

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

15

**ESTUDIO DE LOS ENTRECruzAMIENTOS
(CROSS-LINKS) ADN-PROTEÍNAS
INDUCIDOS POR ARSÉNICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A :

M.I.B.B. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

DIRECTORA DE TESIS: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

MÉXICO, D.F., 2000

182678



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte bajo su tutoría.

Este trabajo estuvo apoyado económicamente de manera parcial por el Programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP) durante los años de 1999 y 2000 con registro número: 201426 y 192356. Así como al programa PAPIIT 207196.

La alumna Patricia Ramírez Noguera fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) durante la realización de este trabajo .

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por su apoyo desde mis primeros años en el Instituto y hasta estos últimos en donde siempre conté con ella.

A la señora Delfina Aquino y a Patricia Guzmán ya que gracias a su trabajo me ayudaron a que el mío fuera más fácil.

A la Dra. Luz María Del Razo por todos sus comentarios y su ayuda en la realización de este trabajo.

A la Técnico Académico Tzype Govezensky por su ayuda en la determinación de las densitometrías.

A los miembros del comité tutorial a la Dra. Adela Rodríguez Romero y al Dr. Luis Servín González por sus comentarios mejoraron este trabajo.

A mis demás compañeros de laboratorio porque de alguna manera compartimos juntos el gusto por la Toxicología, Química y Biología entre otras cosas de la vida.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a la gente que siempre ha estado conmigo apoyándome de una u otra forma para que yo pueda hacer lo que hice y lo que hago:

* A mis suegros Ma. Luisa y Roberto porque sin su ayuda incondicional no hubiera podido concluir esta etapa de mi vida, MIL GRACIAS.

* A Ana María mi amiga incondicional de Biomédicas porque siempre estuvo cuando más la necesitaba tanto en lo personal como en lo profesional.

* A mis padres Beatriz y Pedro así como a mis hermanos Rodrigo y Carolina de quien estoy orgullosa por todos los valores y formación que me han transmitido.

* A Roberto porque siempre me ha apoyado en el ámbito profesional y como pareja. Te amo.

* Y muy especialmente a mi hijos José Roberto y Paulina quienes me acompañaron en estos últimos 4 años "*in utero*" en la realización del trabajo de laboratorio así como por todo el tiempo que no estuve compartiendo su aprendizaje a cambio de mi aprendizaje. Los amo.

* A Dios porque me dio la oportunidad de conocer y tener toda la gente que estuvo durante este tiempo conmigo y de quien aprendí algo. *Gracias a la vida que me ha dado tanto.*

INDICE GENERAL	PAGINA
<u>RESUMEN</u>	1
<u>ABSTRACT</u>	4
CAPITULO I	
<u>INTRODUCCIÓN</u>	7
1.1 Evaluación o estimación de riesgo	8
a) Identificación del peligro	8
b) Evaluación dosis-respuesta	9
c) Evaluación de la exposición	10
d) Caracterización del riesgo	11
1.2 Estimación del riesgo al cáncer	11
1.3 Biomarcadores	13
1.4 Carcinogénesis	16
1.5 Genotoxicidad o daño al ADN	23
CAPITULO II	
<u>ADN-PROTEÍNAS</u>	
2.1 Interacciones ADN-proteínas	29
2.2 Entrecruzamientos (cross links) ADN-proteínas y el monitoreo genético	31
2.3 La formación de entrecruzamientos y el monitoreo genético	37

CAPITULO III	PAGINA
<u>ARSÉNICO</u>	
3.1 Generalidades	40
3.2 Biotransformación	42
3.3 Exposición	46
3.4 Efectos tóxicos	49
Efectos cutáneos	50
Efectos gastrointestinales y hepáticos	52
Efectos cardiovasculares	52
Efectos hematológicos	52
Efectos pulmonares	53
Efectos inmunológicos	53
Efectos neurológicos	54
Efectos endocrinológicos	55
Efectos en el desarrollo y reproductividad	56
3.5 Mecanismos moleculares de carcinogénesis	52

CAPITULO IV

MÉTODO CIENTÍFICO

4.1 Planteamiento del problema	60
4.2 Hipótesis	61
4.3 Objetivos de trabajo	62
4.3.1 Objetivo general	62
4.3.2 Objetivos específicos	62

CAPITULO V	PAGINA
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	
5.1 Cultivos y tratamiento de la línea celular WRL-68	63
5.2 Determinación intracelular de arsénico	64
5.3 Determinación de glutatión reducido	65
5.4 Aislamiento de los DPC	66
5.5 Caracterización de las proteínas	67
5.6 Tratamientos con NaCl	68
5.7 Inmunohistoquímica	70
5.8 Experimentos <i>in vivo</i>	72
5.9 Aislamiento de los núcleos	73
5.10 Precipitación de los DPC	73
5.11 Análisis de datos	74
 CAPITULO VI	
<u>RESULTADOS</u>	75
 CAPITULO VII	
<u>DISCUSION</u>	96
 CAPITULO VIII	
<u>CONCLUSIONES</u>	108

CAPITULO X	PAGINA
<u>PERSPECTIVAS</u>	109
CAPITULO IX	
<u>REFERENCIAS</u>	114

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	PAGINA
Tabla A. Blancos potenciales para los carcinógenos químicos	18
Tabla B. Usos de químicos industriales con actividad inductora de entrecruzamientos (cross-links) ADN-proteínas	35
Tabla C. Inducción de entrecruzamientos ADN-proteínas por metales y compuestos químicos después de una exposición <i>in vivo</i>	36
TABLAS en resultados	76

Tabla I. Entrecruzamientos ADN proteínas inducidos por arsenito de sodio en células WRL-68 tratadas durante 16 horas.

Tabla II. Especies de arsénico determinadas mediante espectroscopia de absorción atómica en cultivos de células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio durante 16 horas.

Tabla III. Glutación (GSH) inducido en células WRL-68 después de su tratamiento durante 16 hrs con arsenito de sodio.

Tabla IV. Persistencia de los DPC inducidos por arsénico en células WRL-68.

Tabla V. Inducción de DPC en ratones BALB/c tratados con arsenito de sodio.

Tabla VI. Densitometrías de los entrecruzamientos ADN-citoqueratinas inducidos por arsenito de sodio en células WRL-68 tratadas durante 16 horas.

Tabla VII. Densitometrías de los entrecruzamientos ADN-citoqueratina 18 (CK18) inducidos por arsenito de sodio en células WRL-68 tratadas durante 16 horas.

FIGURAS

Figura A. Modelo de Volgestein para el cáncer de colon

Figura B. Monoadductos inducidos por *cis*-platino

Figura C Organización del nucleosoma

Figura D. Biotransformación del arsénico

Figura 1. Inducción de DPC en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio

Figura 2. Correlación entre la inducción de DPC y la concentración de arsénico inorgánico intracelular

Figura 3. Inducción de glutatión en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio

Figura 4. Persistencia de los DPC inducidos en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio.

Figura 5. Inducción de DPC en ratones BALB/c tratados con arsenito de sodio

Figura 6. Proporciones de DPC inducidos en hígado de ratones BALB/c tratados con arsenito de sodio

Figura 7. Electroforésis de los DPC inducidos en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio

Figura 8. DPC-CK inducidos en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio

Figura 9. DPC-CK18 inducidos en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio

Figura 10. DPC tratados con cloruro de sodio (2.5M) inducidos por arsenito en células WRL-68

Figura 11. CK18 en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio

Figura 12. Análisis confocal de la CK18 en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio

Figura 13. Cantidad de CK18 entrecruzada al ADN y total en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio

RESUMEN

Se ha propuesto la inducción de entrecruzamientos "cross-links" entre el ADN y las proteínas (DNA-protein cross-links), DPC como un marcador biológico de daño temprano al ADN ya que carcinógenos conocidos o agentes potencialmente carcinógenos inducen un incremento en la proporción de proteínas fuertemente unidas al ADN. El arsénico (As) es un carcinógeno humano que se encuentra frecuentemente en el ambiente a concentraciones que pueden inducir DPC. Es metabolizado en el hígado a través de reacciones de óxido-reducción. Para investigar si el arsénico trivalente (arsenito de sodio, As^{3+}) puede inducir DPC utilizamos como modelo experimental una línea celular humana derivada de hepatocitos fetales (WRL-68) y ratones machos de la cepa BALB/c. Después del tratamiento de las células hepáticas en confluencia, con diferentes concentraciones de As^{3+} , las células se lisaron para aislar por precipitación los DPC utilizando una solución de 2% SDS y de cloruro de potasio (KCl). El As^{3+} indujo DPC en las células WRL-68 guardando relación lineal con la concentración. En el caso de los ratones y después de una dosis única, la inducción fue significativa aunque no existió un comportamiento dependiente de la dosis. La proporción de DPC inducidos en la línea celular WRL-68 correlacionó linealmente con la concentración intracelular de arsénico inorgánico trivalente (As_i). Los DPC fueron reparados (removidos) eficientemente en las células WRL-68 llegando a niveles incluso, menores al del control negativo. También se observó una inducción de glutatión reducido (GSH) en las células tratadas con As^{3+} . Los estudios de biotransformación del As en

las células WRL-68 no mostraron la presencia de especies metiladas del metaloide.

