaria para que estas células den paso al inicio de la diferenciación celular, además de ser un proceso indispensable en los queratinocitos humanos.

La progresión del ciclo celular a través de la fase  $G_1$  requiere la participación de las ciclinas tipo D, que se unen y activan a las Cdks. Ciclina D1 es una importante proteína requerida en la progresión del ciclo celular a través de la fase  $G_1$  y en conjunto con otras proteínas (cdk4 and cdk6) inactivan a pRB, la principal proteína responsable de un arresto celular. La pérdida de ciclina D1 puede resultar en la

inhibición de la proliferación celular mediante el arresto en la fase G<sub>1</sub> (Sherr 2000). Con respecto a la proteína ciclina D1 se muestra una disminución bajo las mismas condiciones de exposición al arsenito de sodio, lo que nuevamente coincide y refuerza la detección de una disminución en la proliferación celular.

Al respecto, Vega et. al., en 2001, reportaron que al tratar queratinocitos humanos con dosis de NaAsO<sub>2</sub> relativamente bajas, observaron un incremento en la proliferación celular y al emplear concentraciones mayores a 0.5μM, la proliferación fue inhibida (Vega et al. 2001). Una de las explicaciones propuestas se basó en la estimulación de la secreción de citocinas como los Factores Estimulantes de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF), el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF-α) y la IL-6, como resultado de la exposición al arsénico, todos estos factores son de gran importancia en la activación de la proliferación celular de los queratinocitos. De esta manera se demostró que la exposición al NaAsO<sub>2</sub>, a dosis bajas, indujo significativamente la secreción de GM-CSF, TNF-α e IL-6, pero al aumentar las dosis, la secreción de las tres citocinas regresó a sus niveles basales e incluso se redujo significativamente.

En las células C33-A también se determinó la activación de la vía PI3K/PKB/Akt, sin embargo esta activación reguló de manera distinta al complejo p53-DNA. Al parecer en este sistema celular la activación de la vía no favoreció la actividad de unión de p53 al DNA, siendo más evidente a tiempos largos de exposición al NaAsO<sub>2</sub>, el complejo fue drásticamente disminuído. La activación de la vía PI3K/PKB/Akt en respuesta a señales de sobre vivencia ha sido ampliamente estudiada, recientes trabajos han revelado que PKB/Akt tiene una compleja relación con la vía de p53; su blanco no es directamente p53 por si mismo, más bien es mdm2. PKB puede unirse a mdm2 y promover su fosforilación en el dominio central, una vez fosforilada mdm2, es capaz de traslocarse del citoplasma al núcleo e interactuar con p53 y promover su inactivación, ubiquitinización y finalmente su degradación (Mayo and Donner 2001; Zhou et al. 2001; Gottlieb et al. 2002). Apoyándonos en estos antecedentes, proponemos que bajo nuestras condiciones este efecto podría estarse llevando a



cabo en las células C33-A expuestas al NaAsO<sub>2</sub>, específicamente a tiempos largos, razón por la cual observamos una disminución del complejo p53-DNA. Los experimentos realizados a 30 min de exposición al NaAsO<sub>2</sub>, confirman la participación de la vía PI3K/PKB/Akt sobre la formación del complejo p53-DNA; el complejo se incrementó significativamente con respecto al control. Sin embargo, dicho incremento es menos notable a medida que aumenta el tiempo de exposición, resultados que ayudan a explicar el comportamiento observado durante 24 h.

Por otra parte, se analizó la participación de la cinasa PKC como una pieza importante en la regulación de la actividad de unión de p53 al DNA, a tiempos tempranos de exposición al NaAsO<sub>2</sub>. En este sentido, nuevamente se corroboró que existen mecanismos específicos que regulan la actividad de unión de p53 al DNA, lo que contribuye a dilucidar los mecanismos moleculares que regulan los eventos de proliferación y diferenciación celular bajo una exposición al NaAsO<sub>2</sub>.

Una de las funciones biológicas más importantes de la proteína p53 en respuesta a diversas señales de estrés celular, es su papel como transactivador de un gran número de genes blanco que favorece un arresto celular, dando tiempo a la reparación del daño, o bien promoviendo apoptosis. En este sentido, al evaluar funcionalmente a p53 en las células C33-A, se determinó que el papel que ejerció sobre la construcción p53CAT fue el de activar la transcripción, dado que al favorecer su permanencia en el núcleo (mediante el empleo de la wortmannina y Akt1) la actividad de p53CAT fue notablemente recuperada (la activación del promotor del gen p21 es favorecida), en comparación con la actividad registrada cuando sólo se empleó el NaAsO<sub>2</sub>, en donde se observa que la actividad de la construcción es disminuída (pérdida de la actividad del promotor del gen p21) dado que se encuentra activada la vía PI3K/PKB/Akt y por lo tanto se considera que prodría estar promoviendo el exporte nuclear de p53 ó regulando su afinidad al DNA. Al parecer al exponer a las células C33-A al NaAsO<sub>2</sub>, la actividad del promotor del gen p21 es regulada en función de la activación de la vía PI3K/PKB/Akt, la cual modula la actividad de unión de p53 al DNA. Este comportamiento indicó que

probablemente tendría un efecto sobre los eventos de la proliferación celular. Efectivamente la proliferación se incrementó, se determinó la inducción de la actividad transcripcional de la construcción pXP2-CD1 y la inducción del complejo myc-DNA, procesos que favorecen la proliferación celular. Al parecer, la actividad de p53 es muy compleja, debido a que está modulada por varios factores. En este sentido, uno de los puntos más esenciales a considerar son aquellos factores que regulan a p53 y que finalmente repercute en las diferentes respuestas que se desencadenan ante una exposición a una gran diversidad de agentes.

Los mecanismos que desencadenan respuestas específicas en los diferentes tipos celulares pueden no ser activados o responder distintamente, todo esto en función de la integridad de aquellos genes y sus productos involucrados en estos mecanismos. La presencia de mutaciones ha sido uno de los puntos más discutidos en la literatura, teniendo como consecuencia una serie de alteraciones que conducen a eventos que potencian la tasa de error celular. Al realizar estudios que nos permitan proponer los eventos que repercuten principalmente en los procesos de proliferación celular, seguramente conllevarán a una nueva visión dentro de la naturaleza, mecanística y magnitud de los eventos del cáncer inducido por el NaAsO<sub>2</sub>.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que ante una exposición al NaAsO<sub>2</sub> en dos sistemas epiteliales, cuya diferencia marcada es la integridad de la proteína p53, los eventos moleculares desencadenaron las siguientes respuestas:

- El NaAsO<sub>2</sub> no es citotóxico en los cultivos secundarios de los QHN ni en las células C33-A a las concentraciones utilizadas en este estudio, concentraciones que son similares a aquellas a las que se encuentran expuestas las poblaciones humanas en las zonas endémicas de exposición a este metaloide.
- Los QHN expuestos al NaAsO<sub>2</sub> presentaron daño genotóxico, puesto de manifiesto a través de la presencia de micronúcleos (concentración de 0.5 μM) . Así mismo, se encontró que en respuesta a este daño los niveles de la proteína p53 se incrementaron y su actividad de unión a una secuencia consenso en el DNA se potenció, favoreciendo su activación como factor de transcripción.
- El NaAsO<sub>2</sub> activó a las cinasas PKB/Akt y GSK3β en los cultivos secundarios de los QHN vía PI3K. La activación de PI3K es esencial para potenciar la unión de p53 al DNA.
- El NaAsO<sub>2</sub> indujo la expresión de un marcador temprano de diferenciación celular, la involucrina humana y disminuyó la tasa de proliferación, eventos característicos y necesarios para el inicio de la diferenciación de los QHN.
- En las células C33-A, el NaAsO<sub>2</sub> disminuyó la actividad de unión de p53 mutado al DNA, específicamente durante periodos largos de tratamiento. Este efecto podría deberse a la pérdida de un p53 mutado nuclear.
- La activación de la vía PI3K/PKB/Akt favoreció la unión de p53 mutado al DNA, sin embargo tiempos mayores a 6 hr, p53 mutado perdió afinidad a su secuencia consenso en el DNA. En respuesta a dichos eventos, se incrementó la actividad transcripcional de ciclina D1 y la unión de c-myc al

DNA, comportamientos que favorecieron el incremento en la proliferación celular.

- A tiempos cortos de exposición al  $\text{NaAsO}_2$  en las células C33-A, PKC es una de las cinasas responsable de incrementar el complejo p53-DNA.

## **Bibliografía**

- Abbas T., White D., Hui L., Yoshida K., Foster D. A. and Bargonetti J. (2004) Inhibition of human p53 basal transcription by down-regulation of protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 279, 9970-9977.
- Appella E. and Anderson C. W. (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268, 2764-2772.
- Astolfi E. (1971) [Study of arsenic in drinking water. Endemic regional chronic hydroarsenicism]. *Prensa Med Argent* 58, 1342-1343.
- Avantaggiati M. L., Ogryzko V., Gardner K., Giordano A., Levine A. S. and Kelly K. (1997) Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 89, 1175-1184.
- Azuara-Liceaga E., Sandoval M., Corona M., Gariglio P. and Lopez-Bayghen E. (2004) The human involucrin gene is transcriptionally repressed through a tissue-specific silencer element recognized by Oct-2. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 361-371.
- Bae D. S., Gennings C., Carter W. H., Jr., Yang R. S. and Campain J. A. (2001) Toxicological interactions among arsenic, cadmium, chromium, and lead in human keratinocytes. *Toxicol Sci* 63, 132-142.
- Banin S., Moyal L., Shieh S., Taya Y., Anderson C. W., Chessa L., Smorodinsky N. I., Prives C., Reiss Y., Shiloh Y. and Ziv Y. (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281, 1674-1677.
- Basu S., Totty N. F., Irwin M. S., Sudol M. and Downward J. (2003) Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* 11, 11-23.
- Bates M. N., Smith A. H. and Hopenhayn-Rich C. (1992) Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am J Epidemiol* 135, 462-476.
- Bellacosa A., Testa J. R., Staal S. P. and Tsichlis P. N. (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274-277.
- Bellacosa A., Kumar C. C., Di Cristofano A. and Testa J. R. (2005) Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 94, 29-86.
- Bernard B. A., Robinson S. M., Vandaele S., Mansbridge J. N. and Darmon M. (1985) Abnormal maturation pathway of keratinocytes in psoriatic skin. *Br J Dermatol* 112, 647-653.

- Blaydes J. P., Luciani M. G., Pospisilova S., Ball H. M., Vojtesek B. and Hupp T. R. (2001) Stoichiometric phosphorylation of human p53 at Ser315 stimulates p53-dependent transcription. *J Biol Chem* 276, 4699-4708.
- Blume-Jensen P. and Hunter T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365.
- Braman R. S. and Foreback C. C. (1973) Methylated forms of arsenic in the environment. *Science* 182, 1247-1249.
- Brazil D. P., Yang Z. Z. and Hemmings B. A. (2004) Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 29, 233-242.
- Brennan P., Babbage J. W., Burgering B. M., Groner B., Reif K. and Cantrell D. A. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity* 7, 679-689.
- Buchet J. P. and Lauwerys R. (1988) Role of thiols in the in-vitro methylation of inorganic arsenic by rat liver cytosol. *Biochem Pharmacol* 37, 3149-3153.
- Canman C. E., Lim D. S., Cimprich K. A., Taya Y., Tamai K., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M. B. and Siliciano J. D. (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-1679.
- Carroll J. M., Albers K. M., Garlick J. A., Harrington R. and Taichman L. B. (1993) Tissue- and stratum-specific expression of the human involucrin promoter in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10270-10274.
- Cavigelli M., Li W. W., Lin A., Su B., Yoshioka K. and Karin M. (1996) The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *Embo J* 15, 6269-6279.
- Cebrian M. E., Albores A., Aguilar M. and Blakely E. (1983) Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum Toxicol* 2, 121-133.
- Coffer P. J. and Woodgett J. R. (1991) Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* 201, 475-481.
- Colman M. S., Afshari C. A. and Barrett J. C. (2000) Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res* 462, 179-188.
- Craig A. L., Burch L., Vojtesek B., Mikutowska J., Thompson A. and Hupp T. R. (1999) Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the

- binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers. *Biochem J* 342 ( Pt 1), 133-141.
- Crish J. F., Howard J. M., Zaim T. M., Murthy S. and Eckert R. L. (1993) Tissue-specific and differentiation-appropriate expression of the human involucrin gene in transgenic mice: an abnormal epidermal phenotype. *Differentiation* 53, 191-200.
- Chan T. O., Rittenhouse S. E. and Tschlis P. N. (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 68, 965-1014.
- Chanda, S., U. B. Dasgupta, et al. (2006). "DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy." *Toxicol Sci* **89**(2): 431-7.
- Chehab N. H., Malikzay A., Appel M. and Halazonetis T. D. (2000) Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 14, 278-288.
- Chen C. J., Chuang Y. C., Lin T. M. and Wu H. Y. (1985) Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: high-arsenic artesian well water and cancers. *Cancer Res* 45, 5895-5899.
- Chen W., Martindale J. L., Holbrook N. J. and Liu Y. (1998) Tumor promoter arsenite activates extracellular signal-regulated kinase through a signaling pathway mediated by epidermal growth factor receptor and Shc. *Mol Cell Biol* 18, 5178-5188.
- Cheng J. Q., Altomare D. A., Klein M. A., Lee W. C., Kruh G. D., Lissy N. A. and Testa J. R. (1997) Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis. *Oncogene* 14, 2793-2801.
- Daksis J. I., Lu R. Y., Facchini L. M., Marhin W. W. and Penn L. J. (1994) Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* 9, 3635-3645.
- Dale B. A., Resing K. A. and Lonsdale-Eccles J. D. (1985) Filaggrin: a keratin filament associated protein. *Ann N Y Acad Sci* 455, 330-342.
- Donehower L. A. and Bradley A. (1993) The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1155, 181-205.
- Dong J. T. and Luo X. M. (1993) Arsenic-induced DNA-strand breaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. *Mutat Res* 302, 97-102.

- Dowdy S. F., Hinds P. W., Louie K., Reed S. I., Arnold A. and Weinberg R. A. (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73, 499-511.
- Eckert R. L. (1989) Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* 69, 1316-1346.
- Eckert R. L., Crish J. F., Banks E. B. and Welter J. F. (1997) The epidermis: genes on - genes off. *J Invest Dermatol* 109, 501-509.
- Eckert R. L., Yaffe M. B., Crish J. F., Murthy S., Rorke E. A. and Welter J. F. (1993) Involucrin--structure and role in envelope assembly. *J Invest Dermatol* 100, 613-617.
- el-Deiry W. S. (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8, 345-357.
- el-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Fenech M., Chang W. P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S. and Zeiger E. (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 534, 65-75.
- Ferbeyre G., de Stanchina E., Querido E., Baptiste N., Prives C. and Lowe S. W. (2000) PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14, 2015-2027.
- Germolec D. R., Spalding J., Yu H. S., Chen G. S., Simeonova P. P., Humble M. C., Bruccoleri A., Boorman G. A., Foley J. F., Yoshida T. and Luster M. I. (1998) Arsenic enhancement of skin neoplasia by chronic stimulation of growth factors. *Am J Pathol* 153, 1775-1785.
- Germolec D. R., Spalding J., Boorman G. A., Wilmer J. L., Yoshida T., Simeonova P. P., Bruccoleri A., Kayama F., Gaido K., Tennant R., Burleson F., Dong W., Lang R. W. and Luster M. I. (1997) Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors. *Mutat Res* 386, 209-218.
- Gille H. and Downward J. (1999) Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 274, 22033-22040.
- Gniadecki R. (1998) Regulation of keratinocyte proliferation. *Gen Pharmacol* 30, 619-622.
- Gohler T., Reimann M., Cherny D., Walter K., Warnecke G., Kim E. and Deppert W. (2002) Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain. *J Biol Chem* 277, 41192-41203.



- Gonsebatt M. E., Vega L., Herrera L. A., Montero R., Rojas E., Cebrian M. E. and Ostrosky-Wegman P. (1992) Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutat Res* 283, 91-95.
- Gottlieb T. M., Leal J. F., Seger R., Taya Y. and Oren M. (2002) Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21, 1299-1303.
- Goytia-Acevedo R. C., Cebrian M. E. and Calderon-Aranda E. S. (2003) Differential effects of arsenic on intracellular free calcium levels and the proliferative response of murine mitogen-stimulated lymphocytes. *Toxicology* 189, 235-244.
- Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M. and Harris C. C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54, 4855-4878.
- Hamadeh H. K., Vargas M., Lee E. and Menzel D. B. (1999) Arsenic disrupts cellular levels of p53 and mdm2: a potential mechanism of carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 446-449.
- Hamadeh H. K., Trouba K. J., Amin R. P., Afshari C. A. and Germolec D. (2002) Coordination of altered DNA repair and damage pathways in arsenite-exposed keratinocytes. *Toxicol Sci* 69, 306-316.
- Harris S. L. and Levine A. J. (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24, 2899-2908.
- Hennings H., Michael D., Cheng C., Steinert P., Holbrook K. and Yuspa S. H. (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19, 245-254.
- Herber B., Truss M., Beato M. and Muller R. (1994) Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* 9, 2105-2107.
- Hernández G. L. (2005) Clonación de las secuencias de reconocimiento para los factores de transcripción p53, YY-1, C/EBP y E2-F en un vector reportero, in *Genética y Biología Molecular*, p 53. Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados, CINVESTAV, México.
- Hoh J., Jin S., Parrado T., Edington J., Levine A. J. and Ott J. (2002) The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8467-8472.
- Huang C., Ma W. Y., Li J. and Dong Z. (1999) Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH2-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Res* 59, 3053-3058.
- Hughes M. F. (2002) Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 133, 1-16.
- IARC (1987).

- Ito A., Lai C. H., Zhao X., Saito S., Hamilton M. H., Appella E. and Yao T. P. (2001) p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *Embo J* 20, 1331-1340.
- Juan L. J., Shia W. J., Chen M. H., Yang W. M., Seto E., Lin Y. S. and Wu C. W. (2000) Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem* 275, 20436-20443.
- Kachinskas D. J., Qin Q., Phillips M. A. and Rice R. H. (1997) Arsenate suppression of human keratinocyte programming. *Mutat Res* 386, 253-261.
- Kandel E. S., Skeen J., Majewski N., Di Cristofano A., Pandolfi P. P., Feliciano C. S., Gartel A. and Hay N. (2002) Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 22, 7831-7841.
- Kapoor M. and Lozano G. (1998) Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2834-2837.
- Ko L. J. and Prives C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10, 1054-1072.
- Koutsodontis G., Vasilaki E., Chou W. C., Papakosta P. and Kardassis D. (2005) Physical and functional interactions between members of the tumour suppressor p53 and the Sp families of transcription factors: importance for the regulation of genes involved in cell-cycle arrest and apoptosis. *Biochem J* 389, 443-455.
- Lane D. P. and Benchimol S. (1990) p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 4, 1-8.
- Lee C. H., Yu C. L., Liao W. T., Kao Y. H., Chai C. Y., Chen G. S. and Yu H. S. (2004) Effects and interactions of low doses of arsenic and UVB on keratinocyte apoptosis. *Chem Res Toxicol* 17, 1199-1205.
- Lee T. C., Huang R. Y. and Jan K. Y. (1985) Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity, and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 148, 83-89.
- Levine A. J., Momand J. and Finlay C. A. (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.
- Li J. H. and Rossman T. G. (1989) Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol Toxicol* 2, 1-9.
- Lill N. L., Grossman S. R., Ginsberg D., DeCaprio J. and Livingston D. M. (1997) Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* 387, 823-827.

- Liu L., Scolnick D. M., Trievel R. C., Zhang H. B., Marmorstein R., Halazonetis T. D. and Berger S. L. (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202-1209.
- Lopez-Bayghen E., Vega A., Cadena A., Granados S. E., Jave L. F., Gariglio P. and Alvarez-Salas L. M. (1996) Transcriptional analysis of the 5'-noncoding region of the human involucrin gene. *J Biol Chem* 271, 512-520.
- Luo J., Su F., Chen D., Shiloh A. and Gu W. (2000) Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 408, 377-381.
- Lynn S., Lai H. T., Gurr J. R. and Jan K. Y. (1997) Arsenite retards DNA break rejoining by inhibiting DNA ligation. *Mutagenesis* 12, 353-358.
- Marsit, C. J., M. R. Karagas, et al. (2006). "Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer." *Carcinogenesis* 27(1): 112-6.
- Mass M. J. and Wang L. (1997) Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res* 386, 263-277.
- Mayo L. D. and Donner D. B. (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11598-11603.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Muise-Helmericks R. C., Grimes H. L., Bellacosa A., Malstrom S. E., Tsihchlis P. N. and Rosen N. (1998) Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 273, 29864-29872.
- Murre C., Voronova A. and Baltimore D. (1991) B-cell- and myocyte-specific E2-box-binding factors contain E12/E47-like subunits. *Mol Cell Biol* 11, 1156-1160.
- Nicholson K. M. and Anderson N. G. (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14, 381-395.
- Ortega A., Eshhar N. and Teichberg V. I. (1991) Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience* 41, 335-349.
- Ostrosky-Wegman P., Gonsebatt M. E., Montero R., Vega L., Barba H., Espinosa J., Palao A., Cortinas C., Garcia-Vargas G., del Razo L. M. and et al. (1991) Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic

findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat Res* 250, 477-482.

Pavelic K., Hrascan R., Kapitanovic S., Vranes Z., Cabrijan T., Spaventi S., Korsic M., Krizanac S., Li Y. Q., Stambrook P., Gluckman J. L. and Pavelic Z. P. (1996) Molecular genetics of malignant insulinoma. *Anticancer Res* 16, 1707-1717.

Pei X. H., Nakanishi Y., Takayama K., Yatsunami J., Bai F., Kawasaki M., Wakamatsu K., Tsuruta N., Mizuno K. and Hara N. (1996) Granulocyte-colony stimulating factor promotes invasion by human lung cancer cell lines in vitro. *Clin Exp Metastasis* 14, 351-357.

Petrick J. S., Ayala-Fierro F., Cullen W. R., Carter D. E. and Vasken Aposhian H. (2000) Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 163, 203-207.

Poole, A. W., G. Pula, et al. (2004). "PKC-interacting proteins: from function to pharmacology." *Trends Pharmacol Sci* 25(10): 528-35.

Rossmann T. G., Uddin A. N. and Burns F. J. (2004) Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 198, 394-404.

Sakaguchi K., Herrera J. E., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassilev A., Anderson C. W. and Appella E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831-2841.

Salazar A. M. (1994) *fhbsohf<ndsf*, in *UNAM*. UNAM, México.

Salazar A. M., Ostrosky-Wegman P., Menendez D., Miranda E., Garcia-Carranca A. and Rojas E. (1997) Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutat Res* 381, 259-265.

Scheffner M., Munger K., Byrne J. C. and Howley P. M. (1991) The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5523-5527.

Schreiber E., Matthias P., Muller M. M. and Schaffner W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17, 6419.

Sherr C. J. (2000) Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect* 96, 73-92.

Shieh S. Y., Ahn J., Tamai K., Taya Y. and Prives C. (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14, 289-300.

- Smith M. L., Chen I. T., Zhan Q., O'Connor P. M. and Fornace A. J., Jr. (1995) Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* 10, 1053-1059.
- Sordo M., Herrera L. A., Ostrosky-Wegman P. and Rojas E. (2001) Cytotoxic and genotoxic effects of As, MMA, and DMA on leukocytes and stimulated human lymphocytes. *Teratog Carcinog Mutagen* 21, 249-260.
- Souza K., Maddock D. A., Zhang Q., Chen J., Chiu C., Mehta S. and Wan Y. (2001) Arsenite activation of P13K/AKT cell survival pathway is mediated by p38 in cultured human keratinocytes. *Mol Med* 7, 767-772.
- Steinert P. M. and Marekov L. N. (1997) Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J Biol Chem* 272, 2021-2030.
- Styblo M., Del Razo L. M., LeCluyse E. L., Hamilton G. A., Wang C., Cullen W. R. and Thomas D. J. (1999) Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 12, 560-565.
- Takuwa N., Fukui Y. and Takuwa Y. (1999) Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19, 1346-1358.
- Thierry F., Spyrou G., Yaniv M. and Howley P. (1992) Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol* 66, 3740-3748.
- Thompson D. J. (1993) A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem Biol Interact* 88, 89-14.
- Trouba K. J., Glanzer J. G. and Vorce R. L. (1999) Wild-type and Ras-transformed fibroblasts display differential mitogenic responses to transient sodium arsenite exposure. *Toxicol Sci* 50, 72-81.
- Tseng W. P., Chu H. M., How S. W., Fong J. M., Lin C. S. and Yeh S. (1968) Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 40, 453-463.
- Vega L., Gonsebatt M. E. and Ostrosky-Wegman P. (1995) Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutat Res* 334, 365-373.
- Vega L., Styblo M., Patterson R., Cullen W., Wang C. and Germolec D. (2001) Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 172, 225-232.

- Verma A. K., Wheeler D. L., Aziz M. H. and Manoharan H. (2006) Protein kinase Cepsilon and development of squamous cell carcinoma, the nonmelanoma human skin cancer. *Mol Carcinog* 45, 381-388.
- Webley K., Bond J. A., Jones C. J., Blaydes J. P., Craig A., Hupp T. and Wynford-Thomas D. (2000) Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 20, 2803-2808.
- Welter J. F., Crish J. F., Agarwal C. and Eckert R. L. (1995) Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity. *J Biol Chem* 270, 12614-12622.
- WHO (1993).
- Yamanaka K., Hayashi H., Kato K., Hasegawa A. and Okada S. (1995) Involvement of preferential formation of apurinic/apyrimidinic sites in dimethylarsenic-induced DNA strand breaks and DNA-protein crosslinks in cultured alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 207, 244-249.
- Yeh S. (1973) Skin cancer in chronic arsenicism. *Hum Pathol* 4, 469-485.
- Youmell M., Park S. J., Basu S. and Price B. D. (1998) Regulation of the p53 protein by protein kinase C alpha and protein kinase C zeta. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 514-518.
- Younus J. and Gilchrest B. A. (1992) Modulation of mRNA levels during human keratinocyte differentiation. *J Cell Physiol* 152, 232-239.
- Zhao R., Gish K., Murphy M., Yin Y., Notterman D., Hoffman W. H., Tom E., Mack D. H. and Levine A. J. (2000) Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14, 981-993.
- Zhou B. P., Liao Y., Xia W., Zou Y., Spohn B. and Hung M. C. (2001) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3, 973-982.

# ***Anexos***

ANEXO 1

Sandoval, M., Morales, M., Tapia, R., del Carmen Alarcon, L., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P., et al., 2007. p53 response to arsenic exposure in epithelial cells: protein kinase B/Akt involvement. *Toxicol Sci.* 99, 126-140.



## p53 Response to Arsenic Exposure in Epithelial Cells: Protein Kinase B/Akt Involvement

Marisol Sandoval,\* Moisés Morales,\* Rocío Tapia,† Luz del Carmen Alarcón,‡ Montserrat Sordo,§  
Patricia Ostrosky-Wegman,§ Arturo Ortega,\* and Esther López-Bayghen\*<sup>1</sup>

\*Departamento de Genética y Biología Molecular, †Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México D.F., México; ‡Laboratorio de Citopatología, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México; and §Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México D.F., México

Received February 9, 2007; accepted June 6, 2007

Inorganic arsenic is a major environmental contaminant associated with an increased risk of human skin cancer. Arsenic modulates cellular signaling pathways that affect diverse processes such as cell proliferation, differentiation, and apoptosis, including genotoxic damage. The p53 protein plays a central role in mediating stress and DNA damage responses, leading to either growth arrest or apoptosis. Several signal transduction pathways activated under a plethora of stressing conditions increase p53 protein levels. To further understand the molecular mechanisms involved in the arsenic mode of action, we explored the effects of this metalloid on the activation of the phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)/Ca<sup>2+</sup>/diacylglycerol dependent protein kinase/protein kinase B (PKB) signaling cascade and its repercussion in p53 activation in two epithelial cell types: primary normal human keratinocytes cultures (NHK) and the carcinoma-derived C33-A cell line. Although in both cell systems arsenic leads to an increase in p53 and its binding to DNA, the final outcome is different. In NHK, arsenic triggers a sustained activation of the PI3K/PKB/glycogen synthase kinase-3 beta pathway, driving the cell into a cell-differentiated stage in which the proliferation signals are turned down. In sharp contrast, in C33-A cells, arsenic leads to a transient increase in p53 followed by a drastic reduction in its nuclear levels and an increase in cell proliferation. These findings favor the notion that p53-stage and transcriptional abilities are important to understand modifications in the proliferation–differentiation balance, an equilibrium that is severely impaired by arsenic.

**Key Words:** arsenic; p53 protein; protein kinase B; Akt; human keratinocytes.

Arsenic is a ubiquitous element that has represented a human health concern for centuries. The contamination of water supplies with this metalloid has resulted in a very high incidence of skin lesions and cancer. Human exposure to inorganic arsenic at elevated levels is widespread in several

populous regions of the world as demonstrated in a large amount of epidemiologic studies (Chen *et al.*, 1985; Chiou *et al.*, 1995, 2001; Lokuge *et al.*, 2004; Nordstrom, 2002; Sun, 2004). Benign skin lesions related to chronic arsenic exposure act as early warning signals, including hyperpigmentation and hyperkeratosis (reviewed in Tchounwou *et al.*, 2004; Tondel *et al.*, 1999). The molecular mechanisms underlying arsenic carcinogenicity have been explored, noticing that exposure-associated effects are genotoxicity, cell proliferation changes, and altered DNA repair (Dong, 2002). Recently, new animal models of transplacental carcinogenesis and cocarcinogenesis are adding new molecular insights about the specific gene alterations associated with carcinoma development (Liu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006b). Also *in vitro* transformation studies demonstrate the importance of altered DNA methylation (Xie *et al.*, 2007). Mode-of-action studies suggest that arsenic might be acting as a cocarcinogen, a promoter or a progressor of carcinogenesis.

