



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



"INDUCCION DE ADUCTOS ADN-PROTEINAS POR
MONOMETIL ARSENICO (MMA) EN CULTIVOS DE CORTES
DE HIGADO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
AMBAR LOPEZ MACAY

ASESOR: DRA. PATRICIA RAMIREZ NOGUERA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“INDUCCIÓN DE ADUCTOS ADN-PROTEÍNAS POR
MONOMETIL ARSÉNICO (MMA) EN CULTIVOS DE CORTES
DE HÍGADO “**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
Ambar López Macay

Asesor: Dra. Patricia Ramírez Noguera



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen Garcia Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

" Inducción de eductos ADN-proteínas por monometil
arsénico (MMA) en cultivos de cortes de hígado "
que presenta el pasante: Amber López Macey
con número de cuenta: 9754575-2 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a de Diciembre de 2003

- PRESIDENTE CFI. Leticia Zúñiga Ramírez
VOCAL Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo
SECRETARIO Dra. Patricia Ramírez Noguera
PRIMER SUPLENTE MC. Francisco López Mejía
SEGUNDO SUPLENTE MC. Rose Isela Álvarez González

Handwritten signatures and initials of the board members.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

 Especialmente a mi familia por todo el apoyo que me ha brindado desde siempre, no solo en mi carrera, sino en todos los aspectos de mi vida.

¡ muchas gracias a los tres ¡

☺ A la doctora Paty por todas sus enseñanzas, apoyo y su amistad, muchas gracias Paty.

👥 A mis compañeros en el laboratorio de toxicología celular porque cuando se trabaja con personas como ellos el tiempo pasa mucho más rápido y es más placentero, gracias.

👋 A mis amigos tanto de la facultad como fuera de ella, por haberlos conocido y ser como son, esta tesis es también para ustedes y por ustedes.

† Finalmente a la persona que ha estado conmigo estos últimos tres años compartiendo muchas experiencias en las buenas y en las malas y que me ha apoyado mucho también, a ti Lillian muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINAS
Índice de tablas.....	<i>i</i>
Índice de figuras.....	<i>ii</i>
Glosario de abreviaturas.....	<i>iv</i>
Resumen.....	<i>Vi</i>

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

1.0.- <u>El arsénico</u>	1
1.1.-Generalidades.....	1
1.2.-Fuentes de arsénico en la naturaleza.....	1
1.3.- Fuentes naturales.....	2
1.4.-Fuentes antropogénicas.....	4
1.5.-Contaminación por arsénico en el mundo.....	5
1.6.-La contaminación por arsénico en México.....	6
1.7.-Genética toxicológica.....	7

CAPÍTULO II BIOTRANSFORMACIÓN DEL ARSÉNICO

2.0.- <u>Biotransformación y detoxificación del arsénico</u>	9
2.1.-Mecanismo de toxicidad del arsénico pentavalente.....	13
2.2.- Mecanismo de toxicidad del arsénico trivalente.....	14
2.3.-Mecanismo de toxicidad de los metilados de arsénico.....	14

CAPÍTULO III CARCINOGENESIS DEL ARSÉNICO

3.0.- <u>Mecanismos moleculares de carcinogénesis por arsénico</u>	16
3.1.-Estudios de Genotoxicidad <i>in vitro</i>	17
3.2.- Co-mutagénesis.....	18

3.3.- Genotoxicidad in vivo.....	18
3.4.-Amplificación de genes.....	19
3.5- Alteración en el sistema de reparación del ADN.....	19
3.6.- Alteración de la metilación del ADN.....	20
3.7- Estrés oxidativo.....	21
3.8.-Proliferación celular.....	22
3.9.- Promoción de tumores.....	23
3.10.-Otros sitios blanco del arsénico.....	23

CAPÍTULO IV EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO

4.0.- <u>Exposición al arsénico</u>	25
4.1.-Síntomas de toxicidad.....	27
4.2.-Toxicidad del arsénico.....	28
4.3- Efecto de la dieta y la exposición al arsénico.....	31
4.4.-Efectos vasculares.....	32
4.5-Enfermedad del pie negro.....	32
4.6.-Otros efectos en piel.....	33
4.7.-Alteración metabólica.....	34
4.8.- Efectos de la transformación celular inducida por arsénico.....	34
4.9.-Cáncer de piel.....	35
4.10.-Cáncer de riñón y vejiga.....	35
4.11.-Cáncer de pulmón.....	35
4.12.-Cáncer de hígado.....	36
4.13.-Susceptibilidad al arsénico.....	36

CAPÍTULO V ESTUDIO DE LOS ADUCTOS ADN-PROTEÍNAS

5.0.- <u>Cultivo de cortes de tejido</u>	37
--	----

5.1.- <u>Biomarcadores</u>	40
5.1.1.- Biomarcadores de exposición.....	40
5.1.2.- Biomarcadores de efecto.....	41
5.1.3.- Biomarcadores de susceptibilidad.....	41
5.2.- <u>Estudio de los aductos ADN- proteínas</u>	42
<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	48
<u>HIPÓTESIS</u>	49
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	49
Objetivos específicos.....	49
<u>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</u>	50
Cultivos de cortes de hígado.....	50
Determinación de K ⁺ intracelular (viabilidad).....	50
Precipitación de los aductos ADN-proteínas.....	51
Determinación de los Aductos ADN-proteínas por fluorescencia.....	52
Análisis de datos.....	52
<u>RESULTADOS</u>	53
Cuantificación de K intracelular a las tres y doce horas de tratamiento.....	53
Determinación de aductos ADN-proteínas.....	57
<u>DISCUSIÓN</u>	61
<u>CONCLUSIONES</u>	67
<u>PERSPECTIVAS</u>	68
Glosario.....	69
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	71

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1.- Concentraciones de arsénico en el agua en diferentes países afectados. Badal y Kazuo, 2002.	4
Tabla 2.- Cuantificación de K ⁺ intracelular en las cortes de hígado de ratón por efecto del MMA a las tres horas de tratamiento.....	53
Tabla 3.- Cuantificación de K ⁺ intracelular en las cortes de hígado de ratón por efecto del MMA a las doce horas de tratamiento.....	55
Tabla 4.- Inducción de aductos ADN-proteínas en cortes de hígado de ratón a las tres horas de tratamiento con MMA.....	57
Tabla 5.- Inducción de aductos ADN-proteínas en cortes de hígado de ratón a las 12 horas de tratamiento con MMA.....	59

Índice de Figuras

	Página
Figura 1.- Rutas de las especies xenobióticas y las interacciones bioquímicas que pueden dirigir los efectos tóxicos (Modificada de Manahan, 2003.).....	8
Figura 2.- Inducción de daño por radical peroxilo y la reacción de la dimetil arsina en la dimetilación del arsénico trivalente y el O ₂ . Modificada de Yamanaka y cols, 1994).....	13
Figura 3.- Proceso carcinogénico producido por sustancias como el arsénico. Manahan, 2003.....	16
Figura 4.- Principales efectos durante la respuesta a tóxicos. Modificada de Manahan, 2003.....	29
Figura 5.- Representación de la precipitación y obtención de los DPC's así como su marcaje con I ¹²⁵ de acuerdo a Zhuang y Costa, 1993.....	46
Figura 6.- Precipitación de aductos ADN-proteínas. Modificado de Costa y cols , 1993. P-SDS: proteína unida al SDS, P-KSDS: proteína unida al K y al SDS.....	47
Figura 7.- Gráfica concentración de K ⁺ vs. Concentración de MMA a las tres horas de tratamiento.	54
Figura 8.- Gráfica concentración de K ⁺ vs. Concentración de MMA a las 12 horas de tratamiento.	56

Figura 9.- Gráfica % DPC's vs. Concentración de MMA a las tres horas de tratamiento	58
Figura 10.- Gráfica % DPC's vs. Concentración de MMA a las doce horas de tratamiento.....	60
Figura 11.- Inducción de DPC's en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito de sodio durante 3 horas. Castro, 2003.....	62
Figura 12.- Comparación de la Inducción de DPC's en cortes de hígado de ratón tratados con arsenito de sodio durante tres horas y MMA a las tres y doce horas de tratamiento respectivamente....	63
Figura 13.- Comparación de los coeficientes de regresión lineal y la Inducción de DPC's en cortes de hígado de ratón tratados con arsenito de sodio durante tres horas y MMA a las tres y doce horas.....	64

Glosario de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosina fosfato

ARN: Ácido ribonucleico

AsH₃: arsina

Asi: arsénico inorgánico

ATP: Adenosina trifosfato

DMA: el ácido dimetilarsénico

DPC's: Aductos o complejos ADN-proteínas (DNA-protein cross-links)

EPA: Agencia de protección ambiental (Environmental Protection Agency)

g: Gramo

GSH: Glutación reducido

Kg: Kilogramo

MMA: ácido monometil arsénico

mg: Miligramo

μmoles: Micromoles

M: Molar

PBS: Buffer salino de fosfatos (Phosphate Buffer Saline)

PDH: Enzima piruvato deshidrogenasa

ppm: partes por millón

P-KSDS: Complejo entre proteínas, SDS y potasio

P-SDS: Complejo entre proteínas y el SDS

REN: reparación por excisión de nucleótidos

ROS: especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)

SAM: S- adenosil metionina

RESUMEN

El arsénico es un elemento común en la naturaleza, el cual se puede encontrar en diferentes formas químicas tanto de manera natural como antropogénica. El arsénico se ha usado desde hace mucho tiempo como veneno y como medicamento principalmente, sin embargo en la actualidad se le ha dado muchos otros usos desde plaguicida y en varios tipos de industrias como la de metales, vidrio, transformación, etc., por lo que en décadas recientes el estudio de la toxicidad del arsénico ha tomado mucha importancia debido a diversos reportes en varios países de su efecto sobre los seres vivos expuestos a este metaloide sin esclarecerse totalmente los mecanismos de toxicidad de este elemento.

La contaminación de arsénico en diversas regiones del planeta ha provocado alarma especialmente por encontrarse muchas veces arriba de los niveles permisibles en agua y suelo y estar relacionada a diversos daños a personas y animales, pero también niveles bajos de arsénico y sus diferentes especies han mostrado que pueden provocar diversos daños inclusive relacionados a cáncer en humanos. La exposición a arsénico se ha vinculado a efectos a nivel de piel como hiperqueratosis, hígado como cirrosis no alcohólica, hepatitis y fibrosis, así como efectos a nivel vascular, pulmonar, gastrointestinales, vejiga, etc.

Los mecanismos involucrados en la toxicidad del arsénico así como de sus metabolitos se están estudiando recientemente por diversos investigadores, por lo que algunos de ellos han encontrado diversos tipos de daños a nivel metabólico y bioquímica relacionados a la exposición aguda y crónica al arsénico, como son aberraciones cromosómicas, micronúcleos y entrecruzamientos ADN-proteínas. Los entrecruzamientos ADN-proteínas también conocidos como complejos o aductos, son de reciente estudio por lo que se intenta ver el papel que juegan en la toxicidad del arsénico. Se han encontrado evidencias que muestran la capacidad que tiene el As de inducir de manera dosis dependiente la formación de entrecruzamientos ADN-proteínas *in vitro* e *in vivo* (Ramírez y cols., 2000; Costa y cols., 1996).

La inducción de aductos ADN-proteínas por arsenito de sodio en hepatocitos humanos nos lleva al estudio de este tipo de daño por uno de los metabolitos del arsénico (El ácido monometil arsénico MMA y el ácido dimetil arsénico DMA) que se ha reportado mucho más tóxico que las especies trivalentes y por lo tanto ayudar a descifrar las diferentes mecanismos para provocar daño a la célula y al material genético. En este trabajo se estudio la capacidad que tiene el ácido monometil arsénico para inducir aductos ADN-proteínas en un sistema de cortes de hígado de ratón durante un tratamiento de tres y doce horas a concentraciones de $1 \times 10^{-11} \text{M}$, $1 \times 10^{-9} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ de MMA. Los resultados indican que hay una inducción significativa de aductos a las tres y doce horas de tratamiento, siendo el sistema de cortes de tejido confiable y funcional para el estudio de la toxicidad del MMA *in vitro*, ya que mantuvo hasta por doce horas viables a los cortes de hígado.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

1.0.-El arsénico

1.1.-Generalidades

El arsénico con símbolo químico As, es un metaloide el cual se puede encontrar en diferentes formas químicas y estados de oxidación en la naturaleza (3-, 0, 3+, 5+), ubicándose en la parte VA de la tabla periódica, con un peso molecular de 74.921, se le puede encontrar en forma cristalina, en polvo o amorfo. El arsénico elemental no es soluble en agua, el arsenato y arsenito de calcio son medianamente solubles en agua, mientras que las sales de sodio del arsénico son solubles en etanol (Nineth Report on Carcinogenesis: Arsenic, 2001).

El arsénico se ha usado desde hace casi 3000 años, se utilizó como veneno y como medicamento contra la sífilis, en la agricultura y en la extracción de metales. En el Reino Unido, por ejemplo, fue usado para extraer hierro de la mina férrica y se ha sabido desde hace mucho tiempo que el arsénico es agudamente tóxico, sin embargo en la actualidad esta propiedad y otras que tiene han hecho que se siga utilizando en muchos lugares y para diferentes usos (Rosen, 2002).

1.2.- Fuentes de arsénico en la naturaleza

El arsénico es uno de los 20 elementos más abundantes en la naturaleza y uno de los doce más comunes en el cuerpo humano. La abundancia terrestre del arsénico es alrededor de 1.5-3mg/kg, por lo que las fuentes de arsénico en la naturaleza se pueden dividir en natural y antropogénica. (Hughes y cols, 2002).

1.3.-Fuentes naturales

El arsénico es un elemento cristalino que comprende cerca de 500-1000 del 1% (0.00005%) de la corteza terrestre siendo la concentración de arsénico en rocas ígneas y sedimentarias de 2 mg/kg, a demás las concentraciones encontradas en sedimentos marinos contienen más de 3000 mg/kg. El arsénico debe ser co-precipitado con hidróxidos de hierro y sulfuros en rocas sedimentarias; en depósitos de hierro se encuentran manganeso y arsénico en abundancia (Ruiz-Navarro y cols, 1998).

Desde antes de que las actividades del hombre tuvieran un efecto en el balance de la naturaleza, el arsénico estaba distribuido ubicuamente a través de la corteza, suelo, sedimentos, agua y en los organismos vivientes. El arsénico se encuentra asociado naturalmente en aproximadamente 200 formas minerales diferentes de las cuales el 60% son arsenatos, 20% sulfatos y sales de sulfuros, permaneciendo el 20% restante en arsenidos, arsenitos, óxidos, silicatos y arsénico elemental (As). El arsénico se encuentra naturalmente en piedras y tierra, agua, aire, y plantas y animales. Puede soltarse más allá en el ambiente a través de las actividades naturales como la acción volcánica, corrosión de piedras, y fuegos del bosque (Sukumar y cols., 2002).

El arsénico es encontrado a bajas concentraciones de manera natural en el agua, el contenido de arsénico en el agua en diferentes países se reporta en la tabla 1. Los valores de la EPA y de la WHO para la máxima cantidad de arsénico en el agua son de 50 µg/L y las recomendaciones normales son de 10µg/L, El contenido en el agua de mar oscila entre 0.001-0.008mg/L de arsénico. Encontrándose el ion arsenato como el más común en agua de mar. (Sukumar y cols., 2002).

Localización	Periodo de las muestras	Fuente de arsénico	Concentración $\mu\text{g/l}$
Hungría	Hasta la fecha	Depósitos subterráneos	68 (1-174)
Sureste de Finlandia	1993-1994	Pozos de agua	17-980
New Jersey, EUA Oeste de EUA.	1977-1979 sin reporte	Ambiente geoquímico Mantos acuíferos	hasta 1160 48,000
IOWA, Missouri, EUA.	hasta la fecha	Origen natural	16-62
Sur Ohio, EUA	sin reporte	Origen natural	34-490
Región lagunera, México	hasta la fecha	Pozos de agua	8-624 470
Córdoba, Argentina			>100
Chile			100-3810
Pampa, Córdoba, Argentina	sin reporte 1983	Subsuelo Pozos de agua	0.05-850 0.05-850
Kuitum-Usun,	1988	Pozos de agua	0.003-1700
Xingjiang, China	1989-1996	Sedimentos ricos en Arsénico	50-223
Shanxi, China	1990-1997	Contaminación por Pesticidas	10-1000
Oeste de Bengala, India	1996-1997 1994	Pozos de agua Origen natural	0.001-0.293 359(1-1550)
Calcuta, India	1999-2000	Sedimentos ricos en arsénico	1.25-5514
Bangladesh	1994	Mantos acuíferos	359

Fukuoka, Japon	199-2001	Sedimentos ricos	503.5
Hanoi Vietnam Takhon Si Thammarat, Tailandia	1994	Agua subterránea	

Tabla 1 Concentraciones de arsénico en el agua en diferentes países afectados. Badal y Kazuo, 2002.

1.4.-Fuentes antropogénicas

El origen del exceso natural de arsénico se debe al hombre debido a la utilización de los recursos naturales, con lo cual a contaminado el aire, el agua y el suelo, estas emisiones pueden afectar en niveles bajos a plantas y animales y se debe principalmente al uso de pesticidas arsenicales, la aplicación de fertilizantes, a la industria y la contaminación de alimentos tanto de origen animal como vegetal.

La utilización del arsénico se lleva a cabo principalmente por países como China Rusia, Francia, México, Alemania, Perú, Namibia, Suecia y Estados Unidos, encontrándose en estos países alrededor del 90% de la producción y utilización del arsénico (Sukumar y cols, 2002).

Aproximadamente se usa el 90 por ciento del arsénico industrial en EE.UU. El uso más común en este país es como un preservativo de madera, pero el arsénico también se usa en pinturas, tintes, pirotecnia, metales, drogas, industria del vidrio, cerámicas, jabones, y semiconductores. Los combustibles de petróleo, producción del papel, fabricación de cemento, y minas también pueden soltar arsénico en el ambiente (Chappell, 1995)

En combinación con el cobre y el cromo el arsénico se usa para la preservación de la madera, una más reciente aplicación es su utilización en estado sólido para la fabricación de transistores. El arsénico galio es usado como material láser para producir electricidad y luz.

El arsénico tiene una larga historia de uso en la medicina, especialmente antes de la introducción de los antibióticos. Actualmente se está utilizando nuevamente en la lucha contra el cáncer, especialmente en leucemias (Basu y cols. 2001).

El arsénico está presente como un contaminante en carnes. El arsénico también se encuentra en muchos aceites de combustible y carbones, para que se agregue al ambiente cuando éstos se queman y en el desyerbe de un huerto con un poco de insecticidas (particularmente llevan arsenato los rocíos).

1.5.-Contaminación por arsénico en el mundo

La contaminación con arsénico se ha vuelto un problema en muchas partes del mundo; al principio como resultado de casos laborales y de minas en países como Australia, Canadá, Japón, México, Tailandia, Reino Unido, y los Estados Unidos, pero ahora también en mantos acuíferos naturales recientemente usados para suministro de agua en países como Argentina, Bangla Desh, Camboya, Chile, China, Ghana, Hungría, Mongolia Interna, México, Nepal, Nueva Zelanda, Filipinas, Taiwán, y los Estados Unidos (Nickson y cols., 2000).

