



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA
ACUAGLICEROPORINA 9
POR ARSENITO DE SODIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MANUEL TORRES AVILA

TUTORA

DRA. MARÍA EUGÉNIA GONSEBATT BONAPARTE

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. María Eugenia Gosebatt Bonaparte del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, en colaboración con la Dra. Luz María Del Razo Jiménez de la Sección de Toxicología del CINVESTAV.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Torres

Avila

Manuel

56704152

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

098232956

4. Datos del sinodal 3

Dra.

Rubio

Lightbourn

Julieta

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Arias

Álvarez

Ana Brígida Clorinda

1. Datos del Tutor

Dra.

Gonsebatt

Bonaparte

María Eugenia

Datos del trabajo escrito

Modulación de la expresión de

la acuagliceroporina 9 por

arsenito de sodio

44 p

2007

2. Datos del sinodal 1

Dra.

Fanjul

Peña

María Luisa

3. Datos del sinodal 2

Dra.

Del Razo

Jiménez

Luz María

La ciencia es ante todo un mundo de ideas en movimiento.

François Jacob

Quiero agradecer profundamente a Maricha por permitirme trabajar con una de sus brillantes ideas, por el apoyo sin límites que me proporcionó a lo largo de esta y otras investigaciones, por llevarme de la mano en el sendero de la biología molecular, por creer en mí, por estar cerca en los momentos críticos y difíciles, y porque al final más que mi tutora, ha llegado a ser mi amiga. Gracias.

Gracias a Julieta por ser una consejera constante, por ser tan maravillosa y divertida, por los cafés y las pláticas tan ricas y constructivas (ora de la ciencia, ora de la vida), por apoyarme y por darme la chispa necesaria en los momentos oscuros.

También quiero agradecer a Clorinda por la alegría que me contagió desde que nos conocimos, por su sinceridad y por las observaciones hechas a mi trabajo.

A la Dra. Luzma por el trabajo realizado en la determinación de la distribución de arsénico en los tejidos y por poner tanto cuidado en la lectura del manuscrito y hacer correcciones tan pertinentes y detalladas.

Finalmente quiero agradecer a la Dra. Maria Luisa por la revisión de mi tesis y por su preocupación acerca de hacerla más comprensible para otros estudiantes. Su vocación como docente e investigadora es un ejemplo a seguir.

Agradecimientos

Gracias a mis padres, Carmen y Manuel, por darme todo lo necesario para que se llevara a cabo este trabajo el cual es la culminación de uno mayor y más hermoso. Gracias por la paciencia y la confianza. Gracias por estar a mi lado siempre y por el amor tan grande que me demuestran. Son la doble hélice que guía mi vida.

También quiero agradecer a Penélope, Minerva y Trinidad por estar siempre en mi camino. Su compañerismo, ayuda, cariño, nobleza y sinceridad han sido imprescindibles en mi formación no solo como biólogo, sino como persona. Los botánicos se equivocan y ustedes son la prueba de que hay flores que no se marchitan.

Gracias a todos los TORRES ZARAGOZA y a los AVILA por escuchar mis aventuras extrañas (a veces incomprensibles) en la biología y hacerme parte de su mundo extenso y maravilloso. Con ustedes no necesito a la noche para ver supernovas.

Gracias a los técnicos y colegas del “labo” que me asesoraron de una u otra forma en la técnica.

Agradezco a César, Mariana y Alicia, quienes con su sonrisa y buen ánimo iluminaban mis horas en el labo. Nunca lo supieron pero, ¡Cuanta falta me hicieron al final!

También quiero expresar mi profundo agradecimiento a Perla y a Ana por su sinceridad, su cariño y amistad, únicos en Biomédicas. Son los astros que el azar me puso enfrente al final, cuando más luz necesité. Las quiero mucho.

Finalmente, quiero agradecer al círculo de los perversos (el Pablo, el Haku y el Hapus): parranderos, mujeriegos y críticos implacables, creyentes de la ficción, combatientes burlones y patéticos de la “estupidización masiva”, miembros distinguidos del “discutoscopio” y fanáticos del “perreo con clase”. Gracias por aquella época tan intensa y... emotiva.

Para mi familia: Carmen, Manuel, Trini, Pemple y Mine.

*Cuauhtica ocoloyotica in ninextli in tlatocayotl
(Con trabajos de guerra vine a ser señor)*

Fray Bernardino Sahagún. *Historia general de las cosas de la Nueva España.*

ÍNDICE

	Páginas
Resumen	1
1. Introducción.....	2
1.1 El arsénico.....	2
1.1.1 <i>La problemática con el arsénico</i>	2
1.1.2 <i>El caso del arsénico en México</i>	3
1.1.3 <i>Metabolismo del arsénico</i>	4
1.2 Las acuaporinas.....	7
1.2.1 <i>CHIP28: el principio en la investigación de las acuaporinas</i>	7
1.2.2 <i>Acuaporinas y acuagliceroporinas</i>	8
1.2.3 <i>Propiedades estructurales generales de las acuaporinas</i>	9
1.2.4 <i>Localización, estructura y propiedades funcionales de la acuagliceroporina 9 en mamíferos</i>	10
1.3 Las acuagliceroporinas y el transporte de arsénico.....	13
2. Planteamiento del problema	15
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivo general	17
4.1 Objetivos particulares.....	17
5. Materiales y métodos.....	18
5.1 <i>Protocolo de exposición</i>	18
5.2 <i>Extracción del hígado</i>	18
5.4 <i>Cuantificación de la concentración y pureza del RNA</i>	19

5.5 Integridad del RNA.....	19
5.6 Obtención de cDNA	20
5.7 Diseño de oligonucleótidos y estandarización de condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	20
5.8 Extracción de proteínas y Western blot.....	21
5.9 Cultivos celulares de HepG2.....	23
5.10 Medición de arsénico y sus metabolitos en tejido	23
5.11 Análisis estadístico.....	24
6. Resultados.....	25
6.1. Integridad del RNA de hígado.....	25
6.2 Estandarización de condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.	25
6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa de aqp9 y gapdh	27
6.4 Western blot.....	28
6.5 Expresión de AQP9 en HepG2	30
6.6. Concentración de arsénico en tejido	30
7. Discusión	34
8. Perspectivas	38
9. Bibliografía.....	39

Resumen

El arsénico (As) es un metaloide cancerígeno cuyos mecanismos de acción se desconocen. Recientemente se ha demostrado que la forma trivalente del As (As^{III}) penetra a las células a través de transportadores como las acuagliceroporinas. En hepatocitos se ha demostrado que el As^{III} es capaz de entrar a través de la acuagliceroporina 9 (AQP9). La presente tesis investigó si la exposición al arsenito de sodio era capaz de modular la expresión de AQP9 a nivel de RNA mensajeros y proteínas en un modelo *in vivo* e *in vitro*. Se utilizaron ratones macho CD1 adultos a los cuales se les administraron 0, 2.5, 5 o 10 mg de arsenito de sodio/kg de peso por vía oral durante 1, 3 o 9 días. Se investigaron los niveles de expresión de AQP9 en el hígado por RT-PCR y western blot además de medir la distribución del As y sus metabolitos en el tejido. También se utilizaron cultivos de la línea celular HepG2 los cuales se expusieron a 0, 1 o 5 μ M de arsenito de sodio durante 48 H y se observó la expresión de AQP9 por inmunofluorescencia. Se observó un aumento significativo en la expresión de *aqp9* en ratones tratados con 10 mg de arsenito de sodio/kg de peso durante nueve días. La cantidad de proteína aumentó significativamente en ratones tratados con 2.5 mg de arsenito de sodio/kg de peso. En hepatocitos de ratón el aumento en la acumulación de As^{III} podría explicarse por el aumento en la cantidad de AQP9. En los cultivos de la línea celular HepG2 se observó un aumento dosis-dependiente en la cantidad de AQP9. Así pues, se concluye que el arsenito de sodio es capaz de modular la expresión de AQP9 *in vivo* e *in vitro*.

1. Introducción

1.1 El arsénico

El arsénico (As) es un elemento metaloide que se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre con una concentración media de 2 mg/kg. El As puede existir en cuatro estados de valencia: -3, 0, +3 y +5. Las sales de este elemento tienen una amplia gama de solubilidades en función del pH y de las condiciones iónicas (WHO, 2001). En el medio ambiente, se encuentra combinado con oxígeno, cloro y azufre formando compuestos inorgánicos. En animales y en plantas se combina con carbono e hidrógeno formando compuestos orgánicos. Los compuestos inorgánicos de As se usan principalmente para preservar madera, mientras que los compuestos orgánicos se usan como herbicidas, generalmente sobre plantas de algodón (Agency of Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR-, 2005).

1.1.1 La problemática con el arsénico

Las poblaciones humanas están expuestas a este elemento (Abernathy *et al.*, 1999) en sus formas orgánicas como inorgánicas, a través del ambiente. Ello ocurre por ingerir alimentos contaminados o medicamentos que contienen As como la solución de Fowler* u ocupacionalmente en las refinerías de cobre, oro y plomo; en la producción o el empleo de algunos pesticidas para la agricultura; mediante el uso de pigmentos o colorantes que contienen As; en la manufactura de semiconductores, vidrio, etc. (Chiou *et al.*, 1995). También se ha demostrado exposición alta a este metaloide, cuando se habita cerca de sitios de desechos de minas o en áreas geográficas con subsuelo de roca volcánica que contiene concentraciones altas de As inorgánico (As_i). La vía más común de exposición es a través del agua contaminada del subsuelo con minerales de As, en donde se presenta, principalmente, en forma inorgánica como arsenito (As_i^{III}) o arsenato (As_i^V).

* Solución inyectable que contenía 1% de As_i y que se usaba en el siglo XIX para combatir enfermedades de la piel, leucemia, estomatitis y gingivitis (Valdovinos CF, 2007). También se prescribía como tónico de la salud lo cual generó hemangiosarcoma (Regelson *et al.*, 1968) y angiosarcoma (Lander *et al.*, 1975)

En 1987 la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (*IARC*, por sus siglas en inglés) clasificó al As como un carcinógeno humano. Muchos estudios epidemiológicos han evidenciado la problemática con la exposición al As_i. Se sabe que la exposición crónica a este metaloide en concentraciones bajas, está relacionada con el incremento en la tasa de mortandad por cáncer en el sistema respiratorio, frecuencia a padecer cáncer de cavidad bucal, faringe, pulmón, riñón, intestino grueso, recto y hueso (Enterline *et al.*, 1995). Numerosos estudios también han asociado la exposición crónica al As_i con la prevalencia de cánceres de piel, pulmón, hígado, vejiga, próstata y riñón (Enterline *et al.*, 1995; Chiou *et al.*, 1995; Abernathy *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001); también se ha relacionado con problemas cardiovasculares endocrinos y neurológicos, angiocarcinoma hepático y carcinoma hepatocelular (Abernathy *et al.*, 1999). Además, la exposición a concentraciones altas (~2-4 mg/kg) de As_i puede causar la muerte (ATSDR, 2005).

En el mundo existen muchos sitios en donde el subsuelo tiene concentraciones muy altas de As_i causadas por el enriquecimiento geoquímico natural, la minería y el procesamiento de metales por largos periodos (Bhattacharya *et al.*, 2007). De estos sitios destacan los cada vez mas frecuentes reportes de efectos tóxicos reportados en áreas del sur de Asia, en donde la exposición con As_i ha sido considerado como es el principal desastre ambiental para la salud humana (Bhattacharya *et al.*, 2007). La posible contaminación del agua profunda así como la superficial por el As de los suelos y su entrada a la cadena alimenticia debe ser considerada como un riesgo serio para la salud.

1.1.2 El caso del arsénico en México

En México, los estados de Coahuila, Durango, Michoacán, Baja California Sur, Sonora, Zacatecas, Guanajuato, Puebla, Morelos, Chihuahua e Hidalgo, tienen localidades contaminadas con As_i en el agua de bebida (Méndez y Armienta, 2002). La modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994[†], ha establecido desde

[†] NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

el 2005 como límite permisible de As en el agua, el valor de 0.025 mg/L. Sin embargo, la OMS, la US, EPA y otras normatividades internacionales, incluidas la de lugares de Ibero América, han implementado el valor de 0.010mg/L. Sin embargo, en México existen muchos sitios con concentraciones elevadas de As_i en el agua para el consumo humano (Del Razo *et al.*, 1990; Hernández-Zavala *et al.*, 1998; Méndez y Armienta, 2002). Por ejemplo, en La Comarca Lagunera, Coahuila, se han reportado sitios con concentraciones de hasta 0.624 mg/L, con una media de 0.1 ± 0.12 mg/L (Del Razo *et al.*, 1990). Tan solo en este sitio se estima que 400 000 habitantes de áreas rurales han estado expuestos a concentraciones mayores de 0.05 mg/L. En Hidalgo, la actividad minera que hubo en el pasado ha provocado que en la localidad de Zimapán varios pozos contengan agua contaminada con As_i en concentraciones mayores a 0.437 mg/L (Méndez y Armienta, 2002; Valenzuela *et al.*, 2005). En una información reciente de la Comisión Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2003) informa que existen alrededor de 2, 000,000 de personas en México que beben agua con concentraciones de As mayores a 0.025 mg/L.