The skin epithelium provides a barrier between the internal and external regions of the body. It is constantly subjected to physical and chemical stress, and consequently has high renewal rates. The epidermis consists of a stratified squamous epithelium composed mainly of keratinocytes at variable differentiation stages (Fuchs, 1990a; Zinkel and Fuchs, 1994). In consequence, there is a highly regulated balance between epithelial cell growth and cell differentiation. A number of laboratories have described responses of cultured keratinocytes to inorganic arsenic treatment, including increased growth factors production, (Germolec *et al.*, 1996), changes in differentiation (Jessen *et al.*, 2001), and global (Germolec *et al.*, 1996), effects assessed by DNA microarray (Hamadeh *et al.*, 2002; Rea *et al.*, 2003).

In epithelia, damage to DNA results in increased levels of the tumor suppressor p53 (Colman *et al.*, 2000). This protein mediates genotoxic stress responses and has been regarded as a key element in maintaining genomic stability (Appella and Anderson, 2001). At the cellular level, p53 is a central regulator of stress reacting pathways, becoming active in response to

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed at Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN, Apartado Postal 14-740 México DF 07000, México. Fax: +52-55-5061-3800 ext. 5380. E-mail: ebayghen@cinvestav.mx.

abnormal proliferation, hypoxia, DNA damage, nucleotide depletion, and disruption of the mitotic spindle. Increased levels of active p53 can have many consequences including cell cycle arrest, apoptosis, senescence, and differentiation that depend on numerous cell intrinsic and extrinsic factors. Upon several cellular stress stimulus, p53 can induce reversible cell cycle arrest and participate in damage repair mechanisms (reviewed in Hofseth *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2007).

The p53 protein is a transcriptional activator with a trans-activation domain at its NH<sub>2</sub> terminus, a regulatory region and tetramerization domain located at the COOH terminus and a central sequence-specific DNA binding domain (reviewed in Kaustov *et al.*, 2006). Ser15 phosphorylation through the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) is critical for p53 interaction with the transcriptional machinery (Woo *et al.*, 1998). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Ca<sup>2+</sup>/diacylglycerol dependent protein kinase (PKC), and protein kinase B (PKB/Akt) have also been implicated in p53 activation in response to different stressors and damage inducers Abbas *et al.*, (2004), Lee *et al.*, (2006), Magnelli *et al.*, (1998), Nakamura *et al.*, (2000). Phosphorylated p53 accumulates in the nucleus and trans-activates a number of key genes that participate in DNA repair and cell proliferation (Appella and Anderson, 2001).

Our current knowledge of p53 response after arsenic exposure is variable. Depending on the cell type, previous p53 stage, and timing, responses are different (Hamadeh *et al.*, 1999, 2002; Hernandez-Zavala *et al.*, 2005; Salazar *et al.*, 1997). Particularly, the role of p53 as gene activator under these circumstances has been barely explored. Following activation by posttranslational modifications such as phosphorylation and acetylation, p53 protects the cell from further stress by activating the transcription of genes involved in cell cycle checkpoints, DNA repair, cellular senescence, and apoptosis. Serine 392 phosphorylation at in COOH terminal site of p53 activates the protein for sequence-specific DNA binding. Furthermore, there is an interdependence between phosphorylation and dose-dependent responses of p53 (Latonen *et al.*, 2001). An apparent tissue-specific p53 phosphorylation response takes place, since the same type and level of damage induce a differential p53 phosphorylation pattern in different cell lineages. Another important posttranslational modification of p53 is acetylation on lysine residues (Liu *et al.*, 1999). This modification activates transcription and stabilizes p53 by preventing murine double minute-2 (Mdm-2)-mediated degradation (Li *et al.*, 2002).

In this contribution, we characterized the DNA binding activity of p53 when epithelial cells were exposed to sodium arsenite in varying times and doses. We found marked differences in p53-DNA binding depending on the dose, epithelial cell type, and stage of p53 expression. Upon arsenite, NHK display a long-term stabilization of nuclear p53, induced and maintained by PI3K, PKC, and PKB/Akt, which renders the cell into growth arrest and expression of differentiation markers such as involucrin. On the other hand, differential kinetics in kinases activation seems to be involved in p53 responses to arsenite in the

C33-A cell system, where a mutant p53, is rapidly translocated from nuclei in order to inactivate its function in growth arrest, resulting in an increase in cell proliferation.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** BAPTA (1,2-bis(2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) was obtained from Tocris-Cookson (St Louis, MO). Calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>), 2-[1-(3-dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimide (Bis I) and 12-tetradecanoyl-13-acetate (TPA) were purchased from Sigma (St Louis, MO). LiCl and wortmannin were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA) and all other chemicals from Merck (Whitehouse Station, NJ).

**Cell culture.** Keratinocyte primary cultures were obtained from neonatal human foreskin as described previously (Pirisi *et al.*, 1987) and grown in Keratinocyte Serum Free Media medium (Invitrogen, Gaithersburg, MD) containing the appropriate antibiotic mix at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Culture media was replaced every 2 days. The C33-A cell line (Human Papillomavirus negative cervical carcinoma-derived cell line) was routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 medium, 50:50 (DMEM/F-12, Invitrogen) and HeLa cells growth in DMEM at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. In both cases, media were supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. Primary cultures from cerebellar Bergmann glia were obtained as reported before (Ortega *et al.*, 1991).

**Arsenic treatment.** An aqueous sterile stock solution of sodium arsenite (10 mg/ml) was prepared and diluted to obtain the desired final concentrations. Cell cultures were grown to approximately 80–85% confluence and treated with sodium arsenite for the indicated time periods.

**Cytotoxicity assessment.** Cell viability was measured 24 and 48 h after treatment by the MTT reduction assay (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich Co.) performed as described by Mosmann (1983). Cells were seeded on 12-well plates in 500 µl of culture media. These cultures were incubated for 24 h with sodium arsenite at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After that, the cells were treated with the MTT reagent (5 mg/ml) for approximately 4 h. Isopropanol:HCl solution was added to lyse the cells and solubilize the colored crystals. The optical density of the samples was determined at 630 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader Osys MR (Dynex Technologies, Frankfurt, Germany).

**Cell proliferation rates determination.** For cell proliferation rates, cells were seeded on a 12- (NHK) or a 24-well (C33-A) plate in 500-µl culture media with or without sodium arsenite (1.5 µM), incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, and analyzed in quadruplicates at 12- to 24-h intervals for 4 days. Two hundred microliters of MTT labeling mixture was added to each well 4 h before each spectrometric measurement.

**Cytokinesis-block method and nuclear index determination.** Keratinocytes cultures were treated with different sodium arsenite concentrations and incubated with 2 mg/ml cytochalasin B for an additional period of 48 h. After that, the cultures were trypsinized and suspended gently in complete medium. The cells were fixed in methanol:acetic acid solution and centrifuged for 10 min at 50g. Keratinocytes were deposited in slices, air-dried, and stained with eosin and methylene blue. The frequency of cytoplasmic micronuclei was scored under an optic microscope at a magnification of ×100. One thousand binucleated cells were examined for micronuclei presence (per treatment). For cell proliferation, 500 cells were examined and a calculation was done in order to obtain the nuclear index (Fenech *et al.*, 2003a,b).

**Protein electrophoresis and immunoblotting.** Cells were harvested after arsenic treatment (time and concentrations are indicated in each figure legend) and incubated on ice for 40 min in lysis buffer (50mM Tris HCl; 1mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]; 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 5 µg/ml aprotinin and leupeptin; 10mM NaF; 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; and 1mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>). The lysates were centrifuged for 10 min at 10,000 g and

supernatant fractions were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  or used immediately. Standardized amounts of total protein extracts (30–50  $\mu\text{g}$ ) were analyzed in sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA). Blots were stained with Ponceau S to confirm equal protein loading in all lanes. Membranes were soaked in phosphate-buffered saline (PBS) to remove Ponceau S and incubated in PBS containing 5% dried skimmed milk and 0.1% Tween-20 for at least 1 h at room temperature, to block the excess of nonspecific protein-binding sites. After blocking, the membranes were incubated with specific antibodies. The following primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA): p53 (sc-126), cyclin D1 (sc-717), involucrin (sc-21748), p-Akt1 (sc-7985), p-glycogen synthase kinase-3 beta (sc-11757), and  $\beta$ -actin (sc-32251). Horseradish peroxidase–conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) were used as secondary antibodies, followed by a chemiluminescence detection system ECL + PLUS (Amersham).

**Electrophoretic mobility shift assays.** Nuclear extracts were prepared as described previously (Lopez-Bayghen *et al.*, 1996). All buffers contained a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) to prevent proteolysis. Protein concentration was measured by a Bio-Rad protein assay system. Nuclear extracts (20–30  $\mu\text{g}$ ) from keratinocytes and 15  $\mu\text{g}$  for C33-A were incubated on ice with 1  $\mu\text{g}$  poly [dI–dC] as nonspecific competitor (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and 1 ng of  $^{32}\text{P}$ -labeled double stranded oligonucleotides (for 10 min):

---

p53	5'-CTAGTACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGGACT-3' (Gohler <i>et al.</i> , 2002)
Sp1	5'-CTAGATTTCGATCGGGGCGGGCGGA-3'
AP-1 (SV40)	5'-CTAGRATAATATGACTAAGCTGTG-3'
Myc	5'-CTAGGGAAGCAGACCACGTGGTCTGCTCC-3' (Murre <i>et al.</i> , 1991)

---

The reaction mixtures were electrophoresed in a low ionic strength  $0.5\times$  TBE buffer in 7% polyacrylamide gels. The gel was dried and exposed to an X-ray film (89mM Tris, 89mM boric acid, 2mM EDTA). For competitive studies, the reaction mixtures were preincubated with different amounts of indicated unlabeled competitor oligonucleotides, before adding labeled DNA. For gel super-shift experiments, reactions with the DNA–protein complexes were incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  with anti-p53 (sc-126) and anti-sox10 (sc-17342) both from Santa Cruz Biotechnology for 4 h prior to electrophoresis.

**Plasmids.** The plasmid p53CAT contains the p53 consensus sequence from p21 promoter region (Gohler *et al.*, 2002), under control of the SV40 promoter and chloramphenicol acetyltransferase (CAT) as reporter gene. Vector pXP2-CD1 contains luciferase reporter gene under the control of the human cyclin D1 promoter (Herber *et al.*, 1994) kindly donated by Dr Françoise Thierry (Institute Pasteur, Paris).

**Transient transfections and reporter assays.** Transient transfections were performed in the C33-A cell line. Cells were grown in 60-mm tissue culture dishes and transfected at 60% of confluence (6  $\mu\text{g}$  of reporter plasmid/dish) by standard calcium mediated method. Protein lysates for CAT assays were obtained as follows: cells were harvested in TEN buffer (40mM Tris–HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, and 15mM NaCl), lysed with three freeze–thaw cycles in 25mM Tris–HCl, pH 8.0, and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 3 min. Standardized amounts of protein lysates were incubated with 0.25  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ] chloramphenicol (50 mCi/mmol, Amersham Life Science) and 0.8mM acetyl-Co-A at  $37^{\circ}\text{C}$ . Acetylated forms were separated by thin-layer chromatography and quantified using a radioactive image analyzer Typhoon Optical Scanner (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Buckinghamshire). CAT activities were expressed as relative activities to the untreated control. For luciferase assays, cells were harvested 24-h posttransfection and processed with the Luciferase assay system (Promega). Briefly, protein lysates were obtained in cold PBS by two freeze–thawing cycles and resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of reporter

lysis buffer. Equal amounts of protein lysates ( $\sim 70 \mu\text{g}$ ) were incubated with luciferase assay reagent. Light detection was performed in a FluoroSkan Ascent FL 374 (Labsystems, Finland).

**Immunohistochemistry.** Cell culture staining with anti-p53 monoclonal and anti-Hi antibodies was performed using NHK grown on ethanol-washed glass coverslips ( $22 \times 22 \text{ mm}$ ) in the same culture conditions as described above. Cells were fixed by exposure for 10 min to methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$ , washed twice with PBS, and were immunostained using the biotin–streptavidin–peroxidase DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (ImmunoDetector horse radish peroxidase/DAB, BIO SB, Inc, Santa Barbara, CA). Control immunolabeling was performed with the same staining procedure but using the visualizing reagents in the absence of the primary antibodies. Slides were treated with 0.3% hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) for 15 min to block endogenous peroxidase. Sections were pressure cooked for 30 min in 10mM citrate buffer, pH 6.0 (ImmunoDNA retriever with citrate, BIO SB, Inc., Santa Barbara, CA) to unmask epitopes. Sections were incubated with primary antibody (1:100 dilution of monoclonal mouse anti-involucrin and 1:100 dilution of monoclonal mouse anti-human p53 (clone DO7, cat # M7001, Dako Cytomation) for 40 min at room temperature and rinsed in Tris-buffered saline (Immuno/DNA Washer, BIO SB, Inc., Santa Barbara, CA). The sections were incubated with biotin-labeled secondary antibody and streptavidin–biotin–peroxidase for 20 min each. DAB (0.05%) was used as the substrate, and positive signal was detected as a brown color under a light microscope. Cells were weakly counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and mounted in Entellan mounting medium (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The slides were examined under bright field Zeiss Axioscope 40 microscope and the Axiovision software (Carl Zeiss, Inc. Thornwood, NY) at  $\times 400$  magnification.

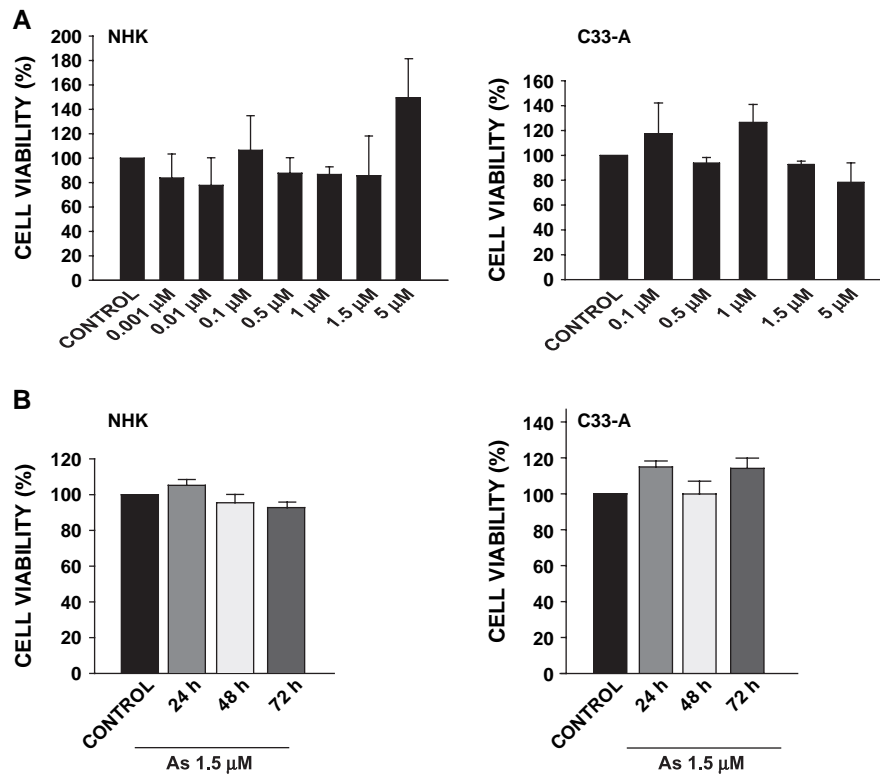
## RESULTS

### Arsenic Cytotoxicity

Initial experiments were designed to evaluate the effect of sodium arsenite over cell viability of NHK and C33-A cells. Dose–response curves were performed in these cell systems, measuring cell viability by the MTT method. As depicted in panel A of Figure 1, exposure to increasing concentrations of sodium arsenite for 24 h does not induce change in the cell viability and not lead to cell death as compared to untreated control in either of the cultures. In order to prove that  $1.5 \mu\text{M}$  is not a toxic dose, we also performed cytotoxicity assays after 24 h incubation with sodium arsenite followed by another 24, 48, or even 72 h of incubation in fresh culture media, results are presented in Figure 1B. No significative changes in cell viability were present under these conditions.

### Effects of Sodium Arsenite on p53 Activation

One of the most recognized indicators of DNA damage is p53 activation. The genotoxicity recorded in arsenic-treated keratinocytes may indicate that surveillance by p53 might be activated. NHK cells were exposed to increasing concentrations of sodium arsenite for 24 h, and p53 protein levels were determined via Western blot. The results, depicted in Figure 2, panel A, show that exposure of NHK to sodium arsenite leads to a dose-dependent increase in p53 levels, reinforcing the idea that arsenic induces p53 in our system. Taking into consideration that p53 is capable of inducing the expression

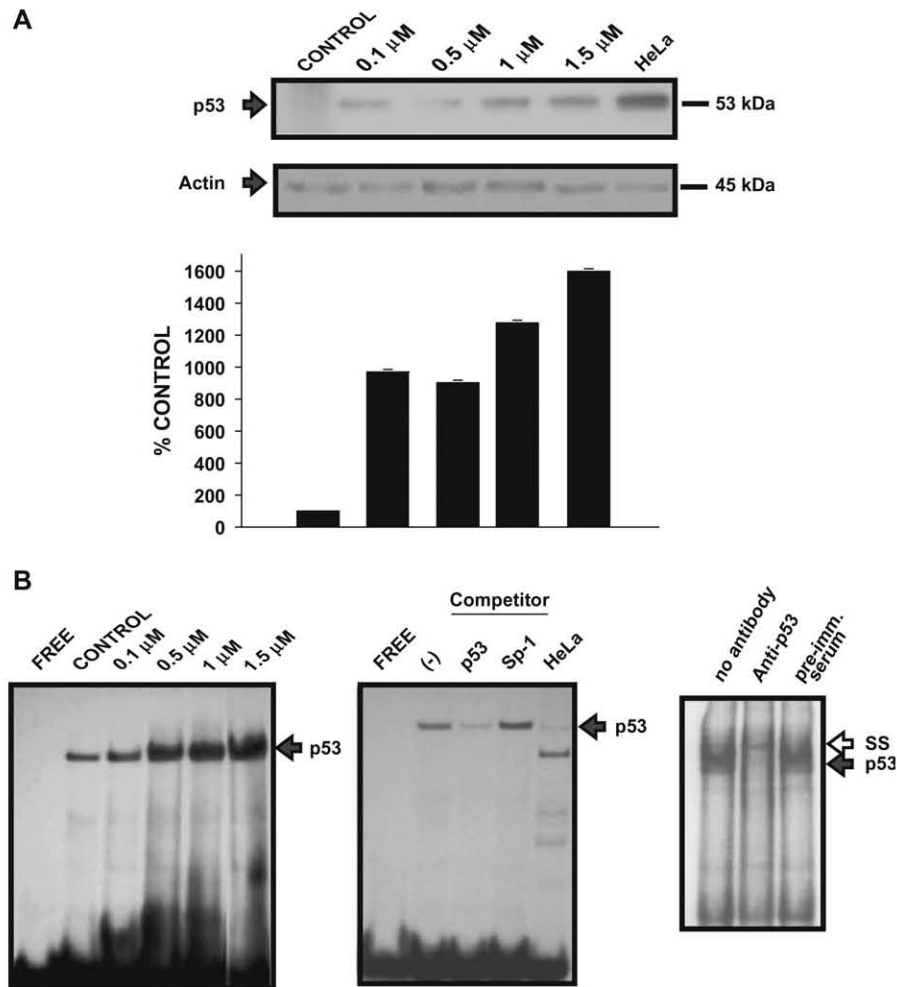


**FIG. 1.** Cell viability in human epithelial cells under sodium arsenite treatment. (A) NHK and C33-A cells were treated with increasing concentrations of sodium arsenite (as indicated) during 24 h. (B) Both cell types were treated with 1.5 μM of sodium arsenite for 24 h, then media was replaced and cell viability determined after the indicated additional recovery time (24–72 h). Cell viability was evaluated by the MTT method and expressed as % of untreated control. Mean values ± SE are plotted.

of genes containing one or more copies of a p53 DNA-binding element we decided to perform protein-DNA binding assays using a p53 consensus oligonucleotide as a labeled probe and nuclear extracts obtained from NHK treated with sodium arsenite (0.1–1.5 μM). As detected for the p53 protein levels, a specific dose-dependent increase in p53 DNA-binding activity was found (Fig. 2, panel B). Specificity of the p53-DNA interaction was demonstrated by competition assays using the unlabeled p53 oligonucleotide (100-fold molar excess) and the unrelated SP-1 oligonucleotide (100-fold molar excesses). As expected, the unlabeled p53 oligonucleotide efficiently abolishes the formation of p53 complex, while the SP-1 oligonucleotide did not modify the complex. To further demonstrate that p53 is the specific protein that interacts within this region, we performed the immuno-electrophoretic mobility shift assays (immunoEMSA) shown in the right panel of Figure 2B. Addition of anti-p53 antibodies causes a super-shifted complex (SS) that matches with the disappearance of p53 typical complex. In contrast, the preimmune serum did not exert any additional shifting. Taken together these data demonstrate that arsenic exposure of NHK increases nuclear p53 protein, which is capable to interact with its DNA binding element.

Since NHK are nontransformed cells, we wondered if the p53 response was reproduced in a cell line with a mutated form

of p53. The point mutations present in the p53 version of C33-A cells result in an amino acid change of Arg-<sup>\*</sup>Cys in codon 273, change that is not involved in the protein-DNA interactions (Scheffner *et al.*, 1991). As shown in panel A of Figure 3, in C33-A cells exposed 24 h to 1.5 μM sodium arsenite, p53-DNA binding is detected albeit to a lower extent than in NHK cells. Specificity of this complex was demonstrated by competition experiments and immunoEMSA. When a dose-response effect was sought, exposing cell for 24 h, a decrease in p53-DNA binding was found (Fig. 3, panel B). This result prompted us to examine in detail the effect of a shorter arsenic exposure (30 min). A dose-dependent increase in p53 DNA-binding activity was found (panel B, Fig. 3). A quantitative analysis is shown in panel C, where we compare the DNA-binding behavior of p53. As a control of nuclear extracts quality, we tested AP-1 (c-jun/c-fos) transcription factor binding to its cognate sequence, using the same nuclear extracts tested with p53. Note that arsenic effect over the AP-1 DNA-binding activity is different from that of p53. The robust AP-1 complex detected after 24-h exposure to sodium arsenite indicates that the decrease in p53-DNA binding is not the result of protein degradation (Fig. 3, panel D). Arsenic increased significantly the AP-1 DNA-binding activity independently of the exposure time, suggesting a mechanism that regulates the



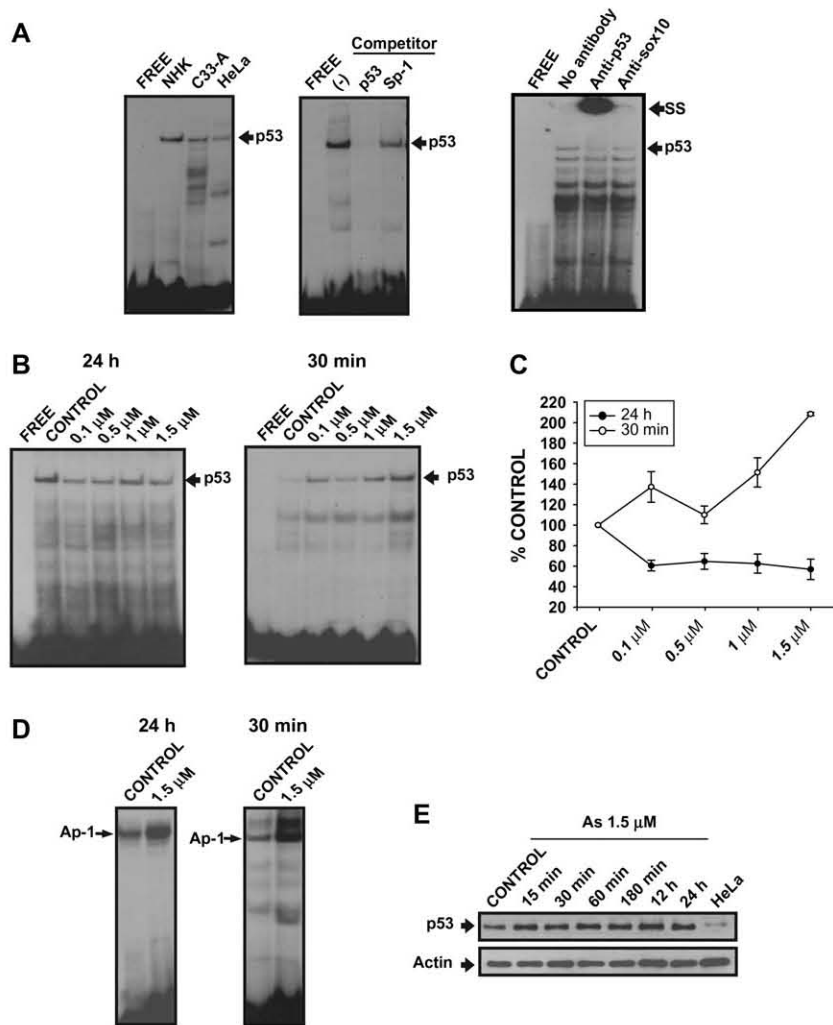
**FIG. 2.** Induction of p53 by sodium arsenite. (A) NHK cultures were exposed to sodium arsenite for 24 h and the effects on p53 protein levels were analyzed by Western blotting using anti-p53 antibody (sc-126) and comparing with  $\beta$ -actin (antibody sc-32251) levels for normalizing purposes. HeLa whole cell extracts were used as a positive control. Values plotted in graph were obtained by densitometry and represent the mean of two independent experiments  $\pm$  SE. (B) DNA binding of p53 transcription factor is increased in human keratinocytes (left panel), when same treatment indicated in A was applied to NHK cultures. Cells were harvested 24-h posttreatment and processed to obtain nuclear extracts. Normalized protein amounts from NHK cells treated or not were incubated with  $^{32}$ P-labeled p53 *bona fide* DNA-binding sequence to define the p53 complex (arrow). In the center panel, competitive EMSAs were performed in the presence of 100-fold excess of indicated nonlabeled competitors. Right panel, gel super-shift assays in the absence or presence of 1  $\mu$ g of anti-p53 (sc-126) antibody or preimmune serum. (-): no competitor added.

decrease in p53 DNA-binding activity. Additionally, whole cell extracts were analyzed by immunoblotting. Interestingly, when C33-A cells were exposed to sodium arsenite for different time periods using a fixed concentration (1.5  $\mu$ M), p53 protein levels augmented as early as 15 min, increase that was maintained for up to 24 h (Fig. 3, panel E).

#### Role of Calcium Influx and PKC in p53 Activation by Sodium Arsenite

Under arsenite exposure, keratinocytes showed an increase in p53 levels which may be associated with cell cycle arrest, but also with changes in gene expression and signaling pathways activation.  $\text{Ca}^{2+}$  is an important factor in the

regulation of the differentiation process in keratinocytes. It is a requirement for stratification, assembly of desmosomes, and activation of epidermal transglutaminase (Eckert *et al.*, 1997). In this sense, other studies have shown that arsenic increases the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in lymphocytes. With this in mind, we evaluated if changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels regulate the p53-DNA complex formation in response to arsenic. We first evaluated the effect of the exposure of NHK cells to increasing  $\text{CaCl}_2$  concentrations for 24 h. As expected, an increase in the p53-DNA complex was found (Fig. 4A). When cells were pre-exposed to a 50  $\mu$ M concentration of the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA previous to sodium arsenite, the p53-DNA complex was less evident (Fig. 4B). These results point out that  $\text{Ca}^{2+}$  has an important role in the activation of p53.

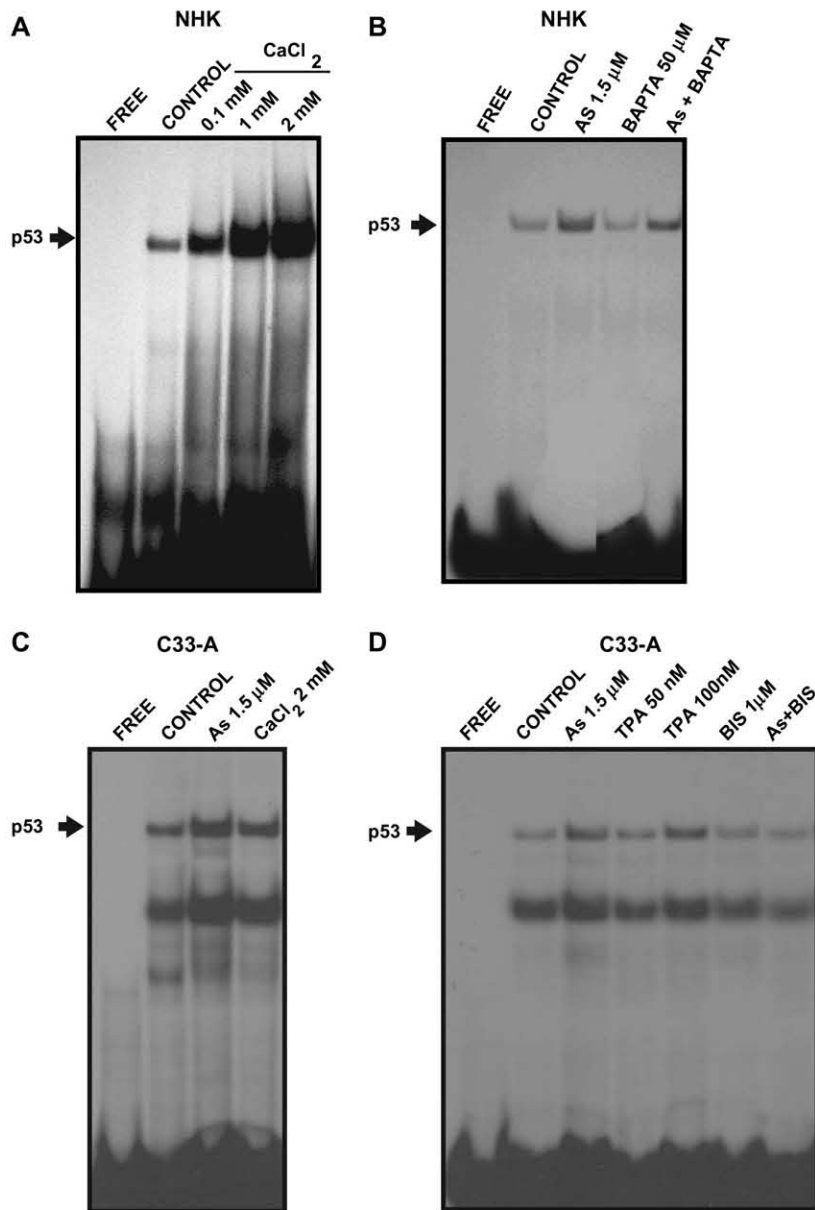


**FIG. 3.** Different p53-responses to sodium arsenite are recorded in C33-A cell line. (A) NHK, C33-A, and HeLa nuclear extracts were used to compare p53-complexes by EMSA (left panel, all cells untreated). In the center panel, competitive EMSA were performed in presence of 100-fold excess of indicated nonlabeled competitors. Right panel, gel super-shift assays in the absence or presence of 1  $\mu$ g of anti-p53 (sc-126) or 1  $\mu$ g of anti-sox10 (sc-17342) antibodies. (-): no competitor added. (B) C33-A cells were exposed to the indicated concentrations of sodium arsenite for 24 h or 30 min, nuclear extracts obtained and processed by EMSA with p53 probe. (C) From experiments as those shown in (B), p53 complex values were obtained by densitometric analysis and plotted in the graph (mean of three independent experiments  $\pm$  SE). (D) Same nuclear extracts (from cells no treated or treated with 1.5  $\mu$ M tested in B) were used to test AP-1 binding to an AP-1/SV40  $^{32}$ P-labeled probe. (E) Effects of sodium arsenite on p53 protein levels (whole cell extracts) were analyzed by Western blotting using anti-p53 antibody (sc-126) and  $\beta$ -actin antibody (sc-32251).