El Arsénico también se usó ampliamente como un pesticida. Se importaron 20,000 toneladas por año en Estados Unidos, y quizás dobla esa cantidad, fue usado para rociar exclusivamente en cosechas en Estados Unidos. Ninguna atención se prestó al último destino del químico, y el arsénico en consecuencia ahora aparece en comestibles.

Es importante distinguir los problemas en Bangladesh, Bengala Oriental y, en menor grado, Mongolia Interna y Chile, de los problemas que se han encontrado hasta ahora en el resto del mundo. Estas situaciones tienen en común que en estos países asiáticos la contaminación del suelo y agua son debido a una llanura aluvial donde el arsénico se encuentra y donde se han derrumbado colinas circundantes por milenios las cuales han diseminado el arsénico en zonas de suelo y agua que colindan con las poblaciones humanas (Basu y cols., 2001).

1.6.-La contaminación por arsénico en México

La exposición crónica al arsénico por la ingestión de agua sea reportado en varios estudios en seis áreas de la región lagunera en Coahuila México (con una población de 200,000 personas durante el periodo de 1963-1983). El rango de las concentraciones de arsénico en esta zona es de 0.008-0.624 mg/L y las concentraciones más grandes encontradas llegan hasta 0.05 mg/L. La forma del arsénico más abundante es la forma inorgánica pentavalente encontrada en el 93% de las muestras, el porcentaje restante se refieren a las formas trivalentes. Se han también encontrado altas concentraciones de fluoruros que van de 0.5-3.7 mg/L (Badar y Kazuo, 2002).

Además de la presencia del arsénico en la región lagunera, se encuentran otros estados en los cuales se ha encontrado contaminación natural de arsénico en los últimos años, tal es el caso de los estados de Hidalgo, Guanajuato y Jalisco; debido a este problema el estudio de la toxicidad del arsénico en nuestro país ha cobrado importancia en los últimos años, y en el caso de la genética toxicologica se ha hecho un mayor énfasis en el estudio de la exposición a arsénico y sus diferentes compuestos.

1.7.- Genética toxicológica

La genética toxicológica se encarga de evaluar la acción mutagénica y carcinogénica de los agentes que se ponen en contacto con los organismos vivos. La genética toxicológica desempeña un papel dual, uno de ellos es el diseño de métodos y ensayos para el análisis de riesgo que definen el impacto de los agentes genotóxicos presentes en el ambiente y el segundo papel es el investigar mediante las pruebas genéticas apropiadas la manera de detectar la presencia y los mecanismos de acción de las sustancias carcinogénicas (Arman y cols, 2001).

Los seres vivos de la población mundial viven expuestos a cerca de cien mil sustancias con capacidad de generar cáncer, ya que nueve de cada diez tumores malignos son producidos por elementos que se encuentran en el medio ambiente (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000).

El cáncer es una patología que se encuentra entre las tres primeras causas de muerte en México. El cáncer de mama por ejemplo es una de las principales causas de mortandad femenina en la población mexicana, en tanto que entre los varones predominan los tumores malignos de pulmón y de próstata”.

Para que un tóxico ambiental cause un daño, en primer lugar se debe estar expuesto a él y en segundo lugar el tóxico tiene que vencer las defensas del organismo que tratan de impedirle que llegue al tejido blanco en forma activa. Las defensas consisten fundamentalmente en mecanismos que restringen la movilidad y disminuyen el período de exposición del tejido blanco (Manahan, 2003). Esto lo puede hacer el organismo poniendo barreras a su desplazamiento hacia determinados tejidos, disminuyendo su difusibilidad a través de las membranas celulares y/o facilitando su excreción. El siguiente esquema muestra la forma general mediante la cual diferentes tóxicos como el arsénico y sus metabolitos tóxicos pueden ser metabolizados en el organismo y ser excretados o tomar formas tóxicas que causan diversos daños tóxicos.

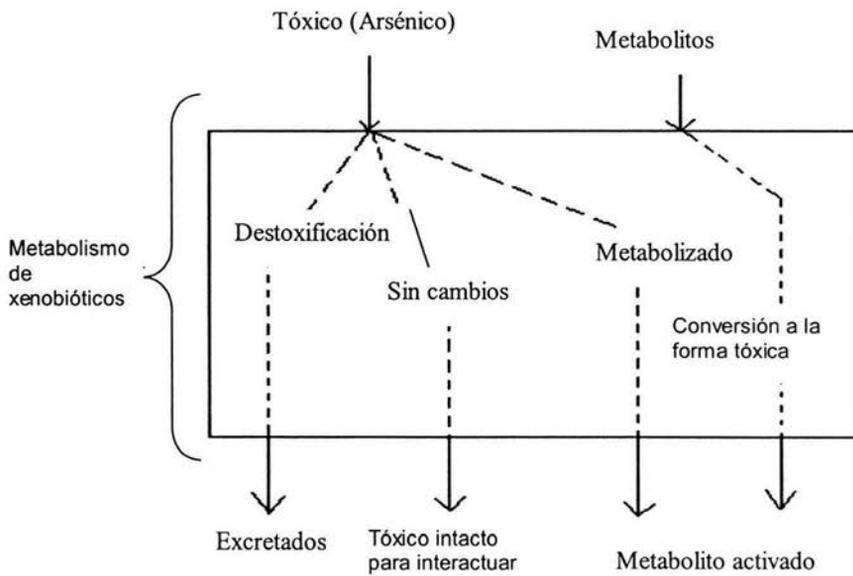


Figura 1.- Rutas de las especies xenobióticas y las interacciones bioquímicas que pueden dirigir los efectos tóxicos (Modificada de Manahan, 2003.)

CAPÍTULO II BIOTRANSFORMACIÓN DEL ARSÉNICO

2.0.-Biotransformación y detoxificación del arsénico.

El metabolismo del arsénico involucra su detoxificación en el hígado y el paso de las formas pentavalentes a las formas trivalentes así como la acción de diferentes enzimas sobre estas para metilarlas formando el ácido monometil arsénico (MMA) y el ácido dimetil arsénico (DMA) los cuales son metabolitos estables del arsénico inorgánico y son excretados principalmente en orina, por lo que el interés por el DMA y las sales de sodio del MMA han sido usados desde hace tiempo por el hombre como herbicidas, sin embargo en décadas más recientes el papel de estos metabolitos ha cobrado importancia por el efecto toxico aun mayor que las especies inorgánicas de acuerdo a estudios en diferentes partes del mundo (Vather, 2001).

El metabolismo del arsénico tiene un papel importante en sus efectos tóxicos, muchas pero no todas las especies de mamíferos metilan el arsénico inorgánico. El arsénico ambiental permanece en la forma pentavalente, el arsénico trivalente se encuentra se encuentra en condiciones reductoras como en depósitos de agua subterránea, el agua que se bebe aquí puede contener grandes cantidades de arsénico y minerales solo en algunas regiones específicas (Vather, 2002).

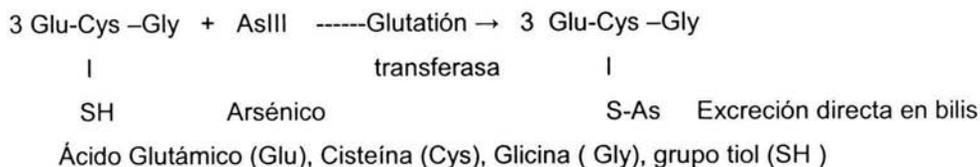
Las formas solubles del arsénico son eficientemente absorbidas en el tracto gastrointestinal y distribuidas a otros órganos. La absorción pulmonar de las especies como el trióxido de arsénico se da de manera rápida, mientras que el arsenato de calcio se da mas lenta su absorción, además de influir el tiempo de exposición en el aire contaminado por estas sustancias (Hughes, 2002). En el caso de los metabolitos trivalentes de arsénico, la exposición humana se da principalmente por ingestión o inhalación resultando en la excreción urinaria del arsénico inorgánico y de los metabolitos ácido monometil arsénico (MMA) y ácido dimetil arsénico (DMA), pero una parte es retenida en diferentes tejidos en especial en el hígado y en riñón, a pesar de esto la retención de los metabolitos se da en sangre y pulmón, donde diversos estudios

muestran las concentraciones de As y metilados en estos órganos después de 4 horas de tratamiento.

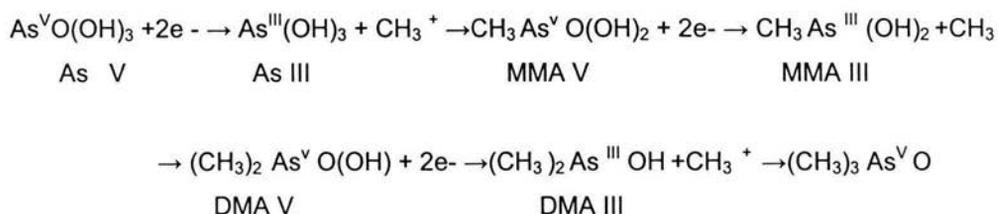
Muchos estudios experimentales han resaltado el papel del hígado como un sitio importante de metilación del arsénico ya que es después de su ingestión y distribución, cuando el arsénico pasa al hígado, esto está soportado por estudios que marcan al arsénico metilado en pacientes con enfermedades de hígado relacionada con la exposición al arsénico; los efectos tóxicos de los metabolitos se mencionarán un poco más adelante.

El arsénico inorgánico trivalente es la especie que más predomina en diferentes tejidos, encontrándose en estos con un porcentaje alrededor del 53-85% del total del tejido, mientras que la especie inorgánica pentavalente (As V) tiene menos del 2%, pero en el caso del ácido monometil arsénico (MMA) está del 10-32% y el dimetil arsénico (DMA) del 4-1%, he ahí la importancia biológica del estudio de estos últimos al permanecer más tiempo en el organismo tanto de personas expuestas crónicamente como agudamente al arsénico. (Thomas y cols., 2001).

Existe una variación entre especies y entre poblaciones humanas en la metilación de las sales inorgánicas ya que éstas son metabolizadas por un proceso secuencial que relaciona una reducción de dos electrones del arsénico pentavalente a la forma trivalente del arsénico orgánico. La reducción puede ocurrir con proteínas y enzimas en la presencia de un grupo tiol como en el caso del glutatión (GSH). La reducción del arsénico a la forma trivalente por el glutatión reducido (GSH) ha sido demostrada experimentalmente ya que es la unión para la formación del arsenotriglutatión [As^{III}(GS)₃], un complejo en el cual el arsénico trivalente está unido a la parte tiol de los residuos de las cisteínas de las tres moléculas de glutatión como se muestra enseguida:



El estudio del arsenato metabolizado en el hígado humano a servido para encontrar algunas MMA reductasas que se han purificado junto con glutatión-S- transferasas en estudios recientes lo que implica que la metilación del arsénico es enzimática requiriendo S-adenosilmetionina (SAM) y una metiltransferasa (Thomas y cols., 2001) .



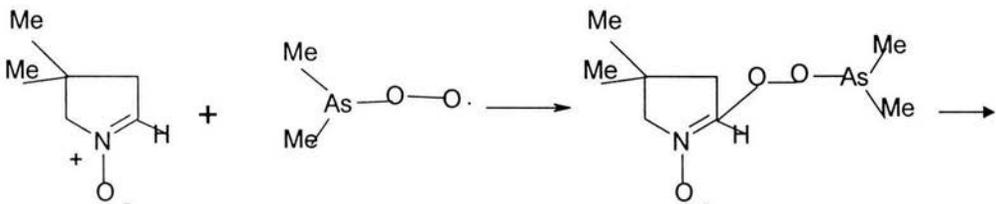
El metabolito predominante del arsénico inorgánico, el ácido dimetilarsénico $[(\text{CH}_3)_2\text{As}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})]$, es rápidamente excretado por la mayoría de los mamíferos. El óxido trimetilarsina $[\text{TMAO}, (\text{CH}_3)_3\text{As}^{\text{V}}\text{O}]$ es el producto final del esquema, pero es encontrado en bajas cantidades en la orina después de una exposición a arsénico. Por muchos años el ácido monometilarsénico (MMA^{III}) y el ácido dimetilarsinoso (DMA^{III}) han sido propuestos como intermediarios en el metabolismo del arsénico. Recientemente el MMA y el DMA han sido detectados en orina de humanos en exposiciones crónicas debido al agua de beber contaminada con arsénico y en la bilis de ratas tratadas con arsénico (Vather, 1994).

La exposición a diferentes formas inorgánicas o a los metabolitos del arsénico (formas orgánicas) provoca la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a sí como de radicales libres tanto *in vitro* como *in vivo*. En el caso de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se ha notado la activación del factor NF-κB debido a estrés oxidativo producido por los metabolitos del Arsénico produciendo ruptura de la cadena

simple de ADN en pulmón de ratas y ratones tratados con dimetil arsénico (DMA). Así mismo se ha encontrado mediante resonancia paramagnética de electrón-spin la producción de radicales peroxilo $(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}\cdot$, y del radical superóxido (O_2^-) durante la reducción del DMAV a dimetil arsina $[(\text{CH}_3)_2\text{As}^{\text{III}}\text{H}]$, sin embargo estos efectos no se han encontrado en cultivos de células humanas ni en tejidos humanos (Thomas y cols., 2001).

Otro mecanismo potencial para la generación de ROS por el dimetil arsénico DMA es la liberación de Hierro (Fe^{III}) a partir de la ferritina del bazo en ensayos *in vitro* se ha sugerido que el hierro induce ROS provocando daño al ADN y probablemente la carcinogenesis del arsénico a través de los metilados. Los estudios del DMA llevados a cabo por diversos investigadores (Lee y cols., 1994, Vather y cols., 1984, Hughes y cols., 2000) mencionan el efecto carcinogénico del DMA al dañar al ADN, mientras que otros (Terada y cols., 1996) utilizando generadores de ROS comparan al DMA y estos para producir efectos similares sobre el ADN. Se ha postulado que la formación de aductos estables entre el ADN y los metilados puede incrementar la susceptibilidad a iones como el súper oxido O_2^- (Liu y cols., 2001) y que el DMA inhibe la reparación del ADN *in vitro* permaneciendo este tipo de daños en el ADN.

La formación de radicales como el superoxido y el radical peroxilo también ayudan por sí mismos para seguir metilando el arsénico trivalente en el organismo así lo menciona Yamanaka utilizando la dimetil arsina en estudios *in vitro* y ácido dimetil arsénico (Yamanaka y col., 1989, 1990).



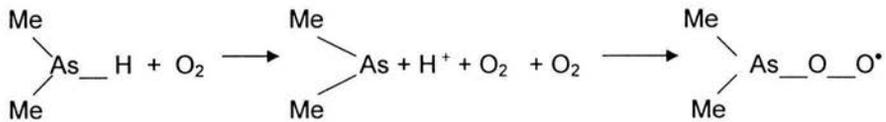


Figura 2.- Inducción de daño por radical peroxilo y la reacción de la dimetil arsina en la dimetilación del arsénico trivalente y el O₂. Modificada de Yamanaka y cols, 1994).

El ácido dimetil arsénico también es capaz de producir radicales libres *in vitro* en tejido de pulmón ayudando a producir daño sobre el ADN, produciendo ruptura de la cadena simple del ADN y un incremento en el contenido de heterocromatina (Yamanaka y cols, 1994).

2.1.-Mecanismo de toxicidad del arsénico pentavalente

El arsenato (V) puede reemplazar al fosfato en muchas reacciones bioquímicas ya que tienen estructura similar y por tanto propiedades semejantes. Por ejemplo, las reacciones del arsenato *in vitro* con glucosa y gluconato para formar glucosa-6-arsenato el cual es el sustrato para la glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa y puede inhibir a las hexocinasa como la glucosa-6-fosfato. El arsenato también puede reemplazar fosfatos en la bomba de sodio y el intercambio de transporte de aniones en eritrocitos humanos. Se ha visto que en células de carcinoma epidermoides crecen en medio libre de fosfatos el arsenato se acumula en las células de manera notable. El agotamiento de ATP por arsenato ha sido observado en sistemas celulares. Los niveles de ATP se encuentran reducidos en conejos y eritrocitos humanos.

2.2.- Mecanismo de toxicidad del arsénico trivalente

Grupos funcionales específicos sin enzimas, receptores o coenzimas como los tioles tienen un papel importante en la actividad de estas moléculas. Los arsenicales trivalentes parecen reaccionar *in vitro* con las moléculas endógenas con grupos tioles como el glutatión como ya se había dicho antes y con la cisteína. La unión del MMA y el DMA a las proteínas *in vitro* ocurre más frecuentemente que con las formas pentavalentes. El arsénito tiene una mayor afinidad por los ditioles que por los monotioles como en la transferencia del arsénito a complejos (GSH)₃-As al ditiol ácido 2,3 dimercaptosuccínico. La unión del arsénico trivalente a los grupos tiol puede inhibir importantes eventos bioquímicos provocando toxicidad.

La piruvato deshidrogenasa (PDH) es una subunidad multi compleja que requiere cofactores como el ácido lipoico un ditiol para la actividad enzimática. El arsénito inhibe la PDH por unión al ácido lipoico. Algunos investigadores como Petrick y colaboradores (2001) muestran que el MMA es un inhibidor más potente de la PDH que el arsénito. La PDH oxida piruvato hacia acetilCoA un precursor intermediario del ciclo de Krebs. El ciclo de Krebs degrada los intermediarios y suministra equivalentes reducidos al sistema de transporte de electrones para la producción de ATP. La inhibición de la PDH por consiguiente provocaría disminución en la producción de ATP's. Esta inhibición de la PDSH puede explicar en parte la disminución en carbohidratos observada en ratas administradas con arsénito.

2.4.-Mecanismo de toxicidad de los metilados de arsénico

Los arsenicales trivalentes metilados como el MMA son potentes inhibidores de la GSH reductasa y el sistema de la tioredoxina reductasa con cyt 19, la inhibición puede ser por la interacción con grupos tioles de estas moléculas. La actividad de los metilados de los arsenicales trivalentes (MMA y DMA) parece ser mucho mayor que el arsénito, la inhibición de enzimas por estas moléculas debe alterar los sistemas redox celulares eventualmente y como consecuencia provocar citotoxicidad.

Estudios recientes mencionan al MMA como más reactivo que las formas inorgánicas del arsénico in vitro en hepatocitos y keratinocitos humanos (Petrick y cols, 2000). Más interesantes son algunos estudios que indican que el porcentaje urinario de MMA en muestras de personas esta relacionado a los efectos en la salud y su retención en determinados tejidos debido a la ingesta de agua contaminada por arsénico (Del Razo y cols.,1997). En Taiwán las lesiones en piel fueron las más abundantes por ingesta de agua encontrándose alrededor del 2% de MMA en orina. El numero de aberraciones cromosomicas en linfocitos también esta aumentado en personas expuestas asociándolo al MMA encontrado en orina.