1.1.3 Metabolismo del arsénico

Una vez incorporado en el organismo el As_i es transportado hacia el interior de la célula, en donde es biotransformado a especies metiladas por enzimas específicas. Las interacciones moleculares que se llevan a cabo en la célula ocurren en presencia tanto de las especies inorgánicas como de aquellas orgánicas generadas en el interior celular (Thomas, D. J., 2007).

Con respecto a la incorporación de As a las células, se sabe que la bacteria *Escherichia coli* incorpora arsenato a través de dos transportadores de fosfatos, Pit (*Pi transport*) y Pst (*phosphate specific transport*) (Rosenberg *et al.*, 1976; Willsky *et al.*, 1980); la levadura *Saccharomyces cerevisiae* también utiliza diferentes transportadores de fosfatos (Yompakdee *et al.*, 1996; Bun-ya *et al.*, 1996) y, aunque no se ha demostrado, se cree que en mamíferos la incorporación de este compuesto es similar (Rosen, 2002). Por otro lado, se ha demostrado que la entrada a la célula de las especies trivalentes se lleva a cabo a través de las acuagliceroporinas (Meng *et al.*,

2004; Wysocki *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004) y de los transportadores de glucosa (Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006).

Una vez dentro de la célula el As_i es metilado por enzimas específicas. Esta metilación es el principal evento intracelular, crítico para los efectos tóxicos de este compuesto, ya que debido a la metilación oxidante, se generan intermediarios y productos finales que tienen efectos adversos en la estructura y función celulares (Thomas, 2007).

Existen dos esquemas generales que explican la metilación del As_i (Figura 1). Por un lado, se propone que la metilación del arsénico es catalizada enzimáticamente por la arsénico 3-metiltransferasa (AS3MT) en un proceso de óxido-reducción. La otra alternativa propuesta es que la metilación se lleva a cabo con la formación de compuestos arsénico-glutatión como una manera de preservar el estado trivalente del arsénico. En ambas, se propone que la enzima AS3MT es la responsable de la adición de grupos metilo, usando como donador de metilos a la S-adenosilmetionina (AdoMet). Durante el proceso de biotransformación, se lleva a cabo la reducción de los arsenicales por medio de reductores endógenos como el glutatión, el ácido lipoico y el sistema tiorredoxina (Waters *et al.*, 2004). Asimismo, en experimentos *in vitro* se ha demostrado que en mamíferos, las arsenato reductasas catalizan la transformación de arsenato a arsenito y del ácido metilarsónico a ácido metilarsenoso (Zakharyan *et al.*, 1999) aunque el papel *in vivo* de dichas enzimas es controversial.

Finalmente, el As_i inorgánico y sus metabolitos orgánicos son selectivamente excretados de la célula. Se ha propuesto que en mamíferos la acuagliceroporina 9 y el transportador de glucosa 1 (GLUT1) son las vías de excreción tanto del As_i^{III} así como del MMA^{III} (Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006) pero es de destacar que actualmente no se sabe como se excretan las formas di- y tri-metiladas del arsénico. Las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP, por sus siglas en inglés), MRP1 y MRP2, y la MRD1 (p-glicoproteína de resistencia a múltiples fármacos 1), excretan conjugados de arsénico-glutatión, por ejemplo, el As^{III} (GS)₃ (Thomas, 2007).

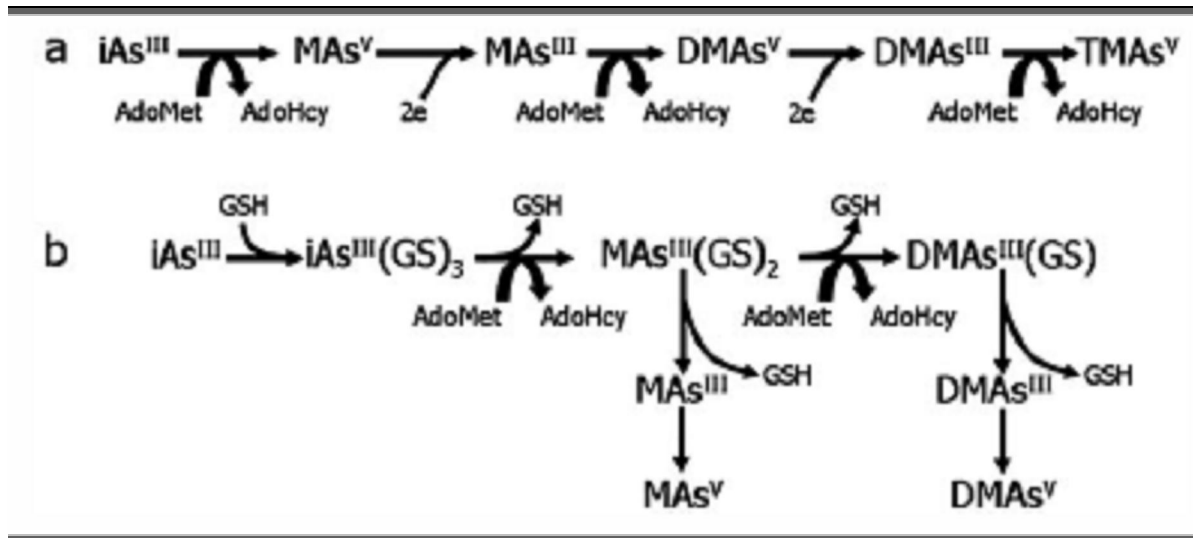


Figura 1. Esquema general para la conversión de arsénico inorgánico (iAs) a sus metabolitos metilados. (a) Esquema para la metilación oxidante en la cual la reducción de especies oxidadas se interpone entre cada reacción de metilación. (b) Esquema para la metilación del arsénico relacionada con la formación de complejos arsénico-glutatión (GSH). AdoMet: S-adenosilmetionina; AdoHcy: S-adenosilhomocisteína. (tomado de Thomas, 2007)

1.2 Las acuaporinas

1.2.1 CHIP28: el principio en la investigación de las acuaporinas

El interior de la célula está constituido principalmente por agua y desde hace mucho tiempo se sabía que ésta podía difundir libremente a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática, aunque también se reconocía que había una tasa límite para esta difusión (Gonen *et al.*, 2006). Una observación interesante era que algunos tejidos presentaban una permeabilidad al agua mayor que otros. Un caso excepcional es el riñón de los mamíferos, en el cual el tubo proximal y el asa descendente de Henle tienen una gran permeabilidad ya que en un riñón adulto se encargan de reabsorber más de 150 litros de agua al día; en contraste, la parte ascendente del asa de Henle y los tubos distales renales tienen muy poca permeabilidad por el agua. Los tubos distales se vacían en los tubos colectores y aquí la estimulación con vasopresina activa e incrementa la permeabilidad por el agua (Agre *et al.*, 1998). Esta observación llevó a formular la hipótesis de que deberían existir proteínas especializadas para facilitar la conducción del agua a través de las membranas biológicas y que contrastaba con la idea muy aceptada de que el agua permeaba libremente a través de los lípidos constituyentes de la bicapa membranal.

En los años 60's se reconocía que la piel de los anfibios tenía una gran permeabilidad al agua y que las células rojas de la sangre presentaban una conductancia muy selectiva al agua y que esta permeabilidad observada era inhibida selectivamente por el cloruro de mercurio, aunque se podía recuperar por el tratamiento con agentes reductores. Así, se creía que debían existir poros en la membrana constituidos por proteínas que tuvieran grupos sulfhidrilo libres, los cuales reaccionarían con el mercurio. Debido a que en aquel tiempo se creía que todas las proteínas de este tipo celular habían sido identificadas, se estableció la idea de que alguna de estas sería el supuesto poro. Sin embargo, todos los experimentos realizados mostraron que no era así. Incluso se expresó GLUT-1 en ovocitos de *Xenopus* para probar la hipótesis de que esta proteína era la responsable de la permeabilidad al agua pero no fue posible detectar una conductancia similar a la encontrada en las células rojas de la sangre. Por otro lado, si se inducía la expresión de mRNA aislado de riñón y eritrocitos en ovocitos

de *Xenopus*, se encontraba un incremento marcado en la permeabilidad al agua; sin embargo, la identidad del poro permaneció sin conocerse.

Fue el grupo del Dr. Peter Agre (Borgnia *et al.*, 1999) quienes lograron la identificación del misterioso poro. Por coincidencia, mientras trabajaban con el antígeno del grupo sanguíneo Rh[‡], en sus electroforesis de proteínas encontraron una banda que migraba a los 30-32 kDa. Observaron que era una proteína abundante y existía como oligómero y se pensó que funcionaba como un canal. La secuenciación de la proteína reveló que pertenecía a la familia principal de proteínas intrínsecas (MIP, por sus siglas en inglés) y la llamaron CHIP28 (por *CHannel-forming Intregral Protein* de 28 kDa). Usando el sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus*, demostraron que esta proteína era el canal de agua en los eritrocitos. Poco después se encontraron proteínas homólogas en mamíferos, plantas y bacterias que transportaban agua y así se decidió acuñar como un término descriptivo el de “acuaporinas, (AQP)” para los miembros de esta familia (Agre *et al.*, 1993). La CHIP28 cambió su nombre y actualmente la conocemos como acuaporina 1 (AQP1).

1.2.2 Acuaporinas y acuagliceroporinas

Las AQP pertenecen a la familia ubicua de las Proteínas Intrínsecas Principales (MIP, por sus siglas en inglés). La familia MIP está compuesta por proteínas membranales que funcionan como canales. Los miembros de ésta se reconocen, principalmente, por la similitud en su secuencia y la presencia de dos motivos asparagina-prolina-alanina (NPA, por su abreviación de una sola letra), pero también por su habilidad de incrementar la permeabilidad al agua y a otras moléculas (como el glicerol y la urea), cuando se expresan en ovocitos de *Xenopus*, o por alterar la permeabilidad osmótica de liposomas cuando son expresadas heterológamente en estos sistemas (Zardoya & Villalba, 2001).

Muchos estudios han revelado la presencia de las AQP prácticamente en todos los seres vivos, desde las bacterias hasta los humanos. Actualmente se conoce la

[‡] El grupo de antígenos Rh de las células rojas de la sangre son llamados así porque son idénticos a aquellos del mono Rhesus (de ahí el Rh, por *Rhesus*). El grupo de antígenos sanguíneos Rh son de gran importancia clínica debido a su papel en enfermedades hemolíticas de los recién nacidos, en las transfusiones y la anemia hemolítica autoinmune (Agre P. *et al.*, 1991).

secuencia, tanto genética como proteínica, de muchas AQP. Hasta la fecha se conocen 13 AQP en mamíferos. De manera muy general, este grupo se puede dividir en 2 subgrupos: aquellas proteínas que transportan agua, las que en sentido estricto son llamadas AQP y, por otro lado, aquellas que además de transportar agua también son permeables a solutos pequeños sin carga, las cuales han sido llamadas acuagliceroporinas. Aún es muy controversial esta clasificación debido a la escasez de datos para algunos miembros de la familia (por ejemplo, la AQP0, AQP11 y AQP12) y también porque depende mucho del parámetro empleado. La mayoría de estas clasificaciones se han hecho principalmente con base en datos experimentales, tomando en cuenta aquellas moléculas que son transportadas a través de cada proteína. Sin embargo, también existen clasificaciones más formales realizadas con base en las secuencias genéticas y proteicas, como la hecha por Zardoya y Villalba en 2001. Ellos reúnen en el grupo de las AQP a las AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 y AQP6; luego, dentro de las acuagliceroporinas están las AQP3, AQP7 y AQP9. Por otro lado, hay que tomar en cuenta que aún no se sabe qué tipo de moléculas pueden transportar las AQP0, AQP11 y AQP12.