The differential effect of arsenite in NHK and C33-A cells in terms of p53 DNA-binding activity, might be related to differential signaling pathway activation by arsenite in both cell systems, although, 2mM  $\text{CaCl}_2$  increases p53-DNA binding in C33-A cells as in NHK (Fig. 4C). Classical isoforms of PKC are activated in  $\text{CaCl}_2$ -exposed NHK. So, we asked if PKC induction may directly increase p53-DNA binding in C33-A. As can be observed in panel D of Figure 4, TPA, a PKC activator, mimics  $\text{CaCl}_2$  or sodium arsenite responses. Additional confirmation of the link between  $\text{Ca}^{2+}$  entrance, PKC activation, and p53-DNA binding is provided by the fact that the PKC blocker Bis I diminishes the arsenite-dependent p53-DNA binding.

#### PKB/Akt Involvement in NHK Response to Sodium Arsenite

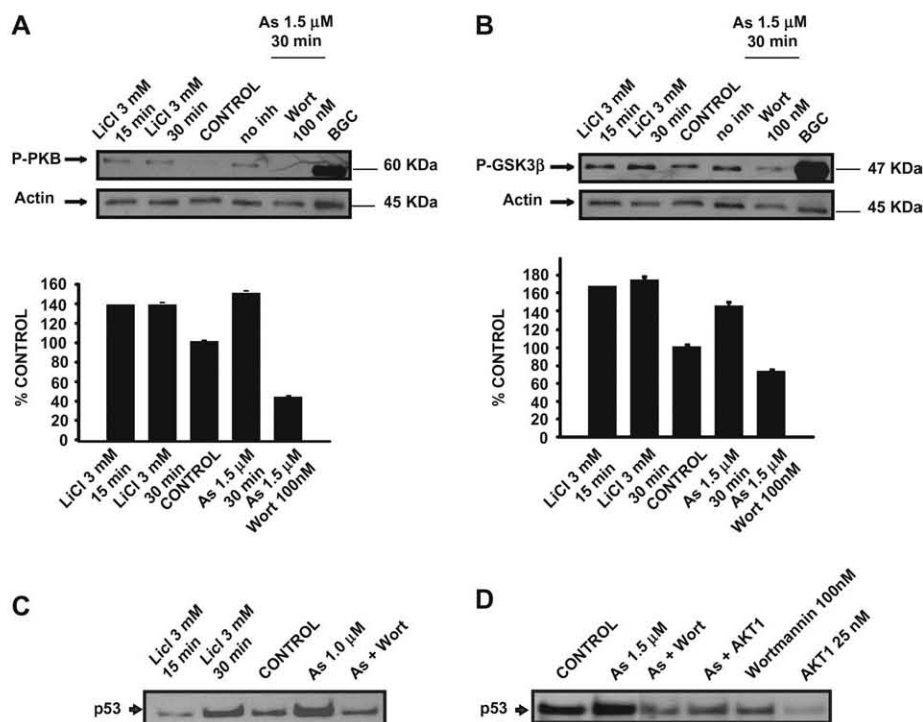
Multiple pathways have been proposed for p53 activation in a variety of cell lines. Among them, several kinases activated under elevated  $\text{Ca}^{2+}$  levels are those of the AGC family, i.e., PKC, cyclic AMP-dependent protein kinase, and PKB/Akt. In fact, arsenite activates PKB/Akt, with an important role for PI3K/Akt/I-kappa-B kinase beta/nuclear factor-kappaB pathway in cyclin D upregulation and arsenite-induced proliferation in mouse epidermal Cl41 cells (Ouyang *et al.*, 2006). Therefore, we investigated if the PKB/Akt signaling pathway is triggered under arsenic exposure in NHK, contributing to p53 activation. To this end, confluent NHK were treated with sodium arsenite (1.5  $\mu$ M for 30 min) and phosphorylated PKB/



**FIG. 4.** Role of PKC activation in regulating p53 binding to DNA. (A) Nuclear extracts from NHK, control, or exposed to CaCl<sub>2</sub> (for 24 h, concentrations are indicated) were obtained and used for DNA-binding assays with the <sup>32</sup>P-labeled p53 oligonucleotide. (B) Nuclear extracts were obtained from NHK treated with sodium arsenite (1.5 μM), and the calcium blocker, BAPTA (50 μM, added at least 45 min before sodium arsenite). (C, D) For nuclear extracts preparation, C33-A cells treated with sodium arsenite (1.5 μM), CaCl<sub>2</sub> (2 mM), TPA (50 and 100 nM) for 30 min or the PKC inhibitor bisindoleimaleimide (1 μM) added 30 min before treatment. Extracts were tested with the p53 probe.

Akt (Ser473) was detected by Western blot. As shown in panel A of Figure 5, sodium arsenite treatment results in the phosphorylation and presumably activation of PKB/Akt. As expected, LiCl, an inositol phosphatase inhibitor, also increases PKB/Akt phosphorylation (Gerling *et al.*, 2004). Although Ser473 phosphorylation has been correlated with PKB/Akt activity, we decided to explore directly its activity over a well-known substrate, GSK3-β (Nicholson and Anderson, 2002). The results are depicted in panel B of Figure 5, sodium arsenite

increases Ser9 GSK3-β phosphorylation after 15 min. As expected, both phosphorylation events are strictly dependent on PI3K. In order to obtain direct confirmation of the involvement of the PI3K/PKB/Akt pathway on the arsenite-promoted p53–DNA binding, EMSA were performed. When cells were treated with the PI3K blocker wortmannin (100 nM, 30 min) previous to sodium arsenite, the p53–DNA complex decreased considerably with respect to complex obtained from cells treated with sodium arsenite alone. These results indicate



**FIG. 5.** Sodium arsenite induces PKB/Akt and GSK-3 $\beta$  phosphorylation in NHK. Cultured NHK were treated with LiCl (3mM), sodium arsenite (1.5 $\mu$ M), and wortmannin (100nM, 30 min before As treatment). Phosphorylation of PKB/Akt (in A) and GSK-3 $\beta$  (in B) was analyzed by Western blotting. Cerebellar Bergmann glia cells were used as a positive control for antibodies (Morales *et al.*, 2006). Quantitative densitometry data after sodium arsenite treatment are shown as relative to levels found in untreated cells, normalizing by actin content. Values represent the mean and  $\pm$  SE of two independent experiments. (C) EMSA performed with nuclear extracts from NHK treated with same inhibitors as in (A) and (B), harvested 24 h after and tested with the p53 probe. (D) EMSA performed with nuclear extracts from NHK treated as indicated but harvested 24 h after treatment. AKT I: PKB/Akt1 inhibitor, 25nM.

that PI3K/PKB/Akt pathway activation is participating in the regulation of p53 protein DNA binding in NHK. Also notice, in Figure 5C, that a similar increase in p53 binding to its consensus sequence is present when the cells are exposed to the phosphatase inhibitor LiCl (stabilizing Akt phosphorylation). Similarly, pretreatment with 1L-6-hydroxymethylchiro-inositol 2-(*R*)-2-*O*-methyl-3-*O*-octadecylcarbonate, an AKT1 blocker, avoids p53 complex activation (Fig. 5D).

Comparative analysis of the arsenite effect in PKB/Akt phosphorylation was performed in the C33-A cell line. Interestingly, a time and dose-dependent increase in PKB/Akt phosphorylation was found and maintained for up to 12 h (Fig. 6, upper panels). Moreover, when we performed EMSA a clear blockage of the formation of p53–DNA complex induced by arsenic in the short term was achieved with the previous application of the PKB/Akt inhibitor, AKT I applied at a 25nM concentration (Fig. 6, panel C).

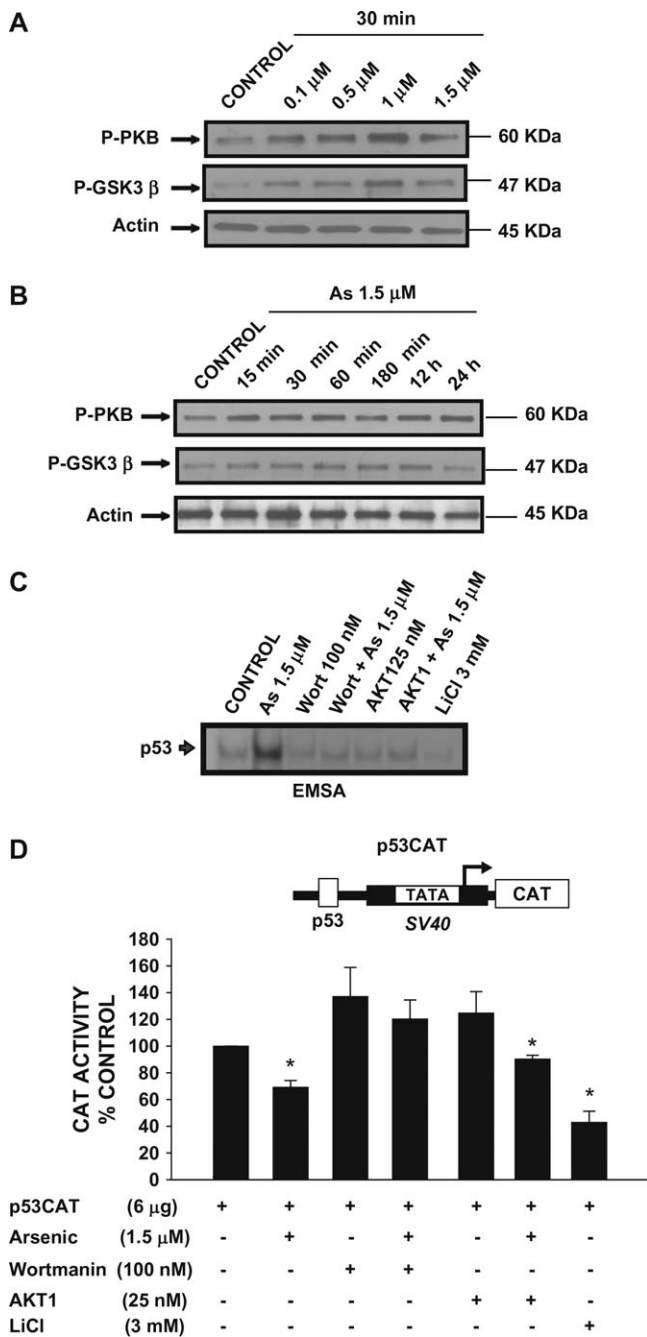
As a measurement of the pathway behavior in the long term, we decided to test the activity of p53 as a transcription factor in a functional assay. Using a reporter gene system, where a p53 DNA-binding site was cloned to direct the SV40 early promoter activity (see map, Fig. 6D) we evaluated the arsenite effect. The promoter activity was reduced after the continuous exposure to the metalloid. This result is in line with those

shown in Figure 3; in the long-term, arsenic treatment is apparently linked to the removal of the mutated p53 from nuclei, lowering the p53–DNA complex formation and obviously its transactivating capacity. Interestingly, the PKB/Akt pathway blockers avoid this effect and the inositol phosphatase mimics it.

#### *Sodium Arsenite Induces NHK Differentiation*

As p53 seems to be activated for a long period of time under arsenite presence, NHK are expected to be more restricted to the cell growth control exerted by p53. In line with this, we observed that arsenite treatment caused changes in cell morphology that resemble those obtained when cells are induced to differentiate *in vitro* by adding 2mM CaCl<sub>2</sub>. Comparative images shown in panel A of Figure 7 reflect a rather similar morphology when cells are differentiated by calcium addition or when they are treated with 1.5 $\mu$ M of sodium arsenite. Involucrin is a marker tightly related to the normal differentiation process and widely used in NHK. In fact, the involucrin promoter is responsive to sodium arsenite through an AP-1 site (Jessen *et al.*, 2001). With this in mind, we determined the arsenite effects over involucrin expression, obtaining a clear augmentation in its protein levels when the





**FIG. 6.** Arsenic-induced PKB/Akt phosphorylation in C33-A cells: transcriptional modulating effects. Cells were treated with increasing concentrations in (A) or for increasing times at a fixed sodium arsenite amount (1.5  $\mu$ M) in (B) and tested for PKB/Akt phosphorylation as in Figure 5A. Whole  $\beta$ -actin levels were used for normalizing purposes. (C) p53 complex induction was evaluated under similar conditions in the presence of wortmannin (100 nM), AKT I (PKB/Akt1 inhibitor, 25 nM), or LiCl (3 mM) during 30 min, previous to arsenic treatment. (D) Transcriptional activity of p53 (long-term effects) was determined after transient transfection assays in C33-A. The construct p53CAT was transfected (6  $\mu$ g of plasmidic DNA) in 80% confluent cells. Cells were treated with sodium arsenite, and when the indicated inhibitors, wortmannin AKT I, and LiCl were applied 60 min before arsenite (24-h posttransfection). Finally, cells were harvested 24-h posttreatment. CAT

cells were exposed to increasing concentrations of sodium arsenite (Fig. 7, panels B and C). Accordingly, we expected an arsenite-treated NHK augmentation in cyclin D1 levels, assessing these levels as a measure of cell cycle progression and cell proliferation. Indeed this is the case, as shown in Figure 7D, cyclin D1 increases in cells exposed to sodium arsenite, note an inverse concentration-dependent effect. With these results, we next examined cell proliferation effect using nuclear index as a tool to evaluate the changes exerted by sodium arsenite on NHK proliferation rates (Fig. 7E). In fact, we were able to establish a correlation between nuclear index assays and cyclin D1 levels (Figs. 7D and 7E). Accordingly to the cell proliferation rates (Fig. 7F), the cells seem to be withdrawn from cell cycle progression. These data may indicate that different responses can be elicited depending on the arsenite concentration to which NHK are exposed, low concentrations lead to a discrete proliferation, whereas higher concentrations (more than 0.5  $\mu$ M) seem to gradually stop cell growth, most possibly through p53 arrest.

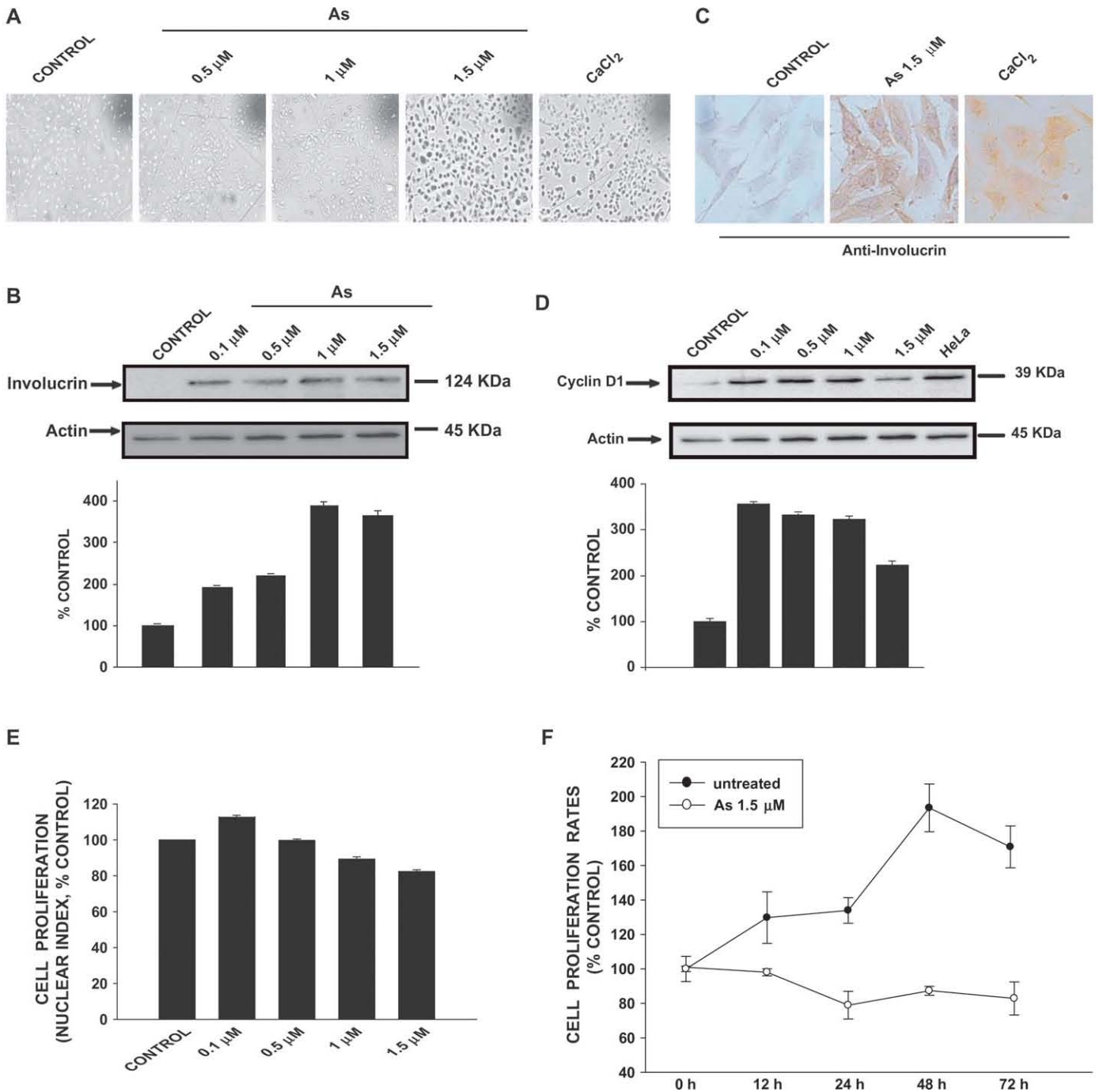
#### Sodium Arsenite Induces Cell Proliferation in C33-A Cells

As the response to sodium arsenite is clearly different when we compare NHK with C33-A cells, we expected a different behavior in the mutated p53 cell line in terms of cell proliferation. The results are shown in Figure 8, serum-starved C33-A are capable to proliferate under arsenite treatment (panel A). Moreover, a cyclin D1-dependent promoter is activated by arsenite in a dose-dependent manner, indicating that the cell cycle is not stopped by the metalloid (Fig. 8B). Even more, *c-myc* is also activated by sodium arsenite and may be the connecting link to activate cyclin D1 and cell cycle progression (Fig. 8C). A model with our current understanding of data presented here is shown in Figure 9.

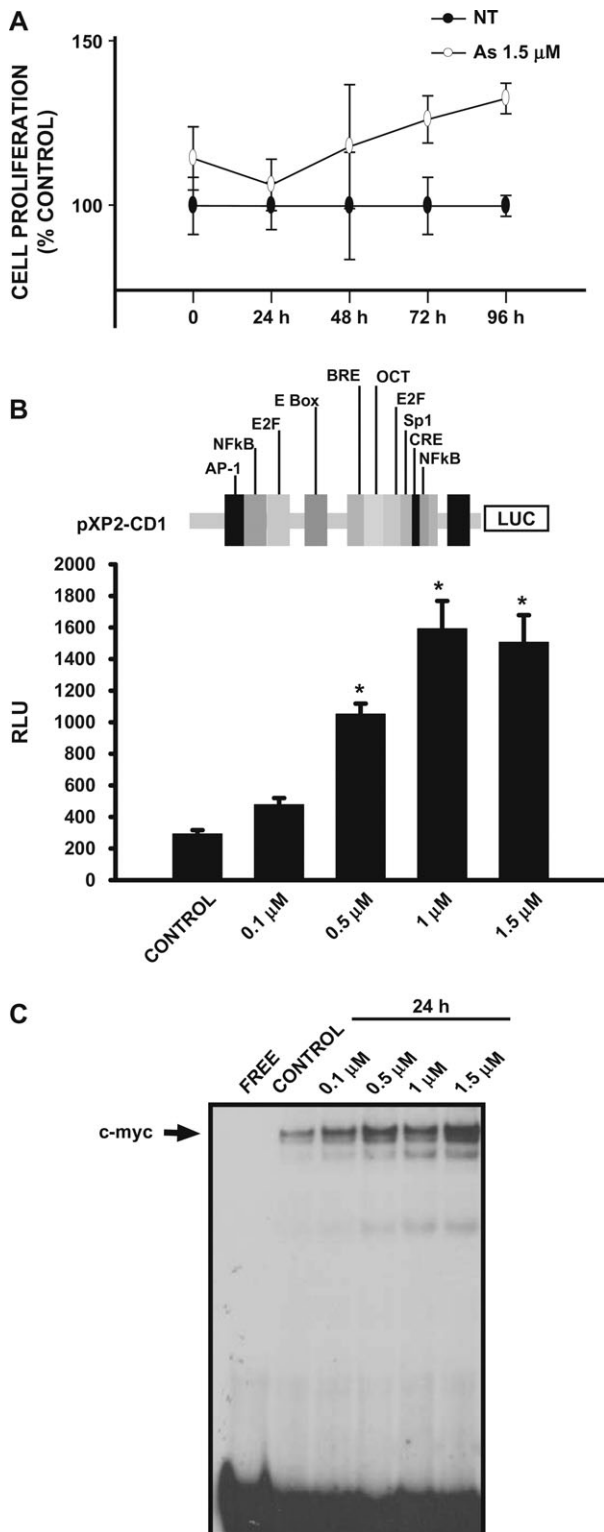
## DISCUSSION

Previous studies have shown that arsenic is cytotoxic to a variety of cell lines and primary cultures, for example fibroblasts (Lee *et al.*, 2004; Trouba *et al.*, 1999), lymphocytes (Sordo *et al.*, 2001), hepatocytes (Petrick *et al.*, 2000), NHK (Bae *et al.*, 2001), and epidermal carcinoma cells (Huang and Lee, 1996). However, variability between different systems has also been reported (Mei *et al.*, 2003). When we evaluated the sensibility of NHK and C33-A to arsenic, no clear cytotoxicity was detected since cell viability assessed by the MTT method was not severely affected even after 72 h (Fig. 1).

activities are shown as the relative activity comparing with the activity recorded for p53CAT construct alone. In all cases data were normalized by protein content and obtained from at least four independent experiments. In all transfection assays, data plotted are mean values  $\pm$  SE from four independent experiments (\* $p$  < 0.05; vs. untreated, by ANOVA).



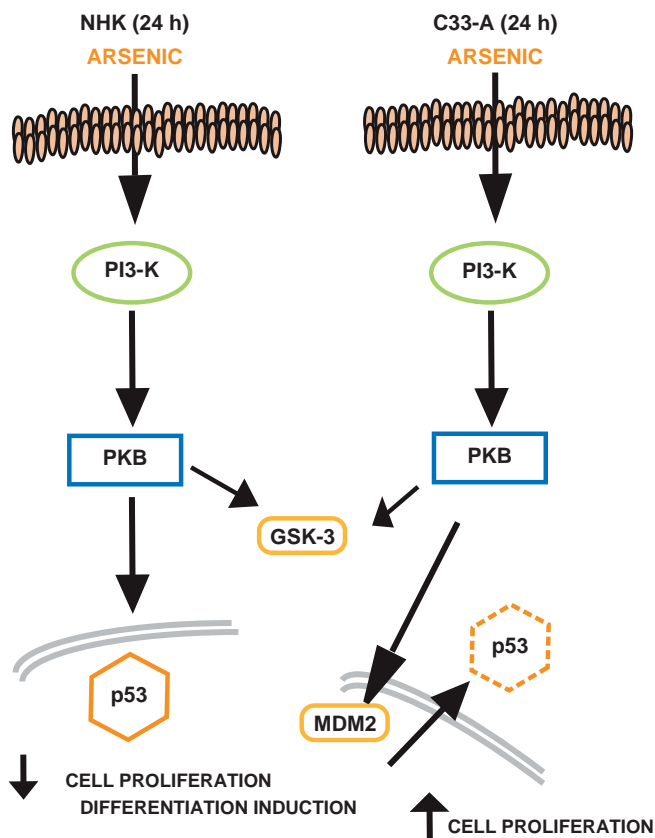
**FIG. 7.** p53/involucrin association under differentiation like conditions elicited for sodium arsenite. (A) Morphological changes shown in microscopically taken images from arsenic-treated cells (24 h, concentrations are indicated) or those treated with the differentiation inducer CaCl<sub>2</sub> (2mM). (B) Involucrin levels were analyzed via Western blot in treated NHK (24 h). (C) Expanded cells from the primary culture were seeded in eight wells glass slides, treated as indicated and the immunostaining performed with anti-involucrin antibody after 24 h treatment. (D) Cyclin D1 protein levels were analyzed by Western blot in treated NHK, with indicated concentrations and for 24 h. HeLa cells are used as a positive control for cyclin D1 protein. Values represent the mean of three separated experiments  $\pm$  SE. Plotted data were obtained by densitometric measurement and are shown as % of levels recorded by the nontreated control, normalizing by actin content. (E) NHK exposed to the indicated concentrations of sodium arsenite and cytochalasin B (to block cytokinesis, 2 mg/ml) during 48 h were fixed, and cell proliferation was evaluated by nuclear index. Binucleated cells counting was performed, assessing the frequency of micronucleated cells. (F) Cell proliferation rates were done by the MTT method. Data are expressed as % of untreated control at time zero, values plotted are the mean  $\pm$  SE.



**FIG. 8.** Sodium arsenite induces cell proliferation in C33-A. (A) C33-A cells were seeded in 12-well culture plates in 2% serum media (starving conditions), treated with sodium arsenite for indicated times, and cell proliferation rates were evaluated by the MTT method. Data are expressed as % of untreated control at time zero; values plotted are mean  $\pm$  SE. (B) Transcriptional activity of cyclin D1 promoter was determined after

Arsenic has profound genotoxic effects (Gradecka *et al.*, 2001). Many studies have shown that exposure to arsenic increases the frequency of chromosome aberrations and micronuclei in humans and experimental animals (Gebel, 2001; Wacławiczek *et al.*, 2001). When we evaluated the arsenic clastogenic activity over NHK, we found the presence of micronuclei in the cytoplasm, a common feature indicative of genotoxic damage (data not shown). A number of stimuli, including DNA damage, reactive oxygen species, nucleotide depletion, and other genotoxic stressors induce p53 activation (Appella and Anderson, 2001; Colman *et al.*, 2000). Arsenic exposure results in the activation of p53 in different cultured cell systems (Hernandez-Zavala *et al.*, 2005; Salazar *et al.*, 1997; Yih and Lee, 2000). Protection against cancer by p53 is due mainly to its activity as a transcription factor. In fact, p53 accumulates in the nucleus and transactivates a number of key genes that regulate the DNA repair processes and cell proliferation. The function of p53 in transactivation of target genes deals with the dilemma of inducing cell growth arrest or apoptosis pathways. Among the induced p53 genes, p21<sup>waf</sup> is a gene critically involved in senescence (Noda *et al.*, 1994) and identified as an universal inhibitor of cyclin dependent kinases, which block the cell cycle at G1/S transition and inhibits cell growth (Harper *et al.*, 1993). Interestingly, p21<sup>waf</sup> promoter harbors two p53 DNA-binding sites. In this sense, we evaluated the effects of arsenic on p53 protein levels and its transactivator capabilities and how these effects are related to parameters such as cell growth in two systems of epithelial cells, a primary culture of NHK and a well-characterized cell line that exhibits p53 mutations, the C33-A cell line. In the latter, mutations map to codons 245, 248, 249, and 273 (Scheffner *et al.*, 1991). Under a p53 mutant, exposure to ultraviolet (UV) and arsenite may lead to enhanced metalloid effects. For example, it is well characterized that a higher p53 expression is present in keratinocytes adjacent to small cell carcinoma focuses exposed to UV (Lee *et al.*, 2004; Rossman *et al.*, 2004). Sun-exposed human skin contains thousands of clones of p53-mutant keratinocytes (Jonason *et al.*, 1996) and the p53-mutant keratinocytes clones grew only during chronic UVB exposure (Zhang *et al.*, 2001). Moreover, in endemic zones of arsenic contamination, both factors are usually concurrent. It is quite possible that arsenic exerts a differential effect in a cell with a previously mutated p53 protein.

transient transfection assays in C33-A. The pXP2-CD1 construct was transfected (6  $\mu$ g of plasmidic DNA) in 80% confluent C33-A, which were treated or not with the indicate concentrations of sodium arsenite, along 48 h in media with 0.5% serum and harvested 24-h posttreatment. Relative luciferase units were obtained from at least three independent experiments, data plotted are mean values  $\pm$  SE (\* $p$  < 0.05; vs. untreated, by ANOVA). (C) c-myc DNA binding increases in C33-A exposed to sodium arsenite. Cells were harvested 24-h posttreatment and processed to obtain nuclear extracts, which were normalized by protein content and incubated with [<sup>32</sup>P]-labeled c-myc probe. FREE, no nuclear extract added.