Existen variaciones en la metilación del arsénico tanto en poblaciones humanas diferentes como entre individuos, existen varios factores en este caso desde el nivel de la dosis administrada el tiempo de exposición, la vía de administración así como el estado nutricional del individuo, otros estudios dicen que la edad y el embarazo también influyen de cierta manera en la metilación del arsénico. Los estudios realizados determinan el arsénico metilado en diferentes lapsos del individuo y mencionan que se mantiene estable pero que solo factores como los anteriormente mencionados podrían alterar la metilación en varios casos.

CAPÍTULO III CARCINOGENESIS DEL ARSÉNICO

3.0.-Mecanismos moleculares de carcinogénesis por arsénico

A pesar de que es notoria la carcinogenicidad del arsénico en humanos y de que hay mucho estudios y resultados de ello tanto en animales como humanos, el mecanismo de acción por el cual se lleve a cabo tanto por las formas inorgánicas como orgánicas no es del todo conocido. Muchos diferentes mecanismos de acción han sido propuestos y algunos han sido recientemente evaluados por expertos en el campo. (NRC, 2001). Algunos mecanismos propuestos incluyen genotoxicidad, proliferación celular, alteración en la reparación del ADN y estrés oxidativo por metilación del ADN así como co-carcinogenesis y promoción de tumores. Debido a esto definir un mecanismo de acción para la carcinogenicidad del arsénico ha sido difícil por muchas razones, por lo que primeramente mencionamos el proceso por el cual el arsénico conduce a la carcinogenesis.

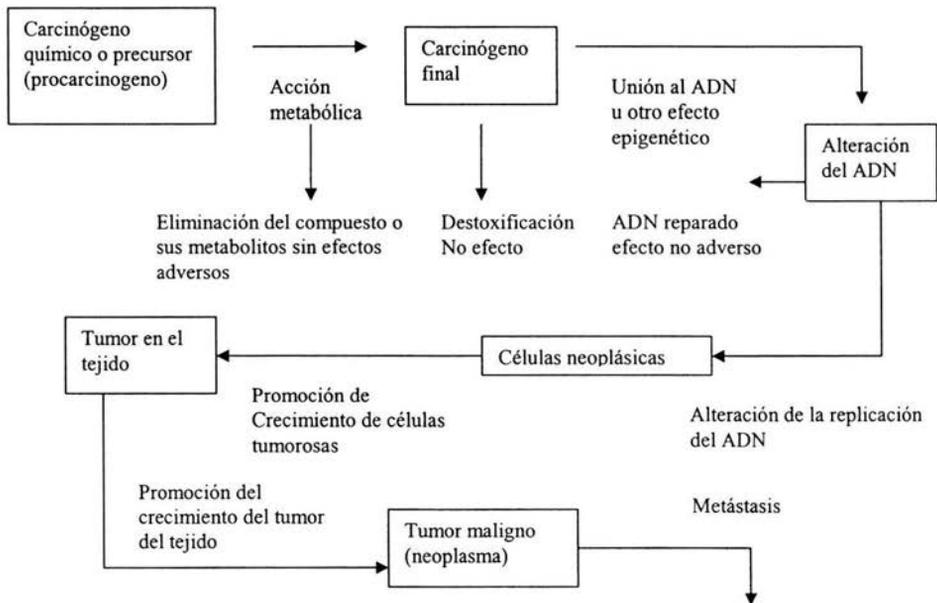


FIG. 3.- Proceso carcinogénico producido por sustancias como el arsénico. Manahan, 2003.

Algunas de las causas para referirse a la carcinogenicidad de varios arsenicales se describen en base a la variación en los resultados y en ensayos estandarizados en animales, faltando evidencia de que el arsénico es un mutágeno característico se ven en los estudios de las diferentes formas trivalentes del arsénico y sus efectos.

3.1-Estudios de genotoxicidad *in vitro*

El arsénito por ejemplo no parece ser un mutágeno característico en los ensayos estandarizados; el arsénito no es mutágeno en las pruebas con *Escherichia Coli* para convertir la reversión de triptofano positivo, tampoco se demostraron en células de ovario de Hámster en estudios con ATP asas y otras mutantes, sin embargo el arsénito induce de cualquier manera deleciones y mutaciones en células híbridas de hámsteres y humanos.

Las aberraciones cromosomales, complejos ADN-proteínas, (Ramírez y cols., 2001) e intercambios de cromátidas hermanas son observadas en células embrionarias de hámster, fibroblastos y linfocitos humanos (Rossman y cols 1980, Kochhar 1996, Rasmussen y Menzel. 1997) en exposiciones a arsénico inorgánico. En cuanto a las aberraciones cromosómicas e han encontrado cromátidas dispersadas, rotas y fragmentadas reduplicadas así como cromosomas rotos. Estos efectos son dosis-dependientes encontrándose al arsénito más potente que el arsenato para producirlos.

Estudios recientes (Mass y cols. 2001) muestran que los arsenicales trivalentes metilados como el MMA y el DMA son directamente genotóxicos. Un súper enrollamiento del DNA ϕ X174 fue atribuido al DMA y al MMA, además estos metabolitos dañan a los linfocitos humanos a nivel DNA de 386 a 77 veces de manera más potente que el arsénito de sodio.

3.2.- Co-mutagénesis

El arsénico inorgánico es co-mutagénico junto a otros químicos y con luz ultravioleta en células de mamíferos, provocando aberraciones cromosómicas graves. Existen también aberraciones cromosómicas por el ADN complejo por diepoxibutano en linfocitos junto con arsénico. Los rayos X y la Luz ultravioleta en fibroblastos después de exposición al arsénito inducen también intercambio de cromátidas hermanas y otras aberraciones cromosómicas pero con diferencias a las de del diepoxibutano y arsénito o con luz ultravioleta con arsénito.

3.3.- Genotoxicidad *in vivo*

La administración de arsénito en ratones resulta en un incremento lineal dosis-dependiente de micronúcleos en eritrocitos policromáticos. Los micronúcleos inducidos son observados solamente en células somáticas. Estudios en células de médula ósea muestran intercambios y deleciones de cromátidas y cromosomas.

Después de exposiciones al dimetil arsénico pentavalente (DMA^V) (1.5g/kg) hay cadenas simples de DNA incompletas además de entrecruzamientos de DNA tanto en ratón como en pulmón de ratas expuestas. El daño no es observado en ratones después de 12 horas de exposición y es reparado hasta las 24 horas.

En los estudios *in vivo* se reportan entrecruzamientos o aductos de ADN y proteínas incrementados en vejiga e hígado en células parénquimales de ratón con diferentes tratamientos de arsénico en deficiencia de colina (Parrish, 1999).

3.4.-Amplificación de genes

El arsénico une la amplificación del gen que codifica para la enzima dihidrofolato reductasa, por lo que algunos sugieren que la amplificación genética inducida por el arsénico tiene un papel importante en el efecto carcinogénico (Lee, 1988).

Las células 376 de ratones crecidas en medio que contiene arsénico inorgánico desarrollan resistencia a los efectos tóxicos del metotrexato, se ha visto que el número de células resistentes es dependiente de la dosis de arsénico, siendo el arsénito mucho más potente que el arsenato. La línea celular de hígado de rata TRL1215 es transformada por el arsénito según los estudios de Zhao en 1997 donde las células fueron transformadas después de una exposición de 8 semanas al arsénito y entonces fueron inoculadas sobre ratones atímicos, se encontró una relación dosis dependiente en el desarrollo de tumores en el sitio de administración y de tumores en metástasis en pulmón. Las células retienen su estado de transformación y la habilidad para inducir tumores en ratones aun después de cambiar el medio que contiene arsénito sugiriendo que ocurrió un cambio genético permanente.

3.5.-Alteración en el sistema de reparación del ADN

La inhibición de la reparación del ADN debe ser de las más importantes en los daños genotóxicos, esta reparación es inhibida en células tratadas con arsénito de sodio pudiendo provocar un efecto co-mutagénico con rayos x, luz ultravioleta y algunos químicos. La reparación del ADN por escisión de dímeros de timina en fibroblastos humanos es inhibida por el arsénico inorgánico, el As_2O_3 se mostró el más potente que otros. La actividad de la ADN ligasa en extractos nucleares es disminuida por el arsénito (55% en 10 μM), se sugiere esta inhibición por la alteración celular de los niveles redox afectando las señales de transducción y la fosforilación de proteínas a las cuales se une la ADN ligasa para su actividad.

Las células eucariontes responden al daño sobre las cadenas de ADN por estimulación de la enzima poli (ADP ribosa) polimerasa y esta enzima tiene un papel muy importante en la reparación del ADN. Varios estudios muestran una significancia dosis-dependiente en la disminución de la actividad de esta enzima en humanos en células de linfoma de linfocitos T. Las dosis de de 10 μM de arsénito hay una disminución del 50% de la actividad de esta enzima y disminución del 80% de la viabilidad de las células. Hay que hacer notar que esta enzima contiene dos grupos sulfhidrilo y el arsénito se puede unir a uno o los dos grupos para inhibir la enzima.

3.6.-Alteración de la metilación del ADN

La alteración en la metilación del ADN se sugiere como una vía importante en el desarrollo del cáncer. Los estudios de Mass y cols en el 2001 examinan el efecto del arsénico sobre la metilación del ADN y su relación con la expresión del gen de p53 en la línea celular de adenocarcinoma humano A549. El arsénito incrementa la resistencia sobre la región del promotor del gen p53 por la enzima de restricción Hpa II la cual se une a las citosinas no metiladas en las secuencias CCGG. La resistencia al sitio indica mayor metilación en las citosinas de estos sitios del gen. La hipermetilación inducida por el arsénito fue confirmada por la secuenciación del ADN de la región del promotor marcando con bisulfito para visualizar la 5 metilcitosina. D Sin embargo a pesar de que el gen del p53 fue hipermetilado no se sabe si su expresión tan bien fue alterada por el proceso.

El ADN de las células TRL 1215 de hígado de rata provocó transformación por el arsénito hipometilado siendo el efecto dosis dependiente en exposiciones largas. En las células transformadas los niveles de enzimas que donan los grupos metilos disminuyeron.

3.7.-Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se da por la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden reaccionar con algunos constituyentes celulares como los grupos tioles o los lípidos. El arsénico parece inducir estrés oxidativo tanto *in vivo* como *in vitro* provocando la presencia de proteínas de choque térmico (MAP cinasa, JNK, MKP-1) y de estrés (HO-1, Hsp-90, ciclina p1) en cultivos de células humanas. Se han detectado *in vivo* especies reactivas de oxígeno en células híbridas de hámsteres y humanos después de 5 minutos de exposición al arsénito de sodio (Del Razo y cols, 2001). Las enzimas catalasa y súper oxido dismutasa que se encargan de metabolizar sustancias oxidantes, reducen el arsénito en células de ovario de hámster. Antioxidantes como la vitamina E, la metilamina y benzil-alcohol reducen la muerte de fibroblastos humanos por arsénito. El dimetil arsénico un radical peroxilo ha sido detectado *in vitro* por daño oxidativo en pulmón de ratón después de exposición a DMA.

Los arsenicales orgánicos trivalentes inhiben a la GSH reductasa y a la tioredoxina reductasa, esto provoca que la disminución de la habilidad de la célula para protegerse contra oxidantes. La expresión génica de la tioredoxina ha sido afectada por lo que parece haber también una relación con los factores de transcripción del gen de esta enzima.

En las células de mamíferos la glutatión peroxidasa y catalasa son enzimas claves en la regulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), y de la protección celular contra el daño por arsénito. El arsénito indujo a la apoptosis a varias líneas celulares provocando la disminución del antioxidante N-acetil- L-cisteína el cual contiene grupos tioles ya que este antioxidante se encarga de inhibir la apoptosis además de unirse a las ROS que favorecen también en inicio de la apoptosis (Cohen y cols, 2001).

La producción de radicales libres como ya se había mencionado anteriormente, también es un mecanismo de daño para provocar rupturas o alteraciones en el ADN así como un incremento en la heterocromatización, de acuerdo a las investigaciones *in vitro* de Yamanaka (Yamanaka, y cols 1989, 1990, 1994, 1997) en sus resultados se proponen los mecanismos mediante el cual el dimetil arsénico (DMA) y la dimetil arsina producen radicales libres y todos en conjunto ayudan a provocar el daño sobre el ADN.

3.8.-Proliferación celular

El desarrollo del cáncer involucra en parte el descontrol de la proliferación celular, lo cual puede resultar en citotoxicidad y la consecuente regeneración de las células o la mitogénesis directa.

El incremento en la proliferación celular se ha presentado en vejiga de ratón después de 8 semanas de exposición a DMA pentavalente, en el agua para beber en riñón de rata se encontró después de 4 semanas de administración oral de DMA pentavalente (57-113mg/ kg día, 5 días/semana). Otro incremento en la proliferación celular se encontró en ratas administradas con DMA después de 8 semanas mostrando alteraciones en la superficie de las células endoteliales (Rosen, 2002).

La piel de ratones transgénicos administrados con agua que contiene arsénito mostró hiperkeratosis. Los keratinocitos humanos proliferan después de la exposición a arsénito y varios factores de crecimiento son estimulados durante este proceso, por ejemplo a dosis bajas (1-10nM) arsénito de MMA^{III} y DMA^{III} estimulan la proliferación de keratinocitos epidermales humanos normales. La secreción de factores y citosinas relacionadas con el crecimiento fue elevada con arsenicales trivalentes en diversos estudios *in vivo* e *in vitro* (Hughes y cols, 2002).

La ciclina D es importante dentro del ciclo celular sobre todo en G1 junto con otras proteínas inactivan a la pRb la proteína responsable del control anti-crecimiento. La ciclina D se encuentra sobre expresada en fibroblastos humanos después de una

exposición a arsénito de sodio por 14 días (Vogt, 2001) El arsénito parece en este caso alterar el ciclo celular debido a la proliferación celular encontrada después del tratamiento.

3.9.-Promoción de tumores

El DMA^V un metabolito del arsénico es un promotor de tumores ya que se ha observado en ratas y ratones en diferentes órganos (en rata vejiga, riñón, hígado y glándula tiroideas; en ratón en pulmón). La administración del DMA fue en el agua de beber (2-400 ppm), los tumores empiezan a manifestarse a niveles de 10 ppm.

3.10.- Otros sitios blancos del arsénico

La discusión sobre si el arsénito se puede unir directamente y fuertemente a los grupos tioles y ditiolos ha disminuido por datos más actuales sobre el tema, respaldándose entonces los efectos sobre la célula en especial por ser sitios de unión específicos de muchas enzimas. A concentraciones bajas de 10 μ M el arsénito inhibe el sitio de unión de los receptores glucocorticoides en la región que contiene el grupo ditiol, además el arsénico se puede unir a los residuos de cisteína en los receptores hormonales de α -estrógenos y algunos estudios indican que también se une a los sitios activos de los receptores del estradiol, sin embargo el arsénito activa la transcripción del gen de estrógenos por unión a su receptor.

El trióxido de arsénico puede afectar el crecimiento o desarrollo tumoral en varias células por inhibición de la angiogenesis, el tratamiento de células endoteliales de venas humanas con trióxido de arsénico resulta en alteraciones dosis dependiente en la morfología en la fisiología culminando en apoptosis. La regulación disminuida en la producción de factores de crecimiento endoteliales vasculares se pensó como una de las causas. La relación del arsénico con leucemia en la línea celular HEL sugiere una acción anti-angiogénica del arsénico sobre las células endoteliales y la leucemia.

La exposición al arsénico trivalente de ratas preñadas en el agua de ver muestran daño por necrosis y la inducción de apoptosis por especies reactivas de oxígeno (ROS) así como su protección por antioxidantes, esto también ha sido evaluado en cultivos de células humanas (Sukumar y cols, 2002). Estos estudios determinaron las enzimas involucradas en el ciclo del glutatión no encontrando efectos claros pero en el caso de las especies reactivas de oxígeno estas fueron incrementadas por el tratamiento de arsénico en las células tratadas y la administración en ratas, además se relaciona la pérdida de viabilidad de estas con la cantidad de ROS y con la necrosis de las células en el análisis morfológico así como la inducción de la apoptosis celular, mostrando en el caso de las células de cerebro la activación de los dos procesos, sin embargo estos efectos disminuían con la administración de antioxidantes como la vitamina C y la vitamina E.

El citoesqueleto se ha sugerido como un potencial blanco de los compuestos de arsénico, este se puede unir a tubulina con grupos sulfidilo, así como la unión a los microtubulos durante la mitosis induciendo apoptosis. Los experimentos en células de leucemia mielocítica muestra que el trióxido de arsénico inhibe la polimerización de microtubulos y tubulina, y los estudios de arsénito de sodio en la línea celular WRL-68 de hígado humano muestra expresión de citoqueratinas y entrecruzamientos ADN-proteínas por arsénico incrementando con concentraciones de arsénito de sodio de forma dosis-dependiente. Se ha sugerido que estos daños nos pueden explicar de cierto modo las deleciones y pérdidas de cromosomas durante la división celular y la presencia de micronúcleos. Enfermedades de hiperqueratinización del epitelio estratificado de la piel, las manos y los pies relacionadas con la intoxicación y exposición al arsénico también pueden ser explicadas debido a esto. (Ramírez y cols, 2000).

CAPÍTULO IV EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO

4.0-Exposición al arsénico

El arsénico está distribuido en muchas partes y en contacto frecuente con los humanos aunque sean bajos niveles de este elemento en el medio ambiente, la exposición ocupacional se da por inhalación constante de partículas de arsénico en los trabajadores de la fundición, así como empleados en la elaboración de pesticidas con arsénico así como trabajadores del vidrio. Se han detectado en varias ciudades concentraciones transportadas en el aire que van desde algunos microgramos a $1\mu\text{g}$ por metro cúbico. El arsénico está presente en el agua de mar por lo que se puede encontrar en alimentos provenientes de este, además de estas formas también se encuentran otras formas de exposición como agua potable contaminada, alimentos contaminados, frutas y vegetales donde se utilizó pesticidas, tomando arsenicales medicinales, en el tratamiento de maderas, y al fumar tabaco encontrado en cigarrillos; también en depósitos de sulfatos de hierro o percolatos en suelos volcánicos y sedimentos. En algunas áreas geográficas tiene niveles altos de arsénico que contaminan las aguas y ríos cercanos, sitios de desperdicios químicos deben contener altas cantidades de arsénico frecuentemente desconocidas que llegan a ríos o a los residentes cercanos. El arsénico inorgánico es liberado frecuentemente durante la producción de cobre y otros metales en las fundiciones y se exponen tanto trabajadores como personas que viven cerca de las fábricas e industrias.

Los efectos crónicos de exposición prolongada tienen una aparición reciente. La pigmentación superficial, keratinosis y cánceres superficiales eran encontrados en Taiwán por Tseng en 1977 entre las personas que bebieron de pozos contaminados con arsénico (pero ningún efecto se vio debajo de concentraciones de 150 partes por billón (ppb), que puede ser por consiguiente el umbral biológico) y se encontró una incidencia muy alta de pulmón, ampolla y otros tipos de cáncer en Taiwán por Dr Chien-Yen Chen en el 2000 y por el Dr Allan Smith y colaboradores en Chile en 1992.