1.2.3 Propiedades estructurales generales de las acuaporinas

Diferentes estudios estructurales han revelado que todas las AQP conocidas hasta la fecha comparten la misma arquitectura básica. Son proteínas tetraméricas cuyas estructuras primarias están compuestas por aproximadamente de 250 a 290 aminoácidos, tienen una porción citosólica amino terminal seguida de una porción hidrofóbica de seis hélices transmembranales conectadas por tres asas extracelulares (A, C, E) y dos intracelulares (B, D) (Magni *et al*, 2006). La porción extracelular E y la intracelular B están localizadas en regiones alejadas de la estructura y forman una α -hélice pequeña durante el plegamiento dentro de la bicapa de la membrana delimitando el poro de agua responsable del movimiento del agua y/o los solutos a través de la membrana. Cada monómero tiene una estructura comparada con la apariencia de un reloj de arena y presenta dos motivos asparagina-prolina-alanina (NPA) que forman un cuello central y se traduce en un poro con un diámetro aproximado de 2 Å, el cual es el responsable de la apertura del canal. Estos motivos NPA son esenciales para la

permeabilidad al agua y también sirven como un mecanismo excluyente de protones. La molécula de agua pasa a través del poro rompiendo los puentes de hidrógeno intermoleculares y formando nuevos puentes mediante el oxígeno y las asparaginas 76 y 192 del motivo NPA. Así, la permeabilidad a las moléculas de agua está permitida con una barrera energética mínima (un gran flujo de agua es permitido bajo presión osmótica e hidrostática), mientras los protones son bloqueados (Magni *et al.*, 2006).

1.2.4 Localización, estructura y propiedades funcionales de la acuagliceroporina 9 en mamíferos

La distribución de la AQP9 en el organismo depende de la especie que se estudia y aún es controvertida. Todos los trabajos concuerdan en la presencia de esta proteína en el hígado, específicamente en la membrana sinusoide de los hepatocitos (Rojek *et al.*, 2007; Elkjær *et al.*, 2000; Nicchia *et al.*, 2001; Tsukaguchi *et al.*, 1999). En la rata, Nicchia y colaboradores (2001), así como Tsukaguchi *et al.* (1998), demostraron que se encuentra en hígado, testículos y cerebro. Los experimentos de Elkjær y colaboradores (2000) añaden a la lista anterior el bazo y el epidídimo. En humanos, Tsukaguchi y colaboradores (1999), aseguran que se presenta en hígado, leucocitos y aquellos tejidos donde se acumulan estos últimos: bazo, pulmón y médula ósea. Recientemente, mediante el uso de ratones transgénicos *knockout* para AQP9, se afirma que la proteína se encuentra únicamente en hígado, piel, epidídimo (Rojek *et al.*, 2007) y en leucocitos (Liu *et al.*, 2007).

Actualmente conocemos la estructura a nivel atómico de ocho AQP: las AQP de mamíferos AQP0, AQP1, AQP4 y AQP9; una acuaporina de plantas, la SoPiP2;1; las AQPZ y GlpF pertenecientes a la bacteria *Escherichia coli*; y la AQPM, acuaporina de la arqueobacteria *Methanothermobacter marburgensis*. De todas las proteínas antes mencionadas, únicamente la GlpF y la AQP9, tienen características de acuagliceroporinas. Las diferencias entre las secuencias de las AQP comparadas con aquellas de las acuagliceroporinas también se pueden ver reflejadas en las proyecciones de sus estructuras (Viadiu *et al.*, 2007). Por ejemplo, el mapa de proyección de la AQP9 es más parecido al de la GlpF que al de las AQP0 o AQP1 (Viadiu *et al.*, 2007). El poro que se puede apreciar en el GlpF es parecido al de la

AQP9 y también es más amplio comparado con el de las otras AQP (ver figura 2). Sin embargo, el poro que se aprecia para el GlpF es redondeado con un diámetro aproximado de 7 Å y el de la AQP9 es ovalado y tiene unas dimensiones de 7 Å por 12 Å (Viadiu *et al.*, 2007). Estos mismos autores, proponen que este alargamiento que se observa en el poro de la AQP9 está relacionada con la cara hidrofóbica del poro tripático y podría explicar la permeabilidad que tiene por solutos más voluminosos. Comparando las secuencias de diferentes AQP, se nota que las sustituciones de aminoácidos exclusivos en la AQP9 están cercanas a la abertura del poro permitiendo que solutos más grandes puedan acceder. Finalmente, es probable que se requiera de un cambio en esta región del poro, inducido por el soluto para que éste pueda atravesar.

Existen grupos que han investigado las propiedades funcionales de la AQP9 en la rata y en humanos (Tsukaguchi *et al.* 1998; 1999; Ishibashi *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 1999). Estos trabajos difieren en sus conclusiones respecto al transporte de diferentes solutos. Me enfocaré a los resultados de Tsukaguchi y colaboradores por ser más extensivos y rigurosos. Así, este grupo de investigación concluyó que la AQP9 transportaba una gran cantidad de solutos sin carga y no relacionados, como la urea y la tiourea, polioles (glicerol, manitol y sorbitol), adenina pirimidinas (uracilo y 5 fluoruracilo), ácido úrico, xantina y monocarboxilados como el lactato y el β -hidroxibutírico. El transporte a través de la AQP9 se inhibe con cloruro de mercurio y también con floretina (esto último es una excepción entre otras AQP). Debido a los perfiles de inhibición observados, Tsukaguchi y colaboradores (1998) afirman que tanto el agua como los solutos, comparten una misma ruta transmembranal.

Finalmente, existe información respecto al estado transcripcional y traduccional de la AQP9. Se conoce la secuencia promotora del gen *aqp9* y se ha mencionado que contiene varios sitios de unión a factores de transcripción como AP1, AP2, NF- κ B, HNF3 β , SP1 y C/EBP β (Kuriyama *et al.*, 2002). Además, se sabe que también tiene un elemento de respuesta a insulina (*IRE*, por sus siglas en inglés), el cual influye en la regulación transcripcional del gen (véase Kuriyama *et al.*, 2002; además, Cabrey *et al.*, 2002). De esta forma, la insulina jugaría un papel muy importante en la regulación de *aqp9* y determinaría directamente la cantidad de AQP9 expresada en el hígado.

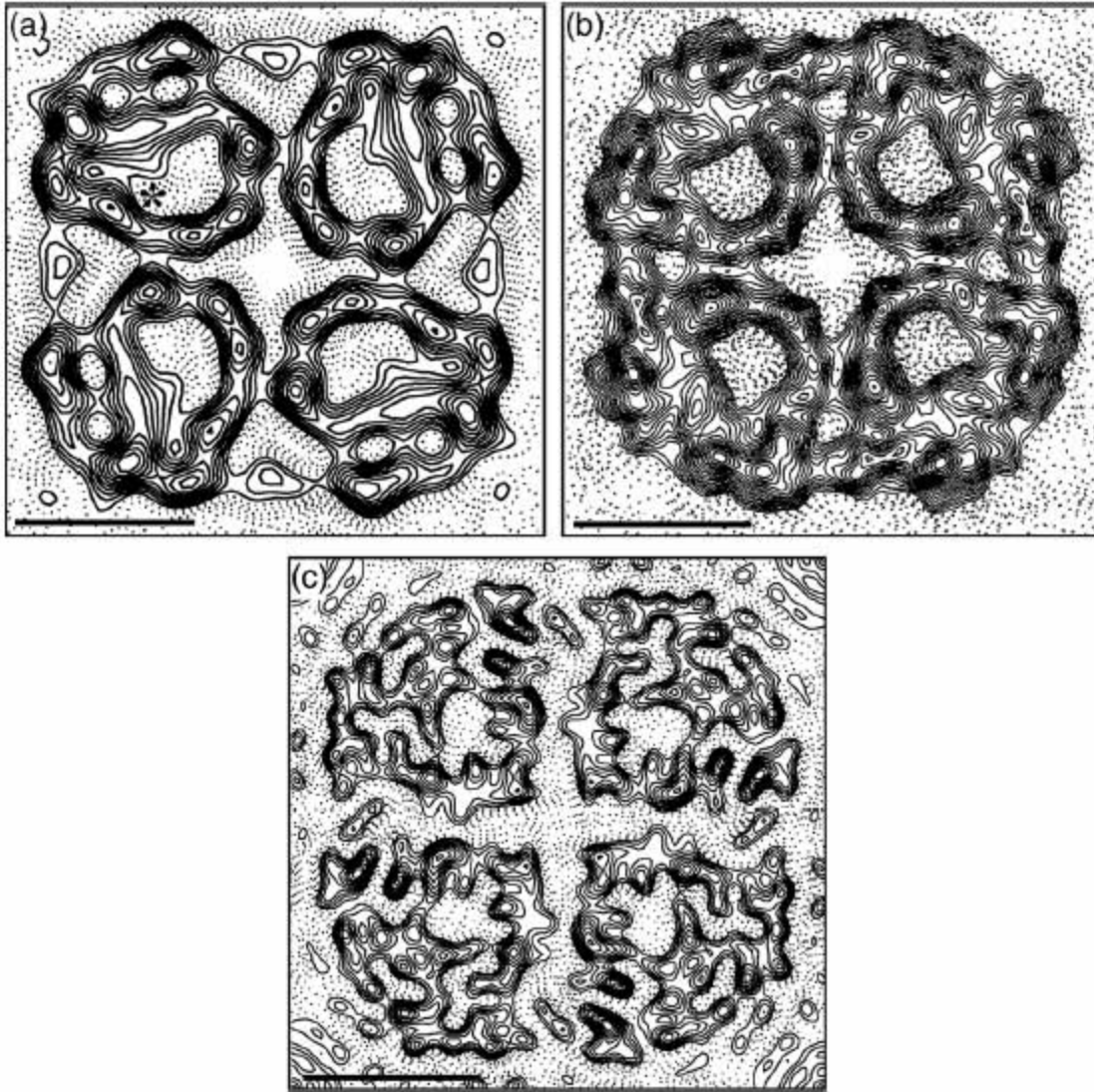


Figura 2. Mapa de proyección de diferentes acuaporinas. (a) Proyección de la estructura del tetrámero de AQP9 con una resolución de 7 Å. El asterisco indica una densidad más débil del poro de AQP9 comparado con el de GlpF; (b) GlpF con una resolución de 3.7 Å; (c) AQP0 con una resolución de 4 Å. La barra de escala representa 2.5 nm. (Tomado de Viadiu *et al.*, 2007)

1.3 Las acuagliceroporinas y el transporte de arsénico

El transporte de As al interior de la célula ha sido estudiado por diferentes grupos de investigación que han demostrado que el transporte de las formas trivalentes es mediado por las acuagliceroporinas (Sanders *et al.*, 1997; Wysocki *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006;).

En procariontes, el grupo del Dr. Barry P. Rosen (1997) probó el transporte de antimonio (Sb [III]) a través de la GlpF de *E. coli*, aunque también utilizaron diferentes concentraciones de arsenito de sodio. En aquellos primeros experimentos no quedó claro si la GlpF era el transportador para el arsenito, pero se podía inferir que así era debido a la susceptibilidad de las cepas sometidas a dosis crecientes del compuesto. En experimentos posteriores se confirmaron estas suposiciones (Meng *et al.*, 2004) y quedó establecido que la GlpF era el transportador para el As_i^{III} y el Sb^{III} .

En cuanto a los organismos eucariontes, se estudió a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual presenta la Fps1p, que es una proteína encargada del transporte de glicerol y tiene un papel importante en la osmoregulación. Wysocki y colaboradores (2001) demostraron que esta proteína también funciona como un canal que es responsable del ingreso del arsénico y el antimonio en sus formas trivalentes.

Por otro lado, Liu y colaboradores (2002) demostraron, mediante ensayos de expresión de AQP9 y AQP7 en *S. cerevisiae* y ovocitos de *Xenopus*, que el transporte de As_i^{III} en las células de mamífero se lleva a cabo a través de estas proteínas, las cuales son los homólogos en mamíferos de la GlpF bacteriana y de la Fsp1p de levadura. Su trabajo demostró que dichas proteínas transportan As_i^{III} al interior de la célula, además de observar una acumulación dosis dependiente relacionada con la sobrevivencia de las cepas estudiadas.