**FIG. 9.** Proposed model of regulation of proliferation and differentiation signaling pathways controlled by sodium arsenite in epithelial cells with different p53 status. Sodium arsenite can activate PKB/Akt via PI3K in NHK and this response is correlated with an increment of p53 binding to DNA. In C33-A, arsenite also increases PKB/Akt phosphorylation but p53 complex and its transcriptional activity were decreased in the long-term exposure.

Therefore, mutated p53 could act as a negative additional risk factor.

Reports concerning the arsenic effects on p53 protein levels are conflicting. For example, it has been reported that a 14-day exposure to environmental relevant arsenic concentrations results in p53 diminished levels in the human keratinocytes (Hamadeh *et al.*, 1999, 2002). In contrast, in most of cell types, including other epithelial cell systems, arsenic exposure causes p53 and p21<sup>waf</sup> augmentation (Hernandez-Zavala *et al.*, 2005; Salazar *et al.*, 1997; Yih and Lee, 2000). Therefore, we decided to investigate the mechanisms by which arsenic regulates p53 through different approaches. When we evaluated the p53 DNA-binding activity we observed that arsenic increases p53 bound to DNA, due to an increase in its protein levels (immunodetected) (EMSA, Fig. 2). In line with this interpretation, we were able to find p53 nuclear accumulation.

Several reports show that arsenic modulates a number of signaling transduction pathways that regulate cell growth, differentiation, and apoptosis (Dong, 2002; Simeonova and Luster, 2000). On the other hand,  $Ca^{2+}$  influx is induced by

sodium arsenite (Goytia-Acevedo *et al.*, 2003). Using DNA-binding assays, we show here that  $Ca^{2+}$  levels are important for the appearance of the p53–DNA complex. The pivotal role of  $Ca^{2+}$  in epidermal differentiation is reflected by a fourfold increase in extracellular  $Ca^{2+}$  from the basal layer to the stratum corneum (Tobin, 2006). Moreover, addition of  $Ca^{2+}$  to keratinocytes *in vitro* arrests the growth of proliferating cells, while induces the expression of differentiation markers like K1/K2, fillagrin, involucrin, and loricerin (Bikle *et al.*, 2001; Deucher *et al.*, 2002). In accordance to this, inhibition of the rise in intracellular  $Ca^{2+}$  levels by BAPTA, confirms the importance of  $Ca^{2+}$  in p53–DNA induction by arsenite. It seems that as part of the differentiation program, cells activate p53, which in turn activates the transcription of other genes that participate in this program, at least in cultured human keratinocytes. This scenario may occur also in normal epithelia. In this context, immunocytochemical analysis show increased levels of p53 in foreskin epithelia, located in spinous stratum, coincident with involucrin expression (data not shown).

A recent study showed that arsenite induces the activation of PKB/Akt and its downstream effector, eNOS, in cultured human keratinocytes (Souza *et al.*, 2001). We observed that arsenic was able to activate the  $Ca^{2+}$ /PI3K/PKB/GSK-3 $\beta$ /p53 pathway. We noticed that arsenic-induced phosphorylation of a typical PKB/Akt target, GSK-3 $\beta$ , known to play diverse roles in cellular processes as differentiation, proliferation, and transformation (Nicholson and Anderson, 2002). Activation of PKB/Akt and its downstream effector, eNOS, in cultured human keratinocytes (Souza *et al.*, 2001). We observed that arsenic was able to activate the  $Ca^{2+}$ /PI3K/PKB/GSK-3 $\beta$ /p53 pathway. We noticed that arsenic-induced phosphorylation of a typical PKB/Akt target, GSK-3 $\beta$ , known to play diverse roles in cellular processes as differentiation, proliferation, and transformation (Nicholson and Anderson, 2002). Activation of PKB/Akt and its downstream effector, eNOS, in cultured human keratinocytes (Souza *et al.*, 2001). We observed that arsenic was able to activate the  $Ca^{2+}$ /PI3K/PKB/GSK-3 $\beta$ /p53 pathway. We noticed that arsenic-induced phosphorylation of a typical PKB/Akt target, GSK-3 $\beta$ , known to play diverse roles in cellular processes as differentiation, proliferation, and transformation (Nicholson and Anderson, 2002). Activation of PKB/Akt and its downstream effector, eNOS, in cultured human keratinocytes (Souza *et al.*, 2001). We observed that arsenic was able to activate the  $Ca^{2+}$ /PI3K/PKB/GSK-3 $\beta$ /p53 pathway. We noticed that arsenic-induced phosphorylation of a typical PKB/Akt target, GSK-3 $\beta$ , known to play diverse roles in cellular processes as differentiation, proliferation, and transformation (Nicholson and Anderson, 2002).

Withdrawn from cell cycle is an essential step for the cell for the differentiation process (Fuchs, 1990b). In this sense, we wonder if arsenic exposure could induce NHK morphological changes. When cells treated with sodium arsenite cell morphology remained as  $Ca^{2+}$  treated control (Fig. 7). Accordingly, sodium arsenite increased the differentiation marker involucrin while diminished the proliferation marker cyclin D1 (Fig. 7). In line with this, it has been shown that arsenite can induce differentiation in other cells systems different responses over the same cells system depending on the concentrations used (Dong, 2002).

Mutations that inactivate or alter p53 are present in different types of human cancer including colon, breast, lung, brain, and esophageal (Nigro *et al.*, 1989). When cells are under stress conditions, p53 activation plays a definite role in cell survival. While in several epithelial cell lines it is possible to notice a clear change in cellular localization (from cytoplasm to nuclei) when p53 is activated, in C33-A cells the nuclear p53 levels remain constant. In terms of transcriptional regulation, activation of a p53-responsive promoter (p53CON reporter gene) increased significantly using Neocarzinostatin in wild type p53 cell lines but not in C33-A (Banuelos *et al.*, 2003). We found clear differences when sodium arsenite effects were analyzed in C33-A. It is tempting to speculate that in the short

term, p53 is activated in response to arsenic-dependent DNA damage, most likely through Ser15 phosphorylation via DNA-PK resulting in the documented dose-dependent augmentation of the p53–DNA complex (Fig. 3). In the long term, the decrease of the p53–DNA complex might be the result of a MDM-2–induced p53 nuclear export and degradation. This interpretation is favored by the fact that the *mdm-2* gene is transcriptionally activated by p53 (Moll and Petrenko, 2003). This model suggests that arsenic-dependent p53 activation drives the transcription of its target genes including p21, cyclin D1, PTEN, and *mdm-2* among others (Rocha *et al.*, 2003; Stambolic *et al.*, 2001).

A different outcome resulted in C33-A cells. When the PKB/Akt signaling was activated, as indicated by the increase in phosphorylation of PKB/Akt and GSK3- $\beta$ , p53 behaves differently. In the short term, activation is detected, but under a long-term exposure, activity decreases considerably. LiCl, normally used to promote phosphorylated PKB/Akt stabilization, caused the same effect, this is, a clear decrease in nuclear p53 available for DNA binding and consequently for transcriptional control. This might indicate a more accelerated rate of p53 nuclear export and degradation, rendering it inactive for activate cell growth controllers such as p21<sup>waf</sup>. In line with this, the activity of a reporter construct based in p53 binding and controlling SV40 promoter, presented a diminished activity under arsenite exposure. In terms of cell ability to growth, this can be translated in the activation of molecules involved in response to mitogens as cyclin D1 or the c-myc factor, as well as the ability to keep a proliferating cell even under starving conditions, as demonstrated for C33-A (Fig. 8).

In summary, our findings clearly suggest that arsenic toxicity is severely augmented in p53-mutant epithelial cells. Work currently in progress in our lab is aimed at establishing the early signaling events triggered by arsenic in epithelial cells.

## FUNDING

CONACyT grants to E.L.B. (50414) and to A.O. (43164); CONACyT fellowship to M.S., R.T., and M.M.; and Promep-SEP grant to L.C.A.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Drs José Iglesias and Sarai Ramírez, Hospital Español for kindly provide neonatal human foreskins. Technical assistance of Miriam Huerta, Bruno Meza and Gerardo Marmolejo is acknowledged.

## REFERENCES

Abbas, T., White, D., Hui, L., Yoshida, K., Foster, D. A., and Bargonetti, J. (2004). Inhibition of human p53 basal transcription by down-regulation of protein kinase Cdelta. *J. Biol. Chem.* **279**, 9970–9977.

Appella, E., and Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2764–2772.

Bae, D. S., Gennings, C., Carter, W. H., Jr, Yang, R. S., and Campaign, J. A. (2001). Toxicological interactions among arsenic, cadmium, chromium, and lead in human keratinocytes. *Toxicol. Sci.* **63**, 132–142.

Banuelos, A., Reyes, E., Ocadiz, R., Alvarez, E., Moreno, M., Monroy, A., and Gariglio, P. (2003). Neocarzinostatin induces an effective p53-dependent response in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 671–680.

Bikle, D. D., Ng, D., Tu, C. L., Oda, Y., and Xie, Z. (2001). Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **177**, 161–171.

Colman, M. S., Afshari, C. A., and Barrett, J. C. (2000). Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat. Res.* **462**, 179–188.

Chen, C. J., Chuang, Y. C., Lin, T. M., and Wu, H. Y. (1985). Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: High-arsenic artesian well water and cancers. *Cancer Res.* **45**, 5895–5899.

Chiou, H. Y., Chiou, S. T., Hsu, Y. H., Chou, Y. L., Tseng, C. H., Wei, M. L., and Chen, C. J. (2001). Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: A follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. *Am. J. Epidemiol.* **153**, 411–418.

Chiou, H. Y., Hsueh, Y. M., Liaw, K. F., Horng, S. F., Chiang, M. H., Pu, Y. S., Lin, J. S., Huang, C. H., and Chen, C. J. (1995). Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: A seven-year follow-up study in Taiwan. *Cancer Res.* **55**, 1296–1300.

Deucher, A., Efimova, T., and Eckert, R. L. (2002). Calcium-dependent involucrin expression is inversely regulated by protein kinase C (PKC)alpha and PKCdelta. *J. Biol. Chem.* **277**, 17032–17040.

Dong, Z. (2002). The molecular mechanisms of arsenic-induced cell transformation and apoptosis. *Environ. Health Perspect.* **110**(Suppl. 5), 757–759.

Eckert, R. L., Crish, J. F., Banks, E. B., and Welter, J. F. (1997). The epidermis: Genes on-genes off. *J. Invest. Dermatol.* **109**, 501–519.

Fenech, M., Bonassi, S., Turner, J., Lando, C., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Bigatti, M. P., *et al.* (2003a). Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat. Res.* **534**, 45–64.

Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., and Zeiger, E. (2003b). HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **534**, 65–75.

Fuchs, E. (1990a). Epidermal differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 1028–1035.

Fuchs, E. (1990b). Epidermal differentiation: The bare essentials. *J. Cell Biol.* **111**, 2807–2814.

Gebel, T. W. (2001). Genotoxicity of arsenical compounds. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **203**, 249–262.

Gerling, N., Culmsee, C., Klumpp, S., and Kriegstein, J. (2004). The tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate mimics NGF-induced neuroprotective signaling in rat hippocampal neurons. *Neurochem. Int.* **44**, 505–520.

Germolec, D. R., Yoshida, T., Gaido, K., Wilmer, J. L., Simeonova, P. P., Kayama, F., Burleson, F., Dong, W., Lange, R. W., and Luster, M. I. (1996). Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**, 308–318.

Gohler, T., Reimann, M., Cherny, D., Walter, K., Warnecke, G., Kim, E., and Deppert, W. (2002). Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 41192–41203.

- Goytia-Acevedo, R. C., Cebrian, M. E., and Calderon-Aranda, E. S. (2003). Differential effects of arsenic on intracellular free calcium levels and the proliferative response of murine mitogen-stimulated lymphocytes. *Toxicology* **189**, 235–244.
- Gradecka, D., Palus, J., and Wasowicz, W. (2001). Selected mechanisms of genotoxic effects of inorganic arsenic compounds. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **14**, 317–328.
- Hamadeh, H. K., Trouba, K. J., Amin, R. P., Afshari, C. A., and Germolec, D. (2002). Coordination of altered DNA repair and damage pathways in arsenite-exposed keratinocytes. *Toxicol. Sci.* **69**, 306–316.
- Hamadeh, H. K., Vargas, M., Lee, E., and Menzel, D. B. (1999). Arsenic disrupts cellular levels of p53 and mdm2: A potential mechanism of carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 446–449.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805–816.
- Herber, B., Truss, M., Beato, M., and Muller, R. (1994). Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* **9**, 2105–2107.
- Hernandez-Zavala, A., Cordova, E., Del Razo, L. M., Cebrian, M. E., and Garrido, E. (2005). Effects of arsenite on cell cycle progression in a human bladder cancer cell line. *Toxicology* **207**, 49–57.
- Hofseth, L. J., Hussain, S. P., and Harris, C. C. (2004). p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 177–181.
- Huang, R. N., and Lee, T. C. (1996). Cellular uptake of trivalent arsenite and pentavalent arsenate in KB cells cultured in phosphate-free medium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **136**, 243–249.
- Jessen, B. A., Qin, Q., Phillips, M. A., Phillips, D. L., and Rice, R. H. (2001). Keratinocyte differentiation marker suppression by arsenic: Mediation by AP1 response elements and antagonism by tetradecanoylphorbol acetate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **174**, 302–311.
- Jonasing, A. S., Kunala, S., Price, G. J., Restifo, R. J., Spinelli, H. M., Persing, J. A., Leffell, D. J., Tarone, R. E., and Brash, D. E. (1996). Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 14025–14029.
- Kaustov, L., Yi, G. S., Aayed, A., Bochkareva, E., Bochkarev, A., and Arrowsmith, C. H. (2006). p53 transcriptional activation domain: A molecular chameleon? *Cell Cycle* **5**, 489–494.
- Latonen, L., Taya, Y., and Laiho, M. (2001). UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene* **20**, 6784–6793.
- Lee, C. H., Yu, C. L., Liao, W. T., Kao, Y. H., Chai, C. Y., Chen, G. S., and Yu, H. S. (2004). Effects and interactions of low doses of arsenic and UVB on keratinocyte apoptosis. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1199–1205.
- Lee, S. J., Kim, D. C., Choi, B. H., Ha, H., and Kim, K. T. (2006). Regulation of p53 by activated protein kinase C-delta during nitric oxide-induced dopaminergic cell death. *J. Biol. Chem.* **281**, 2215–2224.
- Li, M., Luo, J., Brooks, C. L., and Gu, W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J. Biol. Chem.* **277**, 50607–50611.
- Liu, J., Xie, Y., Cooper, R., Ducharme, D. M., Tennant, R., Diwan, B. A., and Waalkes, M. P. (2007). Transplacental exposure to inorganic arsenic at a hepatocarcinogenic dose induces fetal gene expression changes in mice indicative of aberrant estrogen signaling and disrupted steroid metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **220**, 284–291.
- Liu, J., Xie, Y., Ducharme, D. M., Shen, J., Diwan, B. A., Merrick, B. A., Grissom, S. F., Tucker, C. J., Paules, R. S., Tennant, R., et al. (2006a). Global gene expression associated with hepatocarcinogenesis in adult male mice induced by in utero arsenic exposure. *Environ. Health Perspect.* **114**, 404–411.
- Liu, J., Xie, Y., Merrick, B. A., Shen, J., Ducharme, D. M., Collins, J., Diwan, B. A., Logsdon, D., and Waalkes, M. P. (2006b). Transplacental arsenic plus postnatal 12-O-teradecanoyl phorbol-13-acetate exposures associated with hepatocarcinogenesis induce similar aberrant gene expression patterns in male and female mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **213**, 216–223.
- Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1202–1209.
- Lokuge, K. M., Smith, W., Caldwell, B., Dear, K., and Milton, A. H. (2004). The effect of arsenic mitigation interventions on disease burden in Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* **112**, 1172–1177.
- Lopez-Bayghen, E., Vega, A., Cadena, A., Granados, S. E., Jave, L. F., Gariglio, P., and Alvarez-Salas, L. M. (1996). Transcriptional analysis of the 5'-noncoding region of the human involucrin gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 512–520.
- Lu, H., Taya, Y., Ikeda, M., and Levine, A. J. (1998). Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation of the murine p53 protein at serine-389. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6399–6402.
- Magnelli, L., Cinelli, M., and Chiarugi, V. (1998). Chronic treatment of human fibroblasts cultures with diacylglycerol induces down-regulation of p53 functional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 222–225.
- Mei, N., Lee, J., Sun, X., Xing, J. Z., Hanson, J., Le, X. C., and Weinfeld, M. (2003). Genetic predisposition to the cytotoxicity of arsenic: The role of DNA damage and ATM. *FASEB J.* **17**, 2310–2312.
- Menendez, D., Inga, A., Jordan, J. J., and Resnick, M. A. (2007). Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr Watson. *Oncogene* **26**, 2191–2201.
- Moll, U. M., and Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 interaction. *Mol. Cancer Res.* **1**, 1001–1008.
- Morales, M., Gonzalez-Mejia, M. E., Bernabe, A., Hernandez-Kelly, L. C., and Ortega, A. (2006). Glutamate activates protein kinase B (PKB/Akt) through AMPA receptors in cultured Bergmann glia cells. *Neurochem. Res.* **31**, 423–429.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63.
- Murre, C., Voronova, A., and Baltimore, D. (1991). B-cell- and myocyte-specific E2-box-binding factors contain E12/E47-like subunits. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1156–1160.
- Nakamura, K., Sun, Y., Yokoyama, Y., Ferris, D., Singh, N., Ichikawa, T., Shinozuka, K., Kunitomo, M., and Colburn, N. (2000). Phosphorylation status and function of P53 are inversely related to protein kinase C activation. *Anticancer Res.* **20**, 1–5.
- Nicholson, K. M., and Anderson, N. G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* **14**, 381–395.
- Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., et al. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**, 705–708.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* **211**, 90–98.
- Nordstrom, D. K. (2002). Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* **296**, 2143–2145.
- Ortega, A., Eshhar, N., and Teichberg, V. I. (1991). Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience* **41**, 335–349.
- Ouyang, W., Li, J., Ma, Q., and Huang, C. (2006). Essential roles of PI-3K/Akt/IKKbeta/NFkappaB pathway in cyclin D1 induction by arsenite in JB6 Cl41 cells. *Carcinogenesis* **27**, 864–873.
- Patrick, J. S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W. R., Carter, D. E., and Vasken Aposhian, H. (2000). Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic

- than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **163**, 203–207.
- Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., Doniger, J., and DiPaolo, J. A. (1987). Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* **61**, 1061–1066.
- Rea, M. A., Gregg, J. P., Qin, Q., Phillips, M. A., and Rice, R. H. (2003). Global alteration of gene expression in human keratinocytes by inorganic arsenic. *Carcinogenesis* **24**, 747–756.
- Rocha, S., Martin, A. M., Meek, D. W., and Perkins, N. D. (2003). p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4713–4727.
- Rossmann, T. G., Uddin, A. N., and Burns, F. J. (2004). Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **198**, 394–404.
- Salazar, A. M., Ostrosky-Wegman, P., Menendez, D., Miranda, E., Garcia-Carranca, A., and Rojas, E. (1997). Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutat. Res.* **381**, 259–265.
- Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J. C., and Howley, P. M. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5523–5527.
- Simeonova, P. P., and Luster, M. I. (2000). Mechanisms of arsenic carcinogenicity: Genetic or epigenetic mechanisms? *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **19**, 281–286.
- Sordo, M., Herrera, L. A., Ostrosky-Wegman, P., and Rojas, E. (2001). Cytotoxic and genotoxic effects of As, MMA, and DMA on leukocytes and stimulated human lymphocytes. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **21**, 249–260.
- Souza, K., Maddock, D. A., Zhang, Q., Chen, J., Chiu, C., Mehta, S., and Wan, Y. (2001). Arsenite activation of P13K/AKT cell survival pathway is mediated by p38 in cultured human keratinocytes. *Mol. Med.* **7**, 767–772.
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., and Mak, T. W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol. Cell.* **8**, 317–325.
- Sun, G. (2004). Arsenic contamination and arsenicosis in China. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **198**, 268–271.
- Tchounwou, P. B., Centeno, J. A., and Patlolla, A. K. (2004). Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis—A health risk assessment and management approach. *Mol. Cell. Biochem.* **255**, 47–55.
- Tobin, D. J. (2006). Biochemistry of human skin—Our brain on the outside. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 52–67.
- Tondel, M., Rahman, M., Magnuson, A., Chowdhury, I. A., Faruquee, M. H., and Ahmad, S. A. (1999). The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* **107**, 727–729.
- Trouba, K. J., Glanzer, J. G., and Vorce, R. L. (1999). Wild-type and Ras-transformed fibroblasts display differential mitogenic responses to transient sodium arsenite exposure. *Toxicol. Sci.* **50**, 72–81.
- Waclawicki, M., Berer, A., Oehler, L., Stockl, J., Schloegl, E., Majdic, O., and Knapp, W. (2001). Calcium ionophore: A single reagent for the differentiation of primary human acute myelogenous leukaemia cells towards dendritic cells. *Br. J. Haematol.* **114**, 466–473.
- Woo, R. A., McLure, K. G., Lees-Miller, S. P., Rancourt, D. E., and Lee, P. W. (1998). DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* **394**, 700–704.
- Xie, Y., Liu, J., Benbrahim-Tallaa, L., Ward, J. M., Logsdon, D., Diwan, B. A., and Waalkes, M. P. (2007). Aberrant DNA methylation and gene expression in livers of newborn mice transplacentally exposed to a hepatocarcinogenic dose of inorganic arsenic. *Toxicology* **236**, 7–15.
- Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C. C., Schlegel, R., and Howley, P. M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.* **119**, 361–366.
- Yih, L. H., and Lee, T. C. (2000). Arsenite induces p53 accumulation through an ATM-dependent pathway in human fibroblasts. *Cancer Res.* **60**, 6346–6352.
- Zhang, W., Remenyik, E., Zeltermann, D., Brash, D. E., and Wikonkal, N. M. (2001). Escaping the stem cell compartment: Sustained UVB exposure allows p53-mutant keratinocytes to colonize adjacent epidermal proliferating units without incurring additional mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 13948–13953.
- Zinkel, S., and Fuchs, E. (1994). Skin cancer and transgenic mice. *Semin. Cancer Biol.* **5**, 77–90.

ANEXO 2

Azuara-Liceaga, E., Sandoval, M., Corona, M., Gariglio, P., Lopez-Bayghen, E., 2004. The human involucrin gene is transcriptionally repressed through a tissue-specific silencer element recognized by Oct-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 318, 361-371.



## The human *involucrin* gene is transcriptionally repressed through a tissue-specific silencer element recognized by Oct-2<sup>☆</sup>

Elisa Azuara-Liceaga, Marisol Sandoval, Matilde Corona, Patricio Gariglio, and Esther López-Bayghen\*

Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., Mexico D.F. 07000, Mexico

Received 24 February 2004  
Available online 16 April 2004

### Abstract

*Involucrin* is an important marker of epithelial differentiation which expression is upregulated just after basal cells are pushed into the suprabasal layer in stratified epithelia. Several transcription factors and regulatory elements had been described as responsible for turning on the gene. However, it is evident that in basal cell layer, additional mechanisms are involved in keeping the gene silent before the differentiation process starts. In this work, we located a potential transcriptional silencer in a 52 bp sequence whose integrity is necessary for silencing the proximal enhancer promoter element (PEP) in multiplying keratinocytes. Octamer-binding sites were noticed in this fragment and the specific binding of Oct-2 transcription factor was detected. Oct-2 appears to be implicated in an epithelial-specific repression activity recorded only in keratinocytes and C33-A cell line. Overexpression of Oct-2 repressed the *involucrin* promoter activity in epithelial cells and in the presence of the silencer element.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** *Involucrin* gene repression; Oct-2 repression; Epithelial cell-specific silencer

Normal human keratinocytes (HK) are the constituents of the stratified squamous epithelia of the skin. In the basal layer of the epidermis, mitotically active keratinocytes change its biochemical and morphological characteristics as they withdraw from the cell cycle and differentiate through the spinous, granular, and cornified layers of the skin. During this process a number of genes are turned on and off in a spatio-temporal pattern. The complex regulatory pathways that direct the transcription of epithelial differentiation-related genes are of particular importance in human disease. *Involucrin*, an

important precursor of the keratinocyte cornified envelope, is not expressed in multiplying cells whereas its gene becomes transcriptionally activated during differentiation [1,2].

Systematic analysis of the *involucrin* promoter/enhancer regions has previously been performed to identify the regulatory elements controlling *human involucrin* (Hi) expression. Transgenic mice and in vitro studies have demonstrated that these elements reside in a 2456 nucleotide (nt) long 5' non-coding region (5'-NCR) [3–6]. This region consists of three main regulatory elements: a distal cell-type-specific enhancer (DE) responsive to increasing calcium concentrations (nt –2456 to –1272); a putative transcriptional silencer (TS) (nt –651 to –160); and a proximal enhancer/promoter (PEP) (nt –159 to 43) [6,7].

Several transcription factors that interact with these regulatory regions have been implicated in the control of *involucrin* expression. The major *cis*-regulatory element within the 5'-NCR is the DE which appears to be the target of several regulatory pathways that act in concert to activate *involucrin* transcription [7,8].

<sup>☆</sup> **Abbreviations:** MHK, multiplying human keratinocytes; Ca<sup>2+</sup>, calcium; CAT, chloramphenicol acetyl transferase; AP-1, activator protein 1; TPA, 13-terppentil-phorbol-ester; TEF1, transcriptional enhancer factor; YY1, Ying Yang factor; POU, Pit-Oct-UNC transcription factors; Oct-1, 2, and 6, octamer-binding protein 1, 2, and 6, respectively; OBF-1, Oct-binding factor; Skn1a, skin octamer-binding factor; Tst-1, testes 1 transcription factor; CMV, cytomegalovirus promoter; Sp1/Sp3, stimulating protein 1 or 3; DNase HS, hypersensitive site.

\* Corresponding author. Fax: +52-55-50-61-71-00.

E-mail address: [ebayghen@mail.cinvestav.mx](mailto:ebayghen@mail.cinvestav.mx) (E. López-Bayghen).

The PEP region is responsive to TPA and activated by AP-1 and the CCAAT/enhancer-binding protein, C/EBP [9–12]. Several AP-1, TEF1, and YY1-binding sites were identified within the PEP and the TS regions by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) [6,13–15]. Overexpression of TEF1 revealed a role for this factor as a repressor [16]. Our in vitro studies and other studies have shown that the TS could be responsible for silencing *involucrin* expression in multiplying human keratinocytes (MHK), despite the presence of AP-1 [6]. Other relevant factors in keratinocyte development and differentiation are members of the POU-domain proteins. Previous studies have implicated the POU-family factors as repressors for the *involucrin* gene [17,18] but the precise location of the functional binding sites for these factors on this gene has not been yet identified. The regulation of specific genes mediated by POU proteins is highly complex since these transcription factors can interact with different related factors, and several isoforms of a single POU-transcription factor can be generated by alternative splicing. Thus, the action of these proteins relies on the combinatorial input of particular binding sequences and specific-cell environments to confer specificity (for review see [19]). In B-cells and neural cells, POU-family proteins bind to the highly conserved octamer motif –ATGCAAAT– acting as either activators or repressors, playing a role on specific transcriptional regulation of several genes [20,21]. In the most reported case, both Oct-1 and Oct-2 bind to this motif through their POU domain, recruiting the lymphoid specific factor OBF-1 (aka OCA-B, Bob-1) to a subset of octamer sites resulting in promoters regulated in a cell-specific fashion [19,22–24]. Oct-2, initially thought to be restricted to B lymphocytes, is highly expressed in undifferentiated keratinocytes in vitro, whereas Oct-1, Skn1a, and Tst-1 represented the major octamer-binding activities in differentiated keratinocytes [25].

To provide further insights into the regulation of human *involucrin* in the skin, in this study we have begun a thorough and detailed study of the SE element of the *involucrin* promoter. Serial deletions of the 5'-transcriptional silencer (TS) were made and a silencer element (SE) was mapped to nt –386 to –335, a region containing octamer motifs. The SE by itself was able to silence the *involucrin* gene promoter. Several interesting changes in SE DNA-binding were noticed between nuclear proteins from multiplying or differentiated keratinocytes, and also between different cell types. The observed differences were functionally relevant because SE is silencing the *involucrin* promoter in multiplying epithelial cells, but not in fibroblast or differentiated cells. EMSA and super-shift experiments using nuclear extracts from HK proved that the Oct-2 factor binds to the octameric motif in SE. Overexpression of Oct-2 increases the transcriptional activity of Hi promoter in

fibroblasts, whereas in epithelial cells has a stronger repressive effect. These changes may reflect differential interactions with cell-specific co-factors or activators that could be generated during the differentiation process induced by calcium and might be associated with silencing the human *involucrin* gene in multiplying keratinocytes.

All together, our findings suggest that a combination of intrinsic and environmental factors might control the interaction of Oct-2 with *involucrin* promoter provoking the silencing of the Hi gene in MHK before the differentiation process.