Para caracterizar a las proteínas entrecruzadas, los DPC se digirieron con nucleasa para someterse entonces a electroforesis. Se encontraron patrones proteicos menos densos pero similares en las células no tratadas con As^{3+} en comparación a los que se encontraron en las tratadas con arsenito y las tratadas con cromato (control positivo). Cuando se removió el arsenito de los cultivos, se observó que los cultivos tratados con la menor concentración removieron más rápidamente las proteínas entrecruzadas. Mediante Western blotts, se identificaron 5 citoqueratinas (CK) en los DPC, con una masa molecular de aproximadamente 46, 48, 50, 54 y 45 kDa. La citoqueratina 18 (CK18) se identificó con anticuerpos monoclonales de entre las proteínas aisladas de los DPC. Por análisis densitométrico del contenido total de proteína, se observó un incremento en la síntesis de CK18. Un análisis en microscopio confocal mostró resultados similares al inmunoteñir las células con anticuerpos monoclonales contra la CK18. Los filamentos de la CK18 se localizaron en el citoplasma alrededor de la envoltura nuclear y en el núcleo, asimismo la distribución y disposición de la CK18 en las células tratadas con arsenito de sodio, se encontró alterada.

Finalmente con los resultados de este trabajo se demostró que el arsenito de sodio, indujo DPC en células hepáticas *in vitro* e *in vivo*. Dentro de las proteínas entrecruzadas al ADN *in vitro* se identificaron a las citoqueratinas, cuya expresión y organización altera el metaloide. Los DPC representan un tipo de daño al ADN que puede ser utilizado como biomarcador en la exposición a arsénico y este tipo de daño

relacionarse con la lesiones primarias o tempranas del proceso carcinogénico.

ABSTRACT

The induction of DNA-protein crosslinks (DPC) has been proposed as an indicator of early DNA damage due to the fact that known or suspected carcinogens induce an increased proportion of proteins tightly bound to DNA. Arsenic (As) is a human carcinogen, metabolized in liver cells through series of oxi-reduction reactions that could potentiate the formation of DPC.

To investigate if arsenite could induce DPC we decided to use the WRL-68 human hepatic cell line and BALB/c mice. After treatment of confluent cells with different concentrations of As^{3+} , they were lysed and the DPC were precipitated and isolated with 2% SDS and KCl. Trivalent arsenic induced DPC in WRL-68 cell line linearly related with the dose while in BALB/c mice liver the induction of DPC was not dose related. The proportion of DPC induced *in vitro* correlated also, linearly with the intracellular concentration of trivalent inorganic arsenic. An induction of GSH synthesis was observed. To isolate crosslinked proteins, DPC were nuclease digested and then electrophoresed. Similar although less dense band patterns were observed in PAGE of DPC proteins from untreated cells as compared with arsenite and chromate treated cells. A dose-related decay of DPC was also

observed. At least five CK were identified by Western blotting with molecular masses of approximately 46, 48, 50 and 54 kDa. CK18 was identified by immunoblotting among the proteins isolated from DPC. An increase in CK18 expression was observed by densitometry analysis of immunoblots of total cell protein content. Confocal microscopic analysis of cells immunostained with monoclonal antibodies against CK18 showed similar results, indicating an overexpression of CK18. Filaments were identified in cytoplasm, around the nuclear envelope and inside the nucleus. Disruption or alteration in the thread-like pattern of CK18 in treated cells was observed. DPC is a type of DNA damage that could be used as a biomarker of arsenic exposure related to the primary or early lesions of the carcinogenic process.

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucléico
ALAD	Deshidrogenasa del ácido δ amino levulínico
ALT	Alanina aminotransferasa
As	Arsénico
As ³⁺	Arsénico trivalente
Asi	Arsénico inorgánico
BSA	Albúmina sérica bovina
CK	Citoqueratinas
CK18	Citoqueratina 18
DMA	Dimetilarsénico
DPC	Entrecruzamientos ADN-proteínas
DPC-CK	Entrecruzamientos ADN-citoqueratina
GSH	Glutación reducido
MMA	Monometilarsénico
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PHA	Fitoheماغlutininia
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
ARN	Acido ribonucléico
SDS	Dodecilsulfato de sodio

CAPITULO I.

INTRODUCCIÓN

Los numerosos compuestos químicos que están o que entran al ambiente como resultado de diversas actividades antropogénicas, pueden ocasionar impactos adversos para la salud humana y el entorno. Por su abundancia y por la enorme cantidad de sus efectos adversos potenciales, es necesario tanto para los investigadores como para los gobiernos, contar con una metodología confiable, que permita evaluar cuantitativa y cualitativamente los riesgos inherentes a dichos contaminantes, así como jerarquizar los peligros potenciales. Este proceso denominado evaluación de riesgos o manejo de riesgos, se lleva a cabo a través de metodologías que abarcan un conjunto de disciplinas como la epidemiología, la toxicología y la bioestadística (Alatorre, R., 1997; Travis, C.1992).

1.1 Evaluación o estimación de riesgo

El modelo convencional para llevar a cabo evaluaciones de riesgo (Alatorre R., 1997) consta de cuatro fases: a) identificación del peligro, b) evaluación de la relación dosis-respuesta c) evaluación de la exposición y d) caracterización del riesgo (Alatorre, 1997; IARC, 1992).

a) Identificación del peligro

Incluye la recolección y evaluación de datos sobre el tipo de daños en la salud o de enfermedad que puede producir una sustancia y acerca de las condiciones de exposición en que se manifiesta el daño o la enfermedad. Esta identificación no es por sí misma una evaluación de riesgo, simplemente permite determinar si es científicamente correcto inferir que los efectos tóxicos que se han observado bajo condiciones específicas pueden ocurrir en otras condiciones, por ejemplo a través de estudios realizados en animales de laboratorio, de investigaciones epidemiológicas en poblaciones humanas o en comunicaciones de casos de individuos expuestos (Alatorre, 1997; IARC, 1992).

b) Evaluación dosis-respuesta

El siguiente paso en la evaluación de riesgos es la estimación (cálculo aproximado) de la relación dosis-respuesta para varias de las formas de toxicidad que pueden tener una determinada sustancia.

En la mayoría de los casos, las relaciones dosis-respuesta deben estimarse a partir de estudios en modelos animales de laboratorio. Esto está asociado con tres problemas importantes: a) Usualmente los modelos animales son expuestos a altas dosis y los efectos de la exposición a bajas dosis deben predecirse con base en algunos aspectos teóricos acerca de la forma de la curva en las relaciones dosis-respuesta.

b) A menudo, los animales y los humanos difieren en susceptibilidad, p.ej. a causa de la talla y el metabolismo.

c) La población humana es muy heterogénea, por lo que algunos individuos pueden ser más susceptibles que otros.