En trabajos posteriores (Liu *et al.*, 2004; Bhattacharjee *et al.*, 2004) se demostró la habilidad de la AQP9 humana para transportar As_i^{3+} . Liu y colaboradores (2004) han determinado que la AQP9 también es capaz de transportar una especie metilada del arsénico, producto del metabolismo intracelular del mismo: el ácido metilarsonoso (MMA^{III}).

Algunos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos a la comprensión de la relación entre el arsénico y la AQP9. Bhattacharjee y colaboradores (2004) evidenciaron la modulación farmacológica y el transporte del fármaco Trisenox en líneas celulares leucémicas vía AQP9. El Trisenox es un fármaco cuyo compuesto activo es el As_i^{3+} . Este grupo demostró que las células leucémicas que son más susceptibles al Trisenox, son también aquellas que presentan una mayor expresión de AQP9.

En un trabajo más reciente, Løing y colaboradores (2006) investigaron la relación entre la expresión de la AQP9 y la sensibilidad al As_i^{3+} en diferentes líneas celulares leucémicas. Según este grupo de investigación, hay una relación directa entre el nivel de expresión de AQP9, la cantidad de As_i^{3+} que transportan y la sensibilidad de distintas líneas leucémicas al trióxido de arsénico ((As_i^{3+})). Así, a mayor expresión de AQP9 mayor transporte de As_i^{3+} y mayor sensibilidad celular.

2. Planteamiento del problema

En trabajos anteriores hemos observado que existe una acumulación de As_i dependiente de la dosis de exposición en el hígado de ratones tratados con dosis crecientes de arsenito de sodio. Este efecto no se observó en el cerebro. El hallazgo que demuestra que el transporte del As_i³⁺ y MMA³⁺ ocurre a través de AQP9 y que esta proteína se expresa en hepatocitos nos llevó a preguntar si la expresión de esta proteína está relacionada con esta acumulación dosis-dependiente observada en el hígado.

3. Hipótesis

La exposición a arsenito de sodio modula la expresión de la acuagliceroporina 9.

4. Objetivo general

- Investigar la expresión de los mRNA y proteína de la AQP9 en ratones tratados con dosis crecientes de arsenito de sodio.
- Evaluar los niveles AQP9 en cultivos de la línea celular HepG2 tratados con dosis crecientes de arsenito de sodio.

4.1 Objetivos particulares

- Evaluar los niveles de RNA mensajero (mRNA) de la AQP9 mediante RT-PCR semicuantitativo en hígado de ratones CD1 tratados con dosis crecientes de arsenito de sodio.
- Evaluar los niveles de la proteína respectiva, mediante western blots en hígado de ratones CD1 tratados con dosis crecientes de arsenito de sodio.
- Ver con el uso de la técnica de inmunohistoquímica la cantidad de AQP9 en cultivos celulares de la línea hepática humana HepG2 tratados con dosis crecientes de arsenito de sodio durante 48 horas.

5. Materiales y métodos

5.1 Protocolo de exposición

Se utilizaron ratones CD-1[§] machos de 4 semanas de edad que fueron alimentados *ad libitum*, mantenidos en periodos de luz/oscuridad de 12 horas y que fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se usaron 5 ratones por grupo de tratamiento y se les suministraron 0, 2.5, 5 o 10 mg de arsenito de sodio por kg de peso, por vía oral durante 1, 3 y 9 días. Las soluciones de arsenito de sodio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) se hicieron al momento del tratamiento disolviendo la cantidad de arsenito para cada tratamiento en agua destilada. El grupo control recibió únicamente el vehículo como tratamiento. Los animales tenían libre acceso a comida y agua antes y durante la exposición al arsenito de sodio. Se tomaron registros diarios del peso corporal.

5.2 Extracción del hígado

Un día después de la última dosis, se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. La extracción del hígado de cada animal se llevó a cabo con material esterilizado. El hígado total se dividió en varios pedazos que se colocaron en criotubos e inmediatamente se congelaron, por inmersión en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento.

5.3 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA, todo el material utilizado fue previamente esterilizado y los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad. Se utilizó el método de purificación del RNA mediante el uso de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[®]) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Chomczynski *et al.*, 1987; Chomczynski, 1993). Aproximadamente de 30 mg de tejido se homogenizó en 1 mL de TRIzol utilizando un homogenizador eléctrico Pellet pestle[®] Motor (Kontes). Una vez obtenido

[§] La cepa CD-1 es una de las más utilizadas en cuanto a animales de laboratorio debido a su variabilidad genética interindividual y ha sido utilizada para probar distintas condiciones para fármacos y productos biológicos.

el homogenado, las muestras se dejaron reposar por 5 min. a temperatura ambiente (TA) y luego se les añadieron 0.2 mL de cloroformo. Cada tubo se agitó vigorosamente durante 10 a 15 seg., después de lo cual se dejaron reposar por 3 min. a TA. Luego se centrifugó a $12000 \times g$ a 4°C durante 25 min. Se tomó el sobrenadante incoloro de cada muestra y se pasó a otro tubo. A éste se le añadieron 0.5 mL de isopropanol y se mezcló el contenido por inversión. Las muestras se dejaron reposar a TA durante 15 min. y luego se centrifugaron a $12000 \times g$ a 4°C durante 10 min. Después se desechó cada sobrenadante y los precipitados o pastillas obtenidos se lavaron con 1 mL de etanol al 75%. Luego, las muestras se centrifugaron a $7500 \times g$ a 4°C durante 5 min. Se desecharon los sobrenadantes y las pastillas se dejaron secar al aire a TA. Una vez que las pastillas estaban lo suficientemente secas, se disolvieron en agua ultra pura destilada libre de RNAsas y DNAsas (Gibco). Finalmente, las muestras se guardaron a -20°C hasta su utilización.

5.4 Cuantificación de la concentración y pureza del RNA

Para cuantificar la concentración de cada muestra y medir su pureza, se utilizó un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia biotech®). Mediante la lectura de la muestra a 260/280 nm se estimó la concentración y considerando que un cociente igual a 1.8-2.0 equivale a 100% de pureza en el RNA.

5.5 Integridad del RNA

Para verificar la integridad del RNA extraído, se hizo un gel de agarosa al 1% y se llevó a cabo una electroforesis. Cada muestra (2 μL de RNA total) se mezcló con 1 μL de buffer de carga para RNA (0.75 mL de formamida desionizada, 0.15 mL de MOPS 10x, 0.24 de formaldehído, 0.1 mL de agua desionizada libre de RNAsas, 0.1 mL de glicerol, 0.08 mL de azul de bromofenol al 10%) y se cargó cada mezcla en su carril correspondiente. Además, como referencia, en uno de los carriles se colocó 1 μL de marcador de peso molecular de 1Kb plus (Invitrogen®). Las muestras se procesaron durante 35 minutos a 80V en una cámara de electroforesis horizontal (Bio-Rad). Después de esto, el gel se trasladó a un recipiente con bromuro de etidio y se dejó reposar durante 3-10 min. Finalmente, se extrajo el gel del bromuro de etidio y se

colocó en un transiluminador en donde el RNA se observa por fluorescencia. La integridad del RNA se toma como adecuada cuando la banda que representa al rRNA 28s es más gruesa (aproximadamente el doble) que la del 18s (Figura 3).

5.6 Obtención de cDNA

La retrotranscripción para la obtención de cDNA a partir del RNA se hizo utilizando la enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega, Madison, WI) usando el protocolo del proveedor y tomando 2 µg de RNA total como templado para cada experimento. Se utilizó un termociclador RapidCycler (Idaho Technology) para completar la reacción mediante el siguiente programa: 50 min. a 37°C para permitir la síntesis de cDNA, seguidos de 5 min. a 50°C para detener la reacción. Una vez terminado el programa, todas las muestras se centrifugaron y se guardaron a 4°C.

5.7 Diseño de oligonucleótidos y estandarización de condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se diseñaron un par de oligonucleótidos para *aqp9* de ratón de acuerdo con la secuencia de mRNA reportada para *Mus musculus* (número de acceso NM_022026, GenBank -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). Las secuencias y las condiciones de PCR usadas se resumen en la tabla 1. Con los oligonucleótidos diseñados para *aqp9* es posible diferenciar la amplificación de cDNA de la del DNA genómico. El amplicón esperado para los mRNAs de *aqp9* es de 271 pares de bases (pb); en cambio, para el DNA genómico es de 1290pb aprox. Como control de expresión genética, se utilizaron los mensajeros de la Gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*).

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos y condiciones empleadas en la determinación de niveles de expresión de mRNA para <i>aqp9</i> y <i>gapdh</i>.					
Gen	Oligonucleótidos	Tm (° C)	# Ciclos	Tamaño del amplicón (pb)	MgCl ₂ [mM]
<i>gapdh</i>	F: 5'-tga agg tcg gtg tga acg gat t-3' R: 5'-cat gta ggc cat gag gtc cac c-3'	60	30	940	2
<i>aqp9</i>	F: 5'- cag cgg tgt ctt ttg caa tg -3' R: 5'- atc aga agg agg aac atg gta -3'	61	25	271	2

La reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo mediante el uso del termociclador descrito arriba utilizando una DNA polimerasa (*Platinum Taq DNA polymerase*, Invitrogen) y se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante.

Para estandarizar las condiciones óptimas para la amplificación de *aqp9* se realizó un gráfico de ciclos con una concentración de $MgCl_2$ de 2 mM y usando una temperatura de alineamiento de 61° C. El gráfico se llevó a cabo desde 20 hasta 45 ciclos de amplificación. A partir de los datos obtenidos se realizó un gráfico para elegir el número de ciclos a utilizar (Figura 3).

Una vez terminado el programa en el termociclador, las muestras se centrifugaron dando un pulso para colectar todo el volumen de la reacción y se procedió a visualizar el resultado del PCR en un gel de agarosa al 2%. La separación se llevó a cabo en una cámara de electroforesis (Bio-Rad) a 120 V durante 25 min. Una vez terminada la separación, el gel se sumergió en bromuro de etidio durante 3-5 min. y se visualizó en un fotodocumentador Gel Logic 200, Imaging System® (Kodak®), tomando una fotografía del mismo para su análisis densitométrico.

5.8 Extracción de proteínas y Western blot

La extracción de proteínas se llevó a cabo de acuerdo al reporte de Rojek y colaboradores (2007). Cada muestra de hígado se homogenizó en buffer de disección frío (sacarosa 0.3 M, imidazol 25 mM, EDTA 1 mM, pH 7.2, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM) adicionado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma). Los homogenados se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min. a 4°C y el sobrenadante obtenido se pasó a un tubo nuevo, desechando la pastilla. La concentración de proteínas se determinó usando el ensayo de Bradford (BioRad, Hércules, CA, USA).

Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Para cada muestra, se usaron 80 µg de proteína total con buffer muestra de Laemmli 5X. Una vez procesadas en el gel, las proteínas se electro-transferieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, UK). La electro-transferencia se llevó a cabo a 100 V durante 75 min. a 4°C. Posteriormente, las

membranas se bloquearon toda la noche a 4°C mediante su inmersión en solución de bloqueo (leche Blotto al 5% en TBS) con agitación suave. Después del bloqueo, las membranas se incubaron con anticuerpo primario IgG de cabra anti-AQP9 F-17 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) diluido 1:200 en TBST (TBS con Tween 20 al 0.1%, 0.1% leche blotto y 0.1% BSA). La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente (TA) durante 90 min. con agitación suave. Después de la incubación con anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min. c/u en solución de lavado (TBS-Tween 20 al 0.1%) cambiando la solución entre cada lavado. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario IgG de burro anti IgG de cabra acoplado a peroxidasa (Sta. Cruz Biotech.) diluido 1:10'000 en TBST. Esta vez, la incubación se hizo durante 45 min. a TA con agitación suave. Luego, las membranas se lavaron como se mencionó antes. Finalmente, la presencia de la proteína se determinó por quimioluminiscencia incubando las membranas durante 1 min. en la oscuridad con el sistema ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) y exponiendo una placa fotográfica Amersham Hyperfilm ECL film (Amersham Biosciences) a las mismas.

Para la normalización de los datos obtenidos con AQP9, las membranas se lavaron como se mencionó anteriormente, para después someterlas a un despegado de los anticuerpos anti AQP9 y volverlas a probar con anti-GAPDH. El despegado se realizó de la siguiente manera. Las membranas se sumergieron en buffer stripping (100 mM β -mercaptoetanol, SDS 2%, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) durante 30 min. a 65°C con agitación ocasional. Luego, se eliminó el buffer utilizado y se incubaron en buffer nuevo a 74°C durante 10 min. Posteriormente se lavaron y se bloquearon por 1 h a TA y se incubaron con anti-GAPDH (Chemicon International, Temecula, CA, USA) diluido 1:2000 en TBST toda la noche a 4°C. Finalmente, se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón en conejo acoplado a peroxidasa (Zymed, San Francisco, CA, USA) y se revelaron, como se mencionó antes, por quimioluminiscencia. Las imágenes obtenidas se guardaron para su posterior análisis.