## Materials and methods

**Plasmid and oligodeoxynucleotides.** Plasmids are named based on the nucleotide positions from the transcriptional start site (–1/+1). The p2.6CAT plasmid was previously described [6]. The p159CAT plasmid contains the fragment from nt –159 to 43 (PEP region), amplified by PCR using the oligonucleotide O-159 linker 5'-CCCAAGCCTTCGTACGGGGCCCTAAAGGGTTGGGTTC-3' and *inv*2, 5'-GGGTCTAGACAAGACAAGACTCACAG-3'. A series of deletions in the *involucrin* silencer were created by cloning the amplified fragments using the p2.6CAT as a template with oligonucleotides that introduce *Hind*III and *Xba*I sites at the 5' and 3' ends, respectively, and finally cloned into the pCAT-Bas vector (Promega, Madison, WI). p739CAT, p476CAT, p386CAT, p376CAT, p356CAT, p346CAT, p335CAT, p276CAT, and p226CAT plasmids were obtained employing the following primers:

O-739 5'-GGGAAGCTTTGTGTAGATTC-3',  
 O-476 5'-CCCAAGCTTAAGAGAACACCCCAGAAAT-3',  
 O-386 5'-CCCAAGCTTAACCTTCCATTTTCATGC-3',  
 O-376 5'-CCCAAGCTTTTCATGCCCTTGAAAGTG-3',  
 O-356 5'-CCCAAGCTTTCTTTGGCCTAATAATGAG-3',  
 O-346 5'-CCCAAGCTTTAATAATGAGAACAAC-3',  
 O-335 5'-CCCAAGCTTACAAACTCATTTTGAAAG-3',  
 O-276 5'-CCCAAGCTTCAAACAGTACCATGCC-3',  
 O-226 5'-CCCAAGCTTATCACAGGAATAGTTGAGC-3',  
 respectively, and the *inv*2 primer.

The plasmid p41CAT was created by restriction of p2.6CAT at *Pst*I and *Hind*III sites. The plasmid p386 $\alpha$ 335CAT contains the amplified fragment generated by using the oligonucleotides O-386 and O-335R 5'-GCATGCGTTCTCATTATTAGGCCAAAAGA-3', cloned into p159CAT (*Hind*III–*Sph*I sites). Oligonucleotides O-335R and O-336 were hybridized and inserted into p159CAT producing p356 $\Delta$ 335CAT. Octamer mutated oligonucleotides including previously reported changes in octamer-binding essential bases [26] O-386 $\alpha$ M 5'-CCCAAGCTTAAGCTTCCATTCGATGC-3', O-335R $\beta$ M 5'-AGCATGCGTTCTCATTATTAGGCCAAAAGGCTCACTCGC-3', and O-335R $\delta$ M 5'-ACATGCATGCGTTCTCATGCTGCGGCCAAAACA-3' were used to generate p $\alpha$ M386 $\Delta$ 335CAT, p $\beta$ M386 $\Delta$ 335CAT, and p $\delta$ M386 $\Delta$ 335CAT, respectively, using PCR amplifications as well. All clones were screened to confirm the appropriate orientation and were verified by sequencing using a Sequenase kit (Amersham Life Science). Oligonucleotides were synthesized in an Applied Biosystems 391 DNA synthesizer. The pJT7-Oct-2.5 mice-isoform expression plasmid under the control of the cytomegalovirus (CMV) enhancer/promoter was a gift from Dr. Latchman (University College London Medical School, London, UK) [17].

**Cell culture.** Secondary cultures from neonatal human foreskin keratinocytes were obtained as described before [27] and grown in KSFM medium (Life Technologies) with the appropriate antibiotic mix at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The human carcinoma cell line C33-A, was

grown in an F-12/DMEM media mix (1:1) (Life Technologies) with 7% of fetal bovine serum (FBS). MRC-5 and pulmonary embryonic fibroblasts and HeLa cells were grown in DMEM and 10% of FBS.

**Transient transfections and CAT assays.** Transient transfections were done in normal multiplying human keratinocytes (MHK), C33-A cell line or fibroblasts. Cells were grown in 100-mm tissue culture dishes at 70–80% confluence and for C33-A cells in 60-mm tissue culture dishes at 60% of confluence (6 µg of reporter plasmid/dish, 8 µg for fibroblasts). MHK were transfected with Lipofectamine (Life Technologies). When required the culture medium was replaced with KSFM without supplements and with 2 mM CaCl<sub>2</sub>. For C33-A and fibroblasts, a standard calcium mediated transfection method was used. Co-transfection with the expression plasmid for the isoform Oct-2.5 (+) under the control of the cytomegalovirus enhancer/promoter, both cloned in the pJ7 vector, was performed with 2.5 µg of each plasmid [17]. Protein lysates were obtained as follows: cells were harvested in TEN buffer (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, and 15 mM NaCl), lysed with three freeze-thaw cycles in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, and centrifuged at 12,000g for 3 min. Standardized amounts of protein lysates were incubated with 0.25 µCi [<sup>14</sup>C]chloramphenicol (50 mCi/mmol, Amersham Life Science) and 0.8 mM acetyl-Co-A at 37 °C. Acetylated forms were separated by thin-layer chromatography and quantified using an AMBIS 4000 Scanalytics radioactive image analyzer. CAT activities were expressed as the acetylated fraction corrected for the activity in the pCAT-Bas (vector alone) and were expressed as relative activities to the silencer-less p159CAT construct.

**Electrophoretic mobility shift assays (EMSA).** Nuclear extracts were prepared as described previously [6]. All buffers contained Complete protease inhibitor cocktail (Boehringer-Mannheim) to prevent proteolysis. Protein concentration was measured by a Bio-Rad protein assay system. Nuclear extracts (5–7.5 µg) from keratinocytes were incubated on ice with 1 µg poly[(dI-dC)] as non-specific competitor (Pharmacia Biotech) and 1 ng of <sup>32</sup>P-end labeled oligonucleotide (sequences indicated above and in Fig. 3) for 10 min. The reaction mixtures were electrophoresed in a low ionic strength 0.5× TBE buffer in 7% or 8% polyacrylamide gels. The gel was dried and exposed to an X-ray film. For competitive studies, the reaction mixtures were pre-incubated with different amounts of unlabeled competitor oligonucleotide, before adding labeled DNA. For gel super-shift experiments, reactions with the DNA-protein complexes were incubated at 4 °C with anti-c-Oct-2 (rabbit polyclonal, sc-233 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or anti-p53 (sc126) for half hour prior to electrophoresis. The double strand consensus oligonucleotides employed were the following:

Sp1	5'-CTAGATTCGATCGGGCGGGGCCGA-3'
Oct-1	5'-CTAGTGTGCAATGCAAACTACTAGAA-3'
Oct-1M	5'-CTAGTGTGCAATGCAAGCCACTAGAA-3'
AP-1	5'-CTAGRATAATATGACTAAGCTGTG-3'
NF-1	5'-CTAGAGGTCTGGCTTTGGGCCAAGAGCCGC-3'

**Protein electrophoresis and immunoblotting.** Standardized amounts of total or nuclear protein extracts (15–22 µg) from MHK, C33-A, and HeLa cells were denatured in Laemmli loading buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 2% β-mercaptoethanol, and 0.01% bromophenol blue) and boiled for 5 min before 10% polyacrylamide/SDS gel electrophoresis. Epidermis from human foreskins was separated using dispase and directly lysed in PBS with three freeze-thaw cycles. Gels were electro-transferred to Immobilon P membranes (Millipore, Bedford MA). Blots were stained with Ponceau S to confirm that protein loading was equal in all lanes. Filters were soaked in PBS to remove the Ponceau S and incubated in PBS containing 5% dried skimmed milk and 0.1% Tween 20 for 2 h to block the excess of non-specific protein-binding sites. Filters were then incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies diluted 5% dried skimmed milk and 0.1% Tween in TBS buffer, followed by secondary antibodies.

The antibodies used were: rabbit polyclonal anti-Oct-1 sc-232, rabbit polyclonal anti-c-Oct-2 sc-233, (Santa Cruz Biotechnology, CA); a monoclonal antibody against human involucrin (SY5, Research Diagnostics) and anti-actin antibody (kindly donated by Dr. Manuel Hernandez, CINVESTAV). Detection was done using horseradish peroxidase-linked anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins and the enhanced chemiluminescence reagent (ECL) was obtained from Amersham (Buckinghamshire, UK).

## Results

### Localization and identification of the transcriptional silencer element in human involucrin 5' non-coding region

We have previously reported the presence of a potential transcriptional silencer in the 5'-NCR of the human *involucrin* gene [6], Fig. 1A. To further delineate the precise minimal sequence with silencer activity, other constructs were generated by a deletion approach using the p2.6CAT vector as template (Fig. 1B). The p739CAT construct showed a significant lower activity than the p159CAT in MHK, indicating that the negative regulatory elements are placed upstream the nt -159 (Fig. 1B and [6]). The activity of p476CAT and p739CAT constructs was similar, suggesting that all elements located between the nt -739 and nt -476, such as the TEF1 sites reported before [16], are not implicated in the silencer activity in our system (Fig. 1B). An additional set of deletions (from nt -476 to -159, Fig. 1B) defined at least two additional regions that could contain sequences recognized by repressors (-386 to -335 and -276 to -226). Interestingly, the region between nt -276 and -226 contains an AP-1 site [6], which has an intrinsic negative activity when is cloned in front of a heterologous promoter [28].

Using DNase I footprinting assays, we previously described a region from nt -386 to -335 that was differentially protected using nuclear extracts from MHK or nuclear extracts from calcium induced HK [6]. This region contains a consensus sequence for the transcriptional factor YY1, recognized as a repressor for several cell and viral promoters [29–31]. This fragment by itself (-386/-335) shows a strong repressor effect over the proximal enhancer promoter (PEP) in p386Δ335CAT construct with an 80% decrease in CAT activity in MHK. The activity is similar between p386Δ335CAT and p386CAT (Fig. 1B), suggesting that the major (or most important) negative elements reside in the complete 52 bp fragment. As shown in Fig. 1B, the shorter fragment cloned into the construct p356Δ335CAT shows an incomplete repression over the PEP, pointing out that some additional elements contained in those 52 bp and missing in this construct are necessary for negative regulation. Thus, this result indicates that the 52 bp fragment comprised between nt -386/-335 contains a silencer element (SE).

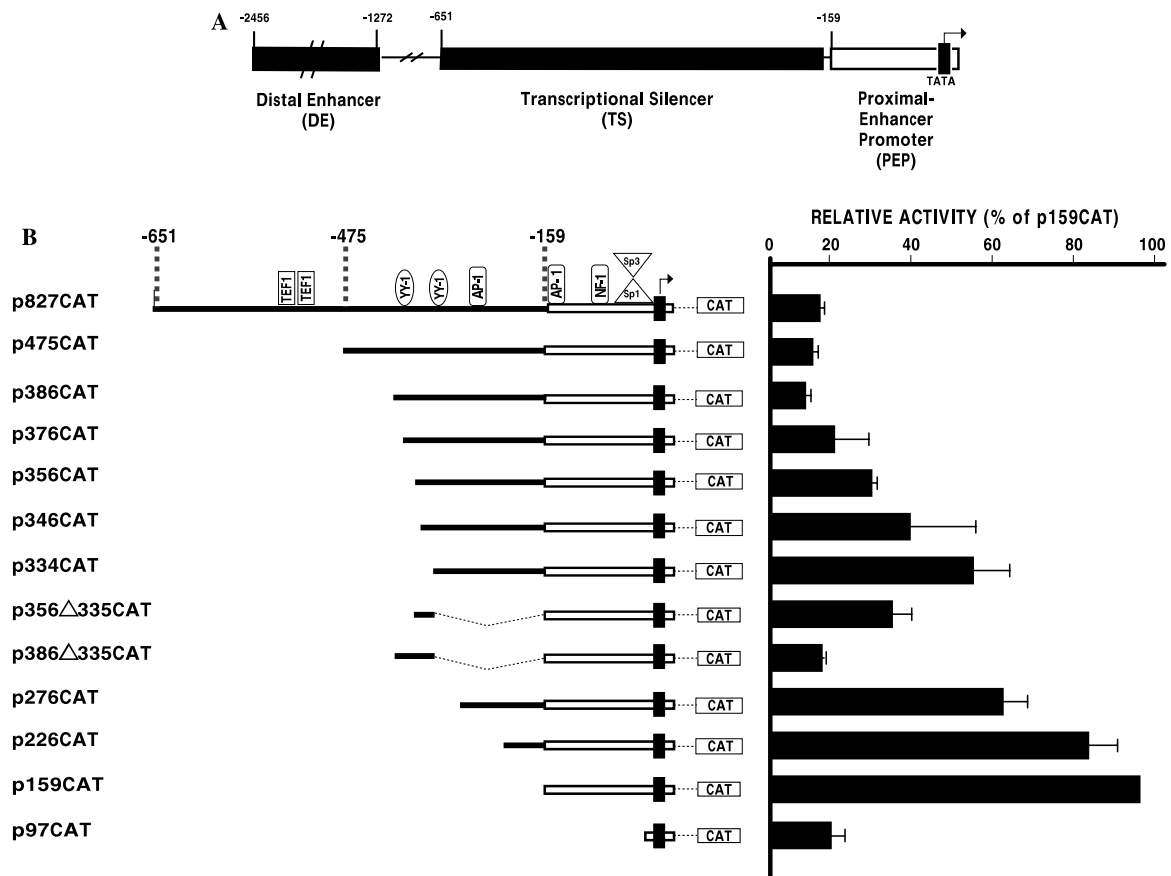


Fig. 1. Localization of the human involucrin silencer element. (A) Schematic representation of the 5' non-coding region (5'-NCR) from human *involucrin* (Hi) gene showing the regulatory domains and the TATA box. (B) Different deletions (left) in the Hi TS region were performed by PCR and the transcriptional activities (right) for these constructs were determined after transient transfection assays in HK (6 µg of DNA, harvesting 48 h after transfection). The CAT activities relative to the silencer-less p159CAT construct were normalized by protein content and were obtained from at least three independent experiments. SEM is indicated. Plasmids are named based on the 5' nt position from the transcriptional start site (-1/+1, broken arrows). Transcriptional factors interacting within the TS and PEP are indicated.

#### *Oct-2* role in silencing human *involucrin* expression

Previously, we identified several DNase I HSs within the silencer region of the Hi promoter [6]. A clear protection on nucleotides -387 to -317 (H4 footprint) was observed and the binding of relevant transcription factors to this region was confirmed by EMSA. To identify the potential transcription factors that might be governing the silencer activity of this region, we first performed mutations that prevented YY1 binding (at nt -384) in the complete 5'-NCR context. No detectable changes in activity were found in functional assays (data not shown). Computer analysis of this region [32] showed the presence of several potential octamer-binding sites within the -386/-335 fragment. Synthetic oligonucleotides containing the complete or partial sequences (Fig. 2A) were used to identify the associated nuclear factors by standard EMSA. Several protein complexes were observed using nuclear extracts from MHK. The specificity of DNA-protein interactions was tested by pre-incubating the nuclear extracts with a 200-fold molar excess of unlabeled homologous or

heterologous competitors (Fig. 2B). For OL50 a specific competition complex I was observed using the consensus octamer-binding site (Oct-1 oligonucleotide, Material and methods). The same molar excess of the mutated octamer version, Oct-1M, or Sp1 competitors did not affect the complex I. Reverse competition using Oct-1 as end-labeled probe and OL50 (Fig. 2B, right) as competitor confirmed that octamer-binding factors are specifically interacting within this fragment. The oligonucleotides containing shorter sequences, OL40 and OL30, were tested in competition assays as done with OL50, demonstrating that Oct family factors are interacting within this region even in the shorter OL30 oligonucleotide. Only an Oct-1 oligonucleotide (and not Oct-1M) efficiently abolished the formation of the complex I. Based on the intensity of this complex and competition behavior it seems that OL30 has a decreased affinity for the nuclear proteins because of its size. Taken together these data suggested that OL40 is the minimal sequence that contains the necessary space for the optimal complex I formation. The POU domain proteins show high flexibility in the octamer motifs

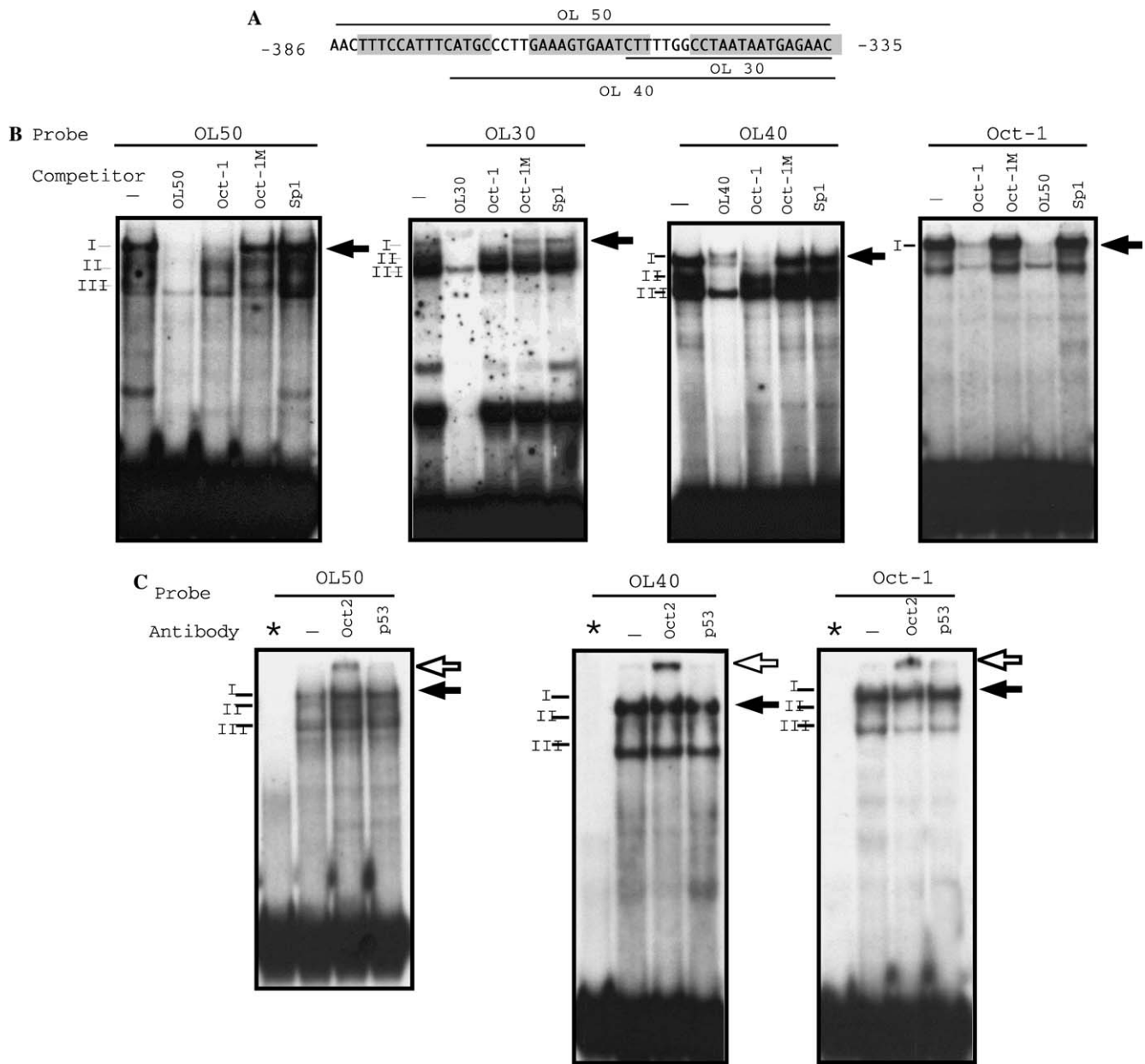


Fig. 2. Oct-2 transcription factor is binding to the SE. (A) OL50 oligonucleotide (complete SE) and the oligonucleotides OL40 and OL30 were used for competitive gelshift assays (B) with 5 µg of total nuclear extracts from MHK and a 200-fold excess of indicated non-labeled competitor. (C) Gel super-shift assays were performed by incubating the indicated oligonucleotides with total nuclear extracts from MHK in the absence (-) or presence of 4 µg of anti-Oct-2 or anti-p53. Black arrows: octamer associated complex; open arrows: Oct-2 super-shifted complex. (\*) Free probe.

recognized for binding, the more degenerated the core sequence is, the more important the flanking bases are for the affinity and the specificity of the binding [33,34]. Additionally, cross-competition was present between OL30, OL40, and OL50 indicating that the same protein recognizes all three sequences (data not shown).

Other reports have implicated POU domain factors as repressors of the *involucrin* gene [17,18]. Co-transfection with several Oct-2 isoforms specifically repressed the activity of the complete 5'-NCR [17]. In order to

identity if Oct-2 is the specific-octamer-binding protein that interacts within the SE, gel super-shift assays were carried out using nuclear extracts of HK. The appearance of a super-shifted complex only after addition of an anti-Oct-2 antibody to the binding mixture confirmed that the octamer sequences in OL40, and OL50, corresponded to the core-binding site for the Oct-2 transcription factor to this region (Fig. 2C). OL50 did not show any super-shifted complex when it was tested with an anti-Oct-1 antibody (data not shown). One

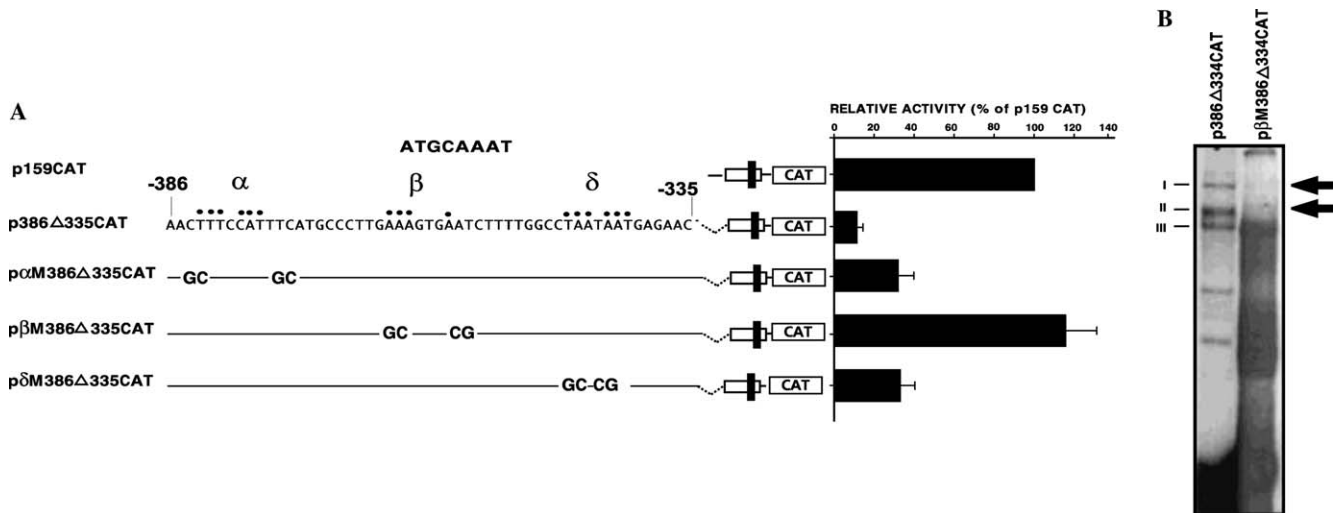


Fig. 3. Loss of complex I binding to OL50 correlates with loss of transcriptional repression. (A) Mutated silencer fragments with 4-bp substitution for each octamer sequence ( $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\delta$ , see Materials and methods) were inserted in p159CAT vector. MHK cells were transfected with 6  $\mu$ g of each vector. Activities are expressed as in Fig. 1. (B) OL50 $\beta$ M probe was generated and labeled by PCR and tested in gelshift assays with nuclear extracts from MHK.

additional oligonucleotide containing the sequences from nt  $-386$  to  $-370$  (sequences left to OL50) was used in gel shift and gel super-shift assays and even when several complexes were observed Oct-1 or 2 antibodies did not produce a super-shift (data not shown).

All together, the results obtained by EMSA, along with our previous deletion analysis of the SE element, support the idea that Oct-2 is binding between nt  $-372$  and  $-335$ . To further evaluate the specificity of Oct-2 binding, several mutations in all possible octameric sequences present in p386 $\Delta$ 335CAT construct were generated. In each octamer, four bases were mutated based on previously reported data [35] as shown in Fig. 3A. The silencer activity of the  $\beta$ -mutant construct p $\beta$ M386 $\Delta$ 335CAT was dramatically affected displaying a robust activity even higher than p159CAT (Fig. 3A). This study underscored the significant contribution of the nucleotides  $-365$ ,  $-364$ ,  $-359$ , and  $-358$  in the octameric core sequences to the silencer activity. In addition, these specific nucleotides in the  $\beta$ -octameric core are necessary for Oct-2 binding to the DNA; since loss of integrity among this sequence clearly prevented the formation of complex I (Fig. 3B). Mutations in the  $\alpha$ -octamer did not show any changes in the formation of the complex associated with Oct-2 (data not shown) and its effect on silencer activity was discrete. Mutations in the octamer have an even more moderated effect on the formation of complex I. All these data suggest that the sequences of the  $\beta$ -octameric core are bona fide Oct-2-binding elements within the SE that might control the silencing of the *involucrin* gene. The identification of these sites is a very important step in understanding the molecular mechanisms underlying *involucrin*-specific gene expression.

#### *SE activity changes during differentiation process in human keratinocytes*

The existence of spatio-temporal changes in the expression levels and distribution patterns of several transcription factors after differentiation induced by calcium has been largely described [13,36–39]. Changes induced by a rise in calcium concentration in cultured keratinocytes resemble several aspects of the *in vivo* epidermal differentiation [6,13,28,39,40]. The human *involucrin* gene becomes activated during keratinocyte differentiation, this is why in order to analyze if the activity of the SE element is stimulated during calcium-induced keratinocyte differentiation we transfected p159CAT, p386 $\Delta$ 335CAT and the construct containing the complete 5'-NCR, p2.6CAT in MHK and treated after transfection with 2mM CaCl<sub>2</sub>. The results obtained showed a robust increase in the activity of the constructs in which the SE is present and repressing the PEP (p386 $\Delta$ 335CAT and p2.6CAT) after differentiation (Fig. 4A), when compared to the activity observed in undifferentiated cells (Fig. 1B). The construct containing the complete Hi 5'-NCR, fully responsive to calcium (p2.6CAT) duplicated its activity whereas PEP activity (p159CAT) did not change as previously described [6]. To analyze whether the changes in the transcriptional activity of the SE element during calcium-induced differentiation were also correlated with a differential interaction of transcription factors to these sequences we performed gel-shift assays with the complete SE sequence (OL50). Significant differences on the protein complexes I and II interacting to the OL50 oligonucleotide were observed along keratinocyte differentiation. Nuclear extracts obtained from HK treated with

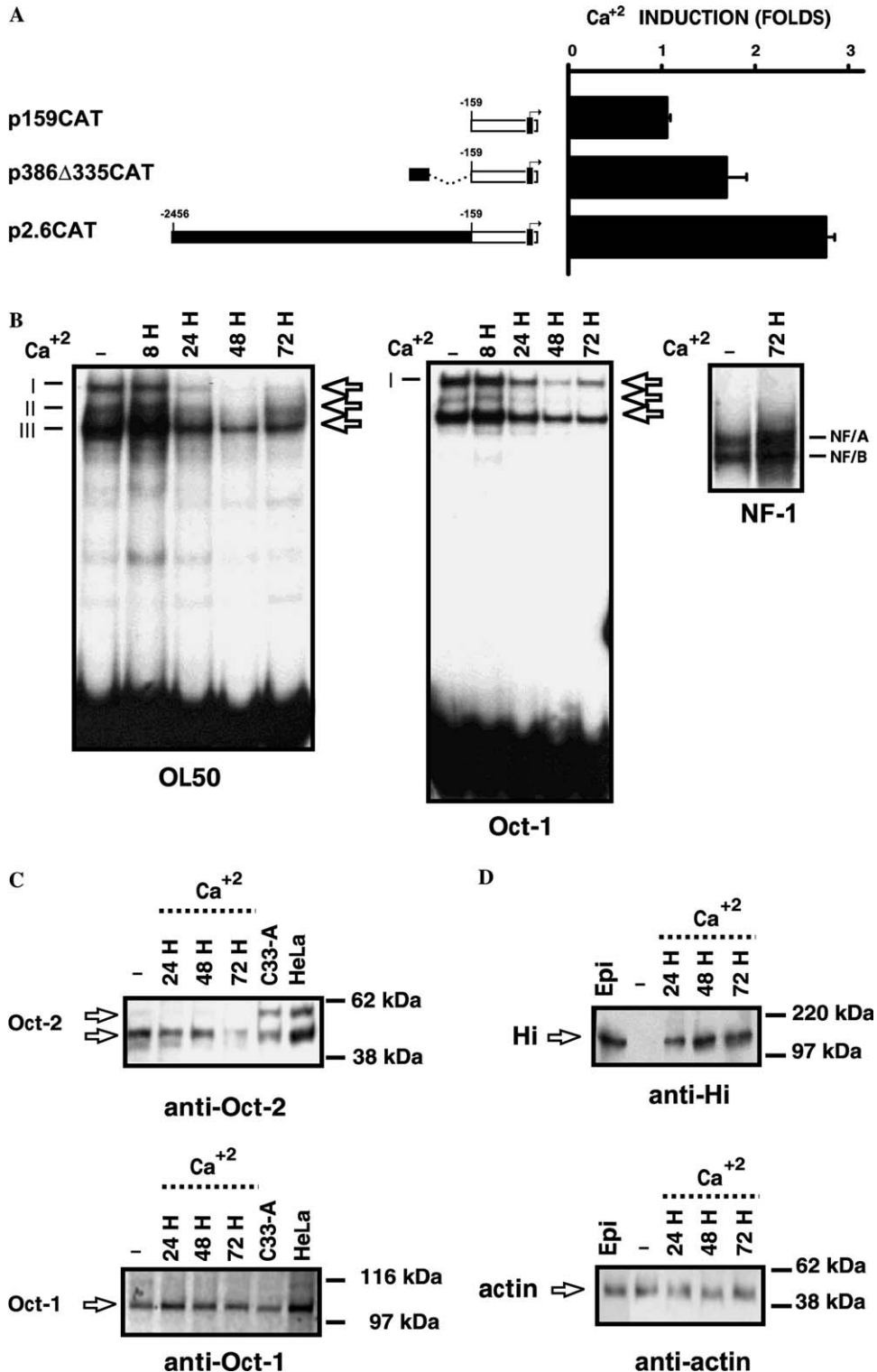


Fig. 4. Activity of the SE in calcium-induced keratinocytes. (A) Indicated constructs were transfected in MHK (6  $\mu$ g of plasmid DNA), cells were treated or not with 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 24 h post-transfection, and harvested 48 h post-treatment. Results are expressed as fold activation relative to the activity of each reporter without treatment. (B) Nuclear extracts from HK (5  $\mu$ g) untreated and treated with CaCl<sub>2</sub> by the indicated times were obtained and used in EMSA with oligonucleotides OL50 (SE), Oct-1, and NF-1. Changes in complexes I, II, and III are noticed for both oligonucleotides (open arrows). (C) Western blot using nuclear proteins (15  $\mu$ g) from HK treated or not (–) with 2 mM CaCl<sub>2</sub>, C33-A and HeLa cells used as a positive control was revealed with anti-Oct-2 or anti-Oct-1 antibodies. Arrows indicate the 90 kDa Oct-1 protein and 49 and 56 kDa Oct-2 isoforms reported before as present in HeLa cells [55]. (D) Western blotting using total protein extracts (22  $\mu$ g) from HK with or without calcium and epidermis used as a positive control for involucrin; Hi arrow indicates the 120 kDa *involucrin* form usually detected in epidermis. Actin detection was used as control. Molecular mass markers shown on the right side.

calcium and harvested starting 8 H after the change in calcium concentration in cell culture media, showed an decrease in the Oct-2 complex with OL50 or Oct-1 consensus oligonucleotide as well (Fig. 4B). To assess that these observed changes were not due to a degradation or loss of stability of the proteins present in our nuclear extracts, as control we used the same extracts with an NF-1 consensus oligonucleotide, in which on the contrary, the appearance of stronger protein complexes was observed during differentiation. This regulation is concordant with a differential expression in Oct-2 that can be noticed by Western blotting of nuclear proteins. Fig. 4C shows that Oct-2 levels decreased as cells are treated with calcium, but Oct-1 protein remains stable. As expected, *involucrin* immunodetection shows a higher expression of the protein after the calcium-induced differentiation process (Fig. 4D).