Para efectos en los que hay alteraciones del material genético, incluyendo la iniciación de cáncer, existen razones teóricas para creer que los efectos ocurren a dosis muy bajas. Para los otros efectos biológicos, usualmente se parte del supuesto de que existe un nivel de "umbral", lo cual significa que puede existir una determinada dosis por

debajo de la cual no habrá ningún efecto (NOEL). Se considera que los agentes carcinógenos no tienen un nivel umbral, esto es, se supone que la curva dosis-respuesta sólo llega a riesgo cero cuando la dosis es cero y que a medida que aumenta la dosis, el riesgo, entendido en este caso como la probabilidad de que se desarrolle cáncer, de inmediato se vuelve infinito (Alatorre, 1997; IARC, 1992).

c) Evaluación de la exposición

Esta etapa incluye la estimación de la cantidad de individuos expuestos a determinado agente ambiental así como de la magnitud, duración y frecuencia de la exposición. Es necesario conocer los factores que controlan la exposición, entre otros se encuentran:

- Factores que controlan la producción del agente en cuestión y su ingreso al medio ambiente.
- La localización y cantidad del agente que fue emitido o liberado.
- Las características que controlan el destino ambiental del contaminante, incluyendo su transporte, persistencia y degradación.
- Los factores que determinan el contacto de los humanos con el agente en cuestión, considerando el tamaño de las poblaciones humanas vulnerables y su distribución.

- Los mecanismos de absorción de la sustancia en los humanos.

Para la estimación de estos efectos se utilizan diversos modelos específicos (Alatorre, 1997; IARC, 1992).

d) Caracterización del riesgo

Consiste en el análisis de la información obtenida en los pasos anteriores. Para ello, no solamente se deben tomar en consideración las estimaciones de riesgo realizadas para unas condiciones específicas de exposición sino que se deben especificar las limitaciones de los supuestos de los que se partió y las incertidumbres cuantitativas y cualitativas que hayan surgido a lo largo de todo el proceso (Alatorre, 1997; IARC, 1992).

1.2 Estimación del riesgo al cáncer.

Las consecuencias a la salud de los agentes tóxicos continúan dilucidándose y el riesgo al desarrollo de cáncer es un tópico de gran interés y de continuo desarrollo especialmente para las futuras generaciones ya que, según la Organización Mundial de la Salud tienen una esperanza de vida entre 10 a 12 años mayor que las actuales (EPA,2000).

El término “riesgo para el cáncer” o también llamado “riesgo carcinogénico” se emplea a menudo para enunciar la probabilidad que presentan los agentes tóxicos para generar cáncer en los seres humanos. Los agentes pueden actuar en diferentes etapas del proceso carcinogénico y diversos mecanismos de acción pueden estar involucrados (IARC, 1992).

Los datos experimentales acerca de la capacidad carcinogénica de agentes físicos y químicos, provienen generalmente de estudios en roedores, usualmente ratas y ratones e históricamente de neoplasias especialmente malignas. Las evaluaciones cualitativas y cuantitativas de las evidencias relacionadas a la carcinogenicidad en cualquier estado del proceso carcinogénico -independientemente de los mecanismos fundamentales- son datos que pueden utilizarse en el desarrollo de la evaluación del riesgo carcinogénico en humanos.

Las inferencias acerca de los mecanismos de carcinogenicidad, pueden hacerse no solo en base a los datos experimentales obtenidos en el sistema de prueba y/o en base a los resultados epidemiológicos (IARC, 1992). Estos últimos se realizan en exposiciones ocupacionales lo que eventualmente genera la introducción de medidas preventivas en exposiciones al agente tóxico.

1.3 Biomarcadores.

El monitoreo del medio ambiente y la evaluación del riesgo a la exposición de agentes xenobióticos, se realiza utilizando sistemas de pruebas biológicas. En ellos se intenta establecer la existencia, naturaleza o grado del daño tóxico provocado por un agente y da pautas acerca del mecanismo de acción a través de indicadores o biomarcadores.

En general, los biomarcadores se consideran elementos relacionados a la actividad biológica de los seres vivos, que permiten determinar eventos relacionados con su fisiología de manera cuali o cuantitativa.

Un biomarcador idealmente, debe proveer la información necesaria para entender la toxicidad atribuida al xenobiótico en el sistema de prueba empleado y relacionarla intra o interespecies considerando ampliamente las extrapolaciones e interpolaciones entre especies. Los biomarcadores se han usado con el fin de alertar a la gente acerca de peligro medioambiental y pueden ser definidos también como indicadores que generalmente incluyen subsistemas de un organismo entero para identificar un efecto específico (Butterworth y cols. 1995). Para establecer la relación dosis-respuesta, es necesario cuantificar los cambios inducidos por el agente a diferentes dosis. Los cambios o

efectos provocados por el agente tóxico se convierten en biomarcadores del efecto. La Agencia de Protección al Ambiente en los Estados Unidos de Norteamérica (USEPA) establece que un biomarcador de efecto es cualquier estimación de las alteraciones ocasionadas por los contaminantes que pueden detectarse en los tejidos, fluidos u órganos de un organismo y que pueden ser reconocidas como un daño potencial o real sobre su salud (Butterworth y cols., 1995). Aquí falta definir con precisión y claridad dosis interna y dosis biológicamente activa. "La cantidad de una sustancia tóxica incorporada a un organismo se conoce como la *dosis interna* si ésta es lo suficientemente alta, se tendrá una pérdida en la homeostasis porque la dosis biológicamente activa será suficiente para afectar alguna función irreversiblemente o por un período sustancial (IARC, 1992).

Si la dosis biológicamente activa se correlaciona con un efecto o concentración en un sitio periférico, esto puede funcionar útilmente en reemplazo de la dosis o efecto que estén ocurriendo en el tejido blanco. Esta substitución puede ser utilizada como un biomarcador de exposición y efecto en el sitio de acción. Ellos incluyen indicadores de la dosis de sustancias tóxicas de acción directa como un metabolismo

hepático alterado de hormonas, que puedan afectar la fertilidad (NCR, 1989) y señales de los compartimentos sustitutos, como el aumento de la enzima deshidrogenasa del ácido δ amino levulínico (ALAD), que es un biomarcador de efecto a la exposición a plomo, (Singhal y Thomas, 1980; NCR, 1989).

Aunque existen biomarcadores que reflejan necesariamente un efecto bioquímico, p.ej. la formación de aductos en proteínas plasmáticas y en el ADN, ellos también han sido considerados como marcadores de *dosis biológicamente activa* de carcinógenos ampliamente distribuidos. (Tardiff y cols., 1994).

Por otra parte, la presencia de marcadores de limitación(es) heredada(s) o adquirida(s) acerca de la capacidad de un organismo a responder al reto de una exposición a un agente tóxico específico se conoce(n) como biomarcador(es) de susceptibilidad. Estos biomarcadores son independientes de la ocurrencia de la exposición, aunque ésta pueda incrementar la susceptibilidad a la exposición. Ellos incluyen factores ambientales, orgánicos o genéticos que modifican la biotransformación de agentes ambientales como por ejemplo las diferencias congénitas en el metabolismo, o las

variaciones en las concentraciones de inmunoglobulinas (Butterworth y cols., 1995).

1.4 Carcinogénesis

La carcinogénesis es un proceso complejo que involucra una sucesión de eventos, que pueden variar con el tipo de carcinógeno, el sitio blanco de tumorigénesis y las especies entre otros. El conocimiento acerca de los mecanismos de carcinogénesis se está desarrollando rápidamente, enfocándose al descubrimiento de genes y los productos génicos involucrados en la regulación de la proliferación celular y diferenciación, así como en la identificación de los eventos genéticos implicados en la formación del tumor. El resultado convergente de varias disciplinas de la investigación en cáncer como la Biología Celular, Genética Molecular, Inmunología y Patología proveen conocimiento genético y epigenético de los mecanismos asociados a la activación de genes relacionados con la inducción del cáncer (IARC, 1992).

Actualmente, el concepto del cáncer está básicamente enfocado a la acumulación de daño genético, dos características principales emergen del conocimiento actual sobre la carcinogénesis. La primera,

establece que el cáncer es un proceso complejo de múltiples pasos a nivel molecular y de desarrollo. En él, están implicados los cambios fenotípicos del desarrollo del tumor para el inicio de la neoplasia y su progresión a tumores invasivos y metástasis (IARC, 1992).