5.9 Cultivos celulares de HepG2

Para los experimentos *in vitro* se utilizó la línea celular de hepatoma humano HepG2, la cual fue generosamente donada por el Dr. Abdullaev (2003).

Las células se cultivaron en cajas de Petri y se crecieron en medio D-MEM (Gibco) adicionado con 10% de suero fetal bovino, a 37°C, en un ambiente húmedo con 5% de CO₂ y 95% de aire. Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se subcultivaron en cubreobjetos. Al día siguiente, las muestras se lavaron 2 veces con PBS y se les añadió medio de cultivo nuevo adicionado con 0, 1 ó 5 µM de arsenito de sodio (Sigma). El tratamiento duró 48 H. Finalmente, se lavaron los cultivos con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 1 h Después se lavaron con PBS por 10 min. (x2) y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se realizó una inmunofluorescencia de la siguiente forma. Los cubreobjetos se incubaron en solución de bloqueo (leche blotto al 5% en PBS) durante 2 hrs. a TA y luego con el anticuerpo primario (anti-AQP9 C-18) diluido 1:100 (en PBS-Triton X-100 al 0.1%, 1% BSA y 1% leche blotto) durante 2 hrs. a TA. Luego, las muestras se lavaron 3 veces con PBS-Triton 0.1% y se incubaron en la oscuridad con anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (Alexa[®] 488 burro anti-cabra IgG (H+L) diluido 1:250 en PBS-Triton X-100 0.1%, durante 1 h Finalmente, los cubreobjetos se lavaron y se montaron con *Gold Prolong antifade with DAPI* (Invitrogen[®]). Las células se observaron en un microscopio confocal y se tomaron fotografías de cada muestra.

5.10 Medición de arsénico y sus metabolitos en tejido

Se utilizó una muestra del hígado de cada animal para evaluar la distribución de arsénico (ng de As/g de tejido) en el tejido. Este análisis se realizó en el Laboratorio de la Dra. Luz María Del Razo Jiménez en la Sección de Toxicología del CINVESTAV en donde se evaluó la concentración de As_i y de sus metabolitos monometilarsénico (MMA), dimetilarsénico (DMA), de acuerdo al método reportado por Rodríguez y colaboradores (2004). Estas concentraciones se utilizaron para evaluar la distribución del arsénico total (la sumatoria del As_i y sus especies metiladas).

5.11 Análisis estadístico

Para el análisis de los productos de PCR y de proteínas por western blot, cada imagen se analizó con el programa KODAK Molecular Imaging Software, v. 4.0. Se midió la intensidad neta de cada banda de *aqp9* y se comparó con la correspondiente de su control interno de expresión (*GAPDH*). Con estos datos se calculó la expresión neta de *aqp9* mediante el cálculo del cociente de la expresión de *aqp9* entre aquella de *GAPDH* para cada individuo. Los cocientes obtenidos de cada tratamiento (2.5, 5 y 10 mg de arsenito de sodio/kg de peso del ratón) se compararon respecto al control (0 mg de arsenito de sodio/kg de peso del ratón). Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza no paramétrica (ANOVA) de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett usando el software *GraphPad InStat v. 3.06 for Windows* (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) y se generó la gráfica correspondiente. Se tomaron como significativas aquellas diferencias donde $p \leq 0.05$.

6. Resultados

6.1. Integridad del RNA de hígado

La figura 3 es una foto representativa que muestra la integridad del RNA de hígado utilizado. Se pueden observar las bandas del 18s y el 28s ribosomales. Para los experimentos posteriores, sólo se usó RNA con la calidad mostrada en esta figura.

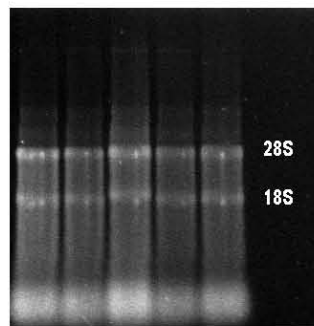


Figura 3. Gel de agarosa al 1% que muestra la integridad del RNA.

6.2 Estandarización de condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa

La figura 4 muestra una foto de las amplificaciones obtenidas para el gráfico de estandarización con el uso del cDNA de una muestra control (tratamiento con 0 mg de arsenito de sodio/kg de peso). El tamaño esperado de amplicón obtenido fue el correcto (271 pb) y, de acuerdo con la figura 5 y con las amplificaciones observadas en el gel, se decidió utilizar 25 ciclos de amplificación para los experimentos posteriores dado que con este número de ciclos no se ha saturado la reacción y no se encuentran amplificaciones inespecíficas.

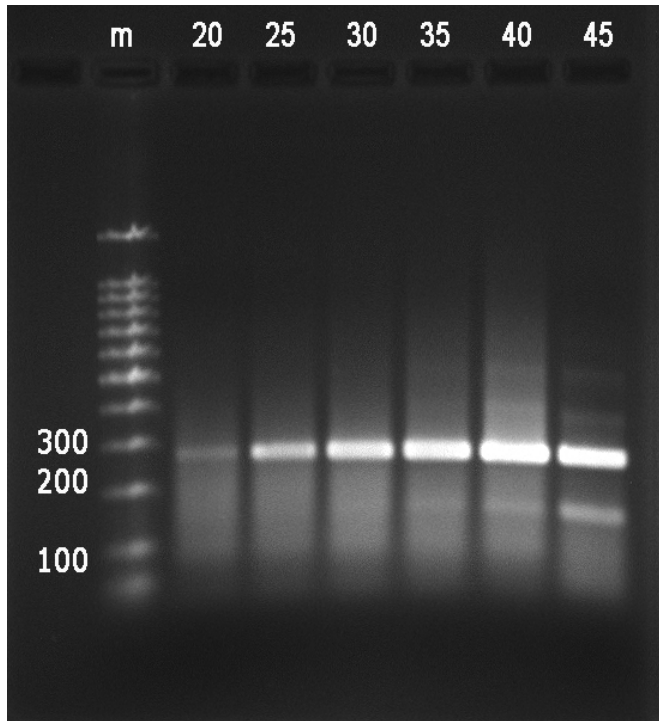


Figura 4. Gel de estandarización de ciclos para *aqp9*. 20-45 = número de ciclos; m= marcador de peso molecular (100pb).

Gráfico de ciclos de *aqp9* de hígado de ratón

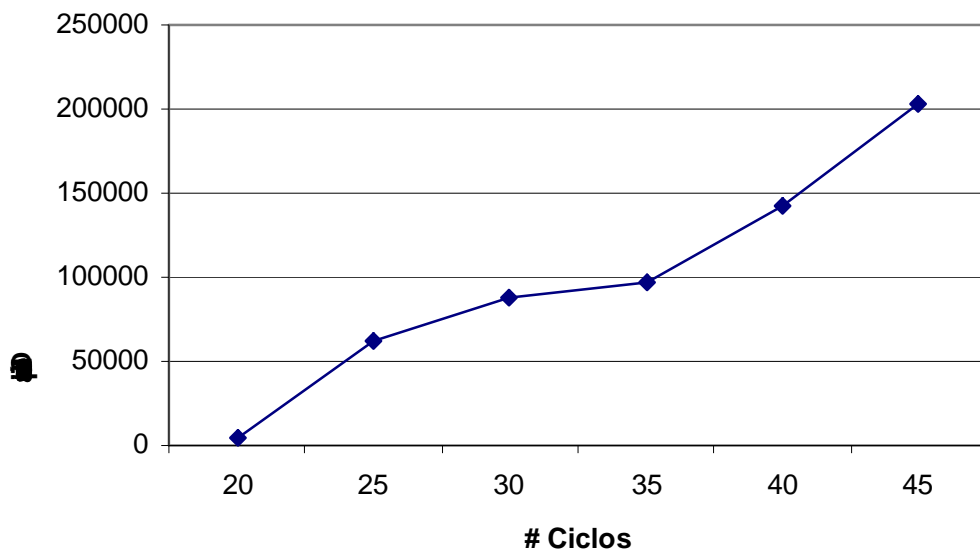


Figura 5. Gráfico de ciclos para amplificación por PCR de *aqp9*.

6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa de *aqp9* y *gapdh*

En las imágenes siguientes se pueden apreciar las amplificaciones observadas para la *aqp9* y *gapdh* (Figura 6) en un organismo representativo de cada grupo de tratamiento (0, 2.5, 5 y 10 mg de arsenito de sodio/kg de peso). A pesar de que se observa una inducción desde los 3 días de tratamiento es en los organismos tratados durante 9 días en donde la inducción se evidencia con mayor claridad.

En los ratones expuestos durante 9 días a dosis de 10 mg de arsenito de sodio/kg de peso se observó una sobreexpresión importante del gen *aqp9* de hasta 4 veces más respecto al control ($p = 0.01$). La figura 7 se generó mediante el análisis estadístico de 5 grupos de ratones analizados independientemente para este periodo de tratamiento.

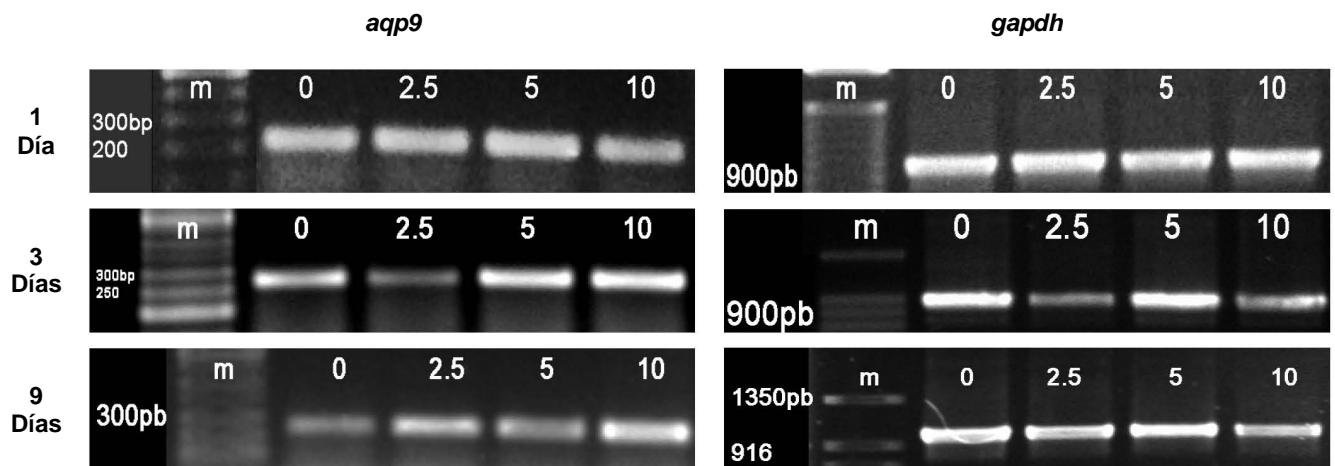


Figura 6. Expresión de *aqp9*. La expresión de *aqp9* en 1, 3 y 9 días de tratamiento con arsenito de sodio. La expresión de *gapdh* se usó para normalizar los datos. m = Marcador de peso molecular; (0-10)= mg de arsenito de sodio/kg de peso administrados durante el tratamiento.