We then decided to further investigate the effect of Oct-2 on the specific activation of the Hi 5'-NCR after calcium-induced differentiation. We co-transfected the p2.6CAT and p159CAT constructs with a plasmid expressing Oct-2.5 reported as the most active Oct-2 isoform in repressing the complete *involucrin* 5'-NCR [17] and after co-transfection we induced the cells to differentiate with calcium (2 mM). Only p2.6CAT responds positively to calcium induction but its endogenous activity and its response to calcium are repressed in the presence of Oct-2.5 (Fig. 5A). Recovery of the complex I after calcium induction was observed in nuclear extracts only when Oct-2.5 was overexpressed (Fig. 5B). All together indicate that the overexpression of Oct-2.5 was sufficient to repress the activation of the Hi 5'-NCR even

in the presence of calcium, resembling the conditions in which an activation of the p386 $\Delta$ 335CAT was observed (Fig. 4A), indicating a potential specific-role for Oct-2 factors in regulating Hi expression.

In order to obtain additional information about the silencer and its binding proteins, we transfected the p159CAT and p386 $\Delta$ 335CAT constructs in C33-A cells. In this system, the activity of p386 $\Delta$ 335CAT was 75% lower than the activity of p159CAT (PEP element alone), resembling what is happening in keratinocytes. In contrast, when we transfected fibroblasts with the same constructs, their activity was practically the same, indicating an epithelial cell-specific silencing activity (Fig. 6A). To test the effect of Oct-2 overexpression, we co-transfected the *involucrin* gene constructs with the Oct-2.5 expression or empty vectors. In epithelial C33-A cells, repression was reinforced only in the presence of the SE (p386 $\Delta$ 335CAT construct is over 66% less active under Oct-2.5 overexpression). Oct2.5 co-transfection with p159CAT in C33-A did not affect reporter gene activity (Fig. 6A) and also Oct 2.5 did not affect the plasmid activities in fibroblasts. Nuclear extracts from the same cells were prepared and tested with OL50 in EMSA. Complexes I, II, and III are present in both C33-A and MHK, but complex I is less evident in fibroblasts, indicating that in this cell type Oct-2 shows a different binding affinity or it might require to interact with proteins not expressed in fibroblasts (Fig. 6B).

These data strongly suggest that the SE element maintains the *involucrin* gene silent in multiplying human keratinocytes and in other cells that do not express *involucrin*. Oct-2 binding to the SE in an orchestrated

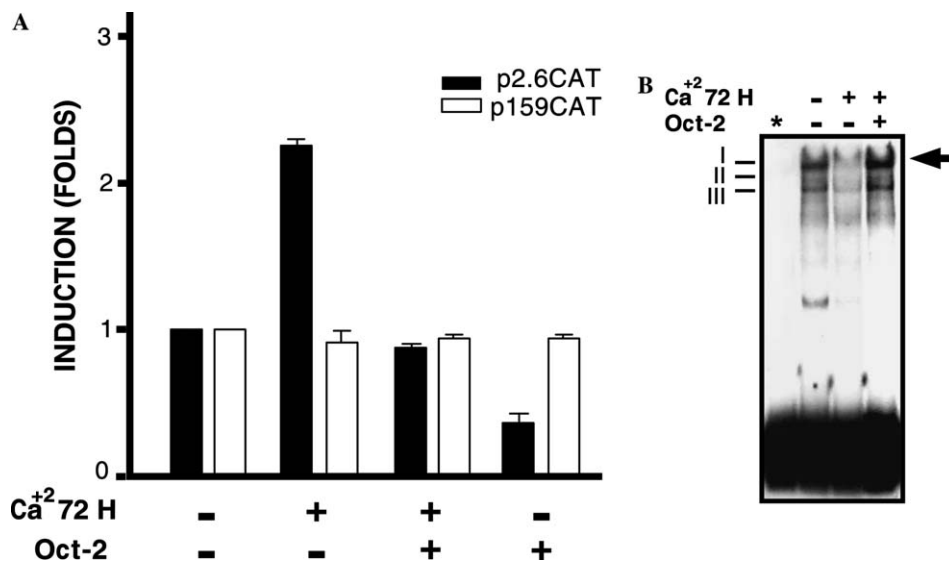


Fig. 5. Oct-2 over-expression repressed the *involucrin* 5'-NCR and counteracts against the positive effect of calcium. (A) MHK were co-transfected with the reporter plasmids p159CAT (open bars) and p2.6CAT (black bars) in combination with the plasmid expressing the Oct-2.5 mice-isoform (+) or pJ7 empty vector (-) (2.5  $\mu$ g each). After transfection, cells were induced to differentiate with calcium when is indicated. (B) MHK transfected with Oct2.5 (+) or the empty vector (-) were treated or not with calcium and harvested 72 h post-transfection to obtain nuclear extracts tested in EMSA with OL50. (\*) Free probe.



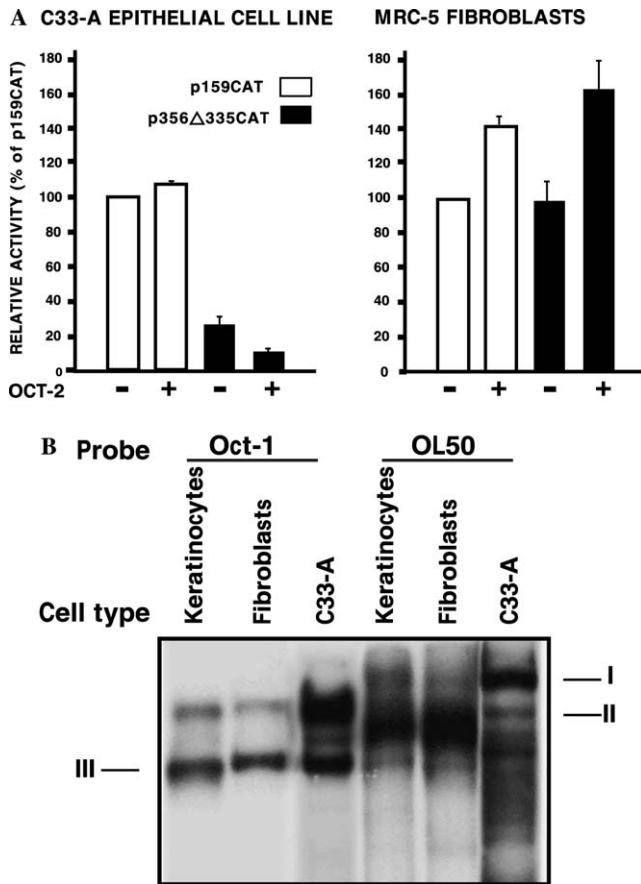


Fig. 6. Oct-2 represses the involucrin promoter depending on the epithelial cells environment. (A) C33-A and fibroblasts were co-transfected with the reporter plasmids p159CAT (open bars) and p386Δ335CAT (black bars) in combination with the plasmid expressing the Oct-2.5 mice-isoform (+) or pJ7 empty vector (-) (2.5 μg each). Reporter gene activity calculations are from at least three independent experiments, harvested 48 h post-transfection. (B) Nuclear extracts (5 μg) from the same cell lines transfected were obtained and tested with either the oligonucleotides Oct-1 or OL50. Changing complexes I and II are indicated on the right side.

manner with still unidentified transcription factor(s) seems to have a crucial repressor role for the regulation of human *involucrin* gene transcription.

## Discussion

In this report, a deletion analysis was employed to localize a silencer element (SE) that may be responsible for maintaining human *involucrin* gene in low transcription levels in multiplying keratinocytes. We also show here that Oct-2 recognized specifically the octamer sequence located between nt -376 and -335, binding that is essential to repress the Hi proximal enhancer promoter activity in epithelial cells. Oct-2 binding seems to be regulated along the differentiation process; there are important changes in Oct-2 complex I formation and protein detection after calcium-switch.

Oct-2 is not activated from a pre-existing inactive form; rather the Oct-2 mRNA and protein are synthesized in neuronal and B-cells, but not in most other cell types. Two important aspects about Oct-2 cell-specific regulation are its interaction with another B-cell-specific factor, OCA-B, and the possible differential regulation through cell-specific alternative splicing [21,41–43]. Interestingly, the Oct-2 protein plays a predominantly inhibitory role in neuronal cells by repressing the expression of artificial promoters containing an inserted octamer motif [44], the Herpes simplex virus immediate-early genes [45], the Varicella Zoster virus immediate early gene 62 promoter [46], and the cellular tyrosine hydroxylase promoter [47]. In this regard, it is of interest that while Oct-2 acts as an activator of immunoglobulin gene expression in B-cells, in neuronal cells Oct-2 appears to repress several genes. Such difference may be attributable to a tissue-specific isoform or association of Oct-2 with another neuron-specific protein which allows it to exhibit a repressive activity.

Oct-2-binding activity has been reported to decrease in after 48 h of calcium-induced differentiation in keratinocytes, suggesting an involvement of Oct-2 in the regulation of Ca-induced genes [48]. Oct-2-binding element within the SE might control the silencing of the *involucrin* gene. The identification of this site is a very important step in understanding the molecular mechanisms underlying *involucrin*-specific gene expression because it has previously been reported that several octamer-binding transcription factors including the Oct-2 factor can repress the *involucrin* gene promoter in keratinocyte cells, but not specific elements that were associated with such effect [18]. Oct-2 factor exists in several different cell-type-specific isoforms with distinct activating or inhibiting effects on gene expression; at high concentrations each Oct-2 isoforms can inhibit the *involucrin* promoter in keratinocytes [17]. In other cell types however, all three isoforms activate the *involucrin* promoter. Furthermore, we notice that Oct-2/SE as an isolated element is differentially responsive in fibroblasts or keratinocytes, suggesting that additional protein-protein cell-type-specific interactions may be required for silencing.

Coincident with the higher expressions of both the *involucrin* and transglutaminase genes there is an increase in the intracellular calcium level [49]. Extracellular calcium raises the intracellular calcium [50] and stimulates keratinocyte differentiation [51]. The expression of the *involucrin* mRNA in human keratinocytes is induced by calcium in a time- and dose-dependent manner [52,53] important for directing the tissue-specific expression of the *involucrin* gene in keratinocytes. The mRNA levels of both *involucrin* and transglutaminase are induced by elevated calcium in the culturing medium [52,54]. The increase in mRNA level is due at least in part to an increase in transcription; therefore, calcium is

important for the transcriptional regulation of differentiation markers such as *involucrin*. The same group had characterized the presence of calcium-dependent elements within *involucrin* gene, reporting that calcium-regulated *involucrin* gene expression is mediated at least in part by AP-1 transcription factors. Several important changes in SE associated proteins were observed here after calcium-switch, significantly the abolishment of the Oct-2 complex I formation and the activation of the human *involucrin* 5'-NCR by overexpression of Oct-2.5 even in the presence of calcium. These data are indicating a potential specific-role for Oct-2 factors in regulating *involucrin* expression, however the presence of additional factors seems to be necessary. All together, our findings suggest a combinatorial input between the Oct-2 transcription factors and cell-type-specific cofactors or activators as AP-1, in conferring a specific regulation of the human *involucrin* gene expression during the differentiation process induced by calcium.

## Acknowledgments

We thank Dr. David S. Latchman (University College London Medical School, London, UK) for the gift of the Oct-2 cDNA expression plasmids, Dr. Vittorio Gallo for critical reading of the manuscript. The technical assistance of Marcia Bustamante and Gerardo Marmolejo is acknowledged. This work was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Grant No. 30579-M to E.L.B. E.A.L. and M.S. were supported by CONACyT fellowships. E.L.B. and P.G. were recipients of a fellowship by the Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

## References

- [1] H. Green, F.M. Watt, Regulation by vitamin A of envelope cross-linking in cultured keratinocytes derived from different human epithelia, *Mol. Cell. Biol.* 2 (1982) 1115–1117.
- [2] F.M. Watt, H. Green, Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells, *Nature* 295 (1982) 434–436.
- [3] J.M. Carroll, K.M. Albers, J.A. Garlick, R. Harrington, L.B. Taichman, Tissue- and stratum-specific expression of the human *involucrin* promoter in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 10270–10274.
- [4] J.M. Carroll, L.B. Taichman, Characterization of the human *involucrin* promoter using a transient beta-galactosidase assay, *J. Cell Sci.* 103 (1992) 925–930.
- [5] J.F. Crish, J.M. Howard, T.M. Zaim, S. Murthy, R.L. Eckert, Tissue-specific and differentiation-appropriate expression of the human *involucrin* gene in transgenic mice: an abnormal epidermal phenotype, *Differentiation* 53 (1993) 191–200.
- [6] E. Lopez-Bayghen, A. Vega, A. Cadena, S.E. Granados, L.F. Jave, P. Gariglio, L.M. Alvarez-Salas, Transcriptional analysis of the 5'-noncoding region of the human *involucrin* gene, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 512–520.
- [7] J.F. Crish, T.M. Zaim, R.L. Eckert, The distal regulatory region of the human *involucrin* promoter is required for expression in epidermis, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 30460–30465.
- [8] E.B. Banks, J.F. Crish, R.L. Eckert, Transcription factor Sp1 activates *involucrin* promoter activity in non-epithelial cell types, *Biochem. J.* 337 (1999) 507–512.
- [9] C. Agarwal, T. Efimova, J.F. Welter, J.F. Crish, R.L. Eckert, CCAAT/enhancer-binding proteins. A role in regulation of human *involucrin* promoter response to phorbol ester, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6190–6194.
- [10] T. Efimova, P. LaCelle, J.F. Welter, R.L. Eckert, Regulation of human *involucrin* promoter activity by a protein kinase C, Ras, MEK1, MEK3, p38/RK, AP1 signal transduction pathway, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24387–24395.
- [11] H. Takahashi, K. Asano, A. Manabe, M. Kinouchi, A. Ishida-Yamamoto, H. Iizuka, The alpha and eta isoforms of protein kinase C stimulate transcription of human *involucrin* gene, *J. Invest. Dermatol.* 110 (1998) 218–223.
- [12] H. Takahashi, H. Iizuka, Analysis of the 5'-upstream promoter region of human *involucrin* gene: activation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *J. Invest. Dermatol.* 100 (1993) 10–15.
- [13] D.C. Ng, S. Shafae, D. Lee, D.D. Bikle, Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the *involucrin* promoter, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 24080–24088.
- [14] J.F. Crish, F. Bone, E.B. Banks, R.L. Eckert, The human *involucrin* gene contains spatially distinct regulatory elements that regulate expression during early versus late epidermal differentiation, *Oncogene* 21 (2002) 738–747.
- [15] J.F. Welter, J.F. Crish, C. Agarwal, R.L. Eckert, Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human *involucrin* promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 12614–12622.
- [16] H. Takahashi, H. Kobayashi, S. Matsuo, H. Iizuka, Repression of *involucrin* gene expression by transcriptional enhancer factor 1 (TEF-1), *Arch. Dermatol. Res.* 287 (1995) 740–746.
- [17] C.M. Chapman, D.S. Latchman, The different alternatively spliced isoforms of the Oct-2 transcription factor repress the *involucrin* promoter in a cell type-specific manner, *Mol. Biol. Rep.* 25 (1998) 253–257.
- [18] J.F. Welter, H. Gali, J.F. Crish, R.L. Eckert, Regulation of human *involucrin* promoter activity by POU domain proteins, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 14727–14733.
- [19] D.S. Latchman, The Oct-2 transcription factor, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28 (1996) 1081–1083.
- [20] C.L. Dent, D.S. Latchman, The overlapping octamer/TAATGARAT motif is a high-affinity binding site for the cellular transcription factors Oct-1 and Oct-2, *Biochem. J.* 277 (1991) 541–545.
- [21] D.S. Latchman, Activation and repression of gene expression by POU family transcription factors, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 351 (1996) 511–515.
- [22] K.L. Cepek, D.I. Chasman, P.A. Sharp, Sequence-specific DNA binding of the B-cell-specific coactivator OCA-B, *Genes Dev.* 10 (1996) 2079–2088.
- [23] M. Gstaiger, O. Georgiev, H. van Leeuwen, P. van der Vliet, W. Schaffner, The B cell coactivator Bob1 shows DNA sequence-dependent complex formation with Oct-1/Oct-2 factors, leading to differential promoter activation, *EMBO J.* 15 (1996) 2781–2790.
- [24] U. Kim, X.F. Qin, S. Gong, S. Stevens, Y. Luo, M. Nussenzweig, R.G. Roeder, The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes, *Nature* 383 (1996) 542–547.
- [25] B. Andersen, M.D. Schonemann, S.E. Flynn, R.V. Pearse 2nd, H. Singh, M.G. Rosenfeld, Skn-1a and Skn-1i: two functionally distinct Oct-2-related factors expressed in epidermis, *Science* 260 (1993) 78–82.
- [26] S. Sebastian, J.A. White, J.E. Wilson, Characterization of the rat type III hexokinase gene promoter. A functional octamer 1 motif is critical for basal promoter activity, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 31700–31706.
- [27] L. Pirisi, S. Yasumoto, M. Feller, J. Doniger, J.A. DiPaolo, Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with

- human papillomavirus type 16 DNA, *J. Virol.* 61 (1987) 1061–1066.
- [28] S.E. Rutberg, T.L. Adams, M. Olive, N. Alexander, C. Vinson, S.H. Yuspa, CRE DNA binding proteins bind to the AP-1 target sequence and suppress AP-1 transcriptional activity in mouse keratinocytes, *Oncogene* 18 (1999) 1569–1579.
- [29] D. Mizuno, Y. Takahashi, T. Hiroi, S. Imaoka, T. Kamataki, Y. Funae, A novel transcriptional element which regulates expression of the CYP2D4 gene by Oct-1 and YY-1 binding, *Biochim. Biophys. Acta* 1627 (2003) 121–128.
- [30] K. Park, M.L. Atchison, Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 9804–9808.
- [31] M.P. Piechocki, R.M. Toti, M.J. Fernstrom, R.D. Burk, R.J. Ruch, Liver cell-specific transcriptional regulation of connexin32, *Biochim. Biophys. Acta* 1491 (2000) 107–122.
- [32] E. Wingender, A.E. Kel, O.V. Kel, H. Karas, T. Heinemeyer, P. Dietze, R. Knuppel, A.G. Romaschenko, N.A. Kolchanov, TRANSFAC, TRRD and COMPEL: towards a federated database system on transcriptional regulation, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 265–268.
- [33] A.K. Ryan, M.G. Rosenfeld, POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes, *Genes Dev.* 11 (1997) 1207–1225.
- [34] C.P. Verrijzer, P.C. Van der Vliet, POU domain transcription factors, *Biochim. Biophys. Acta* 1173 (1993) 1–21.
- [35] U.R. Chandran, B.S. Warren, C.T. Baumann, G.L. Hager, D.B. DeFranco, The glucocorticoid receptor is tethered to DNA-bound Oct-1 at the mouse gonadotropin-releasing hormone distal negative glucocorticoid response element, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 2372–2378.
- [36] K. Hanley, Y. Jiang, S.S. He, M. Friedman, P.M. Elias, D.D. Bikle, M.L. Williams, K.R. Feingold, Keratinocyte differentiation is stimulated by activators of the nuclear hormone receptor PPARalpha, *J. Invest. Dermatol.* 110 (1998) 368–375.
- [37] L.G. Komuves, W.F. Shen, A. Kwong, E. Stelnicki, S. Rozenfeld, Y. Oda, A. Blink, K. Krishnan, B. Lau, T. Mauro, C. Largman, Changes in HOXB6 homeodomain protein structure and localization during human epidermal development and differentiation, *Dev. Dyn.* 218 (2000) 636–647.
- [38] W.I. Al-Daraji, K.R. Grant, K. Ryan, A. Saxton, N.J. Reynolds, Localization of calcineurin/NFAT in human skin and psoriasis and inhibition of calcineurin/NFAT activation in human keratinocytes by cyclosporin A, *J. Invest. Dermatol.* 118 (2002) 779–788.
- [39] S. Yates, T.E. Rayner, Transcription factor activation in response to cutaneous injury: role of AP-1 in reepithelialization, *Wound Repair Regen.* 10 (2002) 5–15.
- [40] K. Hanley, D.C. Ng, S.S. He, P. Lau, K. Min, P.M. Elias, D.D. Bikle, D.J. Mangelsdorf, M.L. Williams, K.R. Feingold, Oxysterols induce differentiation in human keratinocytes and increase Ap-1-dependent involucrin transcription, *J. Invest. Dermatol.* 114 (2000) 545–553.
- [41] D. Liberg, M. Sigvardsson, T. Leanderson, Oct proteins are qualitative rather than quantitative regulators of kappa transcription, *Mol. Immunol.* 34 (1997) 979–986.
- [42] L.M. Corcoran, M. Karvelas, G.J. Nossal, Z.S. Ye, T. Jacks, D. Baltimore, Oct-2, although not required for early B-cell development, is critical for later B-cell maturation and for postnatal survival, *Genes Dev.* 7 (1993) 570–582.
- [43] L.M. Corcoran, M. Karvelas, Oct-2 is required early in T cell-independent B cell activation for G1 progression and for proliferation, *Immunity* 1 (1994) 635–645.
- [44] C.L. Dent, K.A. Lillycrop, A. Bybee, D.S. Latchman, N.S. Thomas, Interferon-alpha treatment of Daudi cells down-regulates the octamer binding transcription/DNA replication factors Oct-1 and Oct-2, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 20888–20892.
- [45] K.A. Lillycrop, C.L. Dent, S.C. Wheatley, M.N. Beech, N.N. Ninkina, J.N. Wood, D.S. Latchman, The octamer-binding protein Oct-2 represses HSV immediate-early genes in cell lines derived from latently infectable sensory neurons, *Neuron* 7 (1991) 381–390.
- [46] Y. Patel, G. Gough, R.S. Coffin, S. Thomas, J.I. Cohen, D.S. Latchman, Cell type specific repression of the varicella zoster virus immediate early gene 62 promoter by the cellular Oct-2 transcription factor, *Biochim. Biophys. Acta* 1397 (1998) 268–274.
- [47] S.J. Dawson, S.O. Yoon, D.M. Chikaraishi, K.A. Lillycrop, D.S. Latchman, The Oct-2 transcription factor represses tyrosine hydroxylase expression via a heptamer TAATGARAT-like motif in the gene promoter, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 1023–1028.
- [48] B. Andersen, W.C. Weinberg, O. Rennekampff, R.J. McEville, J.R. Bermingham Jr., F. Hooshmand, V. Vasilyev, J.F. Hansborough, M.R. Pittelkow, S.H. Yuspa, M.G. Rosenfeld, Functions of the POU domain genes *Skn-1a/i* and *Tst-1/Oct-6/SCIP* in epidermal differentiation, *Genes Dev.* 11 (1997) 1873–1884.
- [49] G.K. Menon, P.M. Elias, Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and normal human epidermis, *Arch. Dermatol.* 127 (1991) 57–63.
- [50] S. Pillai, G.K. Menon, D.D. Bikle, P.M. Elias, Localization and quantitation of calcium pools and calcium binding sites in cultured human keratinocytes, *J. Cell. Physiol.* 154 (1993) 101–112.
- [51] S. Pillai, D.D. Bikle, M.L. Mancianti, P. Cline, M. Hincenbergs, Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium, *J. Cell Physiol.* 143 (1990) 294–302.
- [52] M.J. Su, D.D. Bikle, M.L. Mancianti, S. Pillai, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the keratinocyte response to calcium, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14723–14729.
- [53] D.F. Gibson, A.V. Ratnam, D.D. Bikle, Evidence for separate control mechanisms at the message, protein, and enzyme activation levels for transglutaminase during calcium-induced differentiation of normal and transformed human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 106 (1996) 154–161.
- [54] D.C. Ng, M.J. Su, R. Kim, D.D. Bikle, Regulation of involucrin gene expression by calcium in normal human keratinocytes, *Front. Biosci.* 1 (1996) a16–a24.
- [55] T. Jin, D.R. Branch, X. Zhang, S. Qi, B. Youngson, P.E. Goss, Examination of POU homeobox gene expression in human breast cancer cells, *Int. J. Cancer* 81 (1999) 104–112.

ANEXO 3

Sandoval, M., Morales, M., Ortega, A., P., O.-W., López-Bayghen, E. (2006). Arsenic-induced p53-DNA binding activity in epithelial cells. In J. Bundschuh, M. A. Armienta, P. Bhattacharya, J. Matschullat & M. A.B. (Eds.), *Natural arsenic in groundwaters of Latin America Occurrence, health impact and remediation* (Vol. 1). Rotterdam, Netherlands: A.A.Balkema Publishers, Taylor Francis Books.