La proliferación celular es requerida para convertir el ADN dañado en mutaciones y para la expansión clonal de células iniciadas incrementando también la probabilidad de alteraciones genéticas adicionales en estas células. Las mutaciones pueden ocurrir espontáneamente o en consecuencia a la exposición a agentes genotóxicos. Por genotoxicidad, se pueden generar mutaciones puntuales, rearrreglos cromosómicos, recombinaciones, inserciones o deleciones de genes y amplificaciones génicas entre otras lesiones (IARC, 1992). Una amplia y creciente variedad de genes y productos génicos han sido identificados como blancos críticos potenciales para los carcinógenos. Algunos de ellos se muestran en la tabla A

Tabla A. Blancos potenciales para los carcinógenos químicos.

GEN O PRODUCTO GÉNICO	ONCOGENES CONOCIDOS*	TUMORES EN HUMANOS
Factores de crecimiento.	PDGF(sis)	
Receptores de factores de crecimiento.	EGFR(erbB)	Si
(tirosin-cinasa)	CSF-1R(fms)	
	HERII(neu)	Si
Tipo angiotensina	Angiotensina R (mas)	
Receptor de hormona esteroidea	Hormona tiroidea R(erb A)	
	Acido retinoico	Si
Proteínas G		
heterotrimérica	Gsa(gsp)	Si
GTPasas	<i>ras</i>	Si
Moduladores de proteína G	NF1	Si
Enzimas degradadoras de lípidos		
Tirosincinasas	<i>abl</i>	Si
	<i>src</i>	
Tirosinfosfatasas		
Serin/treonin cinasas	<i>mos</i>	
	<i>raf</i>	
Serin/treoninfosfatasas		
Factores de transcripción	AP1(fos,jun)	
	<i>myc, Rb(?), p53(?)</i>	Si
	<i>ets, rel.</i>	Si

Tomado de la IARC (1992), * La lista continúa creciendo.

El entendimiento de los mecanismos de carcinogénesis se basa en el análisis molecular y celular de los efectos particulares para un xenobiótico sin embargo, no hay que considerar esta vía como la única ya que en realidad estamos simplificando un fenómeno muy complejo. El análisis molecular de los múltiples pasos de la carcinogénesis, indica que el proceso de la evolución neoplásica, es significativamente más complejo que el modelo que considera dos estados del proceso: el de la iniciación y el de la promoción. Un ejemplo claro de esta complejidad lo representa el modelo descrito por Vogelstein y colaboradores para el cáncer colorectal (Figura A). En el se describen cambios genéticos múltiples que ocurren después de la fase de promoción o expansión clonal de las células iniciadas (Fearon y Vogelstein, 1990).

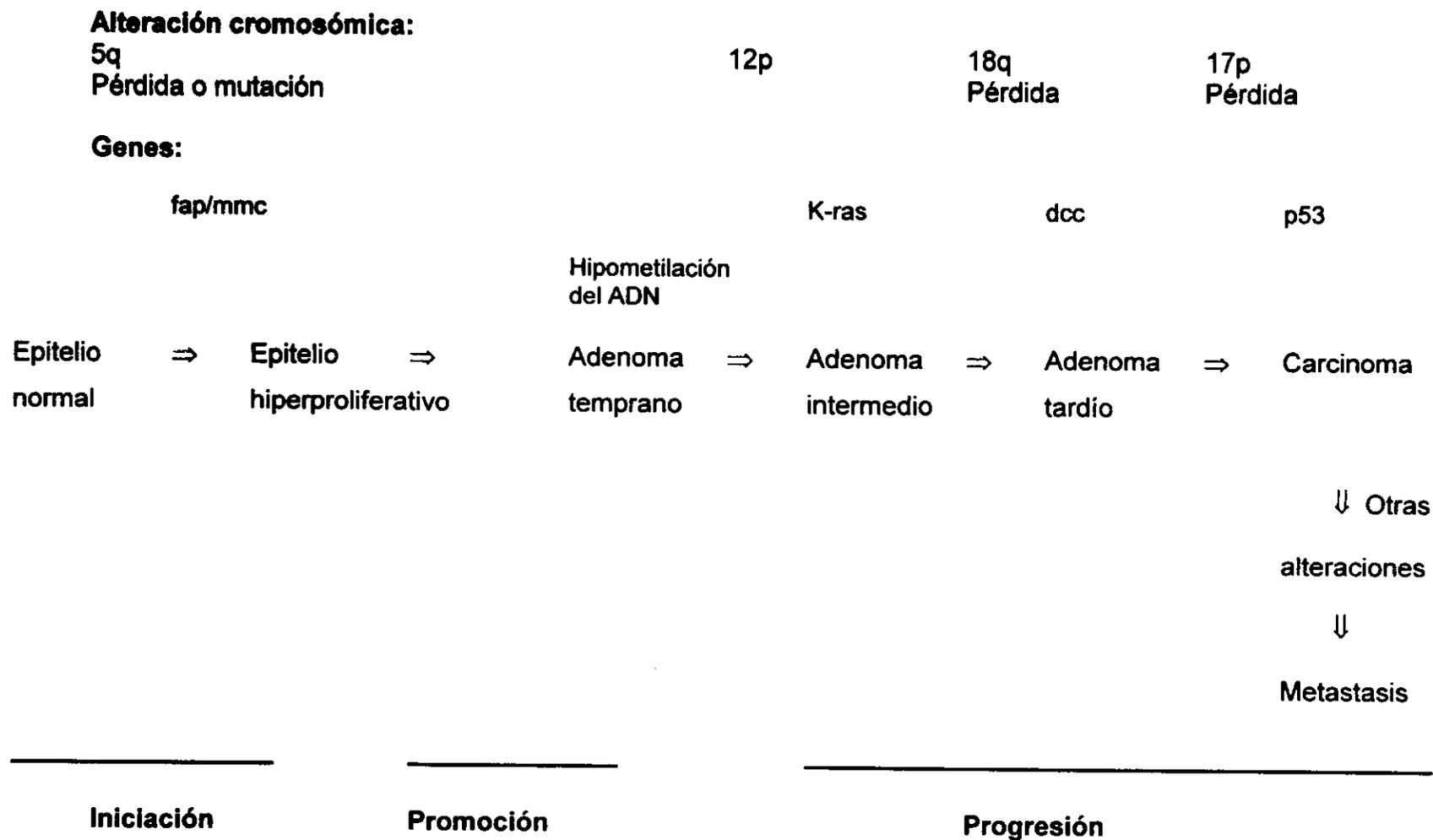


Figura B. Modelo de Vogelstein para el cáncer de colon.

La fase de progresión en la carcinogénesis, representa múltiples estados en los que los agentes químicos pueden influenciar el proceso neoplásico (Hennings y cols., 1983).

Existen estudios epidemiológicos que muestran la capacidad de ciertos químicos de afectar predominantemente a los estados tardíos del proceso carcinogénico (Kaldor y Day, 1987). Lo anterior no implica necesariamente que los químicos operen de manera similar en la promoción de tumores en el modelo experimental de dos estados (iniciación y promoción).

En el caso del arsénico que es un claro carcinógeno humano, (IARC,1982) las evidencias acerca de su carcinogenicidad en animales son escasas (Rudnay y Borzsonyi, 1981; Ishinishi y cols.,1983; Pershagen y cols., 1984). No se han encontrado resultados que apoyen su capacidad de iniciar o promover el desarrollo de tumores en el modelo de iniciación y progresión del cáncer epidermal en ratones (Baroni y cols., 1953 ; Boutwell , 1963). Sin embargo, se ha propuesto en base a los efectos observados en exposiciones humanas, que el arsénico afecta a los estados tardíos del proceso carcinogénico. Los datos en humanos son inconsistentes con la hipótesis de que el arsénico actúa durante la fase de promoción

del cáncer. Esta inconsistencia está apoyada por la reversibilidad en la promoción de los tumores (Boutwell, 1974) aunque los estudios epidemiológicos del cáncer en humanos expuestos a arsénico no han mostrado una reversión del exceso en la mortalidad de cáncer de pulmón después de que la exposición al arsénico cesa (Brown y Chu, 1983). En base a estas observaciones, se propone que el arsénico actúa específicamente en la fase de progresión de carcinogénesis (Barret, 1984). Esta hipótesis se apoya además en las observaciones de que el arsénico es un efectivo inductor de amplificación génica (Lee y cols., 1988). La amplificación génica en algunos tumores correlaciona con el grado de progresión de la neoplasia (Brodeur y cols.; 1984, Schwab y cols., 1984, Slamon y cols.; 1987, 1989). La amplificación génica puede explicar la incidencia incrementada de tumores que se observa en las fases tardías de la carcinogénesis inducida por arsénico (Bishop y cols., 1987). Este ejemplo enfatiza la importancia de considerar todos los pasos del proceso de carcinogénesis.