Después de varios años de exposición a arsénico niveles bajos, las varias lesiones superficiales aparecen. Éstos se manifiestan por hiperpigmentación (las manchas oscuras), hipo pigmentación (las manchas blancas) y keratinosis de las manos y pies. Después de una docena de años se esperan algunos cánceres superficiales, veinte o treinta años después de exposición a 500 ppm de arsénico, los cánceres internos (pulmón, riñón, hígado y ampolla) aparecen entre 10% de todas las personas expuestas. Es más, la relación de la dosis-contestación para estos cánceres interiores es consistente con ser lineal sin umbral. Fotografías de varias víctimas por efecto del envenenamiento por arsénico están disponibles en Bangladesh y Mongolia Interno.

La exposición larga por concentraciones de arsénico se puede dar bebiendo agua contaminada la cual puede llevar a piel, ampolla, pulmón, y cáncer de la próstata. El cáncer se puede dar de ingerir arsénico a los niveles bajos incluyendo enfermedad cardiovascular, diabetes, y anemia, así como los efectos reproductores y de desarrollo, Inmunológicos, y neurológicos.

La norma actual de 50 ppm fue da por la EPA en 1975, basada en un Servicio de Salud Público normal que originalmente se estableció en 1942. En marzo de 1999, se informa por la Academia Nacional de Ciencias que la norma actual no logra la meta de EPA de proteger la salud pública y debe bajarse lo más pronto posible. Bajo las Enmendaduras del Acta de Aguas Potables Seguras de 1996, EPA se exige promulgar una regla final en el 1 de enero de 2001. Actualmente EPA también está proponiendo una meta de salud pública de cero para arsénico. La meta de salud es el nivel más bajo al cual nadie se anticipó por los efectos de salud que ocurrirían. EPA también fija las metas de salud públicas a cero para todos los carcinógenos conocidos para que no haya dosis.

En el caso del arsénico orgánico como los arsenatos (+5 formulario de arsénico) y el arsénico elemental los dos encontraron naturalmente en la tierra y en comidas donde no producen toxicidad rápidamente, de hecho, ellos se manejan bastante fácilmente por el cuerpo y eliminaron por los riñones.

Los arsenitos inorgánicos o los formularios trivalentes de arsénico, como el trióxido arsénico el cual ha usado industrialmente, se encontró como un contaminante en alimentos provocando diversos problemas legales. Estas especies químicas aumentan en el cuerpo, particularmente en la piel, pelo, y uñas, pero también en los órganos interiores. En promedio, hay aproximadamente 10-20 mg de arsénico en el cuerpo humano; los niveles más altos pueden llevar a problemas. El arsénico puede aumentar cuando la función del riñón disminuye; por suerte la absorción de arsénico es bastante baja, normalmente menos del 5 por ciento, la mayoría se elimina en el excremento y en la orina. El pelo y los niveles de sangres son actualmente la mejor manera de evaluar los niveles arsénicos, estos mostrarán los niveles normalmente aumentados cuando las cantidades más altas están presentes en el cuerpo (Vahter, 2002).

4.1.-Síntomas de toxicidad

Existe evidencia de que una exposición larga a ciertas concentraciones de arsénico incrementan el riesgo de producir cáncer, cuando la exposición es por inhalación, los primeros efectos es el riesgo de cáncer de pulmón. Cuando la exposición es por ingestión puede haber cáncer de piel además de cáncer de hígado, pulmón, vejiga y riñón.

Los síntomas de toxicidad no se conocen claramente. La media de succión de arsénico se estima a 1 mg. por día, principalmente de comida, pero éste no es ningún arsénico tóxico; este límite arsénico orgánico en comida generalmente se tolera bien. El arsénico elemental puede aumentar en el cuerpo y puede ser un problema, y los formularios oxidados de arsénico son tóxicos en las cantidades grandes. El trióxido arsénico se usa industrialmente y es el veneno más fuerte de los arsénicos. Debajo de 7-10 ppm. de arsénico en pelo un nivel relativamente seguro.

Cantidades que llevan a toxicidad: No hay ningún cuadro claro de deficiencia arsénico o toxicidad en humanos. Los posibles efectos de toxicidad arsénico incluyen pérdida de pelo, dermatitis, diarrea y otros síntomas gastrointestinales, fatiga, dolores de cabeza, confusión, dolores del músculo, y los problemas de la célula de sangres blancas, síntomas neurológicos, de hígado y daño del riñón. La exposición arsénico aguda puede causar una serie rápida de síntomas. La arsina gaseosa cuya exposición es muy tóxica a los pulmones y riñones y es a menudo fatal, la muerte por exposición a arsénico de bajo nivel, crónica tiene la apariencia de muerte por causas naturales, muy bueno para libros del misterio.

4.2.-Toxicidad del arsénico

Las sales inorgánicas del arsénico son altamente tóxicas. La dosis letal de ingesta de trióxido de arsénico es alrededor de 13 mg /kg peso en adultos mientras que las exposiciones bajas de 1-4 mg/día han causado serios efectos a la salud incluyendo muertes en niños pequeños. Enseguida se muestra una tabla de los efectos que el arsénico como muchos otros tóxicos puede ocasionar en el organismo:

Tóxicos o metabolitos tóxicos

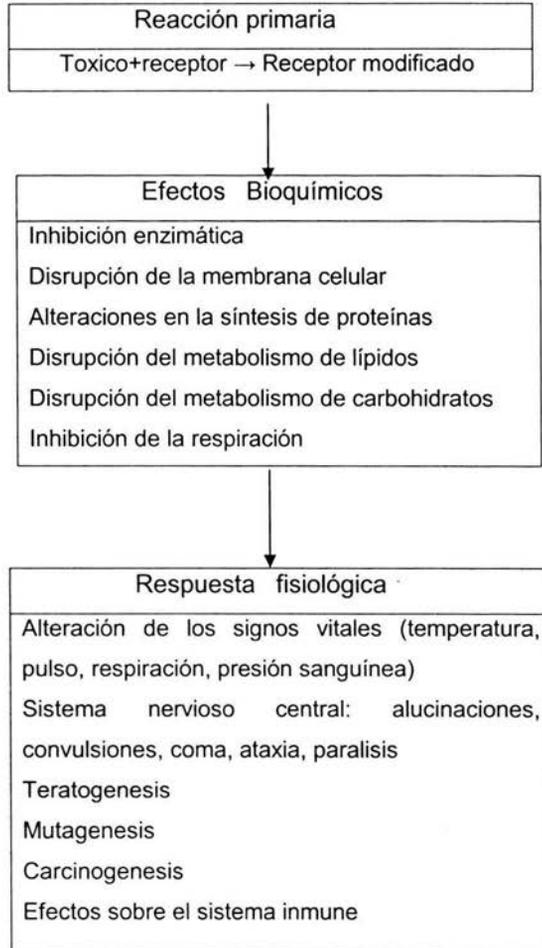


Figura 4.- Principales efectos durante la respuesta a tóxicos. Modificada de Manahan, 2003

Los síntomas de intoxicación por arsénico son náuseas, dolor de cabeza, dolor severo abdominal con daño gastrointestinal en membranas y mucosas, vómito violento y diarrea causados por parálisis del control capilar del tracto intestinal. La pérdida masiva de agua debe provocar daño renal y anuria. La intoxicación aguda de arsénico provoca finalmente excitabilidad aguda del cerebro y muerte por parálisis. Intoxicaciones agudas no fatales deben provocar daño al sistema nervioso periférico manifestado por pérdida de las sensaciones y degeneración a nivel axonal. Otros síntomas incluyen anemia y leucopenia, fiebre, anorexia, hepatomegalia y melanosis.

La inhalación de arsénico causa síntomas a nivel tracto respiratorio, como rinitis, laringitis y bronquitis. Las altas exposiciones provocan hiperplasia y atrofia en el tracto respiratorio y perforación septo nasal.

La exposición subcrónica y crónica ha sido asociada a una reducción en la velocidad de la conducción nerviosa e injuria hepática. Daño vascular periférico ha sido observado en gente con exposición al arsénico en el agua en Taiwán y Chile. La enfermedad desarrolla gangrena en las extremidades inferiores, estos efectos parecen estar asociados con la acumulación de arsénico por la ingesta de agua.

Diversos cambios en la excreción urinaria con presencia de porfirinas han sido mencionados en diversos estudios en poblaciones expuestas a altos niveles de arsénico en el agua. Una reducción en la excreción de coproporfirina III y de uroporfirina también ha sido reportada.

La arsina (AsH_3) es otra de las formas de arsénico esta causa anemia hemolítica seguida por daño renal agudo. La toxicidad es observada en exposiciones debajo de 10 ppm. La hemólisis ocurre después de la fijación de la arsina en una forma no volátil por hemoglobina. La hemólisis requiere la presencia de oxígeno y se ha sugerido que el arsénico elemental es la especie hemolítica activa sobre los intermediarios dihidricos del arsénico. Otra posibilidad es la generación de peróxido de hidrógeno durante la oxidación del arsénico en combinación con la inhibición de la catalasa.

Experimentos en animales muestran que en altas exposiciones a arsénico durante el desarrollo fetal resulta en deformaciones del cerebro, órganos urogenitales, esqueleto y ojos.

Los efectos adversos agudos, subagudos y crónicos a la salud de la exposición a arsénico inorgánico incluyen numerosos reportes e investigaciones que incluyen desde dermatitis, bronquitis crónica, cirrosis de hígado, neuropatía periférica, cáncer del hígado, pulmón, estómago, riñón, próstata, vejiga y piel. En otras palabras el arsénico puede causar un impacto negativo en diferentes órganos del cuerpo.

4.3.-Efecto de la dieta y la exposición al arsénico

Un problema importante por cubrir con la exposición arsénico es el efecto de dieta. Un problema general puede declararse sí: hay frecuentemente más de una causa de un cáncer o una lesión. El cáncer pulmonar puede causarse por cigarro que fuma o asbesto o ambos juntos, de una manera del sinergismo tal que los riesgos multiplican (en lugar de agrega) cuando los dos están presentes. En Estados Unidos se ha encontrado que las personas que tienen una dieta buena de fruta fresca y verduras tienen la mitad del riesgo de muchos cánceres, incluso cánceres pulmonares causados por tabaco, como aquéllos sin una dieta buena. Por analogía, uno podría esperar que el riesgo de cáncer pulmonar de arsénico sea menos entre aquéllos con una dieta buena, pero esto no se apoya todavía por los datos directos.

La investigación de la exposición crónica del arsénico involucra las propiedades carcinogénicas del elemento. De la misma forma los estudios epidemiológicos y resúmenes relacionan mucho sobre el cáncer pero no sobre los efectos no malignos. Muchos artículos se han publicado considerando los efectos vasculares del arsénico, pero se han examinado aspectos como arterosclerosis y enfermedades vasculares periféricas en diferentes áreas geográficas bajo condiciones de exposición variadas.

4.4.-Efectos vasculares

Estudios epidemiológicos de trabajadores expuestos a arsénico por inhalación han dado información acerca de la mortalidad a partir de enfermedades vasculares. Estas investigaciones incluyen algunas ocupaciones en diferentes países como manufactura de lana en Inglaterra, fundición de metales en Estados Unidos, Suecia y Japón así como la producción de insecticidas en Estados Unidos.

Hay una evidencia epidemiológica de una asociación causal entre el agua que contiene arsénico inorgánico y la ocurrencia de la enfermedad de pies negros, donde hay prueba además del incremento en la mortalidad a partir de desórdenes vasculares. Mucho más que por la enfermedad, no está claro porque el arsénico provoca un riesgo en enfermedades cerebro vasculares, a pesar de que hay estudios en Taiwán. La influencia del arsénico sobre el sistema vascular probablemente sea por las alteraciones de las funciones de los vasos sanguíneos que se han encontrado en trabajadores en la fundición del cobre expuestos al elemento en el aire y a concentraciones arriba de las permitidas en condiciones normales.

4.5.-Enfermedad del pie negro

El arsénico es un factor de riesgo para la enfermedad del pie negro, esto es la arterosclerosis periférica resultante de una gangrena seca y amputación espontánea de las extremidades afectadas. La enfermedad fue nombrada por sus características clínicas con los pies o manos decoloradas o negruscas. La causa de la enfermedad no ha sido esclarecida y el primer caso reportado en 1954 fue atribuido a este mal a intoxicación por potasio. Esta enfermedad es endémica en el suroeste de la costa de la región en Taiwán, donde algunos residentes han usado agua contaminada con arsénico por más de 50 años. Los pacientes con esta enfermedad exhiben una alta prevalencia de lesiones en piel por arsénico, incluyendo hiperpigmentación, hiperqueratosis y cáncer de piel, por lo que frecuentemente mueren de cáncer de pulmón, vejiga, hígado, riñón y próstata así como enfermedades circulatorias.

Las enfermedades vasculares periféricas, además han sido reportadas en pobladores que consumen agua contaminada con arsénico en el vino en Alemania.

La enfermedad de los pies negros usualmente empieza con entumecimiento o frialdad en las extremidades inferiores hasta los dedos del pie, aunque los dedos son afectados también, ataques y exacerbaciones han sido asociados con tiempo frío perjudicial, la agonizante y dolorosa condición hasta la gangrena termina en una amputación del miembro afectado que va del mes de la afección hasta en un año en gangrenarse siendo más afectados por lo que se ha visto hombres que mujeres. En algunos reportes reciente se señala que compuestos como la ergotamina, ácido D-lisérgico y/o ergotamina están presentes en muestras de agua en el área donde se encuentra la enfermedad endémica.

4.6.-Otros efectos en piel

La ingestión crónica de arsénico inorgánico causa lesiones características en piel, como keratosis hiperpigmentación e hipopigmentación, se ha observado esto en poblaciones como Bangladesh, Chile, China, India, y Taiwán. Las características de las lesiones en piel han sido consideradas como distintivas de altas exposiciones al arsénico. Las keratosis avanzadas son dolorosas y resultan en malformaciones estéticas pudiendo provocar aislamiento social. Un caso especial es el de Alaska donde algunos habitantes que consumieron agua con grandes cantidades de arsénico similares a las encontradas en Asia y no desarrollaron signos claros de intoxicación por arsénico.

Algunas otras manifestaciones clínicas de ingestión de agua contaminada con arsénico incluyen debilidad conjuntivitis, edema, hipertensión portal, bronquitis y hepatomegalia. Un largo estudio en trabajadores de la fundición ha involucrado problemas como dermatitis e infecciones del tracto respiratorio, perforaciones septales nasales y bronquitis son las afecciones más comunes en los trabajadores.

4.7.-Alteración metabólica

En un estudio biomarcador desarrollado en Chile sobre una población expuesta crónicamente a altos niveles de arsénico de 15-600 $\mu\text{g/L}$ en agua, se concluyó que existía una variación medible interindividual en MMA y DMA en orina. Estos son originados por la metilación de la muestra de una mujer, la cual su arsénico excretado en orina estaba en la forma de DMA, mientras que el análogo MMA esta ausente en monos con polimorfismo y deficiencia en metil transferasas, donde el arsénico es metilado hacia MMA y DMA como en los monos rhesus. El glutatión es requerido para La reducción de As^{V} a As^{III} y es convertido a DMA, por lo que se debe hacer mención también a la activación de glutatión S transferasa Pi para facilitar la excreción del arsénico.

4.8.-Efectos de la transformación celular inducida por arsénico

Un incremento en el aumento de cáncer en la gente expuesta a arsénico fue observado desde el siglo XIX en pulmón debido a los trabajadores en las minas, seguida de reportes de cáncer de piel en personas con tratamientos con arsenicales. La asociación entre el arsénico y el cáncer de piel ha sido confirmada por estudios en áreas donde el agua de beber se encuentra contaminada con arsénico, los daños incluyen carcinomas celulares de células basales aunque también se han encontrado otros carcinomas diferentes. Las investigaciones en animales muestran tumores en ratas y hámsteres, sin embargo es posible que el arsénico trabaje como un cocarcinogeno, como promotor de tumores o progresor en el caso de exposiciones en humanos, otros mencionan la importancia de los metabolitos del arsénico en el daño directo del arsénico.

El arsénico muestra ensayos positivos en estudios de muta génesis que incluyen amplificación de genes, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromatidas hermanas, inhibición de la reparación del ADN, etc. Así mismo se ha visto que es un cofactor de daño a la exposición a luz ultravioleta y mutagenos químicos. El hecho de

que el arsénico sea un potente inductor de de la expresión génica y la amplificación génica esta actualmente estudiada por su relación al cáncer.

4.9.-Cáncer de piel

En 1887, Hutchinson describió por vez primera el cáncer de piel en pacientes tratados con medicamentos que contenían arsénico por soriasis y otras condiciones de piel como son la hiperpigmentación, seguida por la condición precancerosa, keratosis y finalmente el cáncer. Esta secuencia ha sido observada en exposiciones crónicas ha arsenato de potasio para tratamiento medico debido a rociamiento de polvo en viñedos conteniendo compuestos de arsénico. Así como el consumo de vino contaminado y la exposición de animales expuestos a ellos cerca de ahí.

4.10.-Cáncer de riñón y vejiga

La relación dosis respuesta entre la mortandad a partir de cáncer de riñón y vejiga y los niveles de arsénico en el agua de consumo se han descrito extensamente en la población de Taiwán y el riesgo relativo de la mortalidad debido a cáncer de vejiga fue extremadamente alto (28.3 para hombres y 65.4 para mujeres), mientras que la más alta exposición fue de 800 $\mu\text{g/L}$. Algunas indicaciones de cáncer de tracto urinario asociadas con arsénico han sido obtenidas de Argentina, Japón y Chile, sin embargo el riesgo de cáncer de vejiga es 10 veces menor en Argentina que en Taiwán.

4.11.-Cáncer de pulmón

Es conocido que el cáncer de pulmón es producido por inhalación de arsénico inorgánico, pero poca atención se ha dado a sus demás componentes que forma por lo que en Argentina Y Taiwán son frecuentes los reportes de enfermedad de Bowen relacionada con agua contaminada con arsénico.

4.12.-Cáncer de hígado

El angiosarcoma del hígado es un muy raro tipo de tumor y ha sido asociado con arsénico y sus compuestos, casos muy raros se ven en trabajadores de la fundición de metales. En 1957 tres casos de angiosarcoma fueron detectados en exposición a arsénico.

4.13.-Susceptibilidad al arsénico

Exposición a insecticidas, asesinos de la cizaña, carnes contaminadas, y humos de quema con arsénico como colas y aceites pueden causar algunos problemas de toxicidad. Los mineros, fundidores y obreros de la viña pueden tener un nivel más alto de exposición del trióxido arsénico y una incidencia más alta de cáncer pulmonar. El cuerpo no aclara el arsénico trivalente tan fácilmente como hace algunos otros minerales tóxicos, para que un aumento pueda ocurrir con la exposición regular generando los problemas crónicos.

CAPITULO V ESTUDIO DE LOS ADUCTOS ADN-PROTEINAS

5.0.-Cultivo de cortes de tejido

El desarrollo de un método *in vitro* para exhibir la toxicidad que se incorpora mejor a las propiedades de los órganos que a un sistema de cultivo celular siempre es importante ya que se puede ver alteración de la morfofisiología celular en las interacciones célula-célula provocadas por el xenobiótico que en las tradicionales técnicas *in vitro* (Klimecki y cols., 1997).