# Natural arsenic in groundwaters of Latin America — Occurrence, health impact and remediation

*J. Bundschuh, M.A. Armienta, P. Bhattacharya, J. Matschullat,  
& A.B. Mukherjee*  
*editors*

*Foreword*

*Authors preface*

## **1 ARSENIC OCCURRENCE AND GENESIS IN SEDIMENTARY AND HARD-ROCK AQUIFERS**

5. Using GIS to define As-anomalous catchment basins considering drainage sinuosity

*A.B. Silva*

6. Arsenic in groundwater and sediments from La Pampa Province, Argentina

*P.L. Smedley, H.B. Nicolli, D.M.J. Macdonald & D.G. Kinniburgh*

35. Natural arsenic contamination in the southwestern basin in Sébaco valley, Nicaragua

*M. Altamirano Espinoza & J. Bundschuh*

39. Distribution of arsenic in three geochemical fractions of surface sediments from coastal sites of Sonora, Mexico

*M.E. Jara-Marini & L. García-Rico*

59. Preliminary results on arsenopyrite dissolution kinetics

*J. Cama, M. P. Asta, P. Acero & G. De Giudici*

66. Groundwater arsenic in rural Latin America — Occurrence, Health effects and remediation experiences

*J. Bundschuh, M.E. García, P. Birkle, L.H. Cumbal & P. Bhattacharya*

66b. Arsenic in shallow aquifers of El Llano de Tejera village, Jinotega, Nicaragua: Occurrence, social impact, and mitigation needs

*T. Larios & J. Bundschuh.*

66c The origin of arsenic in waters and sediments from Papallacta Lagoon in Ecuador  
*L. Cumbal, J. Bundschuh, V. Aguirre, E. Murgueitio, I. Tipán & C. Chavez*

74. The abundance of natural arsenic in deep thermal fluids of geothermal and petroleum reservoirs in Mexico  
*P. Birkle & J. Bundschuh*

70. Arsenic distribution in the aquifer system of Salamanca, Mexico  
*H. Hernandez, R. Rodriguez & A. Armienta*

95. Arsenic: Evaluation, contamination, speciation; its environmental incidence in the basin of the Bolivian plateau and in Oruro city  
*J. Quintanilla, O.E. Ramos & H. Medina*

110. Hydrogeochemistry of arsenic in groundwaters from Burruyacú basin, Tucumán Province, Argentina  
*H.B. Nicolli, A. Tineo, C.M. Falcón, J.W. García, M.H. Merino, M.C. Etchichury, M.S. Alonso & O.R. Tofalo*

116. Mineralogical study of arsenic-enriched aquifer sediments at Santiago del Estero, Northwest Argentina  
*O. Sracek, M. Novák, P. Sulovský, R. Martin, J. Bundschuh & P. Bhattacharya*

67. Development of a Geographic Information System for Zimapán municipality in Hidalgo México.  
*E. Ortiz, R. Reséndiz, E. Ramírez, M. Armienta, V. Mugica*

89. Arsenic origin determination by geochemical modeling: Region Lagunera aquifer, Mexico  
*C. Gutiérrez-Ojeda*

33. Arsenic mobilization in aquatic sediments of an impacted mining area, North Central Mexico  
*N. A. Pelallo-Martinez, M.C. Alfaro-De la Torre, R.H. Lara-Castro & J. Castro-Larragoitia*

135. Geogenic arsenic in an Australian sedimentary aquifer: Risk awareness for aquifers in Latin American countries  
*B. O'Shea & J. Jankowski*

## **2 GENERAL OVERVIEW OF ARSENIC IN SELECTED AQUIFERS**

83. Arsenic in a Triassic sandstone aquifer, Castellón, Spain  
*M.V. Esteller, E. Giménez & I. Morell*

133. Arsenic distribution in the Ballia and Ghazipur regions in the central Gangetic plain of Uttar Pradesh, India  
*A.L. Ramanathan, P. Tripathi, M. Kumar & P. Bhattacharya*

134. Occurrence, distribution and time-trend of arsenic in groundwater: a case study from Jhikorgachha Upazila, Bangladesh  
*M. Jakariya, P. Bhattacharya, K.M. Ahmed, M.A. Hasan & S. Nahar*

97. Intermediate to high levels of arsenic and fluoride in deep geothermal aquifers from the northwestern Chacopampean plain, Argentina  
*M.G. García, C. Moreno, M.C. Galindo, M. del V. Hidalgo, D.S. Fernández & O. Sracek*

## **3 ARSENIC IN SOIL, WATER AND PLANTS**

### 3.1 Arsenic in soils

#### 15. Geogenic enrichment of arsenic in histosols

*T.R. Rüde & H. Königskötter*

#### 49. Sorption and desorption behavior of arsenic in a soil

*S. Tokunaga & M.G.M. Alam*

#### 40. Effect of wastewater irrigation on arsenic concentration in soils and selected crops of Irrigation District 03, Hidalgo State, Mexico

*C.A. Lucho-Constantino, H.M. Poggi-Varaldo, L.M. Del Razo, M.E. Cebrián, I. Sastre-Conde, R.I. Beltrán-Hernández & F. Prieto-García*

#### 106. Arsenic determination in soils from a mining zone in the eastern Pyrenees, Catalonia (Spain)

*M.J. Ruiz-Chancho, J.F. López-Sánchez & R. Rubio*

### 3.2 Arsenic in waters

#### 7. The presence of arsenic in drinking water in Latin America and its effect on public health

*M.L. Castro de Esparza*

#### 62. Contamination of drinking water supply with geothermal arsenic in Los Altos de Jalisco, Mexico

*R. Hurtado-Jiménez & J.L. Gardea-Torresdey*

#### 64. Evaluation of water quality of rural community wells of San Juan de Limay (Nicaragua) with pollution scenarios with arsenic

*L. Morales, C. Puigdomènech, A. Puntí, E. Torres, C. Canyellas, J.L. Cortina. & A.M. Sancha*

#### 81. Drinking-water in the province of La Pampa: consequences of arsenic content

*C.J. Schulz & E.E. Mariño*

#### 111. Arsenic determination in well-water from South Chihuahua

*C. Romero-Mendoza, L.A. Manjarrez-Nevárez, R., B. Aguirre-Sáenz, V Nevárez-Moorillon, L.P. Terrazas-Bandala, G. González-Sánchez, J. de Gyves, E. Rodríguez de San Miguel, M.T.J. Rodríguez-Salazar & M.L. Ballinas-Casarrubias*

### 3.3 Arsenic in plants

#### 130. Bioavailability of arsenic species in food: practical aspects for human health risk assessments

*J.M. Laparra, D. Vélez, R. Montoro, R. Barberá & R. Farré*

#### 24. Total and inorganic arsenic concentrations in the water-alga-trout system in the Second Region of Chile

*O. Díaz Sch., R. Pastene O., S. Montes S., N. Núñez S., E. Recabarren G., D. Vélez & R. Montoro*

#### 1. Determination of arsenic content in sea products according to the school meals distribution program (PAE), “Junta Nacional de Auxilio Escolar y Becas (JUNAEB)”, VII Region, Chile

*S. Vilches, G. Andrade, O. Muñoz & J.M. Bastías*

#### 25. Influence of the arsenic concentration in the Loa River water (Chile, II<sup>nd</sup> Region) on the soil and vegetables

*O. Díaz Sch., R. Pastene O., S. Montes S., N. Núñez S., E. Recabarren G., D. Vélez & R. Montoro*

#### 4. Total arsenic content in vegetables cultivated in different zones in Chile

*A.M. Sancha & N. Marchetti*

10. Determination of arsenic content in sea products according to the school meals distribution program (PAE), "Junta Nacional de Auxilio Escolar y Becas (JUNAEB)", VII region, Chile.

*S. Vilches, G. Andrade, O. Muñoz & J.M. Bastías*

58. Assimilation of arsenic into edible plants grown in soil irrigated with contaminated groundwater

*I.M.M. Rahman, M. Nazim Uddin, M.T. Hasan & M.M. Hossain*

85. Investigation of arsenic accumulation by vegetables and ferns from As-contaminated areas in Minas Gerais, Brazil

*H.E.L. Palmieri, M.A.B.C. Menezes, O. Vasconcelos, J. Silva, E. Deschamps & H.A. Nalini Jr.*

105. Arsenic in plant samples from a contaminated mining area

*M.J. Ruiz-Chancho, J.F. López-Sánchez & R. Rubio*

125. Soil-to-leaf Transfer Factor for As in peach (*Prunus persica* L.)

*D.L. Orihuela, J.C. Hernández, R.J. López-Bellido, S. Pérez-Mohedano, L. Marijuán & N.R. Furet*

137. Arsenic uptake and distribution in broccoli, cauliflower and radish plants grown on contaminated soil

*M. Del Río-Celestino, M.I. De Haro-Bravo, R. Font & A. De Haro-Bailón*

36. Arsenic mobility in the rhizosphere of the tolerant plant *Viguiera dentata*

*R. Briones-Gallardo, G. Vázquez-Rodríguez & M.G. Monroy-Fernández*

## 4 TOXICOLOGY AND METABOLISM

48. Survey of arsenic in drinking water and assessment of water intake of arsenic in La Puna, Argentina

*S.S. Farías, G. Bianco de Salas, R., E. Servant, G. Bovi Mitre, J. Escalante, R.I. Ponce & M.E. Ávila Carrera*

63. Chronic arsenicosis in El Zapote, Nicaragua 1994-2002

*A. Gomez*

88. High-As dairy cattle drinking water and its transfer to milk (Cordoba, Argentina)

*A. Pérez-Carrera, C. Moscuza & A. Fernández-Cirelli*

94. Genetic mechanisms of arsenic-induced carcinogenesis

*K.K. Singh & M. Shroff*

98. Early signs of immunodepression induced by arsenic in an infant population

*G.A. Soto-Peña, A.L. Luna, L.C. Acosta-Saavedra, P. Conde-Moo, L. López-Carrillo, M. Bastida, M.E. Cebrián, E.S. Calderón-Aranda, & L. Vega*

100. Evaluation of the human arsenic contamination in the district of Santa Bárbara-MG, Brazil

*N.O.C. Silva, C.A. Rocha, T.V. Alves, E. Deschamps, S.M. Oberdá & J. Matschullat,*

34. Effects of fluoride and arsenic on the central nervous system

*D.O. Rocha-Amador, Y.L. Carrizales, V.R. Morales, M.E. Navarro C. & H.J. Calderón*

13. Neurotoxicity of arsenic

*M.E. Gonsebatt, J. H. Limón-Pacheco, E. Uribe-Querol, G. Gutiérrez-Ospina, V. M. Rodríguez, M. Giordano, L.M. Del Razo & L.C. Sánchez-Peña*

44. Effects of selenium deficiency on diabetogenic action of arsenite in rats.



54. Histological characteristics of sural nerves in rats exposed to arsenite.

*E. García-Chávez, L.M. Del Razo, B. Segura, H. Merchant & I. Jiménez*

## **5 NATURAL EMISSIONS AND SOCIAL PROBLEMS**

66d. Targeting arsenic-safe aquifers as innovative socially accepted remediation method —What can rural Latin America learn from Bangladesh experiences?

*J. Bundschuh, P. Bhattacharya, M. von Brömssen, M. Jakariya, M.I. Litter & M.E. García*

91. Volcanic pollution of arsenic and boron at Ilopango Lake, El Salvador

*D.L. López, L. Ransom, J. Monterrosa, T. Soriano, F. Barahona & J. Bundschuh*

47. Microbial volatilization of arsenic

*S. Čerňanský, M. Urík & J. Ševc*

118. Epidemiology of physical and social consequences of chronic arsenicosis in India

*A. Sarkar*

131. Arsenic-induced p53-DNA binding activity in epithelial cells

*M. Sandoval, M. Morales, A. Ortega, P. Ostrosky-Wegman & E. López-Bayghen*

80. Mitigation actions as a result of As exposure investigations in Brazil

*E. Deschamps, S.M. Oberda, J. Matschullat, N.O.C. Silva & O. Vasconcelos*

## **6 TREATMENT AND REMEDIATION OF ARSENIC-RICH GROUNDWATER**

### **6.1 Regionally and locally available materials**

14. Feasibility of arsenic removal from contaminated water using indigenous geological materials

*M.A. Armienta, S. Micete & E. Flores-Valverde*

20. Characterization of Fe-treated clays as effective As sorbents

*B. Doušová, A. Martaus, D. Koloušek, L. Fuitová, V. Machovič & T. Grygar*

79. Natural red earth; an effective sorbent for arsenic removal

*M. Vithanage, K. Mahatantila, R. Chandrajith & R. Weerasooriya*

138. Adsorption of As(V) onto goethite: experimental statistical optimization

*M. Alvarez-Silva, A. Uribe-Salas, F. Nava-Alonso & R. Pérez-Garibay*

101. Unacceptability of two-bucket arsenic removal technology in Dhobawra, Bangladesh

*M. Anwar Hossain, Pulok Rema & M. Korban Ali*

### **6.2 Chemical methods**

11. The use of iron-coated light expanded clay aggregates for the removal of arsenic from aqueous solutions in batch and flow conditions

*I. Cano-Aguilera, A.F. Aguilera-Alvarado, G. de la Rosa, R. Fuentes, G. Cruz-Jiménez, M. Gutiérrez, M.L. Ramírez-Ramírez & N. Haque*

104. Subsurface treatment of arsenic in groundwater —experiments at laboratory scale  
*H.M. Holländer, P.-W. Boochs, M. Billib, T. Krüger, J. Stummeyer & B. Harazim*

21. Two-step “in situ” decontamination of mining water enriched with arsenic and iron  
*B. Doušová, T. Brůha, A. Martaus, D. Koloušek, R. Pažout & V. Machovič*

43. Arsenic removal from groundwater using ferric chloride and direct filtration  
*R.G. Fernández, B. Petrusevski, J. Schippers & S. Sharma*

51. Arsenic removal from groundwater by coagulation with polyaluminum chloride and double filtration  
*R.G. Fernández, A.M. Ingallinella & L.M. Stecca*

72. Polymer-supported Fe(III) oxide particles: An arsenic-selective sorbent  
*L.H. Cumbal & A.K. SenGupta*

3. Application of coagulation-filtration processes to remove arsenic from low-turbidity waters  
*A. M. Sancha & C. Fuentealba*

### **6.3 Other technologies**

78. Arsenic in drinking water: An introduction to a novel filtration method  
*T.R. Roth & K.J. Reddy*

19. Arsenic removal by solar oxidation in groundwater of Los Pereyra, Tucumán Province, Argentina  
*J. d'Hiriart & M. del V. Hidalgo, M.G. García, M.I. Litter & M.A. Blesa*

23. Nanotechnology for the environment: arsenic remediation from groundwater by environmentally reactive iron nanoparticles  
*S.R. Kanel & H. Choi*

102. Phytoremediation of arsenic by Sorghum (*Sorghum biocolor*) under hydroponics  
*N. Haque, N.S. Mokgalaka & J.L. Gardea-Torresdey*

84. Potential use of Cyperaceae in arsenic phytoremediation  
*M.T. Alarcón-Herrera, O.G. Núñez-Montoya, A. Melgoza-Castillo, M. H. Royo Marquez & F.A. Rodriguez Almeida*

113. Filter development from low cost materials for arsenic removal from water  
*G. Muñiz, L.A. Manjarrez-Nevárez, J. Pardo-Rueda, A. Rueda-Ramírez, V. Torres-Muñoz, G. Gonzalez-Sánchez & M.L. Ballinas-Casarrubias*

126. A simple electrocoagulation set up for arsenite removal from water  
*P.D. Nemade, S. Chaudhari & K.C. Khilar*

128. Arsenic removal from water of Huautla, Morelos, Mexico using capacitive deionization  
*S. Garrido, M. Aviles, A. Ramirez, C. Calderon, A. Ramirez-Orozco, A. Nieto, G. Shelp, L. Seed, M. Cebrian & E. Vera*

## **7 ANALYTICAL METHODS FOR DETECTION OF ARSENIC**

26. Rapid, clean and low-cost assessment of inorganic and total arsenic in food by visible and near-infrared spectroscopy  
*R. Font, D. Vélez, M. Del Río-Celestino, A. De Haro-Bailón & R. Montoro*

57. Infield detection of arsenic using a portable digital voltameter

*M. Wajrak*

65. The use of synchrotron micro-X-ray techniques to determine arsenic speciation in contaminated soils TTB

*J.L. López-Zepeda, M. Villalobos, M. Gutiérrez-Ruiz, F. Romero, M. Marcus & G. Sposito*

73. Arsenic speciation study using X Ray Fluorescence and Cathodic Stripping Voltammetry

*L.A. Valcárcel, A. Montero, J.R. Estévez & I. Pupo*

## 131. Arsenic-induced p53-DNA Binding Activity in Epithelial Cells

*M. Sandoval, M. Morales, A. Ortega, P. Ostrosky-Wegman & E. López-Bayghen*

Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN. México DF, México

Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico, DF. México.

### INTRODUCTION

Arsenic, a ubiquitous element, has represented a human health concern for centuries. The contamination of water supplies with this element has resulted in a very high incidence of skin

Exposure to arsenic (As) is associated with an increased incidence of skin pathologies as hyperkeratosis and cancer. As effects include genotoxicity, cell-proliferation changes, alterations in DNA repair and methylation patterns. Proliferation and differentiation coordinated expression of structural and regulatory proteins, is probably lost in arsenic-associated-skin pathologies. We evaluated whether the changes in epithelial cells including human keratinocytes after arsenic exposure, are mediated through modifications in the activity of the tumor suppressor p53, a potent mediator of responses against genotoxic damage, and a pivotal proliferation-controller. We tested if arsenic modulates the abilities of p53 as a transcription factor in epithelial cells treated with, increasing concentrations of sodium arsenite for up to 24h. DNA-binding assays were performed using a p53-consensus sequence. A time and dose-dependent response in p53-DNA binding occurs under arsenic exposure, favouring the notion that p53-regulated genes are important to understand modifications in the proliferation-differentiation balance severely impaired during skin carcinogenesis.

lesions and cancers as demonstrated in a large amount of epidemiologic studies (Vega et al. 2001). Benign skin lesions related to chronic arsenic exposure act as early warning signals, including hyperpigmentation and hyperkeratosis (Chen et al. 1985). The molecular mechanisms underlying arsenic carcinogenicity have begun to be explored, noticing exposure-associated effects over genotoxicity, cell proliferation changes and altered DNA repair, but the exact mechanism in cancer development is still poorly understood (Tondel et al. 1999).

In response to genotoxic stress and DNA damage, the levels of the tumor suppressor protein p53 are increased (Colman et al. 2000). This protein mediates genotoxic stress responses and has been regarded as a key element in maintaining genomic stability (Appella and Anderson 2001). There is controversy of the pathways involved in p53 activation, although Ser15 p53 phosphorylation through the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) is critically involved in its interaction with the transcriptional machinery (Woo et al. 1998). Phosphorylated p53 accumulates in the nucleus and transactivates a number of key genes involved in DNA repair processes and cell proliferation.

Our current knowledge of p53 response after arsenic exposure is variable. Depending on cell type, previous p53 stage and timing responses are different (Salazar et al. 1997; Hamadeh et al. 1999; Hamadeh et al. 2002; Hernandez-Zavala et al. 2005). Particularly, the role of p53 as gene activator has been barely explored. In this contribution, we characterized the biological DNA binding activity of this transcription factor when epithelial cells are exposed to sodium arsenite in varying times and doses. We found marked differences in p53-DNA binding depending on the dose and exposure periods.

## MATERIALS AND METHODS

### *Primary Keratinocyte Cultures.*

Primary cultures from neonatal human foreskin keratinocytes were obtained as described before (Pirisi et al., 1987) and grown in KSFM medium (Life Science Technologies), with the appropriate antibiotic mix at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cultures medium was replaced every 2 days.

### *Cell lines culture and cell proliferation assay.*

HeLa cells (HPV18 positive adenocarcinoma derived cell line) and C33-A (HPV negative cervical carcinoma derived cell line (Yee et al., 1985) were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen Gaithersburg, MD) supplemented with 10% fetal calf serum, with the appropriate antibiotic mix at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Culture media was replaced every two days.

Cell viability was measured by the MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay, performed as first described by Mosmann (Mosmann, 1983). After incubation of the cells with the MTT reagent (1mg/ml) for approximately 4 h, an isopropanol: HCl solution was added to lyse the cells and solubilize the colored crystals. The samples were analyzed with an ELISA plate reader (wavelength of 630 nm) Opsys MR (Dynex Technologies).

### *Arsenic Treatment.*

An aqueous sterile stock solution of sodium arsenite (10 mg/ml) was prepared and appropriate volumes were diluted to obtain the desired final concentrations. Cultures were approximately 80-85% in confluence when treated with various concentrations of sodium arsenite (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 5 µM) for 30 min or 24 h.

### *Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA).*

Nuclear extracts were prepared as described previously (Lopez-Bayghen et al., 1996). All buffers contained complete protease inhibitor cocktail (Boehringer-Mannheim) to prevent proteolysis. Protein concentration was measured by the Bio-Rad protein assay system. Nuclear extracts (15-20 µg) from epithelial cells were incubated on ice with 1 µg poly (dI-dC) as non-specific competitor (Pharmacia Biotech) and 1 ng of <sup>32</sup>P-labeled double oligonucleotide corresponding to the p53 response elements identified in p53-regulated genes as p21 (Gohler et al., 2002), for 10 min (5'-CTAGTACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGGACT-3') or the AP-1/SV40 probe (5'-CTAGRATAATATGACTAAGCTGTG-3'). The reaction mixtures were electrophoresed in a low ionic strength 0.5x TBE buffer in 7% polyacrylamide gels. The gel was dried and exposed to an X-ray film.

For competitive studies, the reaction mixtures were preincubated with different amounts of indicated unlabeled competitor oligonucleotides, including the oligonucleotide SP1 (5'-CTAGATTTCGATCGGGGCGGGCGA -3'), as a heterologous competitor, before adding labeled DNA.

## RESULTS

Changes in p53 levels are associated with arsenic exposure in several cell lines. As a transcription factor, one of the first activities performed by p53 after genotoxic or stress damage is to activate the transcription of several downstream promoter targets such as p21 (Kim, 1997; Liu et al., 2003; Saramaki et al., 2006). In order to do so, its ability to recognize a specific DNA sequence in DNA is dramatically increased both through phosphorylation and its nuclear accumulation. Using the p53 recognition sequence from p21 promoter as a probe, we explored p53-DNA binding activity after arsenic exposure. In Figure 1 a comparison of the protein-DNA complexes obtained when a p53-labeled probe is tested with nuclear extracts obtained from three different epithelial cells: primary human keratinocytes and the cervical derived C33-A and HeLa cell lines is shown. As can be noticed, the same upper complex is coincident in the three epithelial sources tested, albeit at different abundance. Competition experiments shown in panel B of the same Figure, confirmed the specificity of the p53 complex. Furthermore, we have recently corroborated the identity of this complex in human keratinocytes by immunoEMSA (Sandoval, unpubl).

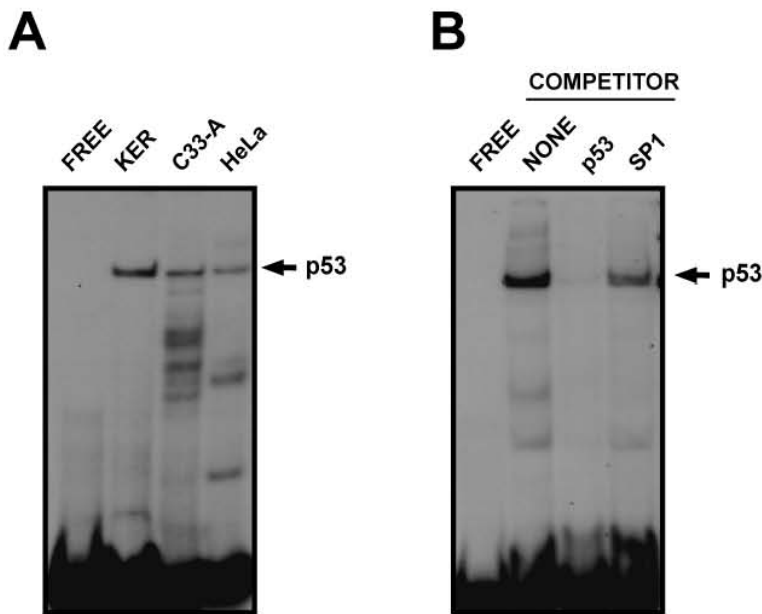


Figure 1. DNA binding comparison in epithelial cells. Complexes obtained using nuclear extracts from normal primary human keratinocytes, C33-A or HeLa carcinoma cells and p53 <sup>32</sup>P-labeled probe (Panel A). Complex denoted as p53 (arrow) is the only constant complex obtained when different cell batches were tested and also is the specific complex not affected by heterologous competitors as SP-1 (Panel B). FREE, labeled probe alone.

We decided to characterize p53 complex in C33-A cells since in this system, a mutated version of p53 is expressed at higher levels than in HeLa cells. The point mutations present in the p53 version of C33-A cells result in an amino acid change of Arg -\* Cys in codon 273 and it is not involved in the protein-DNA interactions (Scheffner et al., 1991). Responses to As are varied and occur at different regulatory levels. As a first approach we exposed C33-A cells to As for different time periods, using a fixed concentration of 1.5  $\mu$ M. This concentration was used since it has been reported to be equivalent to that present in drinking water in areas where people are endemically exposed (Germolec et al., 1998; Tseng et al., 1968). As depicted in Figure 2, As treatment causes a rapid increase in p53-DNA binding, augmentation that not only it is not sustained, but it is even decreased as compared to control levels after 12 h and continues to lower after 24 h of exposure (60% of original non-treated control, Panel B), raising the possibility of a cytotoxic effect. In order to rule out this possibility, we decided to expose C33-A cells to increasing As concentrations for 24 h and test cell viability by a cell proliferation/MTT assay. The results are presented in panel C of Figure 2. No significant effect of As in terms of cell viability was found. It is interesting that the As effects over p53 are different in the short than the long time.

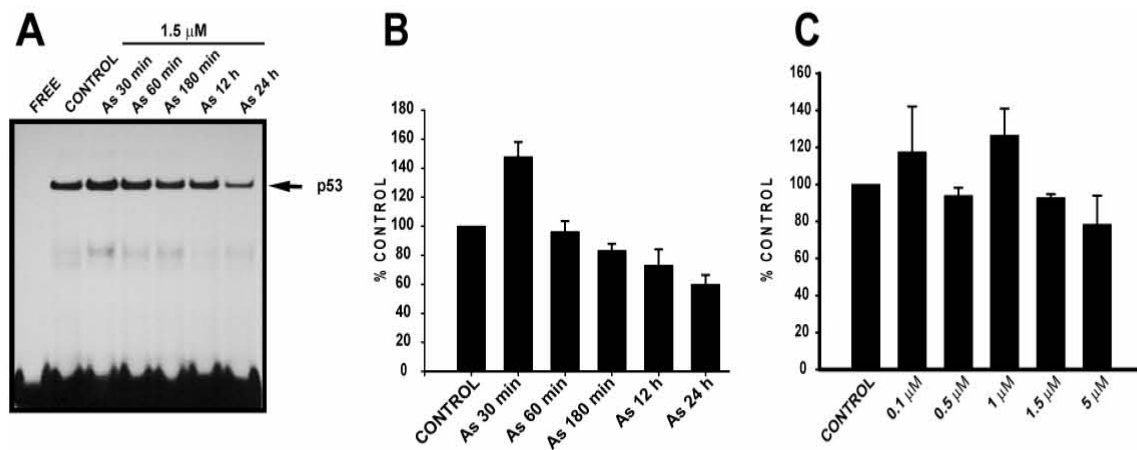


Figure 2. Sodium arsenite exposure changes p53 DNA binding. C33-A cells (90% confluent) were treated with/without sodium arsenite for indicated times and the indicated final concentrations. After treatment completion, cells were harvested and processed for nuclear extracts. Equal amounts of nuclear protein (20  $\mu$ g) were used in DNA binding and resolved in non-denaturing gels. A typical autoradiography is shown (panel A) together with plotted densitometric data (panel B) reflecting the complex intensity. Panel C, C33-A cells viability was assessed by the MTT method, cells were treated with indicated sodium arsenite doses for 24 h, differences are not significant when compared with control in all cases (Student's *t*-test  $p < 0.005$ ). CONTROL, non-treated cells. FREE, probe without nuclear protein added.

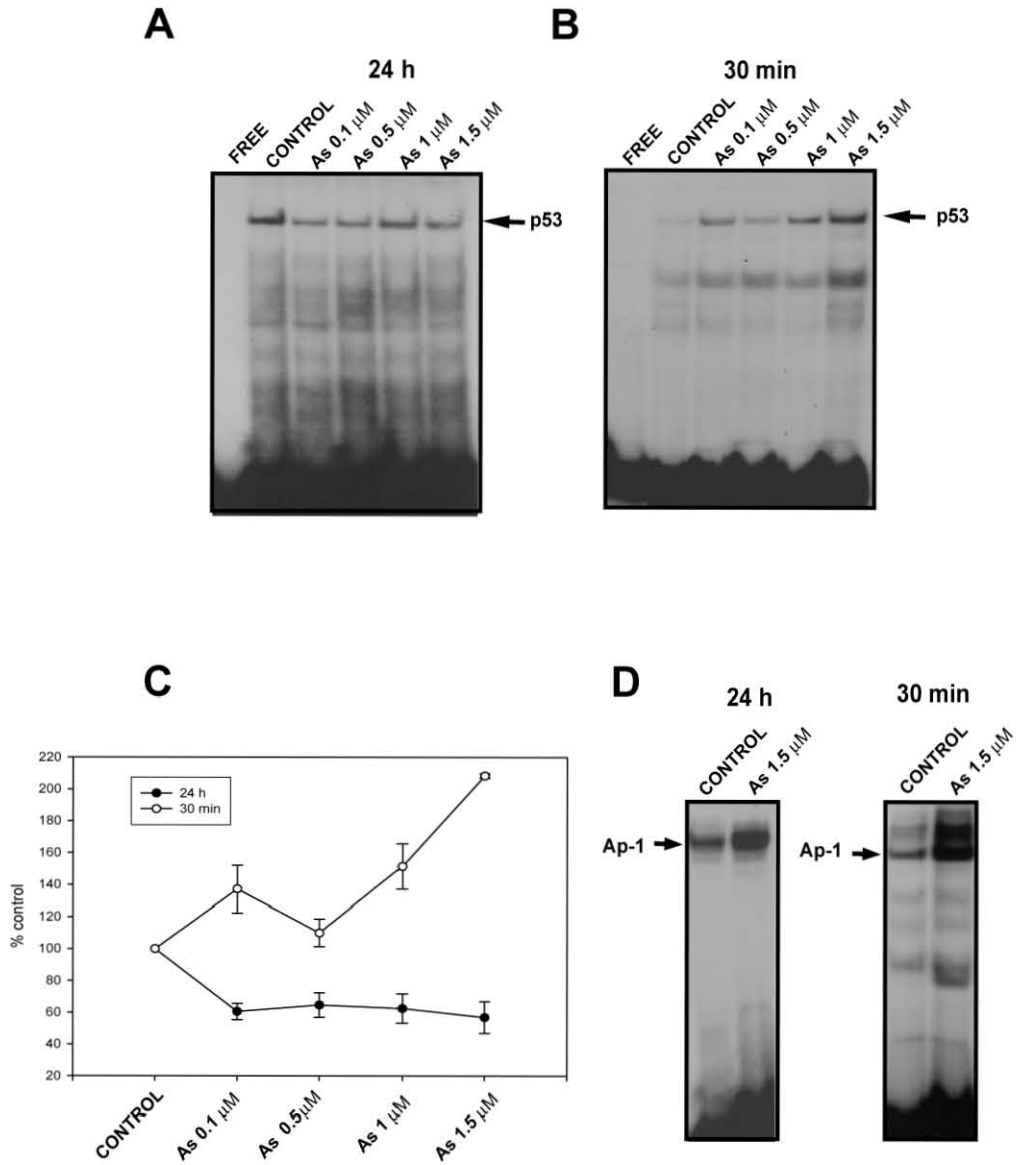


Figure 3. Comparison of effects induced by increasing concentrations of sodium arsenite in p53 DNA binding between short and long exposure times. Cells were treated with increasing sodium arsenite doses for 24 h (Panel A) or for 30 min (Panel B). Exposure time in autoradiography was different between panel A and B in order to obtain an image in which differences with control extracts were better appreciated. Panel C, densitometric analysis of p53 complexes for both times are plotted (data from four independent quantifications). Panel D, same nuclear extracts obtained with cells treated with the highest concentration were used to test AP-1 binding by using an AP-1/SV40  $^{32}\text{P}$ -labeled probe.