1.5 Genotoxicidad o daño al ADN

Numerosos agentes químicos y físicos en el medio ambiente son capaces de reaccionar con el ADN. Estas sustancias potencialmente genotóxicas, incluyen no solo compuestos antropogénicos sino también agentes de origen natural (p.ej. los constituyentes alimenticios y la radiación ultravioleta entre otras). Afortunadamente, los organismos poseemos poderosos sistemas de defensa para hacer frente a los agentes potencialmente dañinos. Estos sistemas comprenden de manera general: a) Procesos metabólicos y farmacocinéticos que determinan la absorción, movimiento, alteración y detoxificación de químicos xenobióticos entre órganos y tejidos del cuerpo b) Mecanismos celulares de reparación del ADN y c) Procesos inmunológicos y de defensa para enfermedades y cáncer.

La evaluación de la capacidad intrínseca y el potencial adquirido para dañar al ADN de innumerables agentes químicos y físicos junto con el conocimiento (aún limitado) de los mecanismos organotrópicos y de defensa celular conforman la estimación de riesgo. La estimación de la magnitud cuantitativa y cualitativa de las respuestas biológicas en individuos expuestos es una tarea nada fácil. Existen factores éticos que limitan la aplicación de sistemas de prueba en la práctica. Aunado

a lo anterior la imposibilidad de contar con resultados en ensayos en humanos y a menudo en especies animales que puedan servir de modelos para los efectos en seres humanos puede restringir y limitar la extrapolación de resultados.

La identificación de los agentes causales así como de él o los mecanismo(s) de acción es una tarea compleja ya que los organismos estamos expuestos a una atmósfera heterogénea a lo largo de la vida. Además, la mayoría de los xenobióticos presentan una diversidad en su(s) efecto(s) dependiendo por ejemplo, del genotipo o rearme de genes del organismo en estudio.

El conocimiento de la presencia e identidad de agentes peligrosos en el ambiente y el alcance o nivel de la exposición a estos, es importante en la interpretación de los resultados obtenidos al estudiar poblaciones humanas expuestas y tratar de identificar los efectos que se producen sobre la salud (Albert, 1997; Butterworth y cols., 1995).

Para la mayoría de los carcinógenos humanos y para muchos carcinógenos en animales de laboratorio, el daño al ADN es producido por ataques electrofílicos de compuestos parentales o a través de sus metabolitos. Para el resto de los carcinógenos su(s) mecanismo(s) de

acción parecen no involucrar daño directo al ADN (carcinógeno no genotóxico o promotor de tumores) (IARC, 1992).

Los metabolitos derivados de la biotransformación o los xenobióticos que sin ella, son capaces de producir elementos reactivos electrofílicos, que reaccionan con centros nucleofílicos en constituyentes celulares como el ADN, ARN y las proteínas. El resultado de esta interacción es la formación de aductos covalentes en sitios nucleofílicos del ADN y representa uno de los preludeos en la inducción de alteraciones en la integridad del ADN. Una de las alteraciones derivadas de la formación de aductos al ADN, son las mutaciones, a las que se les considera uno de los eventos genotóxicos presentes en los pasos iniciales del proceso carcinogénico (Tardiff y cols., 1994, IARC, 1992).

Muchos carcinógenos producen un espectro complejo de alteraciones en la integridad del ADN. Los aductos son estructuras heterogéneas que involucran asociaciones entre el ADN con los xenobióticos, con sus metabolitos o con proteínas. Un ejemplo de este tipo de interacciones y que ha sido extensamente estudiado es la que forma el cis-platino con el ADN y con las proteínas, e incluso con otras sustancias celulares como el glutatión (Figura B).

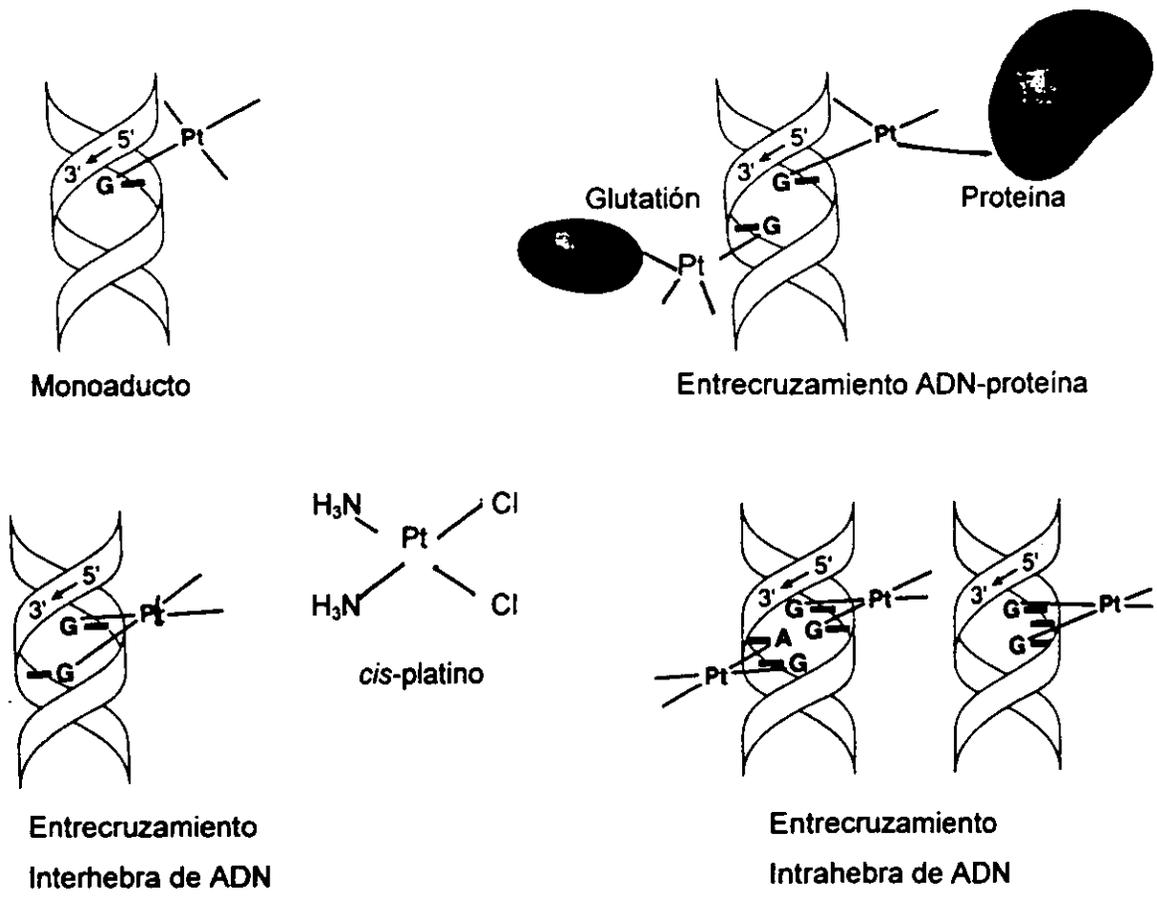


Figura B. Monoadductos inducidos por el *cis*-platino.
 (Tomado de Friedberg y cols. 1995).