Los cortes de tejido han sido usados en bioquímica desde hace años. El corte de las rebanadas de tejido siempre era un problema para mantenerlas lo mas parecidas posibles por lo que se tuvieron que crear aparatos para los cortes y estandarización de los cortes de tejido sin dañarlos demasiado por lo que con la ayuda también del mejoramiento en los medios de cultivo se pudo obtener cortes de tejido viables a partir de diferentes órganos como pulmón, corazón, hígado, riñón, páncreas y cerebro (Gandolfi y cols., 1985).

Las ventajas de los cortes de tejido son:

- 📖 Mantenimiento de un nivel más alto de organización biológica que puede reflejar la del órgano designado.
- 📖 Mantenimiento de un estado diferenciado que este favorecido en cortes de tejido relación en célula-célula e interacción de la célula-matriz.
- 📖 La heterogeneidad funcional del tejido que puede conservarse bien en cortes de tejido.

📖 La falta de un requisito para enzimas proteolíticas normalmente empleadas en aislamiento celular que evita digestión de proteínas de superficie de células importantes.

📖 Mantenimiento del mando metabólico intermediario encima del metabolismo del xenobiotico que se puede reflejar bien *in vivo*.

Los cortes de tejido retienen la capacidad bioquímica y la heterogeneidad funcional del órgano entero, permitiendo la valoración de metabolismo total de un compuesto bajo condiciones similares a la situación *in vivo*. Esto es particularmente ventajoso cuando hay datos pequeños disponibles sobre el compuesto bajo investigación. Adicionalmente, los varios tipos de células dentro de un órgano pueden participar en la biotransformación del compuesto y contribuyen a la lesión celular, mientras aumenta la probabilidad que el sistema de cortes de tejido sea lo más cercano al tejido *in vivo* (Terada, 1996) El procedimiento de corte es flexible, ya que se preparan cortes de una manera similar sin tener en cuenta las especies o órgano, proporcionando un medio para investigar la biotransformación de un compuesto en varias especies así como en órganos diferentes. Además la preparación de las rebanadas es un sistema eficaz para la preparación de microsomas y utilizar la fracción S9 del citosol así como la ayuda extensa en la elucidación de rutas metabólicas y de la acción de isoenzimas del citócromo p450 (Sidelmann y cols., 1996).

Como la presión creciente en la comunidad científica para reducir el uso de animales en laboratorio, se acoplan los cultivos con cortes de tejido a disminuir la cantidad de animales y los costos crecientes de investigación, en sistemas *in vitro* algunos investigadores ofrecen las rebanadas como una herramienta atractiva para obtener resultados confiables y accesibles (Price y cols., 1998). Los cortes de tejido se han hecho un modelo fiable, económico para los estudios toxicológicos, farmacológicos y metabólicos.

Otra ventaja de cortes de tejido es la pertinencia del sistema a tejido humano adquirido que de nuevo reduce el uso animal y proporciona un banco de datos de contestaciones humanas al potencial toxico de un xenobiotico (Parrish y cols., 1999)

Los cortes de hígado en los cultivos guardan algunas propiedades dinámicas del órgano y de forma adecuada algunos parámetros fisiológicos y bioquímicos hasta por 24 horas, aunque durante el corte se ven ligeramente disminuidas en comparación al órgano intacto in vivo manteniéndose después de colocadas en el medio de cultivo, se mantienen los niveles de ATP, K⁺ intracelular y Ca⁺⁺ (Price y cols., 1998)

Algunas ventajas del cultivo de cortes de hígado humano contra el cultivo de cortes de hígado animal son:

Un número grande de estudios del metabolismo de fármacos, toxicidad de drogas e interacciones del droga-droga han demostrado diferencias en el metabolismo de un mismo fármaco o droga con efectos diferentes en animales que humanos. En algunos casos, hay más similitudes que diferencias, pero en otros las diferencias son dramáticas. Es casi imposible predecir de antemano si una nueva droga potencial se metabolizará de la misma manera y al mismo grado por un animal del laboratorio y por humanos. La disponibilidad de tejido del hígado humano, por consiguiente, es crucial en el proceso de descubrir y desarrollar nuevas drogas eficaces. En el hígado mamífero adulto, 65-70% de las células son hepatocitos y aproximadamente 30-35% de las células no parenquimatosas, incluso células de endotelio sinusoidal y células del Kupffer. La mayoría de estos tipos celulares contienen proteínas del citocromo p450 y peroxidases. Las células también liberan una variedad de mediadores que regulan la función de otras células no parenquimatosas o hepatocitos.

En este trabajo escogimos el hígado por ser un órgano blanco del arsénico además de ser el lugar donde sufre su biotransformación por el GSH y además los antecedentes en los que se relaciona su exposición a enfermedades hepáticas como la cirrosis hepática y el cáncer.

5.1.-Biomarcadores

Un aspecto crucial en Toxicología es la medición de los efectos de las sustancias tóxicas en los organismos y su ecosistema. Por causa de factores como las alteraciones bioquímicas de los xenobioticos, la correlación entre los niveles del toxico con la magnitud de los diferentes efectos al organismo es por lo regular muy difícil de seguir, por esto se ha tenido que utilizar biomarcadores los cuales son observaciones medibles de las alteraciones biológicas y son por lo tanto componentes, estructuras, procesos o reacciones atribuibles a la exposición a sustancias xenobióticas. Los biomarcadores se dividen en tres categorías: de exposición, efecto o susceptibilidad.

5.1.1.-Biomarcadores de exposición

Estos consisten en la medición de la sustancia xenobiotica o un metabolito de la misma, también puede ser un efecto directamente atribuible al xenobiotico que se encuentre dentro del organismo. Por ejemplo, un biomarcador de exposición a la anilina en humanos consiste en la medición del metabolito p-aminofenol el cual se encuentra en sangre y orina. Los xenobioticos o sus metabolitos pueden ser medidos directamente en tejidos, orina, sangre y heces así como en el aire exhalado y otros fluidos corporales. Los compuestos carcinógenos o sus metabolitos son generalmente especies electrofílicas (que pueden causar cambios bioquímicos por su afinidad a grupos nucleofílicos (sitios ricos en electrones por tener átomos de oxígeno y nitrógeno) por ejemplo las biomoléculas como el ADN, los aductos formados pueden medirse y tomarse como biomarcadores de exposición (Manahan, 2003).

5.1.2.-Biomarcadores de efecto

Son alteraciones en la fisiología, bioquímica, o causa directa atribuida a la la exposición a sustancias toxicas. En el caso de la anilina se puede medir el p-aminofenol en sangre pero también puede medirse la producción de metahemoglobina en sangre (un producto de la hemoglobina inútil para acarrear el oxígeno en sangre). La exposición a sustancias como los gases nerviosos, organofosfatos, y los insecticidas carbamatos y organofosfatos pueden inhibir la actividad de la enzima colinesterasa la cual puede ser medida fácilmente, en el caso del arsénico se ha propuesto el incremento de aductos entre ADN-proteínas como un efecto por la exposición al arsénico y sus metabolitos en líneas celulares y tejido de animales y personas (Ramírez y cols., 2000).

5.1.3.-Biomarcadores de susceptibilidad

Estos pueden ser por un incremento o indicación de vulnerabilidad del organismo a una enfermedad, a taque físico como cambios en la temperatura corporal, o a taques químicos por otros tóxicos, por lo que también están asociados especialmente en alteraciones del sistema inmune, provocando que los organismos sean más vulnerables a enfermedades como el cáncer, enfermedades infecciosas o parásitos (Manahan, 2003).

5.2-ESTUDIO DE LOS ADUCTOS ADN- PROTEÍNAS

ADUCTO: Son sustancias producidas por la unión del xenobiótico a especies químicas endógenas (ADN-proteínas) o entre éstas por efecto del mismo agente.

En las células el ADN está normalmente asociado a diversas proteínas las cuales le ayudan a mantener su organización estructural y conservación del material genético desde la replicación, reparación, recombinación y transcripción. Muchos compuestos endógenos (por ejemplo los metabolitos de la lípoperoxidación y otros) reaccionan con el ADN y las proteínas produciendo muchas veces uniones covalentes entre las proteínas y el ADN. Los aductos ADN-proteínas representan desde hace algunas décadas un nuevo tipo de daño temprano al ADN incrementándose dramáticamente sobre todo por la exposición a diversos agentes como la luz U.V., radiación ionizante, β -propiolactona, aldehídos (especialmente el formaldehído) arsénito de sodio, nitrilostriacetato ferrico, cromato, níquel y otros además de algunos agentes quimioterapéuticos como el cis y trans platino, bisplatinum y la neocarzinostatina (Miller, 1991).

Los aductos ADN-proteínas han sido estudiados en cuanto a su relación con la expresión genética, y por esto es importante conocer el tipo de enlace que los forma, si son covalente o iónicos dependiendo el agente que los forme, por lo que en estas uniones como en el caso de las proteínas de la cromatina (histonas y proteínas no histonas) que se unen al ADN puede tener serias consecuencias genéticas si se mantienen unidas más tiempo del que deberían al material genético.

La unión de una o varias proteínas al ADN puede ocasionar la activación o iniciación de la expresión génica siendo estas uniones reversibles no covalentes. Algunas enzimas como las topoisomerasas están constantemente ancladas al ADN. El estudio del mecanismo de diversos agente tóxicos en los organismos nos pone a pensar en si estos pueden ser capaces de alterar las uniones no covalentes de las proteínas al ADN y volverlas covalentes ya sea de manera directa o indirecta.

Algunos estudios muestran que algunos xenobióticos son capaces de formar complejos entre proteínas que normalmente no interactúan con el material genético o aumentando la cantidad de otras que si pueden unirse pero no tan frecuentemente, tal es el caso de la actina, una proteína de la matriz nuclear donde células de ovario de hámster son tratadas con cromato y existiendo una relación del cromo con los grupos fosfato del ADN provocan interacciones moleculares covalentes entre la actina y el ADN además del aumento de la síntesis de actina (Miller y cols., 1991).

El estudio de los aductos ADN-proteínas (DPC's) involucra también la expresión de factores de crecimiento y proteínas de estrés, así como de actina y citóqueratinas, en el caso de estas últimas estudios más recientes (Ramírez y cols, 2000) evaluaron la capacidad de arsenito de sodio de inducir DPC en una línea celular hepática humana. En estos estudios se encontró un incremento en la proporción de DPC y además un aumento de diversas citóqueratinas en especial la citoqueratina 18 la cual es parte estructural de los filamentos intermedios del citoesqueleto por lo tanto se sugirió que la presencia de este tipo de aductos puede involucrar la unión al ADN de proteínas del citoesqueleto y posiblemente también la alteración de la expresión génica; se sabe que la forma trivalente del arsénico presenta afinidad por los grupos tiol de las proteínas por lo que estas proteínas tiene interacciones tanto en núcleo como en citoplasma con el arsenito y en el caso del núcleo también con el ADN provocando la formación de estos DPC's.

Se han encontrado interacciones de ciertos aminoácidos a diferentes metales como el níquel que produce aductos ADN-proteínas (Werfel y cols., 1998). El níquel puede oxidarse y formar radicales libres que se unen a diferentes ligandos como los imidazoles o la histidina, además algunos receptores de proteínas de la cromatina se unen al níquel fácilmente provocando todo esto la formación de aductos anormales de ADN-proteínas.

Otra manera de interactuar del níquel es portándose como un antagonista del Mg^{+} que necesitan algunas proteínas que se unen normalmente al ADN; por lo tanto la formación de aductos ADN-proteínas de manera covalente provoca serias variaciones en la expresión génica y en la estructura de la cromatina durante la replicación del ADN como ya se había mencionado. Estos daños al material genético que pueden ser con varias proteínas que regulen distintos genes o las replicación del ADN no son fácilmente reparados en la célula y como en el caso del níquel los aductos ADN-proteínas son daños primarios que se presentan también en la exposición a cromato y otras sustancias como el formaldehído.

El estudio de los DPC's se ha relacionado con el cáncer, por ejemplo en leucocitos de personas con cáncer de pecho, se detecto un aumento en la inducción de Aductos ADN-proteínas por lo que se han propuesto como biomarcadores para detectar el nivel de daño al ADN en estos pacientes con cáncer, además se relacionó con el polimorfismo presente de varias enzimas involucradas en la destoxificación de agentes tóxicos, por lo que se sugiere que este tipo de alteraciones pueden provocar una replicación errónea y alteraciones en la expresión génica.

Actualmente los aductos ADN-proteínas se proponen como biomarcadores de efecto temprano en diferentes órganos. Sin embargo su significado biológico está en proceso de dilucidación. Es interesante conocer la manera en que estos se forman y el efecto que pueden tener en la regulación de los genes, así como la manera en que la célula se encarga de reparar este tipo de lesiones en el ADN y se han propuesto algunas hipótesis a cerca de cómo se lleva esto a cabo a pesar de la dificultad de encontrar los sitios específicos de los DPC's al ADN. Estudios recientes proponen al mecanismo por reparación por excisión de nucleótidos (REN) como una de las vías que tiene la célula para reparar este tipo de daño.

Algunos estudios (Minko y cols., 2001) se encargaron de demostrar la acción del REN *in vitro* utilizando un agente para inducir los DPC's en este caso el + trans-benzo(a) pireno diolepoóxido y la N-2-acetil-aminofluoreno guanina en *Escherichia Coli*, aquí se utilizó una nucleasa la UvrABC la cual inicia el mecanismo por REN, y una proteína la T4-pdg la cual inicia la reparación de dímeros de pirimidina. Los resultados muestran que este mecanismo de REN puede iniciarse tanto por la prevalencia de sitios donde se une una UvrABC al unirse al sitio de daño de los DPC's de igual manera la T4-pdg lo hace al unirse al complejo covalente en sitios AP (apurícos y apirimídicos del ADN) en la doble hélice del ADN, vinculando a la nucleasa UvrABC que se une a ciertos aminoácidos de la proteína que forman el aducto covalente y activando por consiguiente el mecanismo de reparación por excisión de nucleótidos REN. Por lo tanto este modelo de reparación de los DPC's puede ser aplicado a diversas sustancias que forman aductos ADN-proteínas.

Recientemente se ha sugerido que el sistema proteolítico dependiente de ubiquitinas pudiera estar relacionado con la remoción de los DPC's en células de mamíferos junto con el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (REN) por lo menos en aquellos formados por histonas (Zhitkovitch y Quievryn, 2000); esto resulta interesante ya que ayudaría a explicar cómo la célula puede defenderse contra este tipo de alteraciones o también hasta qué punto puede repararlo.

Varios métodos han sido desarrollados para la purificación y detección de los aductos ADN-proteínas y se han ido perfeccionando partiendo desde la dilución alcalina a la digestión con proteasas y después a la precipitación con SDS con o sin marcaje con I^{125} como en los estudios para asegurar la unión de las proteínas al ADN de manera covalente, uniéndose el I^{125} a los residuos de tirosina como se muestra en la figura 5. En nuestro estudio utilizamos la precipitación con SDS modificada por Costa y Zhitkovitch en 1993; para la obtención de los DPC's inducidos por arsénico (figura 6), los cuales ya habían sido obtenidos por Ramírez y cols., 2001 en el estudio de los mecanismos que tiene el arsénico para dañar al ADN y por tanto la alteración de la expresión y regulación génica.

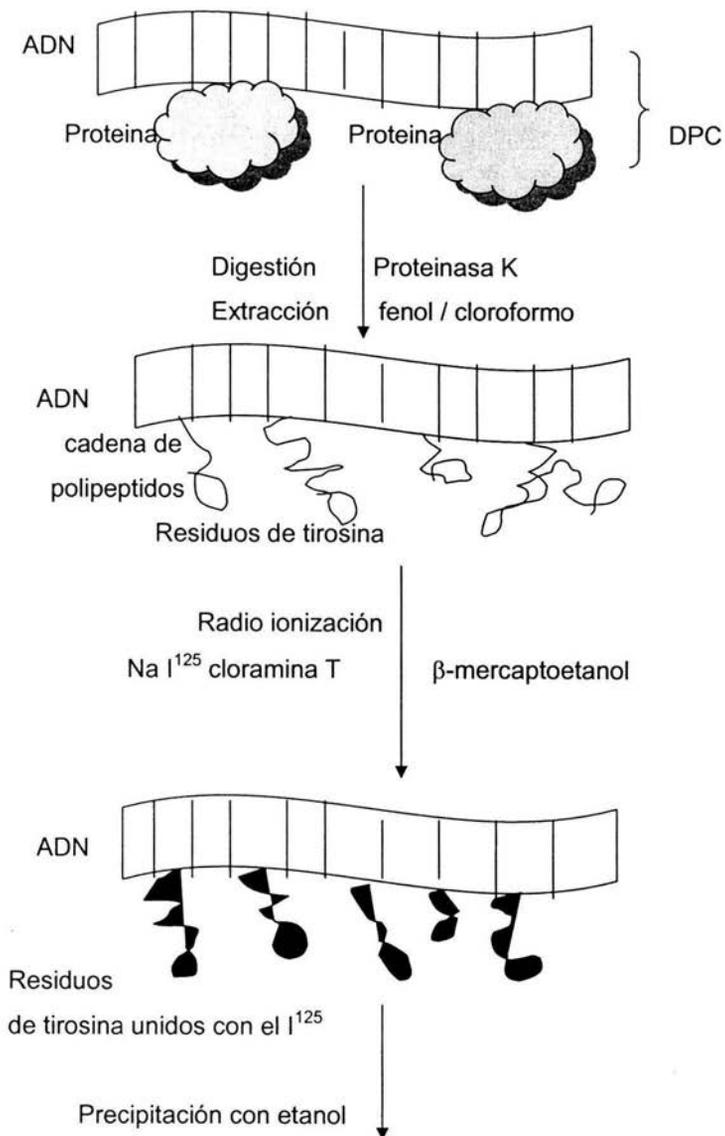


Figura.-5 Representación de la precipitación y obtención de los DPC's así como su marcaje con I¹²⁵ de acuerdo a Zhuang y Costa, 1993.