To characterize these differences, we exposed C33-A cells to increasing As concentrations for 30 min or for 24 h (Figs. 3a, b respectively). As clearly depicted in the upper panels of Figure 3, long term exposure results in significant decrease in p53-DNA binding activity that has already reached its maximal level at a rather low As concentration (0.1  $\mu\text{M}$ ). In contrast, 30 min of As treatment results in a sustained, dose-dependent increase in p53-DNA binding



activity, that it is not saturated even at 1.5  $\mu\text{M}$ . A detailed comparison of this effect is presented in panel C of Figure 3. Even at low As concentrations, after a while the constant presence of this element maintains p53 unable to bind DNA. Other transcription factors are also activated by As exposure; one of them is AP-1 (c-jun/c-fos). This factor has been widely reported as one of those activated by As in different cell types (Burlinson et al., 1996). As a control we show the complexes associated with AP-1 transcription factor in C33-A cells, using the very same nuclear extracts tested with p53 and the very well characterized AP-1/SV40 probe (Fig. 3d). Clearly, As effect in this case is quite different after 24 h exposure, As induced a strong AP-1 binding, providing evidence that a particular series of events is governing the lowering in p53 binding after a long and continuous exposure to As. These results strongly suggest that a biphasic effect in terms of signal transduction pathways is present upon As exposure, leading in the long term to a decrease in p53-DNA binding activity that might reflect either a degradation of p53 or an export from the nucleus.

## DISCUSSION

Although As is a well known human carcinogen, and that the number of individuals chronically exposed to this element is elevated, the molecular mechanisms by which As induce cellular transformation is far from being deciphered. Mutations that inactivate or alter the function of p53 are present in different human cancers. Mutations in the p53 gene have been similarly detected in a high percentage of colon, breast, lung, brain, and esophageal human cancers (Nigro et al., 1989). When cells are under several kinds of stressors, controlling what happens next mostly relies in p53 activation. It is tempting to speculate that in the short term, p53 is activated in response to As-dependent DNA damage, most likely through Ser15 phosphorylation via DNA-PK resulting in the documented dose-dependent augmentation of the p53-DNA complex (Fig. 3, a and c). In contrast, in the long term, the decrease of the p53-DNA complex (Fig. 3b) might be the result of a MDM-2 induced p53 nuclear export and degradation. This interpretation is favored by the fact that the *mdm-2* gene is transcriptionally activated by p53 (Moll and Petrenko, 2003). This model implies that As-dependent p53 activation drives the transcription of its target genes including p21, cyclin D1, PTEN and *mdm-2* among others (Rocha et al., 2003; Stambolic et al., 2001).

The majority of the transcription factors studied thus far, harbor as a primary property a DNA binding ability that may be changed by several parameters for example, the factor abundance, changes in affinity, competition for binding, sequestration outside the nuclear compartment, etc. Therefore, as a closing approach it is important to characterize if the overall DNA binding is affected under stress conditions like As exposure.

## CONCLUSION

The results presented herein, call for an important role for p53 in the signaling events triggered by the continuous exposure to As. Moreover, provide a molecular platform in which the pathological effects of As in epithelial cells can be ascertained. Work currently in progress in our laboratories is aimed at this objective. In epithelial cells, responses to As damage seem to be different depending on cell previous stage.

## REFERENCES

- Appella E, Anderson CW. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268:2764-2772.
- Burlinson FG, Simeonova PP, Germolec DR, Luster MI. 1996. Dermatotoxic chemical stimulate of c-jun and c-fos transcription and AP-1 DNA binding in human keratinocytes. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 93:131-148.

- Chen CJ, Chuang YC, Lin TM, Wu HY. 1985. Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: high-arsenic artesian well water and cancers. *Cancer Res* 45:5895-5899.
- Colman MS, Afshari CA, Barrett JC. 2000. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res* 462:179-188.
- Germolec DR, Spalding J, Yu HS, Chen GS, Simeonova PP, Humble MC, Bruccoleri A, Boorman GA, Foley JF, Yoshida T, Luster MI. 1998. Arsenic enhancement of skin neoplasia by chronic stimulation of growth factors. *Am J Pathol* 153:1775-1785.
- Gohler T, Reimann M, Cherny D, Walter K, Warnecke G, Kim E, Deppert W. 2002. Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain. *J Biol Chem* 277:41192-41203.
- Hamadeh HK, Trouba KJ, Amin RP, Afshari CA, Germolec D. 2002. Coordination of altered DNA repair and damage pathways in arsenite-exposed keratinocytes. *Toxicol Sci* 69:306-316.
- Hamadeh HK, Vargas M, Lee E, Menzel DB. 1999. Arsenic disrupts cellular levels of p53 and mdm2: a potential mechanism of carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 263:446-449.
- Hernandez-Zavala A, Cordova E, Del Razo LM, Cebrian ME, Garrido E. 2005. Effects of arsenite on cell cycle progression in a human bladder cancer cell line. *Toxicology* 207:49-57.
- Kim TK. 1997. In vitro transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochem Biophys Res Commun* 234:300-302.
- Liu G, Xia T, Chen X. 2003. The activation domains, the proline-rich domain, and the C-terminal basic domain in p53 are necessary for acetylation of histones on the proximal p21 promoter and interaction with p300/CREB-binding protein. *J Biol Chem* 278:17557-17565.
- Lopez-Bayghen E, Vega A, Cadena A, Granados SE, Jave LF, Gariglio P, Alvarez-Salas LM. 1996. Transcriptional analysis of the 5'-noncoding region of the human involucrin gene. *J Biol Chem* 271:512-520.
- Moll UM, Petrenko O. 2003. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 1:1001-1008.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al. 1989. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342:705-708.
- Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA. 1987. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 61:1061-1066.
- Rocha S, Martin AM, Meek DW, Perkins ND. 2003. p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 23:4713-4727.
- Salazar AM, Ostrosky-Wegman P, Menendez D, Miranda E, Garcia-Carranca A, Rojas E. 1997. Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutat Res* 381:259-265.
- Saramaki A, Banwell CM, Campbell MJ, Carlberg C. 2006. Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor. *Nucleic Acids Res* 34:543-554.
- Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5523-5527.
- Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S, Mak TW. 2001. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 8:317-325.
- Tondel M, Rahman M, Magnuson A, Chowdhury IA, Faruquee MH, Ahmad SA. 1999. The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 107:727-729.
- Tseng WP, Chu HM, How SW, Fong JM, Lin CS, Yeh S. 1968. Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 40:453-463.

- Vega L, Styblo M, Patterson R, Cullen W, Wang C, Germolec D. 2001. Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 172:225-232.
- Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, Rancourt DE, Lee PW. 1998. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* 394:700-704.
- Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. 1985. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 119:361-366.

ANEXO 4

Sandoval, M., Morales, M., Tapia, R., del Carmen Alarcon, L., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P., et al., 2007. Regulación de la proteína p53 en células epiteliales expuestas al arsénico: el papel de la cinasa PKB/Akt. ISBN 978-968-9241-03-4 Memoria IV encuentro "Participación de la Mujer en la Ciencia".

ISBN 978-968-9241-03-4 Memoria IV encuentro  
"Participación de la mujer en la Ciencia"



24 MAYO 2007 León, Guanajuato  
25

PATROCINADORES:



IV encuentro  
Participación de la  
Mujer  
en la Ciencia

24 MAYO 2007 León, Guanajuato  
25

CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN ÓPTICA, A.C.

CIATEC

Lise Meitner



IV encuentro  
Participación de la  
Mujer  
en la Ciencia



## REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA p53 EN CÉLULAS EPITELIALES EXPUESTAS AL ARSÉNICO: EL PAPEL DE LA CINASA PKB/AKT

M. Sandoval<sup>1</sup>, M. Morales<sup>1</sup>, L. C. Alarcón<sup>3</sup>, P. Ostrosky-Wegman<sup>2</sup>,  
A. Ortega<sup>1</sup>, E. López-Bayghen<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Depto. de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN. Av. Politécnico Nacional No. 2508. A.P. 14-740, México, D.F. 07000. [ebayghen@cinvestav.mx](mailto:ebayghen@cinvestav.mx)

<sup>2</sup>Depto. de Genética y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. A.P. 70228, México D.F. 04510.

<sup>3</sup>Laboratorio de Citopatología, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México

### RESUMEN

El arsénico inorgánico es un compuesto cancerígeno para el hombre cuyo efecto varía dependiendo del tiempo de exposición, de la concentración y del tipo celular en cuestión. Nuestro objetivo fue explorar los efectos del arsénico sobre la proliferación y la diferenciación en cultivos secundarios de queratinocitos humanos. La activación de p53, la disminución de ciclina D1 y el incremento en la expresión de involucrina coinciden con una inducción de la diferenciación celular en los queratinocitos humanos normales expuestos al arsenito de sodio. Así mismo, hay activación de PKB/Akt que correlaciona con un incremento en la actividad de unión de p53 al ADN. Los efectos del arsenito de sodio en la activación de p53 parecen desencadenar un proceso de diferenciación celular en este sistema epitelial.

### 1. INTRODUCCIÓN

El arsénico es un metaloide carcinogénico para el hombre<sup>1</sup> y uno de los compuestos tóxicos de mayor importancia en nuestro país. La principal vía de exposición a este metaloide es la ingesta de agua proveniente de subsuelos ricos en depósitos minerales, que deriva en serios problemas de hidroarsenicismo crónico en los habitantes y en un serio problema de salud pública en diversas regiones del mundo. La exposición crónica al arsénico se asocia con múltiples alteraciones en diferentes órganos como la piel, el pulmón y el hígado y con el desarrollo de enfermedades neurológicas y diabetes. Frecuentemente, la exposición crónica al arsénico se manifiesta en alteraciones epiteliales como hipocromías, hiperchromías, hiperqueratosis y lesiones ulceradas<sup>2</sup>. Las lesiones pre-malignas como las queratosis arsenicales son el reflejo de células epiteliales (queratinocitos) que muestran alteraciones en los procesos de proliferación y diferenciación celular, comprometiendo el desempeño de su función y conduciendo al desarrollo de cáncer epitelial. Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre arsénico y carcinomas epiteliales como el de células basales, el escamoso y la enfermedad de Bowen (carcinoma de células escamosas *in situ*). Un aspecto esencial es analizar los mecanismos moleculares por los cuales el arsénico induce alteraciones en los procesos epiteliales.

El gen p53 es un supresor tumoral cuya activación ocurre al haber daño al ADN ocasionado por radiaciones, sustancias químicas e incluso especies reactivas de oxígeno. Se ha demostrado su participación en procesos

tales como la reparación del ADN y la muerte celular programada. Estos agentes incrementan los niveles de la proteína p53, induciendo la inhibición del ciclo celular en el borde G1/S y de la síntesis del ADN<sup>3; 4; 5; 6</sup>. Cuando las células se someten a estrés genotóxico los mecanismos celulares que monitorean la replicación del ADN se alteran afectando la segregación de los cromosomas y la división celular. p53 se acumula en el núcleo y es activado como un factor de transcripción que modula la expresión de más de 150 genes, entre los que se encuentran: p21WAF, GADD45, MDM2, IGFBP3 y BAX<sup>7; 8</sup>. Estos genes median un arresto celular en dos puntos de vigilancia, en G<sub>1</sub>, cerca del borde de la fase S, o en G<sub>2</sub>, antes de la mitosis.

En este trabajo reportamos un efecto del arsenito de sodio en la activación de p53 y por ende en los procesos de la proliferación y diferenciación celular usando queratinocitos humanos normales. La proteína ciclina D1 se consideró un marcador de la proliferación celular, mientras que la proteína involucrina humana como un indicador de diferenciación epitelial. Se estudiaron los mecanismos moleculares que regulan la actividad de unión de p53 al ADN y su relación con la activación de cinasas que regulan la proliferación como PKB. La correlación de estos datos nos lleva a pensar en un papel primordial de p53 como amortiguador esencial de los efectos del arsénico.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

**Cultivos Celulares.** Los cultivos primarios de queratinocitos (QHN) fueron obtenidos de prepucios de niños recién nacidos, se crecieron en medio Keratinocyte-SFM (K-SFM Life Technologies, Inc), con 50 mg/lit de extracto de pituitaria bovina, 5 µg/lit de factor de crecimiento epidermoide (EGF), 100 mg/ml penicilina-estreptomicina y gentamicina en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. La inducción de diferenciación se realizó con cloruro de calcio CaCl<sub>2</sub> 2mM durante 24 h.

**Genotoxicidad.** La evaluación del daño genotóxico se realizó mediante la técnica de micronúcleos por bloqueo de citocinesis con citocalasina B<sup>9</sup>. Los cultivos QHN (confluencia del 85%) fueron tratados con citocalasina B (2mg/ml) y con diferentes concentraciones de arsenito de sodio (0.5, 1.0, 1.5 µM), durante 24h. Las células fueron tripsinizadas y fijadas con 600µl de solución fijadora (metanol y ácido acético, 3:1). Se centrifugaron y se resuspendieron en solución fijadora. El resuspendido se depositó en laminillas que se tiñeron con eosina y azul de metileno. La evaluación del daño genotóxico se realizó mediante el conteo al microscopio óptico de 1000 células binucleadas, por duplicado, de dos experimentos independientes y analizando en cada una de las células binucleadas la presencia o ausencia de micronúcleos.

**Ensayo de Inmunodetección en fase sólida.** Los QHN (confluencia del 85%) se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito de sodio (0.1, 0.5, 1.0 y 1.5µM, tiempos indicados). Las células fueron cosechadas y las pastillas se resuspendieron en RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EGTA 1 mM, NaCl 158 mM, NaF 25 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, M<sub>a2</sub>M<sub>o</sub>O<sub>4</sub> 1 mM y PMSF 1 mM) para obtener los extractos totales. La concentración de proteína total fue determinada mediante el método de Bradford. Cantidades normalizadas de extractos totales en solución de carga (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8, SDS 6%, 2-mercaptoetanol 300mM, azul de bromofenol 0.3% y glicerol 30%) se hirvieron y fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% en condiciones desnaturalizantes. Los geles se transfirieron a membranas de Polivinilideno di-fluoruro (Bio-Rad). Los sitios irrelevantes se cubrieron por incubación de las membranas a una solución de bloqueo (leche descremada 5%, Tween-20 0.1% en TBS). Posteriormente las membranas se expusieron a los anticuerpos anti-p53 (sc-126), anti-ciclina D1 (sc-717), anti-involucrina (sc-21748), anti-p-AKT (sc-7985), anti-p-GSK-3β (sc-11757) y anti-β-actin (sc-32251). Las membranas se incubaron con anticuerpos acoplados a peroxidasa y las bandas relevantes se detectaron por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

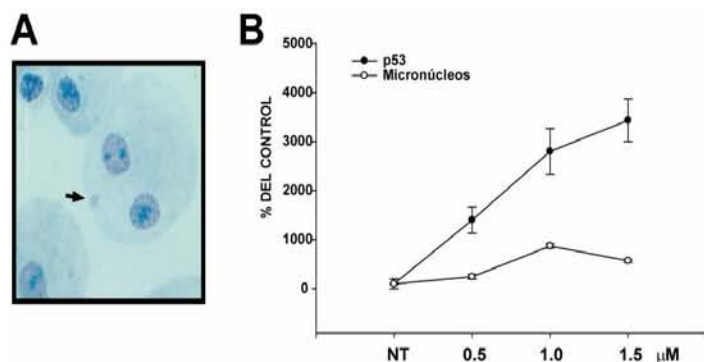
**Ensayos de Interacción ADN-proteína.** QHN en un estado de confluencia del 85%, fueron expuestos a diferentes concentraciones de arsenito de sodio (0.1, 0.5, 1.0 y 1.5µM,) durante 24 h, y a la concentración de 1.5µM durante diferentes tiempos. Los extractos nucleares se obtuvieron mediante la técnica descrita por<sup>10</sup>. Las células se cosecharon utilizando un tampón Tris-Dulbecco (TD) (NaCl 0.7 M, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 mM, Trizma-base 50 mM pH 7.45). La pastilla celular se incubó en buffer A (HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM) durante 15 min, se adicionó NP40 10% y se agitó vigorosamente. El homogenizado se centrifugó y las pastillas obtenidas se resuspendieron en buffer C (HEPES 10 mM pH 7.9, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM), se agitaron durante 30 min a 4 °C. Las muestras se centrifugaron y se obtuvieron los extractos nucleares. El marcaje de los oligonucleótidos de doble cadena se realizó empleando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E.

*coli*. Se marcaron 100 ng de ADN en un volumen final de 10  $\mu$ l, donde se adicionó 1  $\mu$ l de cada nucleótido (10 mM de dGTP, dTTP, dCTP) y 10  $\mu$ Ci de dATP ( $\alpha$ P<sup>32</sup>), así mismo se adicionó 1  $\mu$ l de buffer de marcaje TM 10X (50 mM de NaCl pH 7.6). La mezcla se incubó con 1 U de enzima Klenow (Life Technologies) por 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se diluyó la sonda marcada a una concentración final de 1 ng/ $\mu$ l. La secuencia del oligonucleótido de doble cadena empleado como elemento de respuesta para p53 en gen p21 WAF es: 5'-CTAGTACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGGACT-3'.

**Inmunohistoquímica.** Cortes epiteliales se tiñeron con los anticuerpos anti-p53, anti-involucrina y anti-PCNA, usando Peroxidasa-Estreptavidina-Biotina DAB (ImmunoDetector HRP/DAB, BIO SB, Inc, Santa Barbara, CA). Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, las laminillas se trataron con 0.3 % de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 15 min. Las laminillas se trataron con tampones de citrato (10 mM, pH 6) y se incubaron con los anticuerpos durante 40 min a temperatura ambiente. Se enjuagaron en tampón salino Tris y se incubaron con el anticuerpo secundario biotina-marcada y peroxidasa-biotina-estreptavidina. Como sustrato se empleo 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloride (DAB) al 0.05%. Las laminillas se contratiñeron suavemente con hematoxilina Mayer's, fueron deshidratadas y montadas en medio de montaje Entellan (Merck). Se examinaron bajo campos de luz Zeiss Axioscope 40 microscopio y empleando el programa Axiovision (Carl Zeiss, Inc. Thornwood, NY), con una magnificación de 40X.

### 3. RESULTADOS

**El aumento de p53 correlaciona con el daño genotóxico en respuesta al NaAsO<sub>2</sub>.** La genotoxicidad ejercida por el arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>) fue evaluada detectando micronúcleos en el citoplasma de los QHN expuestos a concentraciones crecientes de NaAsO<sub>2</sub> (Fig. 1A). Al realizar el conteo y registro de los micronúcleos observamos que a partir de la concentración 0.5  $\mu$ M, se observó un aumento pero se presenta el mayor número a una concentración de 1  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> (Fig. 1B). Nuestro siguiente objetivo fue evaluar el efecto del NaAsO<sub>2</sub> sobre la inducción de la proteína p53. Los resultados de la inmunodetección mostraron que los niveles de p53 aumentaron en forma dependiente de la dosis; a partir de 0.1  $\mu$ M el nivel de la proteína aumentó significativamente con respecto al control (Fig. 1B).



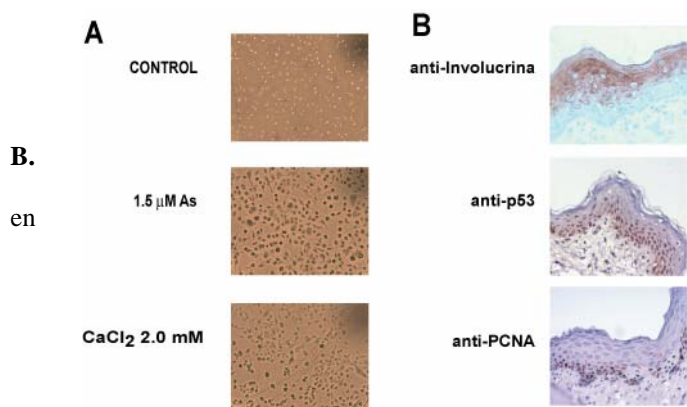
**Figura 1. El arsenito de sodio genera efectos genotóxicos e induce a p53 en QHN.** A. Imagen de una célula binucleada que contiene un micronúcleo en el citoplasma (1  $\mu$ M, NaAsO<sub>2</sub>, 48 h). B. Frecuencia de aparición de micronúcleos registrada en 1000 células binucleadas por tratamiento. Los niveles de la proteína p53 fueron evaluados mediante inmunodetección en fase sólida durante 24 h.

**El NaAsO<sub>2</sub> induce cambios relacionados con el proceso de diferenciación celular en los QHN.** Observamos que el tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> induce cambios morfológicos en los QHN que semejan la inducción de un estado de diferenciación celular (Fig. 2A). Las imágenes muestran que en QHN tratados con NaAsO<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ M el cambio morfológico es similar al observado cuando la diferenciación se induce con CaCl<sub>2</sub>, 2 mM (Fig. 2A). Adicionalmente, realizamos ensayos de inmunohistoquímica para determinar si la expresión de p53 está relacionada con la diferenciación epitelial normal y notamos un incremento en la detección de p53 en las mismas capas en las que se detecta la proteína estructural epitelial Hi (Fig. 2B). Considerando que Hi es un marcador muy temprano de diferenciación epitelial, estos datos indican una posible relación entre p53 y la diferenciación epitelial. Con estos resultados en mente ahondamos en los efectos del NaAsO<sub>2</sub> sobre la activación de p53. Los resultados en la Fig 3A muestran que la actividad de unión de p53 al ADN es inducida por el NaAsO<sub>2</sub> en QHN. Uno de los principales mecanismos de acción de p53 es su activación como un factor

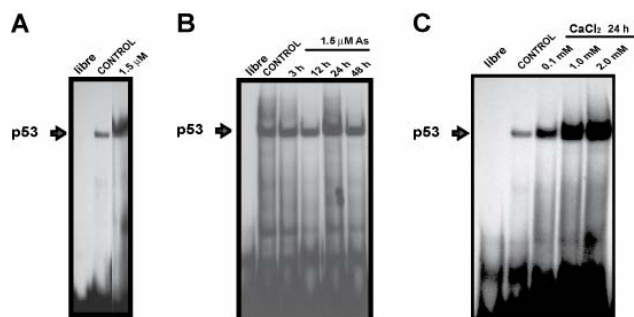


de transcripción. En nuestro caso, la activación incrementa su unión al ADN pudiendo de esta forma regular la expresión de genes blancos como p21WAF.

Se sabe que los gradientes de calcio en la epidermis tienen un papel importante en la regulación del proceso de diferenciación<sup>11</sup>. El calcio podría también modular la actividad de unión de p53 al ADN en las células epiteliales<sup>12</sup>. Cuando los QHN fueron expuestos a diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> durante 24 h, los ensayos de unión al ADN (EMSA) mostraron claramente que CaCl<sub>2</sub> favorece la unión de p53 a su secuencia consenso (Fig 3C), mismo comportamiento que se observó cuando se empleó NaAsO<sub>2</sub>.



**Figura 2. El arsenito de sodio induce cambios relacionados con el proceso de diferenciación celular en los QHN.** A. Cambios morfológicos inducidos por el arsenito de sodio (1.5μM, durante 24 h). Mediante inmunohistoquímica se detectó la expresión de involucrina humana (Hi) y p53 las capas supra-basales. La detección de PCNA se empleó como control de proliferación.



**Figura 3. Efecto del arsenito de sodio en la actividad de unión de p53 al ADN en los QHN.** Ensayos de retardamiento (EMSA) realizados con la sonda p53 y extractos nucleares de QHN tratados como se indica. A. NaAsO<sub>2</sub>, 1.5μM, durante 24 h.

Para determinar los efectos del NaAsO<sub>2</sub> sobre proliferación y diferenciación exploramos estos aspectos mediante la determinación de marcadores como ciclina D1 e involucrina, así como la determinación del índice nuclear. Otro marcador importante en el manejo de la proliferación por parte de la célula es la activación de la cinasa PKB/AKT detectada en condiciones de tratamiento con NaAsO<sub>2</sub>. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla 1.

MECANISMO	EFEECTO	MÉTODO
Proliferación celular Ciclina D1	Disminución Disminución	Índice Nuclear Inmunodetección Fase sólida
Involucrina Humana	Incremento	Inmunodetección Fase sólida
Activación de p53	Incremento	Inmunodetección Fase sólida
Complejo p53-ADN	Incremento	EMSA
Cinasa PKB/Akt	Activación	Inmunodetección Fase sólida

Tabla 1. Efectos del tratamiento con As (1.5 μM) en QHN en cultivo (24 h).

#### 4. DISCUSIÓN

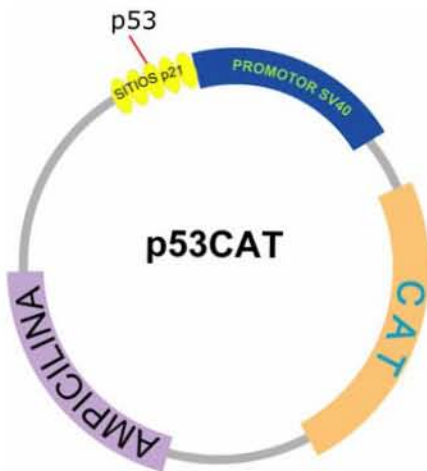
La valoración del daño genotóxico producido por el arsénico y la exploración de diferentes marcadores moleculares en los sistemas celulares constituyen una herramienta útil en el pronóstico de cambios neoplásicos epiteliales. En QNH el NaAsO<sub>2</sub> produjo daño genotóxico (micronúcleos) y fue capaz de activar a p53 y favorecer su unión a una secuencia específica en el ADN (Fig. 1 y 3). Los resultados también nos revelan que el calcio tiene un papel importante en la actividad de unión de p53 al ADN y que este incremento puede indicar que parte del efecto del NaAsO<sub>2</sub> deriva del aumento en las concentraciones intracelulares de calcio promoviendo un estado diferenciado de las células. Varios marcadores de diferenciación son inducidos normalmente en estas condiciones cuando los queratinocitos se diferencian en forma natural o en cultivo<sup>11;13</sup>. Encontramos aquí que uno de ellos, la involucrina aumenta en presencia del arsénico inorgánico (Tabla 1). Experimentos adicionales mostraron cambios notables en parámetros indicadores de proliferación y de diferenciación en los QNH expuestos al arsenito de sodio durante 24 h. La Tabla 1 junto con los resultados de las inmunohistoquímicas de la Fig. 2 muestran que existe una correlación entre la activación de p53 y el aumento en la expresión de involucrina, indicativos de que se ha iniciado un proceso de diferenciación. Concomitantemente, hay menor proliferación celular (disminuye el índice de proliferación nuclear) y una menor expresión de un marcador de proliferación como la ciclina D1. Datos adicionales obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que esta respuesta normal de activación de p53 en células epiteliales puede estar alterada en células con un p53 mutante lo cual puede promover una proliferación celular acelerada.

#### BIBLIOGRAFÍA

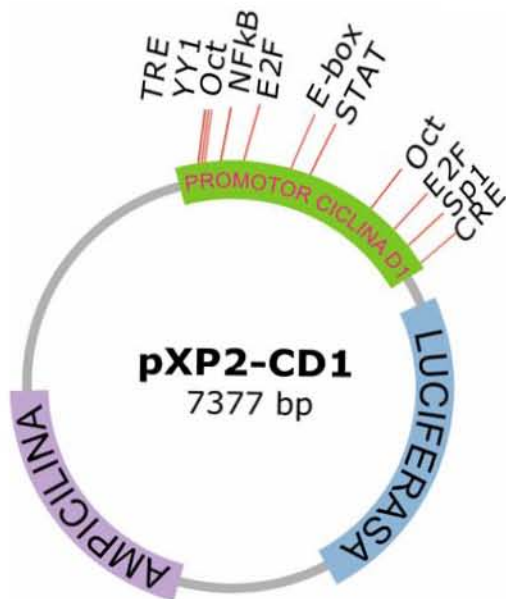
1. IARC, 1987.
2. C.J. Chen, Y.C. Chuang, T.M. Lin, and H.Y. Wu, "Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: high-arsenic artesian well water and cancers". *Cancer Res*, Vol 45, 11 Pt 2, 1985, pp 5895-9.
3. L.A. Donehower, and A. Bradley, "The tumor suppressor p53". *Biochim Biophys Acta*, Vol 1155, 2, 1993, pp 181-205.
4. D.P. Lane, and S. Benichou, "p53: oncogene or anti-oncogene?" *Genes Dev*, Vol 4, 1, 1990, pp 1-8.
5. A.J. Levine, J. Momand, and C.A. Finlay, "The p53 tumour suppressor gene". *Nature*, Vol 351, 6326, 1991, pp 453-6.
6. M.S. Greenblatt, W.P. Bennett, M. Hollstein, and C.C. Harris, "Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis". *Cancer Res*, Vol 54, 18, 1994, pp 4855-78.
7. W.S. el-Deiry, "Regulation of p53 downstream genes". *Semin Cancer Biol*, Vol 8, 5, 1998, pp 345-57.
8. R. Zhao, K. Gish, M. Murphy, Y. Yin, D. Notterman, W.H. Hoffman, E. Tom, D.H. Mack, and A.J. Levine, "Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays". *Genes Dev*, Vol 14, 8, 2000, pp 981-93.
9. M. Fenech, W.P. Chang, M. Kirsch-Volders, N. Holland, S. Bonassi, and E. Zeiger, "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures". *Mutat Res*, Vol 534, 1-2, 2003, pp 65-75.
10. E. Schreiber, P. Matthias, M.M. Muller, and W. Schaffner, "Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells". *Nucleic Acids Res*, Vol 17, 15, 1989, pp 6419.
11. R.L. Eckert, J.F. Crish, E.B. Banks, and J.F. Welter, "The epidermis: genes on - genes off". *J Invest Dermatol*, Vol 109, 4, 1997, pp 501-9.
12. R.C. Goytia-Acevedo, M.E. Cebrian, and E.S. Calderon-Aranda, "Differential effects of arsenic on intracellular free calcium levels and the proliferative response of murine mitogen-stimulated lymphocytes". *Toxicology*, Vol 189, 3, 2003, pp 235-44.
13. E. Lopez-Bayghen, A. Vega, A. Cadena, S.E. Granados, L.F. Jave, P. Gariglio, and L.M. Alvarez-Salas, "Transcriptional analysis of the 5'-noncoding region of the human involucrin gene". *J Biol Chem*, Vol 271, 1, 1996, pp 512-20.

ANEXO 5

Mapas de los plásmidos empleados



Plásmido reportero p53CAT



Plásmido reportero que contiene el promotor de ciclina D1 (humano).