Los aductos varían en estructura, estabilidad y en consecuencia en la habilidad de inducir otras alteraciones genéticas. La naturaleza cuantitativa y cualitativa del perfil de inducción de aductos para cualquier carcinógeno puede ser influenciada por:

a) cinética de absorción, distribución y excreción de la sustancia parental; b) competencia enzimática para conversión metabólica a derivados electrofílicos; y c) el contenido celular de los factores de protección como p.ej. glutatión. Cada uno de estos factores son importantes en la determinación de diferencias en la susceptibilidad interespecies e intraespecies para generar daño al ADN (Tardiff y cols. 1994).

Diversas alteraciones relacionadas con la integridad del ADN como las mutaciones puntuales, deleciones, intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas se pueden originar por replicación o recombinación del ADN dañado. La acumulación de estas lesiones puede ocasionar el inicio de la transformación del ADN. Los cambios genéticos inducidos por los carcinógenos incluyen a las mutaciones génicas, amplificación génica, rearrreglos cromosómicos y las aneuploidías entre otros. Ciertas características que influyen a los procesos de reparación del ADN como la presencia de

mecanismos alternos de reparación del daño genético pueden desencadenar o no la formación de eventos mutagénicos alterando la susceptibilidad de los organismos a agentes carcinógenos (IARC, 1992).

CAPÍTULO II.

ADN-PROTEÍNAS

2.1 Interacciones ADN-proteínas

Se puede afirmar que la organización del ADN en células eucariotas y la regulación de sus funciones (transcripción, traducción, replicación, recombinación y reparación) dependen estrictamente de su interacción con las proteínas. Desde 1974 se conoce que las proteínas cromosómicas conocidas como histonas se asocian ordenadamente con el ADN (Wolffe,1998). Estas combinaciones regulares pueden encontrarse a lo largo de la doble hélice una vez cada 200-260 pares de bases, se conocen como nucleosomas y representan una de las interacciones específicas entre el ADN y las proteínas, figura C.



Figura C. Organización del nucleosoma.
(Tomado de Wolffe, 1998)

Dada la naturaleza estructural de los ácidos nucleicos, su interacción con las proteínas de manera inespecífica tiene generalmente un carácter electrostático sustancial.

Otro tipo de interacciones ADN-proteínas se da en el reconocimiento específico de secuencias involucradas en la regulación de la transcripción, tal es el caso de los factores de transcripción. En el caso de la proteína Gal4 que le permite a las levaduras crecer en medio rico con galactosa su unión se da a secuencias específicas conocidas como UAS_{GAL} en donde una vez unida se activa la transcripción de un promotor cercano (Darnell y cols, 1995).

En el caso de estas interacciones ADN-proteínas específicas y en base al modelo original para el reconocimiento selectivo su asociación se da principalmente a través de uniones de tipo puentes de hidrógeno entre las proteínas y las bases. El resto de la molécula de ADN, los fosfatos y los azúcares se consideran carentes de información para la selectividad dada su estructura. En general las uniones de la(s) proteína(s) a una secuencia específica de ADN son dependientes de dos tipos de interacciones, los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals teniendo como base principal para la

selectividad el contacto directo entre la cadena polipeptídica y el borde expuesto de los pares de bases (Travers, 1993).

En el caso de la exposición transitoria de secuencias de una sola cadena en la célula a la proteína en los que se incluyen los procesos de replicación, recombinación y reparación del ADN. Su asociación tiene como característica común la unión fuerte y cooperativa de los intermediarios de manera transitoria (Revzin, 1990).

2.2 Entrecruzamientos (cross-links) ADN-proteínas

El estudio de los aductos al ADN inducidos por compuestos químicos reactivos ha progresado considerablemente pero hay relativamente pocos estudios que involucran la asociación de aminoácidos, glutatión, proteínas y ADN (Costa y cols. 1997). El ADN *per se* cuenta con proteínas asociadas como es el caso de las histonas que están involucradas en la regulación de la expresión génica y en la estructuración de la cromatina como se mencionó anteriormente, sin embargo, su interacción inespecífica o específica generalmente no es covalente.

Sin embargo se tiene conocimiento de asociaciones ADN proteínas inducidas por xenobióticos y que han sido propuestos como

biomarcadores. Las primeras evidencias de su formación se generaron después de la exposición de células vivas a una variedad de agentes que dañan al ADN incluyendo la radiación UV y la radiación ionizante. En estos casos se reducía la facilidad con la que el ADN se extraía utilizando métodos desproteinizantes como el tratamiento de sales de fenol. (Smith y cols 1969; Friedberg, y cols. 1995). Además la cantidad de ADN extraído de células humanas irradiadas por elución alcalina a través de filtros de nitrocelulosa, aumentaba si el ADN era incubado primero con proteasas (Kohn y cols. 1981). Estas observaciones han sido interpretadas como evidencias de la presencia de entrecruzamientos (crosslinks) entre el ADN y las proteínas (DPC).

Este fenómeno ha sido estudiado también *in vitro* con ADN y proteínas purificadas y con bases y aminoácidos libres (Shetlar y cols., 1984). Se ha observado que la β -propiolactona, un agente alquilante monofuncional, reacciona con el ADN principalmente en la posición N⁷ de la guanina (Boutwell y cols., 1969). Incubaciones de β -propiolactona con el ADN y proteínas purificadas resultaban en la formación de entrecruzamientos ADN-proteínas (Nietert y cols., 1974).

La formación de los entrecruzamientos entre el ADN y proteínas se apoya en el hecho de la existencia de elementos y compuestos químicos que incrementan la formación de radicales de oxígeno en las células causando la oxidación de proteínas, aminoácidos y ADN (Oleinick y cols., 1985). Los DPC pueden generarse vía una reacción de base de Schiff entre el grupo aldehído o los grupos amino de las proteínas. También se ha sugerido que los aldehídos reactivos formados por la oxidación de aminoácidos o proteínas pueden entrecruzar al ADN a través de reacciones p.ej. exocíclicas o con el N² de la guanina (Costa y cols., 1997, Oleinick y cols., 1985). En algunos casos el reactivo químico por si mismo, participa directamente en la interacción de la proteína o aminoácidos al ADN. Este parece ser el caso de compuestos químicos como el formaldehído, cromato y cisplatino de quienes está bien documentada su capacidad inductora de entrecruzamientos ADN-proteínas (Costa y cols., 1997 y Casanova y cols., 1994), (Figura B). En el caso del formaldehído, se sabe que reacciona con el grupo ε-amino de la lisina y causa entrecruzamientos de proteínas ricas en lisina como las histonas del ADN por la reacción exocíclica con el nitrógeno de la guanina (Casanova y cols., 1994).

Algunos fármacos antineoplásicos pueden producir entrecruzamientos ADN-proteínas por la estabilización de intermediarios covalentes entre las topoisomerasas y el ADN (Costa y cols., 1997).

Independientemente del mecanismo de formación, los DPC pueden estar alterando los procesos de replicación y de expresión génica que representan, como se comentó en el capítulo anterior, eventos cruciales en la carcinogénesis.

A pesar de que los agentes inductores de DPC son numerosos, el significado biológico de los entrecruzamientos ADN-proteínas en términos de carcinogenicidad, mutagenicidad o citotoxicidad está poco estudiado. Dentro de los agentes inductores existen agentes químicos industriales con diversos usos, se han reportado como agentes capaces de inducir como primera lesión genotóxica y bajo condiciones *in vitro* entrecruzamientos ADN-proteínas (Tabla B).

Tabla B. Agentes industriales inductores de entrecruzamientos (cross-links) ADN-proteínas.

COMPUESTO QUIMICO	USOS
Diepoxibutano	Preparación de eritriol. Agente esterilizante de comida y equipo médico.
Acetaldehído	Fabricación de desinfectantes, drogas, colorantes, explosivos, perfumes, resinas, pesticidas.
Glutaraldehído	Fijador de tejidos, desinfectante, intermediario químico y en la industria del plástico.
Formaldehído	Fungicida, desinfectante, componente del fluido para embalsamar. Útil en la fabricación de la seda, látex, urea, papel, y drogas.
Acetato de vinilo	Procesos de polimerización para emulsiones, resinas, adhesivos, pinturas, textiles.
Óxido de etileno	Fumigante de productos alimenticios, fungicida, esterilizante hospitalario. Intermediario en la síntesis de plásticos, glicoles, acrilonitrilo.
Acetilaminofluoreno	Pesticidas

(Tabla tomada de Paustenbach, 1996).