Expresión de *aqp9* en hígado de ratón durante 9 días de tratamiento con arsenito de sodio

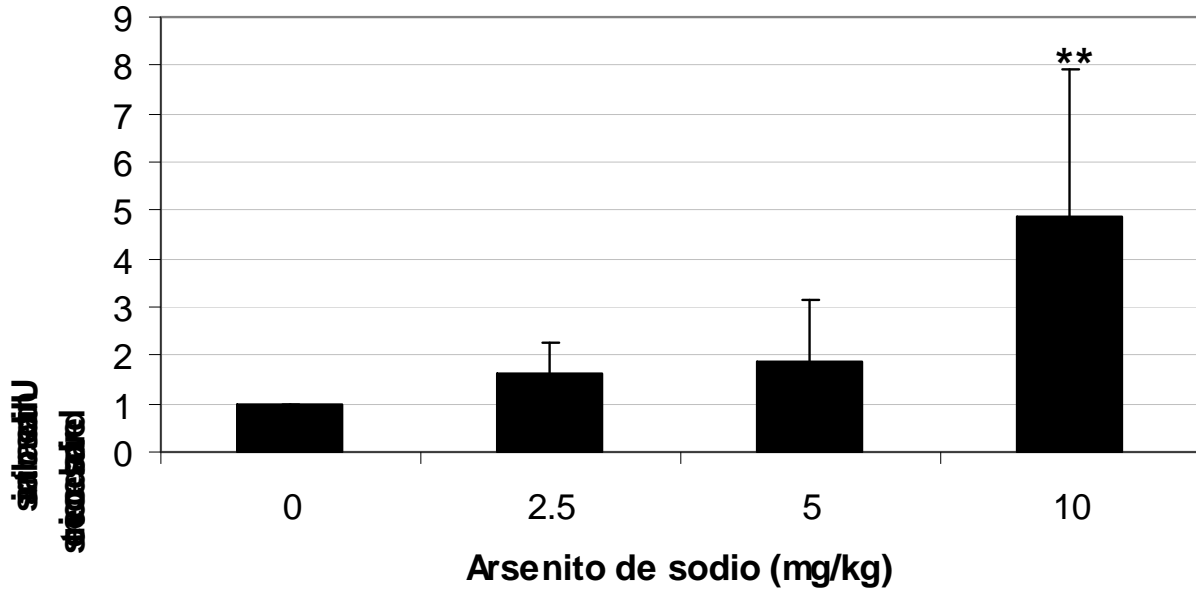


Figura 7. Expresión de *aqp9* en hígado de ratón. La gráfica muestra las diferencias entre los cocientes de las densitometrías de la expresión basal de *aqp9* (0 mg de arsenito/kg) y los tratamientos con arsenito de sodio durante 9 días con 2.5, 5 o 10 mg de arsenito/kg de peso del ratón. Los datos están expresados como la media del error estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas con una $p= 0.01$

6.4 Western blot

El análisis de proteínas de AQP9 se hizo a través de la técnica de Western blot. La figura 8 muestra una imagen representativa del resultado obtenido en los animales tratados durante 9 días. La figura 9 se generó a partir del análisis estadístico de tres experimentos independientes. En ella se observa que en todas las dosis utilizadas hay un aumento en la cantidad de proteína; en la dosis de 2.5 mg de arsenito de sodio/kg de peso el aumento de AQP9 es significativo ($p \leq 0.05$).

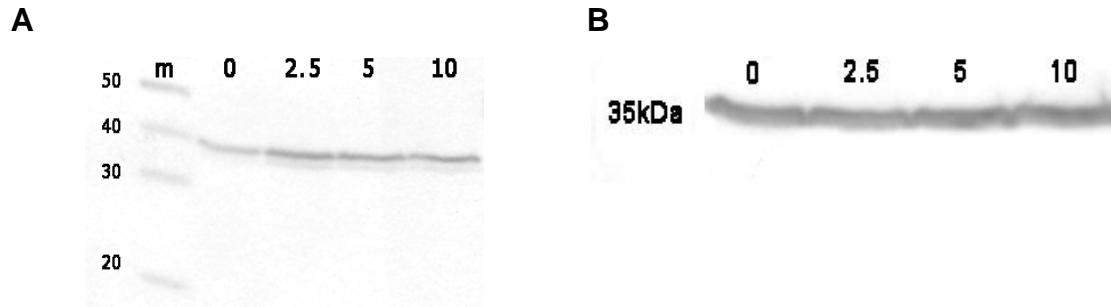


Figura 8. Western blot. (A) AQP9 con un peso aproximado de 34 kDa. (B) GAPDH. m = marcador de peso molecular; 0 – 10 = dosis administrada durante 9 días en mg de arsenito de sodio/Kg de peso.

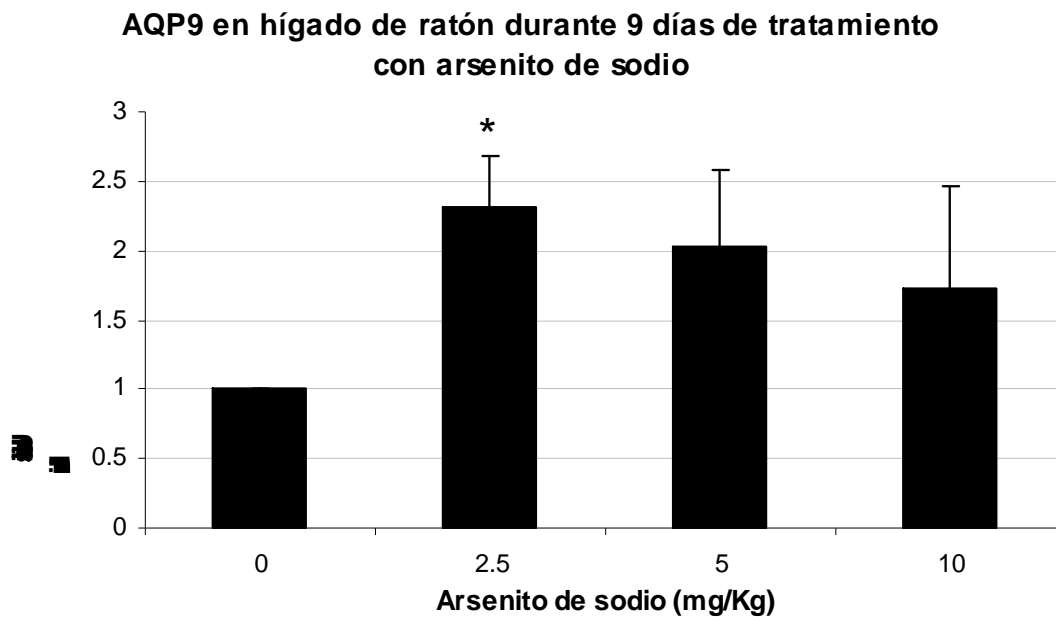


Figura 9. AQP9 en hígado de ratón. Densitometría del contenido de proteína en hígado de ratones tratados con diferentes dosis de arsenito de sodio durante 9 días. El asterisco representa diferencias significativas. $p=0.05$.

6.5 Expresión de AQP9 en HepG2

Se analizó la expresión de AQP9 en la línea celular hepática humana HepG2. En la figura 10 se puede observar como la expresión de AQP9 aumenta de forma dosis-dependiente.

6.6. Concentración de arsénico en tejido

Se analizó la concentración de arsénico en tejido. Con los datos se generaron las figuras 11, 12 y 13. Es interesante observar que, en los tratamientos durante 1 y 3 días, el incremento en la concentración de arsénico inorgánico (iAs) alcanza niveles significativos en las dosis de 5 y 10 mg de arsenito de sodio/kg de peso; sin embargo, durante nueve días de tratamiento se ve un incremento significativo en todas las dosis utilizadas.

Cuando se analiza la distribución de las especies metiladas (MAs y DMA), el incremento es significativo en todas las dosis empleadas durante 1, 3 o 9 días.

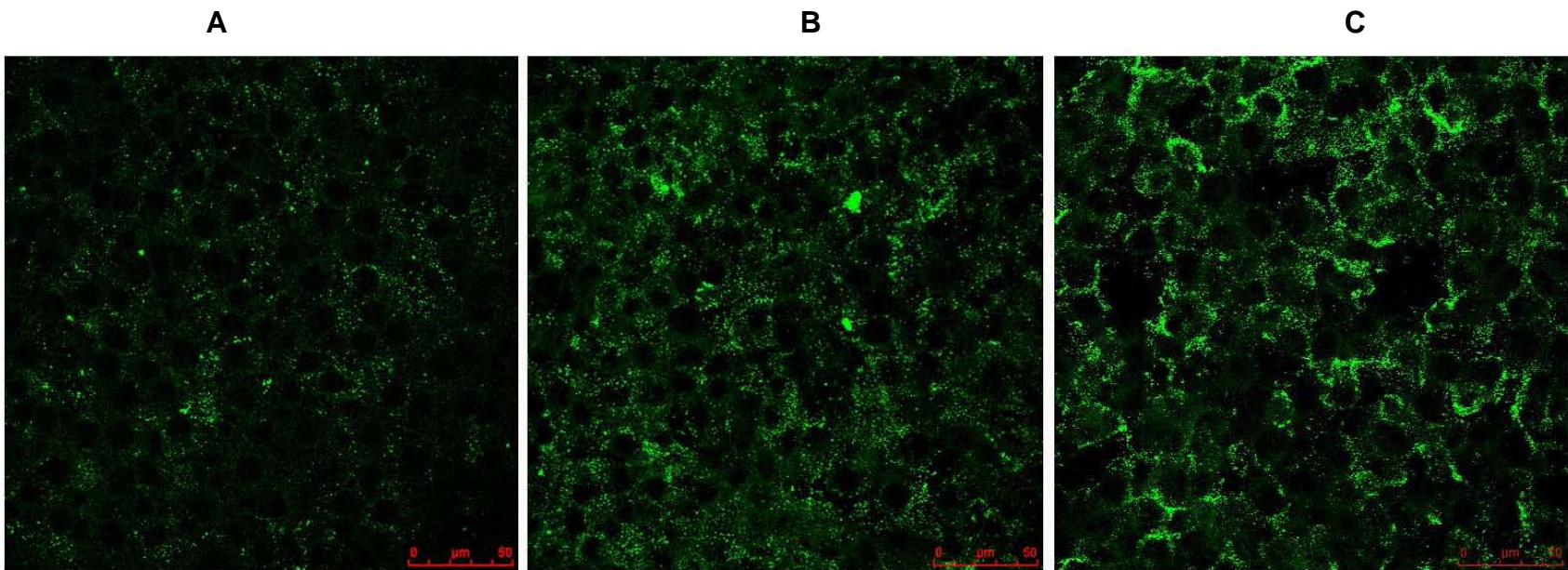


Figura 10. Expresión de AQP9 en la línea celular HepG2. Las imágenes muestran la inmunohistoquímica hecha en los cultivos celulares. Éstos fueron incubados durante 48 horas con 0 (A), 1 μM (B) ó 5 μM (C) de arsenito de sodio.

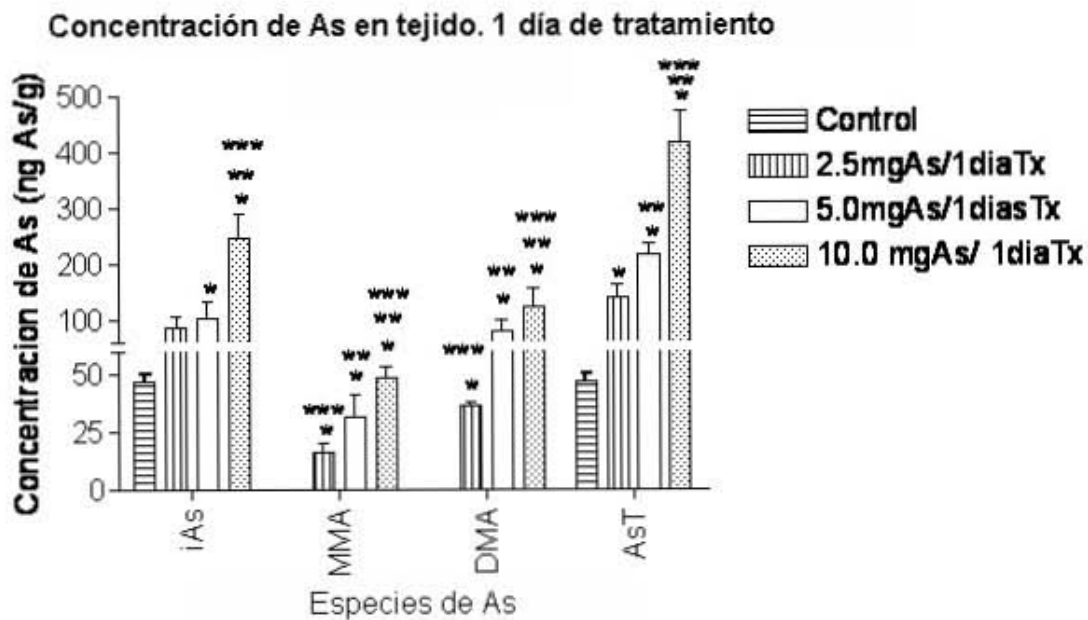


Figura 11. Acumulación de As y sus metabolitos metilados en hígado de ratones tratados por un día. iAs =arsénico inorgánico; MMA= monometilarsénico; DMA= dimetilarsénico; AsT= iAs+MMA+DMMA. Los asteriscos denotan una $p \leq 0.01$.