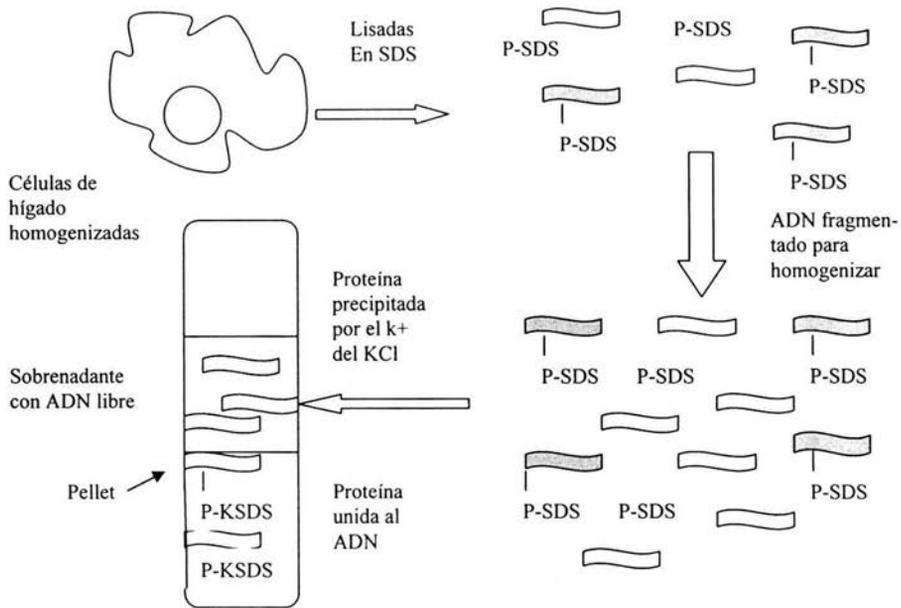


Figura 6.- Precipitación de aductos ADN-proteínas. Modificado de Costa y cols , 1993. P-SDS: proteína unida al SDS, P-KSDS: proteína unida al K y al SDS.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No existen muchos estudios encaminados a investigar los aspectos citotóxicos de los entrecruzamientos ADN-proteínas inducidos por diversos agentes ambientales, especialmente por metales o metaloides y sus metabolitos, además de saber si estos efectos resultan característicos de cada elemento o si existen patrones comunes, y por consecuencia investigar las bases moleculares y bioquímicas de los mecanismos involucrados en los daños a la célula y al ADN provocados por estos agentes.

Debido a que el arsénico se ha vinculado a diferentes tipos de daños al organismo en los seres vivos en distintos países y a que se ha convertido en un problema de salud prioritario en diversos lugares, es importante conocer cual es el mecanismo de toxicidad del arsénico y sus compuestos ya que no se han esclarecido del todo por su complejidad. Se han encontrado evidencias que muestran la capacidad que tiene el As de inducir de manera dosis dependiente la formación de entrecruzamientos ADN-proteínas *in vitro* (Ramírez y cols., 2000; Costa y cols., 1996), por lo que considerando que el arsénico induce entrecruzamientos con proteínas como las citoqueratinas (CK) y que este tipo de daño al ADN pudiera estar correlacionado con el daño cromosómico que induce el metal, es importante continuar con la caracterización de los DPC inducidos por arsénico. Sobre la base de que los procesos de bioactivación y detoxificación del As en el organismo ocurren en el hígado, nos interesa conocer como es la inducción de los DPC por uno de sus metabolitos más importantes el monometil arsénico, el cual es el 2º más abundante después del arsénico trivalente inorgánico que se genera después de su biotransformación en el hígado. Nuestro objetivo principal por lo tanto en este trabajo es determinar la capacidad del monometil arsénico (MMA) de inducir DPC a las 3 horas y 12 horas de exposición en concentraciones del metabolito que no pongan en riesgo la viabilidad celular. Lo anterior lo estudiaremos en un sistema experimental práctico, barato y confiable como el cultivo de cortes de hígado de ratón, ya que este sistema nos permite evaluar los efectos tóxicos de agentes como los metabolitos del arsénico el cuál mantiene la arquitectura y las interacciones célula-célula-matriz observadas *in vivo* en el hígado.

HIPOTESIS

En base a que el arsenito de sodio a concentraciones bajas tiene la capacidad de inducir aductos ADN-proteínas *in vitro*, suponemos que el metabolito ácido monometil arsénico (MMA) induce aductos ADN-proteínas, en un sistema de cultivo de cortes de hígado de ratón a las tres y doce horas de exposición en concentraciones de $1 \times 10^{-11} \text{M}$, $1 \times 10^{-9} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$.

OBJETIVO GENERAL

Investigar la capacidad del ácido monometil arsénico de inducir aductos ADN-proteínas, en el sistema de cultivo de cortes de hígado de ratón durante tres y doce horas, para ayudar a dilucidar el mecanismo de toxicidad del arsénico y sus metabolitos.

Objetivos específicos

Determinar la viabilidad de los cortes de hígado de ratón después de tres y doce horas de tratamiento con ácido monometil arsénico (MMA) mediante la cuantificación de K^+ intracelular por absorción atómica (flama).

Determinar la capacidad del ácido monometil arsénico para inducir aductos ADN-proteínas en cultivos de cortes de hígado de ratón a las tres y doce horas después de tratarlas con concentraciones de $1 \times 10^{-7} \text{M}$, $1 \times 10^{-9} \text{M}$ y $1 \times 10^{-11} \text{M}$.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Cultivos de cortes de hígado

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de 4-8 semanas de edad, se sacrificó a los animales por dislocación cervical. Rápidamente se obtuvo el hígado y se colocó sobre una caja Petri estéril inmersa con medio de cultivo Dulbeco-Eagle modificado y suplementado con suero fetal bovino al 8% y 1% de estreptomycin, los cortes de hígado se realizaron manualmente en condiciones de esterilidad e inmediatamente después del sacrificio y de aproximadamente 8mm de largo y de no más de 4mm de espesor, se pesaron tres rebanadas del órgano con estas características y posteriormente se colocaron en una placa de pozos con medio de cultivo Dulbeco-Eagle. Se incubaron por dos horas a 37 °C, 95% de aire y 5% CO₂.

A las dos horas se trataron con MMA en las siguientes concentraciones: 1x10⁻⁷M y 1x10⁻⁹M y 1x10⁻¹¹M además de un control positivo con arsénito de sodio 1x10⁻⁵M (Sigma, St. Louis MO) y un cultivo sin tratamiento (control negativo) todas por triplicado, La placa se incubó durante tres horas en presencia del agente. Al terminar el tiempo de exposición (tres y doce horas) las muestras se homogenizaron en 2 ml de PBS (Buffer salino de fosfatos pH 7.4) más inhibidor de proteasas (PMSF1 µg/ml, azida de sodio 0.5 M y ortovanadato de sodio 100mM) y se dividieron para llevar a cabo las determinaciones correspondientes.

Determinación de K⁺ intracelular (viabilidad)

La cuantificación de potasio en cultivos *in vitro* se ha utilizado como un índice de la viabilidad por diversos investigadores (Gandolfi y cols., 1985, Price y cols., 1998) debido a que, cuando las células no son viables pierden potasio intracelular lo que indica daño celular y pérdida de la homeostasis electrolítica comprometiendo la viabilidad celular. Se llevó a cabo la cuantificación de potasio intracelular por espectroscopia de absorción atómica de flama. Las muestras se prepararon a partir de

0.9 ml. de cada muestra tratada las cuales se sonicaron y se añadió 1.8 ml de ácido sulfosalicílico al 2% para precipitar las proteínas y recoger el sobrenadante (2.7 ml). A partir de este volumen se tomaron 200 μ l para preparar las muestras y aforarlas a 25ml más una solución de cloruro de cesio al 10% en la solución final con una concentración de 10 μ g/ml para evitar interferencias y que la ionización del potasio fuera estable durante la lectura.

Se preparó una curva estándar para leer las muestras a partir de una sal de fosfato de potasio y con una solución stock de 100 ppm. a partir de ésta se obtuvieron cinco soluciones a diferentes concentraciones las cuales fueron leídas a 766 nm en un espectro Varian GTA 100. Las concentraciones de las muestras se interpolaron en la curva. Los estudios realizados en cortes de tejido indican que las células se mantienen viables hasta 24 horas a no menos de concentraciones de 50 μ moles/g tejido (Fisher y cols, 1991,1995).

Precipitación de los aductos ADN-proteínas

El método que se utilizó en el experimento es el descrito por Costa y cols. (1993) para la precipitación de los complejos (DPC's) con SDS-KCl y se llevo a cabo de la siguiente forma:

Se tomaron 0.5 ml de muestra homogenizada en PBS y se le añadieron 0.5 ml de solución lisis (Tris-HCl 20mM, PMSF 1 mM y SDS al 2%), posteriormente se lisaron las muestras al pasarlas por una jeringa de 3 ml calibre 21 (4-5 veces) por presión, después de esto se agregaron 500 μ l de solución A (100mM KCl + 20 mM TrisHCl pH 7.5), se mezclaron en vortex y se incubaron 10 minutos a 65° C.

Una vez incubadas las muestras se invirtieron 3 veces cada muestra y se colocaron en hielo durante 5 minutos para la precipitación del complejo KCl-SDS-proteína-DNA, posteriormente se centrifugan en frío 10 minutos a 3000 rpm. para después decantar el sobrenadante.

Se adicionó 1 ml de solución A y se repitió la incubación y los dos pasos siguientes 2 veces mas, por ultimo la pastilla se resuspendió en 300-400 μ l de solución D (KCl 100mM, tris HCl 20 mM, EDTA 10Mm, pH 7.5). Después del paso anterior se añadió 20 μ l de proteinasa K (0.2mg/ml.) para eliminar las proteínas y posteriormente se incubaron a 50° C por 3 horas.

Se añadieron 50 μ l de albúmina (4 mg/ml) a cada muestra y se colocaron en hielo 10 minutos, por ultimo se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm a 4°C. Se guarda el sobrenadante para la lectura de absorbancia.

Determinación de los DPC's por fluorescencia

La lectura de absorbancia se realizó con un fluorómetro Turner 450 añadiendo a las muestras preparadas 12.5 ml de sol Hoescht 33258 (1 mg/ml) más la cantidad correspondiente de solución 1y se incubaron 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y leer en el aparato a 450-460 nm. Las concentraciones se reportan en porcentaje de DPCs por cantidad de DNA total en cada muestra.

Análisis de datos

Los valores obtenidos en las determinaciones fueron sujetos al análisis estadístico descriptivo. (Microsoft Excel, 2000). Se llevó a cabo el análisis de varianza para todos los tratamientos para posteriormente ser comparados mediante la prueba de Kruskal Wallis y Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas al $p < 0.05$ indicado por los asteriscos (*) en las gráficas.

RESULTADOS

Cuantificación de K⁺ intracelular a las tres y doce horas de tratamiento

A partir de las muestras homogenizadas de los cortes de tejido se realizó la cuantificación de K⁺ intracelular para evaluar la viabilidad de los cultivos, por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica de flama y por medio de la lectura de una curva estándar se interpola el valor de las muestras obteniéndose la concentración de K⁺ en μmoles por gramo de tejido ($\mu\text{moles/g}$ tejido). Los estudios realizados en rebanadas de tejido indican que se mantienen viables hasta 24 horas con concentraciones mayores al rango mínimo de 50 $\mu\text{moles/g}$ tejido. (Fisher y cols, 1991,1995)

TABLA 2.- Cuantificación de K⁺ intracelular en los cortes de hígado de ratón por efecto del MMA a las tres horas de tratamiento.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN K⁺
(Molaridad)	($\mu\text{mol K}^+/\text{g}$ tejido)
Control -	96.07
$1 \times 10^{-11}\text{M}$ MMA	101.87
$1 \times 10^{-9}\text{M}$ MMA	105.10
$1 \times 10^{-7}\text{M}$ MMA	106.37
Control + $1 \times 10^{-5}\text{M}$ Arsénito de sodio	82.49

El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas ANOVA, Kruskal Wallis y Tukey $p < 0.05$, en la cuantificación de potasio intracelular. Promedio de 5 experimentos por duplicado \pm error estándar.

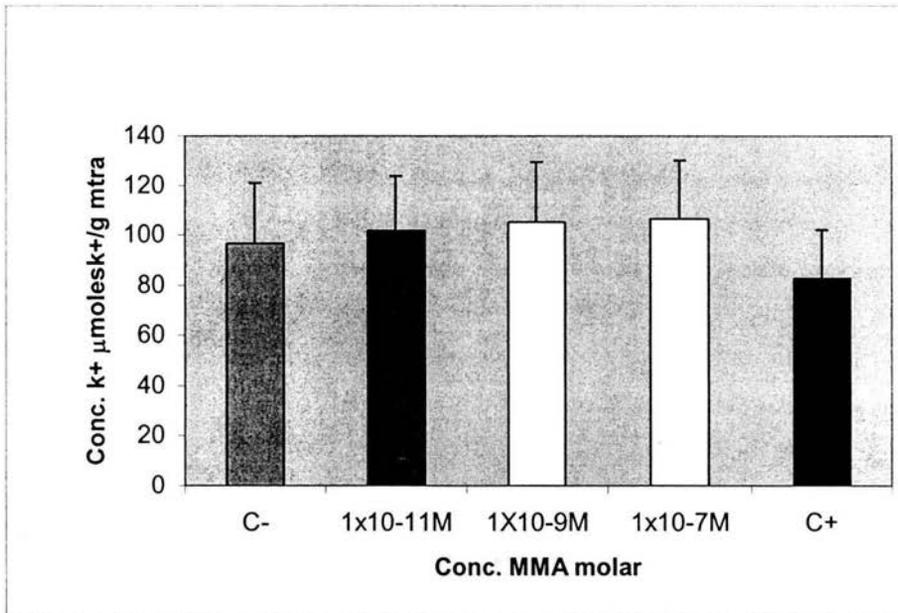


Figura 7.- Gráfica concentración de K⁺ vs. Concentración de MMA a las tres horas de tratamiento.

La viabilidad de las rebanadas de hígado fue medida por absorción atómica de flama, a las 3 horas de tratamiento no hubo diferencias significativas (ANOVA $p < 0.05$, Kruskal Wallis) en la cuantificación de potasio intracelular. Promedio de 5 experimentos por duplicado +/- error estándar.

La gráfica anterior nos muestra que los niveles de potasio intracelular se encuentran por arriba del rango mínimo de viabilidad, es decir, que se ha perdido una cantidad de K⁺ no considerable la cuál no pone en riesgo la viabilidad de los cortes a las tres horas de cultivo después de ser tratadas con las diferentes concentraciones de MMA ($1 \times 10^{-7} \text{M}$, $1 \times 10^{-9} \text{M}$, $1 \times 10^{-11} \text{M}$) no encontrándose diferencias significativas con respecto a los controles.

TABLA 3.- Cuantificación de K⁺ intracelular en los cortes de hígado de ratón por efecto del MMA a las doce horas de tratamiento.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE K⁺
Molaridad	µmoles K⁺/ g tejido
Control -	72.75
1x10 ⁻¹¹ M MMA	66.08
1x10 ⁻⁹ M MMA	73.70
1x10 ⁻⁷ M MMA	77.11
Control + 1x10 ⁻⁵ M Arsenito de sodio	72.41

El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas ANOVA p<0.05 y Kruskal Wallis y Tukey en la cuantificación de potasio intracelular. Promedio de 5 experimentos por duplicado +/- error estándar.

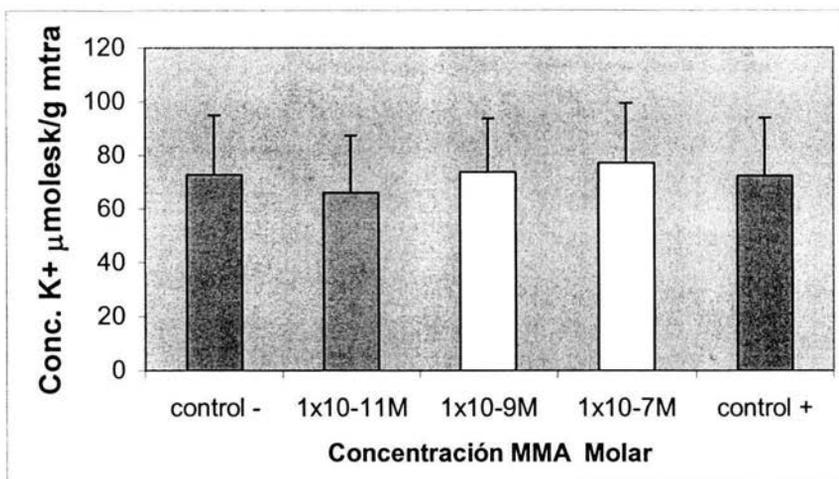


Figura 8.- Gráfica concentración de K^+ vs. Concentración de MMA a las 12 horas de tratamiento.

La viabilidad de las rebanadas de hígado fue medida por absorción atómica de flama, a las 12 horas de tratamiento no hubo diferencias significativas (ANOVA $p < 0.05$) en la cuantificación de potasio intracelular. Promedio de 5 experimentos por duplicado \pm error estándar.

La gráfica 2 muestra las concentraciones de K^+ intracelular de las rebanadas tratadas con MMA a las doce horas de tratamiento, se puede ver que todas ellas son viables y no hubo diferencias significativas entre las muestras y los controles, Las concentraciones a las doce horas se encuentran ligeramente disminuidas (20%) con respecto a las de las tres horas pero sin ser los cambios significativos. (ANOVA $p < 0.05$, Kruskal Wallis y Tukey)

Determinación de aductos ADN-proteínas

Tres horas de tratamiento.

TABLA 4.- Inducción de aductos ADN-proteínas en cortes de hígado de ratón a las tres horas de tratamiento con MMA.

TRATAMIENTOS (Molaridad)	Porcentaje de DPC's (Promedio) %
Control -	2.74
1×10^{-11} M MMA	8.167 *
1×10^{-9} M MMA	11.225 *
1×10^{-7} M MMA	9.389 *
Control + Arsenito de sodio	17.95 *

Los asteriscos (*) muestran los resultados significativos de cada experimento (Anova $p < 0.05$, Kruskal Wallis y Tukey).

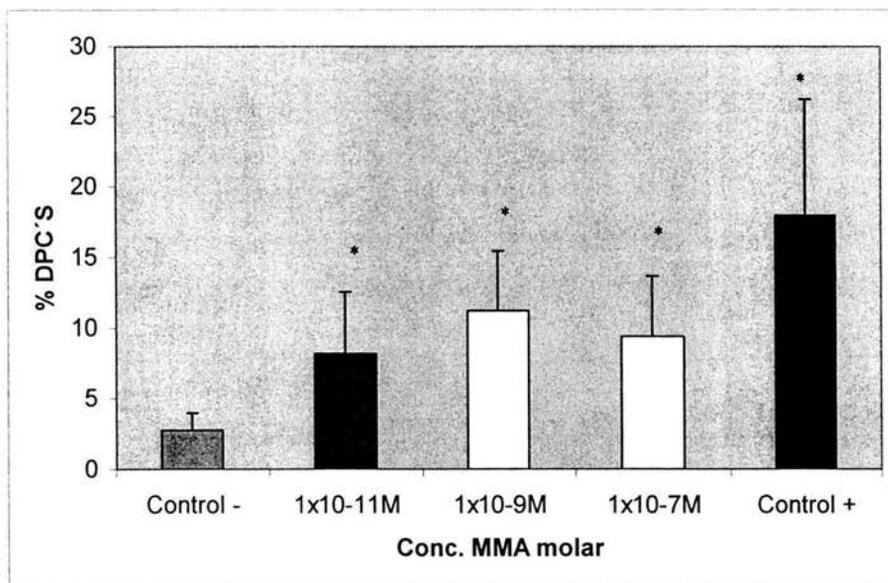


Figura 9.- Gráfica % DPC's vs. MMA a las tres horas de tratamiento.

La gráfica muestra el porcentaje de DPC's evaluado mediante la relación entre la cantidad de DPC's y DNA total para conocer la cantidad de ADN unido a las proteínas después de las tres horas de tratamiento con MMA a las concentraciones de $1 \times 10^{-7}M$, $1 \times 10^{-9}M$ y $1 \times 10^{-11}M$.