Se ha reportado que la inducción de DPC por algunos contaminantes se presentó en condiciones experimentales *in vivo* tal es el caso de algunos compuestos arsenicales como el trióxido de arsénico, Tabla C.

Tabla C. Inducción de entrecruzamientos ADN-proteínas en la exposición *in vivo* de contaminantes.

COMPUESTO	SITIO	DPC
Acetaldehído	Narinas de ratas	Presentes
Formaldehído	Tejido nasal-respiratorio de ratas.	Presentes
	Mono Rhesus	Presentes
	Mucosa nasal	
	Hígado de rata	Ausentes
	Hígado de ratón	Presentes
	Pulmón de ratón	Ausentes
Óxido de etileno	Linfocitos periféricos humanos	Presentes
	Linfocitos periféricos humanos	Presentes
	Células de hepatoma de ratas	Presentes
Cromo	Hepatocitos de embrión de pollo	Presentes
	Linfocitos periféricos humanos	Ausentes
Níquel	Hígado de rata	Presentes
Agentes arsenicales	Pulmón de ratón	Presentes
	Hepatoma de rata	Presentes

(Tabla tomada de Paustenbach, 1996).

Cuando los DPC son inducidos por agentes como el cromato, son relativamente persistentes en las células y no se reparan rápidamente (Tsapakos y cols., 1983), mientras que cuando los DPC son generados por el formaldehído o la radiación ionizante los entrecruzamientos son menos estables y se reparan más rápidamente (Oleinick y cols., 1985; Speit y cols., 2000).

Las lesiones inducidas por cromato son lesiones persistentes, Tsapakos y colaboradores (1983), mostraron que los DPC están presentes en el riñón de rata más de 40 h después de la exposición. Dentro de las proteínas entrecruzadas al ADN por acción del cromo, se han identificado particularmente algunas proteínas no histonas, lo que sugiere una cierta especificidad en la asociación respecto al agente entrecruzador (Tsapakos y cols., 1983, Miller y cols., 1989, 1991).

2.3 La formación de entrecruzamientos y el monitoreo biológico.

Existen estudios que apoyan el interés por proponer a los DPC como biomarcadores en la exposición a carcinógenos (IARC, 1992). En el caso del formaldehído, los entrecruzamientos ADN-proteínas (DPC) se han detectado en concentraciones no citotóxicas o carcinogénicas

y representa uno de los efectos genotóxicos primarios en tejidos blanco. Experimentos *in vivo* con ratas y monos indican que la tasa de formación de DPC es proporcional a la concentración de formaldehído en el tejido blanco y existe una clara correlación entre esos dos parámetros y la incidencia de tumores en el tejido blanco (Casanova y cols., 1994). Esto implica que la tasa de formación de DPC puede ser usada como una estimación de la concentración efectiva (dosis biológicamente activa) de formaldehído. La presencia de DPC como un biomarcador sensible puede contribuir con el proceso de evaluación de riesgo al cáncer inducido por el formaldehído de una manera más precisa (Casanova y cols., 1991, Conolly y Andersen, 1992). En consecuencia, se ha propuesto considerar la inducción de DPC por formaldehído como un indicador de la dosis biológicamente activa del carcinógeno en el tejido blanco (Casanova y cols., 1991).

En el caso del cromo, elemento carcinógeno, existen datos experimentales que permiten proponer a los DPC como biomarcador de exposición al cromo. Hughes y colaboradores encontraron una correlación positiva entre el nivel de exposición de cromo y el incremento al riesgo de cáncer de pulmón asociado a la presencia de entrecruzamientos ADN-proteína, mientras que los datos

epidemiológicos actuales, no han permitido identificar la concentración específica relacionada al cáncer de pulmón (Hughes y cols., 1994).

En el caso de las exposiciones a cromo y otros carcinógenos entre ellos el arsénico, existen biomarcadores que no reflejan la magnitud de la exposición como es el caso de las mediciones de su concentración en sangre. Ellas representan en algunos casos exposiciones muy recientes. Por otra parte las estimaciones de la concentración de agentes tóxicos en tejidos que no necesariamente van a ser blanco del carcinógeno limita el uso de estos biomarcadores en la estimación de riesgo (Tsapakos y cols., 1983). Estos hechos, aunados a la dificultad de identificar biomarcadores de exposición que reflejen las dosis del xenobiótico en el tejido blanco, hacen de los DPC, un parámetro interesante para investigar. Además, la ubicuidad de los agente inductores de DPC, los hallazgos *in vivo* acerca de esta capacidad y la habilidad de los compuestos químicos con estructuras químicas diversas y con capacidad inductora de entrecruzamientos ADN-proteínas enmarcan la importancia de esta reacción como un biomarcador en exposiciones a agentes como el formaldehído y potencialmente para metales como el cromo y el arsénico.

CAPITULO III.

ARSÉNICO

3.1 Generalidades

El arsénico (As) es un elemento ubicuo. Pertenece al grupo VA de la tabla periódica su número atómico es 33 y su masa atómica es 74.9. Se considera elemento de transición o metaloide con propiedades parecidas a las del fósforo y con toxicidad similar a la de metales pesados como el mercurio y el plomo. El As puede existir como As^{3-} , As^{1-} , As^0 , As^{1+} , As^{3+} y As^{5+} los últimos dos estados de oxidación son los de mayor interés toxicológico. La estabilidad de sus compuestos la jerarquizan los pentavalentes. Los compuestos pentavalentes y trivalentes pueden tener un origen orgánico e inorgánico. Dentro de los compuestos trivalentes más comunes están el trióxido de arsénico (As_2O_3), arsenito de sodio ($NaAsO_2$) y tricloruro de arsénico ($AsCl_3$) (Del Razo, 1997).

El As es un tóxico de origen natural. El arsénico inorgánico (As_i) puede ser ingerido vía el agua de bebida y por alimentos cultivados o crecidos en medios contaminados y/o cocinados con agua contaminada. También es un contaminante industrial, el trióxido de arsénico se usa en la manufactura de vidrio, diversos compuestos de

arsénico son usados en semiconductores y en el cromado. El cobre/arsenato ha sido usado para proteger la piel contra degeneración microbiana. El arsénico pentavalente, As^{5+} puede ejercer sus efectos tóxicos mediante la simulación del fosfato (Lindergren y cols., 1982) y consecuentemente desacoplar las reacciones de fosforilación. Cuando el arseniato está presente puede unirse competitivamente con D-gliceraldehído-3-fosfato y generarse así un acil arsonato en lugar de un acil fosfato, la formación del primer compuesto químico es rápidamente hidrolizado mientras que la del último maneja la síntesis de ATP a partir de ADP.

La toxicidad del As^{3+} se ha asociado a la capacidad que presenta de unirse o inactivar sistemas enzimáticos o proteínas que contienen residuos sulfhidrilo. Afecta enzimas mitocondriales y altera la respiración tisular inhibiendo la actividad de la succinato deshidrogenasa, desacoplando la fosforilación oxidativa (Casarett y Doull's, 1994). El citoesqueleto es otro de los blancos celulares del Así diversos trabajos muestran la particular afinidad del metal hacia proteínas con alto contenido en grupos sulfhidrilo como la tubulina (Li y Chou, 1992; Ramírez y cols., 1997).

Recientemente se ha retomado el estudio de la capacidad terapéutica de los compuestos arsenicales, ya que las observaciones clínicas y los resultados experimentales enfocados a la terapia contra la leucemia promielocítica aguda proponen al trióxido de arsénico como agente terapéutico (Chen, y cols. 1996; Soignet y cols., 1998).

El consenso en varios reportes sugiere que el arsénico induce apoptosis en las células leucémicas por la activación de genes apoptóticos (Chen, y cols. 1996; Soignet y cols., 1998).