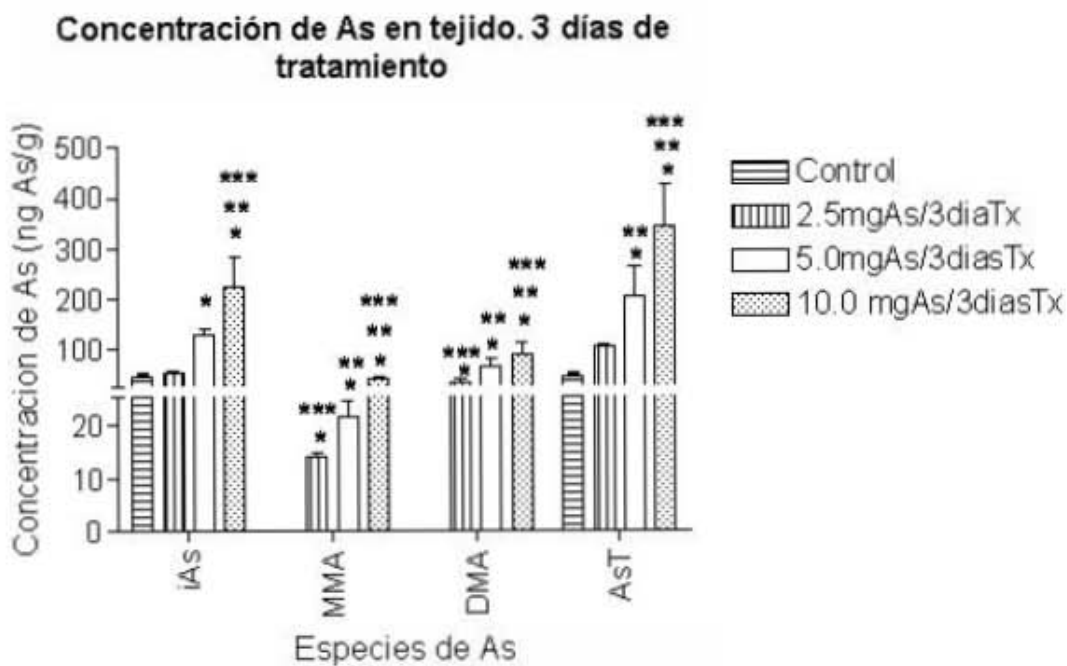


Figura 12. Acumulación de As y sus metabolitos metilados en hígado de ratones tratados por tres días. iAs =arsénico inorgánico; MMA= monometilarsénico; DMA= dimetilarsénico; AsT= iAs+MMA+DMMA. Los asteriscos denotan una $p \leq 0.01$.

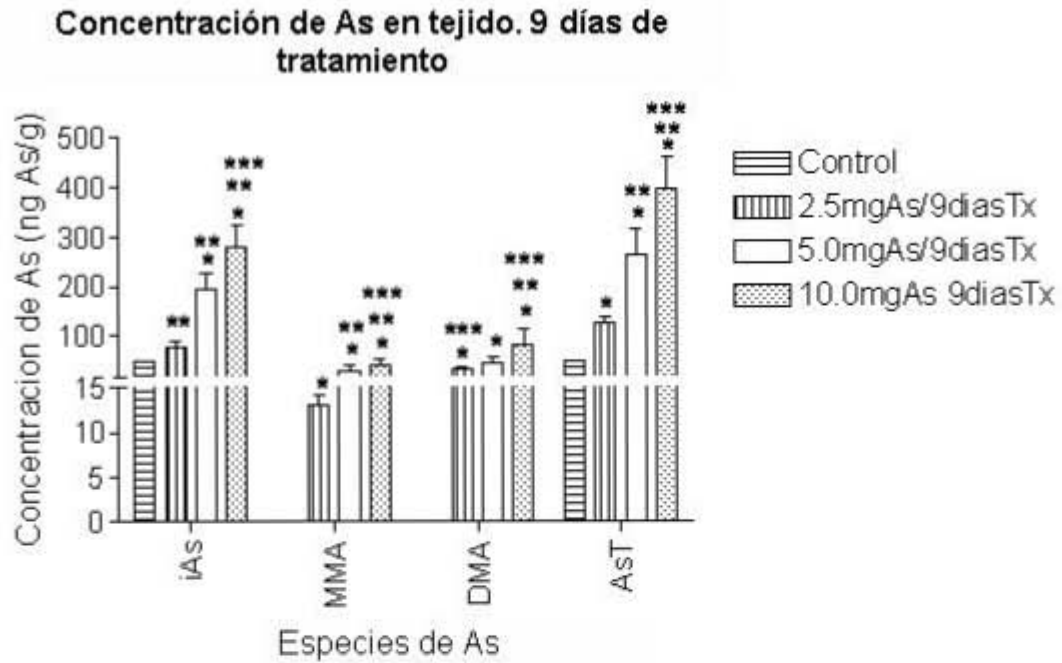


Figura 13. Acumulación de As y sus metabolitos metilados en hígado de ratones tratados por nueve días. iAs =arsénico inorgánico; MMA= monometilarsénico; DMA= dimetilarsénico; AsT= iAs+MMA+DMMA. Los asteriscos denotan una $p \leq 0.01$.

7. Discusión

El presente trabajo describe por primera vez, en un modelo *in vivo* e *in vitro*, la modulación transcripcional del gen de la acuagliceroporina 9 causada por la exposición al arsenito de sodio. En el hígado de ratones CD1, con los tratamientos utilizados durante nueve días se ve una tendencia a aumentar la transcripción génica de *aqp9* llegando en la dosis más alta (10 mg de arsenito de sodio/kg de peso), a un aumento significativo ($p=0.01$) de hasta cuatro veces más que el control. Es interesante observar que los niveles de proteína tienen un patrón similar, es decir, en todas las dosis empleadas en el presente estudio, existe un aumento en la cantidad de proteína respecto al control. Sin embargo, a diferencia de lo observado con los RNA mensajeros, el aumento significativo ($p=0.05$) se evidenció en la dosis más baja (2.5 de arsenito de sodio/kg de peso). Es probable que se necesite la acumulación de arsenicales en la célula para que se encienda la vía de señalización molecular que incrementa la transcripción del gen; por otra parte, la evidencia experimental mostrada en este trabajo indica que los mensajeros se acumulan de manera dosisdependiente con el tratamiento con arsenito de sodio, mientras que las proteínas tienden a disminuir. Esto se puede explicar debido a que a medida que aumenta la cantidad de arsenito de sodio suministrada, la maquinaria celular se va dañando de forma tal que se reprimen muchas enzimas del metabolismo. La dosis más alta utilizada en este trabajo (10 mg de arsenito de sodio/kg de peso) esta cercana a la LD₅₀ para ratones (aprox. 12 mg de arsenito de sodio/kg de peso). Es comprensible que a esta dosis la maquinaria celular de síntesis de proteínas se vea afectada y, a pesar de la cantidad de mensajeros para AQP9, la traducción de la proteína se vea afectada. Existe evidencia que en diversos sistemas que confirma la falta de correlación entre la expresión genética y los niveles de proteína (Carpena *et al.*, 2007; Gygi *et al.*, 1999; Bartling *et al.*, 2005; Rodriguez-Melendez *et al.*, 2005; Carreras *et al.*, 2003). Por ejemplo, Carreras y colaboradores (2003) demostraron que en hígado de rata mientras hay ligación del ducto biliar la expresión génica de la AQP8 aumenta pero los niveles de proteína decrecen.

Hay que destacar que existe una correlación directa entre la concentración de arsenito de sodio suministrado y la distribución de los arsenicales en el hígado (figs. 11,

12 y 13). Nuestros resultados sugieren que la distribución dosis dependiente del As_i y sus metabolitos podrían deberse a que el arsenito es capaz de inducir la expresión de uno de sus transportadores (AQP9). Es importante tener en cuenta que GLUT1 pudiera tener una participación muy importante en el efecto de acumulación observado en el presente trabajo. Por lo que es lógico pensar que conforme mayor sea la dosis de arsenito suministrada, mayor será la cantidad de transportador presente y, debido al gradiente de concentración en el medio, mayor la cantidad de arsenito que entra a la célula.

Si bien se ha descrito la presencia de secuencias para numerosos factores de transcripción en la región promotora de la AQP9, no existen muchos trabajos que hayan investigado la participación de estos factores. Sin embargo se ha reportado que la modulación transcripcional de la AQP9 está relacionada con los niveles de insulina. Se ha demostrado que cuando los niveles de insulina bajan, la expresión de *aqp9* aumenta (Kuriyama *et al.*, 2002) y esto se explicaría debido a la presencia de una secuencia que responde a insulina (IRE) en el promotor del gen. Otra evidencia a este respecto, es la que demuestra que en ratas tratadas con estreptozotocina, compuesto utilizado para destruir las células β pancreáticas**, se observa un incremento en los niveles de AQP9 en hígado (Carbrey *et al.*, 2002). Kuriyama *et al.* (2002) describieron la existencia de secuencias para NF- κ B, AP-1 y SP-1 en la región promotora del gen de AQP9. El As_i^{3+} es capaz de modificar la actividad de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 y SP-1 (Drobná *et al.*, 2003) por lo que es probable que el incremento en la expresión de AQP9 observado bajo las condiciones descritas en el presente trabajo, esté determinado por AP-1 o SP-1 ya que el As aumenta su actividad; sin embargo, no hay experimentos que hayan demostrado este efecto directamente. Por otro lado, existe evidencia de que la sobreexpresión de AQP9 está relacionada con NF- κ B. Se ha demostrado que cuando se activa su receptor, se estimula la expresión de AQP9 en las líneas celulares BMMs y RAW264.7 (Aharon *et al.*, 2006).

Arima *et al.* (2003) probaron que el estrés hiperosmótico causado por el manitol es capaz de incrementar la expresión de AQP9 vía p38 MAPK, en corteza cerebral de

** Células productoras de insulina.

rata vía p38 MAPK. Por otra parte, se ha demostrado que el glucagon incrementa la expresión de los mRNAs de AQP9 y la cantidad de proteína en cultivos de hepatocitos de cerdo, presumiblemente debido a su activación vía adenil ciclasas (Carpena *et al.*, 2006). En la línea celular hepática HepG2, la cantidad de proteína de AQP9 aumenta con el tratamiento de ácido oéico y Wy14643 (un ligando sintético de PPAR- α) probablemente vía PPARs (Lee *et al.*, 2005). Otras investigaciones han demostrado que la AQP9 puede ser sobreexpresada por andrógenos debido a la presencia de una secuencia de unión al receptor de esteroides en la región promotora del gen *aqp9* (Pastor-Soler *et al.*, 2002).

La expresión de AQP9 es diferente entre machos y hembras (Níchia *et al.*, 2001) y es necesario esclarecer la vía de señalización que sigue la expresión de este canal debido a su importancia fisiológica y funcional en los organismos. La AQP9 funciona como un canal promiscuo. En el hígado tiene un papel muy importante como transportador de glicerol que es usado por el tejido hepático para la gluconeogénesis (Kuriyama *et al.*, 2002; Carbrey *et al.*, 2003; Rojek *et al.*, 2007) y se ha propuesto que esto contribuye a la producción elevada de glucosa hepática que se ve en pacientes con diabetes de tipo II (Rojek *et al.*, 2007). Así, es probable que en personas expuestas al arsenito de sodio, la sobreexpresión de AQP9 en el hígado pudiera tener repercusiones fisiológicas importantes. Leung y colaboradores (2007) han demostrado que diferentes niveles de expresión de AQP9 provocan diferente sensibilidad en líneas celulares leucémicas; en aquellas líneas que tienen una mayor expresión de AQP9, el As_3O_3 tiene un efecto tóxico mayor. Además, sus experimentos demostraron la sobreexpresión de AQP9 por ácido retinoico (*All trans-retinoic acid, ATRA*) en la línea HL-60 aunque queda la duda de si el ATRA es capaz de inducir la expresión de AQP9 en otros tipos celulares.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con los hallazgos de Rodríguez *et al.* (2004) en relación a que a diferencia de otros tejidos, donde DMA es la especie arsenical mas abundante, en el hígado de los ratones tratados con arsenito de sodio la especie más abundante fue el As_i . Aunque en el trabajo citado no se da una explicación respecto a la acumulación observada, los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que es debido a la sobreexpresión de la AQP9. Esta expresión aumentada

también podría explicar los niveles bajos de MMA en el hígado comparados con los de DMA, ya que parte del MMA puede estar siendo dimetilado por la AS3MT y parte puede estar saliendo de la célula a través de la gran cantidad de transportadores presentes.