A las tres horas de tratamiento hubo una inducción significativa (ANOVA * $p < 0.05$, Kruskal Wallis y Tukey) de aductos ADN proteínas por efecto del MMA en las tres concentraciones ($1 \times 10^{-11}M$, $1 \times 10^{-9}M$ y $1 \times 10^{-7}M$), encontrándose un aumento mayor en la concentración intermedia de $1 \times 10^{-9}M$ el cual fue significativo con respecto a la de $1 \times 10^{-11}M$.

TABLA 5.- Inducción de aductos ADN-proteínas en cortes de hígado de ratón a las 12 horas de tratamiento con MMA

TRATAMIENTOS (Molaridad)	Porcentaje de DPC's (Promedio) %
Control-	3.93
1×10^{-11} M MMA	11.27 *
1×10^{-9} M MMA	9.72 *
1×10^{-7} M MMA	14.49 *
Control + Arsenito de sodio	17.66 *

Los asteriscos (*) muestran los resultados significativos de cada experimento (Anova $p < 0.05$, Kruskal Wallis y Tukey).

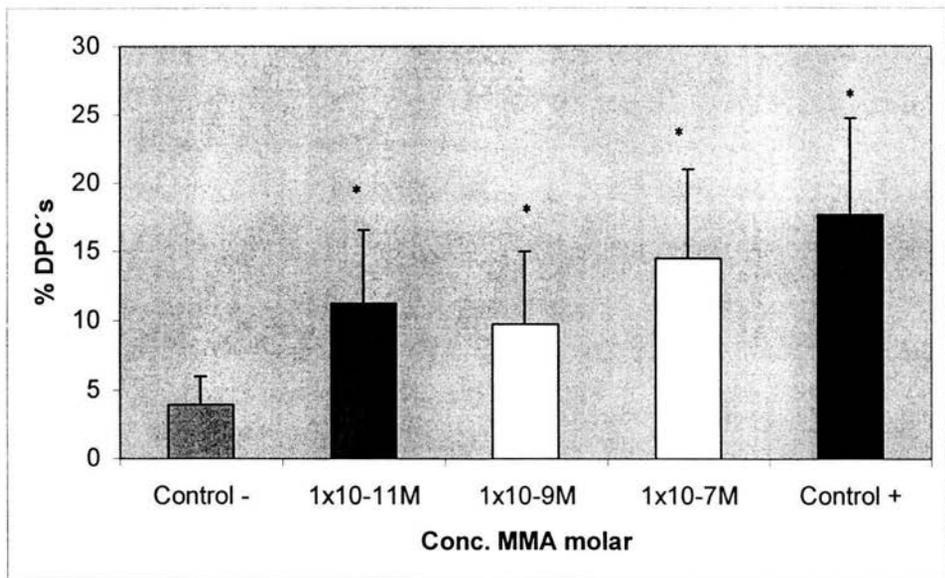


Figura 10.-Gráfica % DPC's vs. Concentración de MMA a las doce horas de tratamiento.

La gráfica nos indica la inducción de Aduetos ADN-proteínas por efecto del MMA (porcentaje de aductos en relación al ADN-total) en las diferentes concentraciones de MMA a las que se expusieron los cortes de hígado de ratón (ANOVA, * $p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Los resultados obtenidos de inducción de aductos ADN-proteínas fueron significativos (ANOVA, * $p < 0.05$, Kruskal Wallis y Tukey) a las doce horas de tratamiento en las muestras tratadas con MMA en las tres concentraciones (Promedio de 5 experimentos por duplicado +/- error estándar), aumentando ligeramente esta cantidad de aductos con respecto a las tres horas de exposición. La mayor inducción de DPC's a las doce horas se presentó en las concentraciones $1 \times 10^{-11} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ con respecto a la de $1 \times 10^{-9} \text{M}$.

DISCUSIÓN

En las células el ADN está normalmente asociado a una gran variedad de proteínas que interactúan para servir y mantener la organización estructural del material genético así como la coordinación de los procesos celulares, como la replicación, reparación, recombinación y transcripción. Diversos tipos de sustancias tóxicas y metales, son capaces de producir uniones fuertes (covalentes ó iónicas) entre el ADN y las proteínas. En particular trabajos previos en nuestro laboratorio muestran que el arsénico induce Aductos ADN-proteínas en sus formas inorgánicas sugiriendo que estas se dan también con proteínas que normalmente no están unidas al ADN como las citóqueratinas (Ramírez, 2000). Ahora en base a los resultados aquí obtenidos nosotros resaltamos que, el metabolito MMA muy común en organismos expuestos al arsénico (Yamanaka, 1995), también es capaz de producir aductos con el ADN en cortes de hígado de ratón Balb-c. Los resultados muestran que tanto las formas trivalentes (arsenito de sodio) y algunos de sus metilados (MMA) pueden incrementar la formación de aductos ADN-proteínas en exposiciones agudas de tres horas en concentraciones bajas, Esto también coincide con los reportes que mencionan que las formas inorgánicas y los metilados producen daños genotóxicos semejantes a la célula (Vather, 2001), sin embargo las especies arsenicales que causan el daño en el organismo no necesariamente tiene que usar los mismos mecanismos para provocar el mismo tipo de daño en este caso los aductos, esto debido a las propiedades químicas de cada compuesto, lo que se puede observar cuando se administra solo la forma inorgánica o solo los metabolitos del arsénico y donde se ha enfatizado además el papel de otros compuestos que se forman durante la biotransformación del arsénico como los radicales libres que colaboran a causar la toxicidad sobre las células, esto visto cuando se administran únicamente los metabolitos metilados del arsénico, por lo que estas diferencias deberán ser evaluadas posteriormente en otras investigaciones para corroborarlo. El arsénico trivalente en su forma inorgánica y el MMA al estar en mayor cantidad en el organismo en exposiciones agudas pueden ser los principales causantes de la toxicidad del arsénico (Vahter, Marafante, 1987), En el caso de las formas trivalentes inorgánicas se ha estudiado su toxicidad mencionándose como ya se

había comentando a través de su afinidad a grupos tiol y ditiol (SH) de proteínas y enzimas alterando su funcionalidad, mientras que el MMA lo podría hacer directamente sobre el ADN como lo reporta Yamanaka (1995) quien sugiere que al encontrar radicales por la exposición a DMA y MMA estos ayudan a la toxicidad sobre el material genético y sobre la heterocromatización del ADN.

Observamos en los resultados de la tres horas de exposición que el MMA es capaz de inducir aductos ADN-proteínas en las tres concentraciones utilizadas, pero la concentración intermedia (1×10^{-9} M) fue la más alta de todas siendo significativa con respecto al control y a la de 1×10^{-11} M. Reportes anteriores mencionan que el arsenito de sodio induce aductos ADN-proteína *in vivo* e *in vitro* en exposiciones agudas de tres horas, pero no se había reportado a las doce horas (Ramírez, 2000, Castro, 2003, Arteaga, 2003).

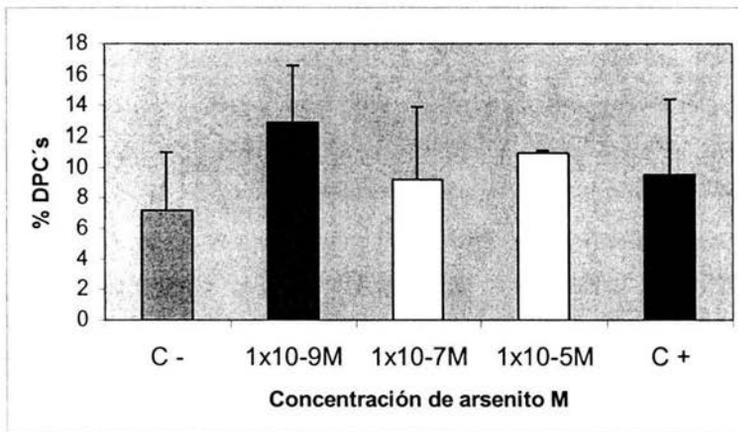


Figura 11.- Inducción de DPC's en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito de sodio durante 3 horas. Castro, 2003.

En lo que respecta a la exposición de los cortes de hígado durante 12 horas al ácido monometil arsénico, el metabolito fue capaz de inducir Aductos ADN-proteínas

en todas las concentraciones de MMA de manera significativa pero son las concentraciones de $1 \times 10^{-11} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ las que aumentaron más en comparación a la de $1 \times 10^{-9} \text{M}$, observándose como ya se mencionó, que el incremento es mayor respecto a la inducción de DPC's a las tres horas sin ser estos cambios significativos, a pesar de ello si parece haber una tendencia a incrementar los aductos con el tiempo de exposición, la que podría estar vinculada a la concentración administrada y a el tiempo de biotransformación del MMA por las células en exposiciones agudas.

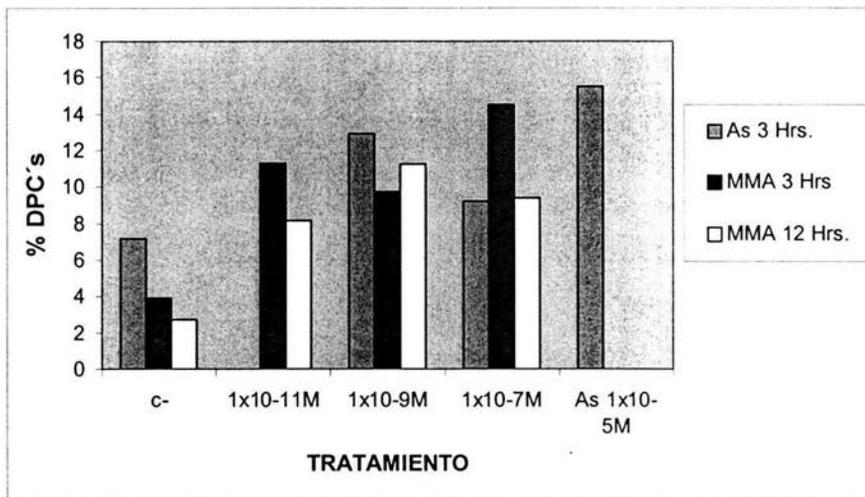


Figura 12.- Comparación de la Inducción de DPC's en cortes de hígado de ratón tratados con arsenito de sodio durante tres horas y MMA a las tres y doce horas de tratamiento respectivamente.

Al comparar nuestros resultados de inducción de aductos por MMA contra los resultados de inducción de aductos ADN-proteínas realizados anteriormente en nuestro laboratorio pero utilizando arsenito de sodio, podemos observar que la inducción a mismas concentraciones de MMA y arsenito de sodio es similar en la de $1 \times 10^{-9} \text{M}$, tanto del MMA a las tres y doce horas como del arsenito, sin embargo lo que si parece visible es que concentraciones más bajas de MMA producen cantidades similares de aductos

por arsenito como lo muestra la figura 12 donde la concentración $1 \times 10^{-11} \text{M}$ de MMA a las 3 horas es cercana a la del arsenito en la concentración de $1 \times 10^{-9} \text{M}$ e inclusive superior en comparación en la de $1 \times 10^{-7} \text{M}$. Estos datos muestran una tendencia en la cual el MMA a menores concentraciones puede inducir aductos ADN-proteínas que concentraciones mayores de arsenito de sodio en un mismo lapso de tiempo, lo que nos recuerda que en reportes del estudio tanto del DMA y el MMA se puede producir una inducción de daño similar por concentraciones bajas de los metilados que mayores de las formas inorgánicas trivalentes (Vahter, 2002).

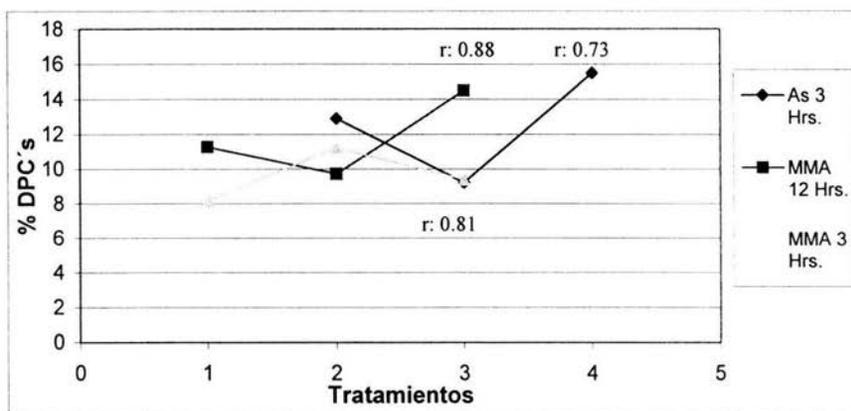


Figura 13.- Comparación de los coeficientes de regresión lineal y la Inducción de DPC's en cortes de hígado de ratón tratados con arsénico inorgánico durante tres horas y MMA a las tres y doce horas.

El análisis de regresión lineal llevado a cabo a los tratamientos con MMA realizados en este trabajo fueron comparados nuevamente con los de arsenito de sodio anteriormente referidos. En base a este análisis se encontró un coeficiente (r) mayor en el tiempo de las doce horas por MMA, seguido del MMA a las tres horas y el más bajo fue el coeficiente del arsenito a las 3 horas, Se hace notar entonces que tratamiento con MMA muestra una tendencia a aumentar la cantidad de aductos a las doce horas de exposición con respecto a las concentraciones de MMA, mientras que con respecto al tiempo se nota mejor la relación de inducción a las doce horas que a las tres y desde luego mejor que con arsenito.

La toxicidad del MMA y del arsenito dependerá entonces de los diferentes daños y alteraciones que puedan causar en los diferentes órganos blanco en este caso de los aductos ADN-proteínas en el hígado; así como de la concentración y tipo de especie arsenical que se utilice (arsénico inorgánico trivalente o metabolitos) además de la proporción en el tejido y el tiempo de exposición; todo esto para poder dirigirse hacia la interacción molecular entre arsénico trivalente y el MMA frente a las proteínas y el ADN, es decir, la forma en que las especies químicas de arsénico a las cuales están expuestos más frecuentemente los humanos tanto aguda como crónicamente provocan daño a la célula dependiendo de sus propiedades químicas y el tipo de biomoléculas con las cuales se unan y por lo tanto alteren, por ejemplo en los aductos ADN-proteínas que podrían ser incrementados tanto por arsenito como MMA en el hígado *in vitro* a las tres y a las doce horas en concentraciones bajas, y por tanto habrá que ver que repercusión tienen estos aductos en la función celular especialmente en la expresión génica y el ciclo celular así como en otras funciones importante de las células en distintos tejidos.

Por otro lado, los mecanismos de reparación celular encaminados a eliminar los daños genéticos en forma de aductos, también son importantes de considerar ya que dependiendo de la especificidad de un cierto tipo de mecanismo activado nos indicará que biomoléculas están siendo afectadas y sobre cuales se está dando la reparación, cabe hacer notar desde luego que para varios compuestos estos fenómenos no son los mismos. De hecho se sugiere que pueden actuar uno o varios mecanismos al mismo tiempo para tratar de reparar los daños al ADN o a las proteínas como lo sugieren diversos estudios (Zhitkovitch y Quievryn, 2000, Minko, 2001); El MMA al inducir DPC's en determinadas concentraciones y tiempos de exposición también debe provocar una respuesta del organismo para reparar este tipo de daño ya sea por el mecanismo de reparación de nucleótidos REN si se actúa detectando el daño al ADN o si es en las proteínas puede actuar el mecanismo del sistema proteolítico proteasoma-ubiquitina, dependiendo también del tipo de aductos que forme el MMA y que proteínas se vean

involucradas todo esto deberá ser tomado en cuenta en el estudio de los mecanismos de toxicidad del arsénico relacionados a los aductos ADN-proteínas.

El sistema de rebanadas de tejido nos permitió evaluar de manera temprana la capacidad del ácido monometil arsénico para inducir significativamente la formación de aductos ADN-proteínas a las tres horas y doce horas de exposición al metabolito, manteniendo la viabilidad del tejido en este tiempo y una disminución de la misma poco considerable, mostrando con ello que es un sistema adecuado para estudiar al arsénico y sus metabolitos de manera rápida, confiable y económicamente accesible, manteniendo varias funciones metabólicas del tejido como en el organismo mucho mejor que una línea celular hasta por 24 horas como indican varios investigadores (Barr y cols.,1990); por ejemplo la actividad de las enzimas de la fase I y II del metabolismo, mostrándose como una alternativa adecuada para el estudio de los efectos tóxicos que pueden estar influenciados por el metabolismo del xenobiótico.

CONCLUSIONES

La utilización del sistema de cortes de hígado de ratón para la inducción de Aductos ADN-proteínas por efecto del arsénico y uno de sus metabolitos (MMA) en exposiciones tempranas, fue confiable y funcional, manteniendo viables los cortes de tejido hasta por 12 horas de cultivo.

El MMA induce aductos ADN-proteínas en concentraciones de $1 \times 10^{-11} \text{M}$, $1 \times 10^{-9} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$, en un sistema de cultivo de cortes de hígado de ratón BALB/c después de tres horas de tratamiento.

El MMA $1 \times 10^{-11} \text{M}$, $1 \times 10^{-9} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ es capaz de inducir en el sistema de cultivo de cortes de hígado de ratón BALB/c aductos ADN-proteínas después de doce horas de tratamiento.

El MMA $1 \times 10^{-9} \text{M}$ tiene una capacidad mayor para inducir aductos ADN-proteínas en el sistema de cultivo de cortes de hígado de ratón BALB/c a las tres horas de exposición en comparación a las de $1 \times 10^{-11} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$.

PERSPECTIVAS

La investigación acerca de la capacidad inductora de DPC por uno de los metabolismos del arsénico llevada a cabo en nuestro laboratorio y los resultados de este trabajo nos permiten preguntarnos lo siguiente en consideración de que las especies orgánicas e inorgánicas de arsénico inducen aductos ADN-proteínas ¿De que manera lo hacen? , es decir ¿Que proteínas forman parte de estos aductos? y ¿Qué tipos de enlaces los forman?, este tipo de preguntas nos ayudara para dirigir nuestra investigación en puntos más específicos sobre las formas de causar alteraciones al ADN por arsénico y por tanto sobre la expresión génica y la carcinogenesis inducidas por el mismo.

Con este trabajo de tesis conocimos cuál es la capacidad del ácido monometil arsénico de inducir aductos ADN-proteínas y compararla con estudios anteriores realizados con la especie inorgánica (As III), sin embargo también hace falta saber si los mecanismos de reparación del ADN y proteínas pueden reparar este daño en las condiciones del sistema utilizado y que sistemas de reparación específicamente actúan en la reparación del mismo. Hace falta conocer como y de que manera este tipo de aductos alteran la replicación y la regulación de la expresión génica en diferentes tipos de células, a diferentes concentraciones de arsénico y que especies químicas de arsénico lo hacen, todo esto investigando no solo al MMA sino a las demás especies de arsénico a las que más estamos expuestos ya sea de manera crónica, subaguda o aguda.

GLOSARIO

Actina: Proteína que constituye el filamento delgado del músculo, es también un componente importante del citoesqueleto de muchas células eucariotas.

ADN complementario: ADN utilizado en la copia de una de las hebras del ADN mediante la enzima transcriptasa reversa producido por un ARNm de la otra hebra de ADN.

ATP: Adenosina trifosfato, ribonucleosido 5'-trifosfato que actúa como dador de grupo fosfato en el ciclo energético celular; transporta energía química entre ciclos metabólicos.

ATP sintasa: Complejo enzimático que forma ATP a partir de ADP y fosfato durante la fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial interna o en la membrana plasmática bacteriana y durante la foto fosforilación en los cloroplastos.

Biomarcador: Sustancias que pueden ser metabolitos del organismo, sustancias xenobioticas u otro indicador que puedan ser medidos como consecuencia a la exposición a una sustancia toxica, por el efecto de la misma o la susceptibilidad a otro tipo de daño al organismo.

Citotoxicidad: Efecto tóxico, manifestado como muerte celular

Cromatina: Complejo filamentosos de ADN histonas y otras proteínas que constituyen el cromosoma eucariótico.

Dimeros de pirimidina: Dimero unido covalentemente de dos residuos pirimídicos adyacentes en el ADN, inducidos por la luz U.V. en su mayor parte provienen de dos timinas adyacentes (dimero de timina).

Expresión génica: Transcripción y, en el caso de proteínas, traducción que da lugar al producto de un gen, un gen se expresa cuando su producto biológico se halla presente y es activo.

Genotoxicidad: Efecto tóxico que actúa sobre el ADN.

Nucleasa: Enzimas que hidrolizan los enlaces internucleotídicos (fosfodiéster) de los ácidos nucleicos.

Queratinas: Proteínas insolubles de protección o estructurales formadas por cadenas polipeptídicas paralelas en conformaciones α -helicoidal o β .

Traducción: Proceso en el que la información genética presente en una molécula de ARNm especifica la secuencia de aminoácidos durante la síntesis de proteínas.

Transformación: Introducción de un ADN exógeno en una célula que hace que esta adquiera un nuevo fenotipo.

Transcripción: Proceso enzimático mediante el que la información genética contenida en una hebra de ADN se usa para especificar una secuencia de bases complementaria en una cadena de ARNm.

Xenobiótico. Todas aquellas sustancias extrañas que ingresan al organismo

BIBLIOGRAFIA

- 📖 Agency for Toxic Substances and Disease, Registry, Division of Toxicology, 1600 Clifton Road NE, Mailstop E-29, Atlanta, GA 30333
- 📖 Aysegul Akbay, Aysun Bozbas, Yaesemin Isgor, Yasemin Yavuz, Serenay Elgun, 2000, Serum dipeptidylpeptidase activity and tissue polypeptide specific antigen in patients with advanced cirrhosis. Preliminary results. Clin. Chem. Acta 292, Vol.14, p.p. 181-185.
- 📖 Arteaga Sandra, 2003, Estudio de la capacidad inductora in vivo de aductos ADN-proteínas por efecto del Arsénico, Tesis de licenciatura QFB, FESC 1, UNAM, p.p. 38-58.
- 📖 Badal Kumar Mandal, Kazuo, Suzuki T., 2002, Arsenic round the world: a review. Talanta, Vol. 58, 3, p.p 201–235
- 📖 Barr J., Weir A.J., Brendel K. 1993, Livers slices in dynamic organ culture. I. An alternative *In vitro* technique for the study of rat hepatic drug metabolism, Xenobiotica, Vol. 21, p.p. 331-339.
- 📖 Barr J., Weir A.J, Brendel K and Sipes I.G., 1991, Liver slices in dynamic organ culture. II. An alternative *in vitro* technique for the study of rat hepatic drug metabolism. Xenobiotica, Vol. 21 p.p. 331-339
- 📖 Basu A., Mahata J. Gupta S., Giri A.K., 2001, Genetic Toxicology of a paradoxical human Carcinogen, arsenic: a review. Mutat. Res., Vol. 488, p.p. 171-194.

- 📖 Castro Bear V. 2003, Inducción de aductos AND-proteínas en rebanadas de hígado de ratón por efecto del arsénico, Tesis de licenciatura QFB, FESC 1, UNAM, p.p.41-52.
- 📖 Chappell Willard R, 1995, Arsenic exposure and health, Edit. University of Colorado, p.p. 220-228.
- 📖 Chen, Y, 2000, K6/ODC transgenic mice as a sensitive model for carcinogen identification. *Toxicol. Letters*, Vol. 116, p.p.27-35.
- 📖 Cohen Samuel M, Yamamoto Shinji, Cano Marty, 2001, Urothelial cytotoxicity and regeneration induced by dimethylarsinic acid in rats. *Toxicol. Sci.*, Vol. 59, p.p. 68-74.
- 📖 Cohen Samuel, Cano Marty, 2002, Comparision of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *J. Pharmacol. and Toxicol. Met.* Vol. 38, p.p. 59-69
- 📖 Concha G., Vogler C. Nemedi B, Vachter M., 2002, Intra-individual in the metabolism of inorganic arsenic. *Intl. Arch. Occup. Environ. Health*. In press.
- 📖 Costa Max, Zhitkovich Anatoly, Toniolo Paolo, 1993, DNA–Protein cross-links in welders: *Molec. Impl. Res.*, Vol. 53, p.p. 460-466.
- 📖 Daniel Wayne W., 2001, Bioestadística Base para el análisis de las ciencias de la salud. Tercera edición. Edit. Limusa S.A.de C.V., México. p.p. 345-360,.
- 📖 Del Razo L. M, Quintanilla-Vega B, Brambilia-Colombres E, Calderon Aranda E. S., Albores A., 2001a, Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 177, p.p.147-148.

- 📖 Del Razo L.M., Styblo, M Cullen, W.R., Thomas D.J., 2001b, Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices. *Toxicol. App. Pharmacol.*, Vol.174, p.p. 282-293.
- 📖 Dogterom P., 1993, Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metab. And Disp.*, Vol.21 p.p. 699-704
- 📖 Dogterom Peter, 1993, Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Pharmacol. Bio –Res. Inter.* Vol.5 p.p. 699-703.
- 📖 Ekins S., 1996, Short-term maintenance of phase I and II metabolism in precision-cut liver slices in dynamic organ culture. *Drug Metab. And Disp.* Vol.24 p.p. 364-6
- 📖 Ekins S, Murray G.I, Burke M.D, Williams J.A, Marchant N.C., Hawksworth G.M. 1995, Quantitative differences in phase I and II metabolism between rat precision-cut liver slices and isolated hepatocytes. *Drug Metab. And Disp.* Vol. 23 p.p. 1274-1279
- 📖 EPA, 1988. Special report on ingested inorganic. Skin Cancer; Nutritional Essentiality, U. S. Environmental Protection Agency, EPA/625/3-87/-13.
- 📖 Fisher R, Putnam C.W, Koep L.J, Sipes I.G, Gandolfi A.J, Brendel K., 1991, Cryopreservation of pig and human liver slices. *Cryobiology*, Vol. 28, p.p. 131-42
- 📖 Fisher R.L, Shaughnessy R.P, Jenkins P.M., Austin M.L., Roth G.L., Gandolfi A.J. y Brendel K., 1995, Dynamic organ culture is superior to multiwell plate culture for maintaining precision-cut tissue slices: optimization of tissue slice culture, part I. *Toxicol. Mets.*, Vol. 5 p.p. 99-113.

- 📖 Gandolfi A.J., Smith P.F., Krumdiek C.L. 1985, Dynamic organ of precision liver slices for *in vitro* toxicology, Life Sci., Vol. 36, p.p. 1367-1375.
- 📖 Hamadeh Hisham K, J.Trouba Kevin, Amin Rupesh J., Afshari Cynthia A., 2002, Coordination of altered DNA repair and damage pathways in arsenite-exposed Keratinocytes. Toxicol. Sci., Vol.69, pp.306-316
- 📖 Han Wang Bo, Rahman Khalid, Billigton David, 1999, Treatment with aged garlic extrac protects against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. Toxicology, Vol. 132, p.p.215-225
- 📖 Hashemi E, Dobrota M, Till C, Loannides C., 1999, Structural and functional integrity of precision-cut liver slices in xenobiotic metabolism: a comparison of the dynamic organ and multiwell plate culture procedures. Xenobiotica, Vol. 29, p.p. 11-25
- 📖 Hughes Michael F., 2002, Arsenic toxicity and potencial mechanisms of action Toxicol. letters. Vol. 133, p.p.1-16.
- 📖 Kanter R, Olinga P, Hof I, de Jager M, Verwillegen W.A, Slooff M.J, Koster H.J, Meijer D.K, Groothuis G.M., 1998, A rapid and simple method for cryopreservation of human liver slices. Xenobiotica, Vol. 28 p.p. 225-34
- 📖 Klimecki. W.T., Borchers A.H., Egbert R.E., 1997, Effects of acutte and chronic arsenic exposure of human-derivated keratinocytes in a *in vitro* Human skin equivalent system. A Novel model of human arsenicism, Toxicology in vitro Vol. 11, p.p. 89-98.

- ☞ Kochhar T.S., Howard W, Hoffman S. Bramer-Carleton L., 1996, Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chromosome alterations in cultured Chinese Hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. Letters*, Vol.84, p.p.37-42.
- ☞ Lake B.G, Beamand J.A, Japenga A.C, Renwick A, Davies S, Price R.J., 1993 Induction of cytochrome P-450-dependent enzyme activities in cultured rat liver slices. *Food and Chem. Toxicol.*, Vol. 31 p.p. 377-86.
- ☞ Lake B.G, Charzat C, Tredger JM, Renwick A.B, Beamand J.A and Price R.J., 1996, Induction of cytochrome P450 isoenzymes in cultured precision-cut rat and human liver slices. *Xenobiotica*, Vol. 26: 297-306
- ☞ Lake B.G, Sauer MJ, Esclangon F, Beamand J.A, Price R.J. and Walters D.G., 1995, Metabolism of coumarin by precision-cut calf liver slices and calf liver microsomes. *Xenobiotica* Vol. 25 p.p. 133-134
- ☞ Lee T.C., Tanaka N, Lamb P.W., Glimer T.M., Barret J.C., 1988, Induction of gene amplification by arsenic. *Science*, Vol.241, p.p. 79-81.
- ☞ Lee, T.C., Ho, I.C., 1994. Differential cytotoxic effects of a arsenic on human and animal cells. *Environ. Health Perspect.* Vol.3, p.p.101–105.
- ☞ Liu, S.X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C., Hei, T.K., 2001. Induction of oxygen radicals by arsenic: implications for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.98, p.p.1643–1648.
- ☞ Manahan Stanley E., 2003, *Toxicological Chemistry and Biochemistry*, third edition, Ed. Lewis Publishers. E.U.A., p.p. 79-92 y 139-152,

- Mass M.J., Tennat A, Roop B.C., Cullen W.R., Styblo M, Thomas D.J. 2001, Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.*, Vol.14, p.p.355-361.
- Minko Irina G, Zou Yue and Lloyd R. Stephen. 2002, Incision of DNA-protein cross links by UvrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair. *Prots. Natl. Acad. of Sci.* Vol 99, n.4, p.p. 1905-1909.
- Miller Charles A, Cohen Mitchell D. y Costa Max. 1991, Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by cis-diamminedichloroplatinum (II) and chromium compounds. *Carcinogenesis*, Vol.12, N.2, pp. 269-276.
- Müller D, Glöckner R, Rost M and Steinmetzer P., 1998, Monooxygenation, cytochrome P450-mRNA expression and other functions in precision-cut rat liver slices. *Experimentl. And Toxicol. Pathol.*, Vol. 50: 507-13
- Nickson R.T., McArthur J.M. Burgess W.G., 2000, Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal. *Appl. Geochem.*, Vol.15, p.p. 403-413.
- Nineth Report on Carcinogenesis review, Arsenic. First listed in the Annual Report on Carcinogenesis,2001.p.p 18-29.
- Parrish AR, Gandolfi A.J. and Brendel K., 1995, Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sciences*, Vol. 57: 1887-901
- Parrish Alan R, Xing Hui Zheng, Karen D. Turney, Gandolfi A. Jay ,1999, Enhanced transcription factor DNA bindin and gene expression induced by arsenite or arsenate in renal slices. *Toxicol. Sci.* Vol. 50, 98-105.

- 📖 Petrick, J.S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E., Aposhian, H.V., 2000 Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 63, p.p. 203–207.
- 📖 Petrick, J.S., Jagadish, B., Mash, E.A., Aposhian, H.V., 2001, Monomethyl arsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD50 in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* Vol.14, p.p. 651–656.
- 📖 Price RJ, Ball SE, Renwick AB, Barton PT, Beamand JA and Lake B.G. 1998, Use of precision-cut rat liver slices for studies of xenobiotic metabolism and toxicity: comparison of the Krumdieck and Brendel tissue slicers. *Xenobiotica*, Vol. 28: 361-71.
- 📖 Ramírez P, Del Razo L.M., Gonsebatt M.E., 2000, Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytoqueratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis* Vol. 21 n.4 p.p. 701-706.
- 📖 Rahman M.M, Chowdhury U.K, Mukherjee S.C, Lodh D, Biswas B.K, Chanda C.R, Basu G.K. 2001, Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India a review and commentary. *J. Toxicol. Clin.*, Vol. 39(7) p.p.683-700.
- 📖 Rasmussen R.E., Menzel D.B., 1997 Variation in arsenic-induced sister chromatid exchange in human lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutation Research*, Vol. 36, p.p. 299-306.
- 📖 Rosen Barry P. 2002, Biochemistry of arsenic detoxification. *Fed. Of Euro. Bio. Soc. Lett.* , Vol. 529 p.p. 86-92.
- 📖 Rossman T.G., Stone D, Molina M, Troll W., 1980, Absence of arsenite mutagenicity in *E.Coli* and Chinese hamsters cells. *Environ. Mutagen.* Vol.2, p.p. 307-314.

- 📖 Ruiz-Navarro M.L., Navarro-Alarcón M, López G.H.,1998, Urine arsenic concentrations in healthy adults as indicators of environmental contamination: Relation with some pathologies. *The Sci. Total Environ.*, Vol.216, p.p.55-61.
- 📖 Scott N, Hatleid K.M. Mackenzie N.E. 1993, Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* Vol. 6, p.p. 102-106.
- 📖 Sidelmann UG, Cornett C, Tjørnelund J and Hansen S.H. 1996, A comparative study of precision cut liver slices, hepatocytes, and liver microsomes from the Wistar rat using metronidazole as a model substance. *Xenobiotica*; Vol.26: 709-22
- 📖 Smith A.H. Hopenhayn-Rich C, Bates, M.N. Goeden H.M. Smith M.T. 1992, Cancer Risks from arsenic in drinking water. *Environ. Health Perspect.*, Vol.97, p.p.259-267
- 📖 Steinmetzer P., Drobner C and Muller D. 1999, Use of fresh and cryopreserved human liver slices in Toxicology with special reference to *in vitro* induction of cytochrome p450. *Glockner. Toxicology in vitro*, Vol.13 p.p. 531-535.
- 📖 Sukumar Chattopadhyay, Bhaumik Sraboni, Purkayastha Madhumita, Basu Srabanti, 2002, Apoptosis and necrosis in developing brain cells due to arsenic toxicity and protection with antioxidants. *Toxicology letters*, Vol. 136, pp.65-76.
- 📖 Terada T, Kaneko H, Terashita S, Tozuka Z, Tokuma Y and Hata T. 1996 A species comparison of ¹⁴C-labeled 7-ethoxycoumarin metabolism in precision-cut liver slices from guinea pig and dog using a phosphor imaging system. *Res.Comm. Mol. Pat. And Pharm.*; 91:p.p. 41-56

- 📖 Thomas David J., Styblo Miroslav and Lin Shan 2001, The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic (REVIEW), *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, Vol. 176, p.p. 124-144.
- 📖 Tseng W-P, 1977, Effects and dose-response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. *Environ. health Perspect.*, Vol.19,p.p. 109-119.
- 📖 Vather Marie, Marafante E. 1987, Effects of low dietary intake of methionine, choline or proteins on the biotransformation of arsenite in the rabbit. *Toxicol. Letters*, Vol.37. p.p. 41-46.
- 📖 Vather Marie, 1994, Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Appl. Organomet. Chem.*, Vol. 8, p.p. 175-182.
- 📖 Vahter Marie, 2002, Mechanisms of arsenic biotransformation, *Toxicology*, Vol. 18 p.p. 211–217
- 📖 Vogt B.L., Rossman T.G. 2001, Effects of arsenite on p53, p21 and cyclin D expression in normal human fibroblasts a possible mechanism for arsenite's comutagenicity. *Mutation Research*, Vol. 478, p.p. 159-168.
- 📖 Walsh JS, Patanella JE, Halm KA and Facchine KL. 1995, An improved HPLC assay for the assessment of liver slice metabolic viability using 7-ethoxycoumarin. *Drug Metab And Disp*; Vol. 23: 869-74
- 📖 Wang BH, Zuzel KA, Rahman K and Billington D. 1998 Protective effects of aged garlic extract against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology*; 126: 213-222

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- ☞ Werfel U., Langen VA., Eickhoff I., 1998, Elevated DNA single-strand breakage frequencies in lymphocytes of welders exposed to chromium and nickel. *Carcinogenesis*, Vol. 19 n.3 p.p.413-418.
- ☞ Worboys Philip Bradbury Alan, Houston Brian, 1995, Kinetics of Drug metabolism in rat liver slices, *Drug Metab. and Disp.*, Vol. 23 n.3 p.p. 393-398.
- ☞ Yamanaka Kenzo, Hasegawa A, Sawamura R, Okada S. 1989a, Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. *Biochem. Biophys. Res.Com.* Vol. 165, p.p.43-50.
- ☞ Yamanaka K, Hoshino M, Okamoto M, Sawamura R. 1990, Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics is for the major part likely due to its peroxyl radical, *Biochem. Biophys. Res. Com.* Vol.168, p.p.58-63.
- ☞ Yamanaka Kenzo, Okada Shoji, 1994, Induction of lung-specific DNA Damage by Metabolically methylated Arsenics via the Production of Free radicals. *Environ. Health Perspect.* Vol. 102 (Suppl 3), p.p.37-40.
- ☞ Yamanaka K, Hayashi H., Kato K., Hasegawa A, Okada S., 1995, Involvement of preferential formation of apurinic7apyrimidinic sites in dimethylarsenic-induced DNA strand breaks and DNA-protein crosslinks in cultured alveolar epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, Vol. 207, p.p.244-249.
- ☞ Zhao C.Q., Young M.R. Diwan B.A., Coogan T.P., 1997, Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proced. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, p.p. 10907-10912.

- 📖 Zhitkovich A, Quievryn George, 2000, Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis*, Vol.21 n.8, p.p.1573-1580.
- 📖 Zhong C.X., Mass M.J., 2001, Both hypomethylation and hipermethylation of DNA associated with arsenite exposure in cultures of human cells identified by methylation-sensitive arbitrarily-primed PCR. *Toxicology Letters.*, vol. 122, p.p. 223-234.
- 📖 Zhuang Zhixiong, Costa Max, 1994, Development of an I¹²⁵-postlabeling Assay as a simple, rapid, and sensitive index of DNA-protein crosslinks. *Environ. Health Perspect*, 102 (suppl 3) 301-304.