En el caso de los cultivos de la línea celular HepG2, el análisis por inmunofluorescencia reveló un claro aumento en la cantidad de AQP9 conforme aumenta la cantidad de arsenito de sodio suministrada (0, 1 μ M y 5 μ M).

Es interesante observar que en los dos modelos utilizados se observa una respuesta similar del arsenito de sodio como inductor en la cantidad de AQP9. Ya que la HepG2 es una línea celular hepática humana y, dada la modulación en la expresión de AQP9 observada *in vivo*, podríamos esperar que el arsenito de sodio cause un efecto similar en el hígado humano.

Por otro lado, dada la controversia actual (Rojek *et al.*, 2007; Yool AJ, 2007; Mao *et al.*, 2006; Trinh-Trang-Tan *et al.*, 2005), queda por demostrar si existe expresión de AQP9 en cerebro. Nuestros datos preliminares con el modelo descrito en este trabajo sugieren que el arsenito de sodio también es capaz de inducir la transcripción de *aqp9* en hipotálamo. Sin embargo, existen autores que niegan la expresión de esta proteína en cerebro (Rojek *et al.*, 2007). Resultaría interesante investigar si la inducción de AQP9 por la exposición al As_i^{3+} es tejido-específico y si fuese el caso, también región-específico.

Finalmente, hay que tomar en cuenta el posible papel que juegan los transportadores de hexosas, como el GLUT1, en relación con la intoxicación por As^{III} y sus efectos en la salud. Hasta ahora se desconoce cómo es posible que la exposición al As ocasiona que éste pueda ser encontrado en tejidos donde no hay expresión de acuagliceroporinas como AQP9 o AQP7. Es posible que el As pueda entrar a dichos tejidos a través de transportadores hasta la fecha desconocidos pero la evidencia experimental actual indica que debido a su amplia distribución en el organismo, los transportadores de hexosas pueden ser la ruta de ingreso para el As en tejidos carentes de AQP9 o AQP7 (Lee *et al.*, 2006).

8. Perspectivas

En el presente trabajo se demostró la modulación en la expresión de AQP9 *in vivo* e *in vitro* causada por la exposición a arsenito de sodio. Aún no se sabe la vía de señalización a nivel molecular que sigue la modulación observada. Queda esclarecer la(s) vía(s) de señalización para la expresión de *aqp9*, lo cual seguramente abrirá un campo de investigación muy amplio, pues se ha propuesto a las AQP como proteínas blanco de futuros tratamientos farmacológicos (Frigeri *et al.*, 2007).

Ya que se ha demostrado que diferentes transportadores de hexosas, incluido el GLUT1, son capaces de transportar As^{III} y MMA^{III} (Liu *et al.*, 2006), será interesante investigar la participación de estas proteínas en la toxicología del As y si éste es capaz de modular la expresión de las mismas.

Finalmente, falta investigar si la exposición al As es capaz de modular la expresión de AQP9 de manera tejido-específico.

9. Bibliografía

Abdullaev FI, Riverón-Negrete L, Caballero-Ortega H, Manuel Hernández J, Pérez-López I, Pereda-Miranda R, Espinosa-Aguirre JJ. 2003. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology In Vitro*. 17(5-6):731-6.

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2000. *Reseña Toxicológica del Arsénico (en inglés)*. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública.

Agency of Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *ToxFAQs & Public Health Statements 2005 (CD)*. U. S. Department of Health & Human Services

Agre P, Bonhivers M, Borgnia MJ. 1998. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *The Journal of Biological Chemistry*. Jun 12; 273(24):14659-62

Agre P, Cartron JP. 1991. Molecular biology of the Rh antigens. *Blood*. Aug 1; 78(3):551-63

Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. 1993. Aquaporins: a family of water channel proteins. *The American journal of physiology*. Sep; 265(3 Pt 2):F461

Agre P. 2006. The aquaporin water channels. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 6; 3(1):5-13

Aharon R, Bar-Shavit Z. 2006. Involvement of aquaporin 9 in osteoclast differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*. Jul 14;281(28):19305-9.

Arima H, Yamamoto N, Sobue K, Umenishi F, Tada T, Katsuya H, Asai K. 2003. Hyperosmolar mannitol simulates expression of aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. Nov 7; 278(45):44525-34

Bartling B, Hofmann H-S, Boettger T, Hansen G, Burdach S, Silber RE, Simm A. 2005. Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma. *Lung Cancer*. 49:145–54.

Borgnia M, Nielsen S, Engel A, Agre P. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annual Review of Biochemistry*. 68:425-58.

Bun-ya M, Shikata K, Nakade S, Yompakdee C, Harashima S, Oshima Y. 1996. Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. 29; 4. pp. 344-351

Caperna TJ, Shannon AE, Richards MP, Garrett WM, Talbot NC. 2007. Identification and characterization of aquaporin-9 (AQP9) in porcine hepatic tissue and hepatocytes in monolayer culture. *Domestic Animal Endocrinology*. May; 32(4):273-86.

Carbrey JM, Gorelick-Feldman DA, Kozono D, Praetorius J, Nielsen S, Agre P. 2002. Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Mar 4;100(5):2945-50

Carreras FI, Gradilone SA, Mazzone A, García F, Huang BQ, Ochoa JE, Tietz PS, Larusso NF, Calamita G, Marinelli RA.. 2003. Rat hepatocyte aquaporin-8 water channels are down-regulated in extrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 37:1026–33.

Chiou HY, Hsueh YM, Liaw KF, Horng SF, Chiang MH, Pu YS, Lin JS, Huang CH, Chen CJ. 1995. Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven-year follow-up study in Taiwan. *Cancer Research*. Mar 15;55(6):1296-300

Chomczynski P. 1993. *Biotechniques* 15, 532.

Chomczynski P., Sacchi N. 1987. *Analytical biochemistry*. 162, 156.

Drobná Z, Jaspers I, Thomas DJ, Stýblo M. 2003. Differential activation of AP-1 in human bladder epithelial cells by inorganic and methylated arsenicals. *FASEB Journal*. Jan; 17(1):67-9.

Enterline PE, Day R, Marsh GM. 1995. Cancers related to exposure to arsenic at a copper smelter. *Occupational and Environmental Medicine*. Jan; 52(1):28-32

Frigeri A, Nicchia GP, Svelto M. 2007. Aquaporins as targets for drug discovery. *Current Pharmaceutical Desing*. 13(23):2421-7

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular Cell Biology*.19:1720–30.

Hernández-Zavala A, Del Razo LM, Aguilar C, García-Vargas GG, Borja VH, Cebrián ME. 1998. Alteration in bilirubin excretion in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Toxicology Letters*. Volume 99, Issue 2, 15 October, pp. 79-84

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Tanaka Y, Marumo F, Sasaki S. 1998. Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Mar 6;244(1):268-74.

Ko SB, Uchida S, Naruse S, Kuwahara M, Ishibashi K, Marumo F, Hayakawa T, Sasaki S. 1999. Cloning and functional expression of rAQP9L a new member of aquaporin family from rat liver. *Biochemistry and Molecular Biology International*. Feb;47(2):309-18

Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K, Kondo H, Furuyama N, Nishizawa H, Maeda N, Matsuda M, Nagaretani H, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. 2002. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes*. Oct; 51(10):2915-21

Lander JJ, Stanley RJ, Sumner HW, Boswell DC, Aach RD. 1975. Angiosarcoma of the liver associated with Fowler's solution (potassium arsenite). *Gastroenterology*. 68: 1582-1586.

Lee DH, Park DB, Lee YK, An CS, Oh YS, Kang JS, Kang SH, Chung MY. 2005. The effects of thiazolidinedione treatment on the regulations of aquaglyceroporins and glycerol kinase in OLETF rats. *Metabolism: clinical and experimental*. Oct; 54(10):1282-9.

Leung J, Pang A, Yuen WH, Kwong YL, Tse EW. 2007. Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood*. Jan 15; 109(2):740-6

Magni F, Sarto C, Ticozzi D, Soldi M, Bosso N, Mocarelli P, Kienle MG.. 2006. Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics*, 6, 5637–5649

Mao X, Enno TL, Del Bigio MR. 2006. Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus. *The European Journal of Neuroscience*. Jun; 23(11):2929-36.

Nelson L. D., Cox M. M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. USA. pp. 389-436

Nicchia GP, Frigeri A, Nico B, Ribatti D, Svelto M. 2001. Tissue distribution and membrane localization of aquaporin-9 water channel: evidence for sex-linked differences in liver. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Dec; 49(12):1547-56

Pastor-Soler N, Isnard-Bagnis C, Herak-Kramberger C, Sabolic I, Van Hoek A, Brown D, Breton S. 2002. Expression of aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. *Biology of Reproduction*. Jun; 66(6):1716-22

Regelson W, Kim U, Ospina J, Holland JF. 1968. Hemangioendothelial sarcoma of liver from chronic arsenic intoxication by Fowler's solution. *Cancer*. Mar;21(3):514–522.

Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, Sarath G, Zemleni J. 2005. High-throughput immunoblotting identifies biotindependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *The Journal of Nutrition*. 135:1659–66.

Rodríguez VM, Del Razo LM, Limón-Pacheco JH, Giordano M, Sánchez-Peña LC, Uribe-Querol E, Gutiérrez-Ospina G, Gonsbatt ME. 2005. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. Mar; 84(1):157-66.

Rojek AM, Skowronski MT, Füchtbauer EM, Füchtbauer AC, Fenton RA, Agre P, Frøkiaer J, Nielsen S. 2007. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Feb 27; 104(9):3609-14

Rosas I., Belmont R., Armienta A., Baez A. 1999. Arsenic concentrations in water, soil, milk and forage in Comarca Lagunera, Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution*. 112:1, 2. pp. 133–149.

Sanders OI, Rensing C, Kuroda M, Mitra B, Rosen BP. 1997. Antimonite Is Accumulated by the Glycerol Facilitator GlpF in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*. May, pp. 3365–3367

Trinh-Trang-Tan MM, Cartron JP, Bankir L. 2005. Molecular basis for the dialysis disequilibrium syndrome: altered aquaporin and urea transporter expression in the brain. *Nephrology, dialysis, transplantation*. Sep;20(9):1984-8

Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Mackenzie B, Devidas S, Guggino WB, van Hoek AN, Hediger MA. 1998. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *The Journal of Biological Chemistry*. Sep 18; 273(38):24737-43

Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA. 1999. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *The American Journal of Physiology*. Nov; 277(5 Pt 2):F685-96.

Valdovinos Flores, Cesar. Modulación transcripcional por Spirulina en el hígado de ratones CD-1 tratados con arsenito de sodio. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, 2007.

Valenzuela OL, Borja-Aburto VH, Garcia-Vargas GG, Cruz-González MB, Garcia-Montalvo EA, Calderón-Aranda ES, Del Razo LM. 2005. Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environmental Health Perspectives*. Mar; 113(3):250-4

Viadiu H, Gonen T, Walz T. 2007. Projection map of aquaporin-9 at 7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. Mar 16; 367(1):80-8.

Warth A, Mittelbronn M, Hülper P, Erdlenbruch B, Wolburg H. 2007. Expression of the water channel protein aquaporin9 in malignant brain tumors. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. Jun; 15(2):193-8.

World Health Organization. Environmental health criteria 224, arsenic and arsenic compounds. Inter-organization programme for the sound management of chemicals. Geneva, 2001

Wysocki R, Chéry CC, Wawrzycka D, Van Hulle M, Cornelis R, Thevelein JM, Tamás MJ. 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. Jun;40(6):1391-401

Yompakdee C, Bun-ya M, Shikata K, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y. 1996. A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. Volume 171, Issue 1, 1996, Pages 41-47

Yool AJ. 2007. Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology And Psychiatry*. Oct; 13(5):470-85

Zakharyan RA, Aposhian HV. 1999. Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: the rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA(V) reductase. *Chemical Research in Toxicology*. Dec; 12(12):1278-83

Zardoya R, Villalba S. 2001. A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. *Journal of molecular evolution*. May;52(5):391-404