3.2 Biotransformación.

El arsénico inorgánico que ingresa al cuerpo por ingestión es rápidamente absorbido hacia el torrente sanguíneo y transportado principalmente al hígado. En este órgano, parte del arsénico inorgánico es metilado a dos derivados metilados, el ácido monometilarsínico (MMA) y el ácido dimetilarsínico (DMA) los cuáles junto con la especie no metilada de arsénico son excretados en la orina, figura D.

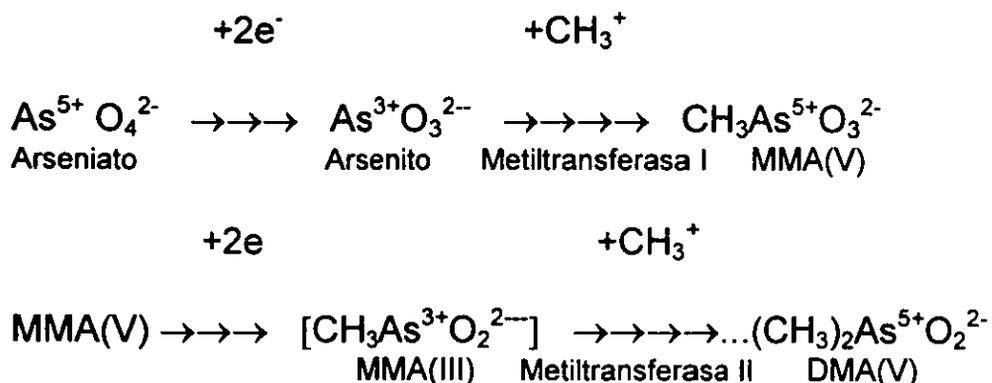


Figura D. Biotransformación del arsénico.
 (Esquema tomado de Del Razo 1997).

El arseniato que es rápidamente reducido a arsenito en la sangre, se incorpora y metila en los hepatocitos. Estudios *in vitro* muestran una capacidad de metilación relativamente baja en eritrocitos, cerebro, pulmón, intestino y riñón de ratas en comparación con la que se da en el hígado (Vahter, M. y cols., 1983). Recientemente estudios *in vitro* muestran que la máxima capacidad de metilación en preparaciones de tejido de ratón se encuentran en los testículos, seguido del riñón, el hígado y el pulmón (Healy y cols., 1997; Aposhian, 1997).

Estudios *in vivo* han mostrado que el GSH es requerido para la reducción de arseniato a arsenito que inició en los procesos de metilación de arsénico (Buchet y cols., 1985, 1987).

La familia de glutatión y glutatión S-transferasas (GST) son un conjunto de enzimas de detoxificación que catalizan la conjugación de GSH a un amplio espectro de compuestos hidrofóbicos y electrofílicos (Board y cols., 1990).

Se cree que el glutatión puede disminuir el potencial tóxico del As mediante diferentes funciones: 1) como antioxidante; 2) en su capacidad de co-factor enzimático en reacciones de metilación; 3) por su unión directa a As 4) a través de incrementar el flujo de los conjugados As-GSH (Huang y cols., 1993; Rosen, 1995).

La especies metiladas de arsénico son más eficientemente excretadas que el Asi por lo que se asume que son menos tóxicas, sin embargo, muchos estudios muestran que la capacidad de metilación del As es diferente entre animales experimentales y humanos. Todos los animales experimentales incluyendo la rata, ratón y hámster excretan muy poco MMA (<2%) en comparación con los humanos (10-18%) (Vahter y cols 1983; Buchet y cols. 1981, Vahter y cols., 1981).

Aunque se ha considerado que las formas metiladas del arsénico son generalmente menos tóxicas que el Asi, no hay evidencias en epidemiología humana de que los compuestos metilados posean

menor riesgo carcinogénico. Recientemente se ha estudiado la capacidad del DMA como promotor tumorigénico (Mass y cols. 1997).

El arsénico inorgánico puede unirse extensamente a componentes intracelulares y acumularse en tejidos del pulmón, riñón, cabello y uñas (Vahter y cols. 1984, Georis y cols., 1990). La baja capacidad de metilación del arsénico en otros tejidos diferentes al hígado podría incrementar la retención en el cuerpo del metal y consecuentemente incrementar el riesgo a la salud derivado de esta situación. Se ha reportado que en biopsias de hígado provenientes de 4 individuos crónicamente expuestos a arsénico inorgánico en agua para su bebida de alrededor de 0.5 mg/ml, tenían alrededor de 2 ppm de arsénico por peso seco lo que equivale a una concentración de 15 μ M (Das y cols, 1995).

Estudios previos muestran que las proporciones relativas de especies urinarias del arsénico en individuos que ingirieron repetidamente arsenito de sodio fueron: 7-26% de arsénico inorgánico, 20-34% para MMA y 34-60% para DMA y para trabajadores involucrados en las industrias productoras de vidrio, preservación de piel y en la manufactura de semiconductores 14-19%, 8-18% y 64-75% de arsénico inorgánico, MMA y DMA respectivamente. En el caso de

residentes de una comunidad aledaña a emisiones de arsénico y cobre se han encontrado niveles de arsénico inorgánico de 11-16% y de 11.3-21.1% y 49.2-72.9% para MMA y DMA respectivamente.

La capacidad de metilación del As depende de los niveles y de la magnitud de la exposición al metaloide, de diferencias interindividuales e intraindividuales, características étnicas, factores ambientales e incluso el estado nutricional así como de la ingestión de otros compuestos en el agua para beber.

3.3 Exposición

La principal fuente de exposición a arsénico para la población en general es a través de la ingestión de agua contaminada con As_i y a través del alimento. El nivel recomendado en el agua de bebida, por la Agencia de Protección al Ambiente en los Estados Unidos de Norteamérica (US EPA) desde 1934 es de 0.05 mg/l y dada la evidencia epidemiológica del riesgo elevado para cáncer, se ha propuesto disminuir los niveles recomendados para el agua potable a 0.005 mg/L), (EPA, 2000). Se estima que en los Estados Unidos de Norteamérica más de 350 000 personas, mientras que en la India existen alrededor de 100 millones de individuos que beben agua

contaminada con niveles superiores a la norma de 0.05 mg/l, y muchos más a la nueva recomendación (Chio y cols., 1997).

La exposición crónica a formas arsenicales inorgánicas a través del agua para beber está asociada con neoplasias de la piel, pulmón, riñón, vejiga e hígado (Germolec y cols., 1997). Efectos dermatológicos menos severos incluyen hiperpigmentación e hiperqueratosis que se presentan en las palmas de las manos y de los pies después de la exposición (Ostrosky y cols., 1991). Estudios epidemiológicos sugieren que la población en riesgo de sufrir cáncer por exposición al agua contaminada por arsénico en Estados Unidos de Norteamérica puede ser comparada con la que existe expuesta a el humo del tabaco y del gas radón en los hogares estadounidenses que es estimada en 1 en 1000 (Smith y cols., 1992).

Una cantidad considerable de arsénico inorgánico ($\mu\text{g/g}$) ha sido encontrada en organismos marinos en comparación con organismos terrestres. Derivados organoarsenicales y la arsenobetaina se encuentran entre los compuestos solubles al agua encontrados en estos organismos. Otros compuestos metilados han sido identificados también entre ellos se encuentran la arsenocolina, óxido de trimetilarsina (Me_3AsO), ion tetrametilarsonio (Me_4As^+) y arseno-

azúcares. Estos hallazgos cobran importancia en aquellas poblaciones humanas que ingieren frecuentemente cantidades considerables de comida marina (Ochi y cols.1989).

Efectos Tóxicos

Efectos cutáneos. Las manifestaciones cutáneas en exposición crónica a arsénico son distintivas y características. Su apariencia usualmente sigue una progresión temporal empezando con hipo e hiperpigmentaciones hasta su progresión a hiperqueratosis palmo-plantares. Existen personas expuestas que subsecuentemente desarrollan una variedad de cáncer de piel no melanómico en las áreas de hiperqueratosis preexistentes.

Las hiperqueratosis arsenicales aparecen predominantemente sobre las palmas de las manos y sobre la zona plantar de pies aunque el dorso de las extremidades y del tronco pueden también presentarlas. Ocasionalmente la lesiones pueden ser grandes (1 cm aproximadamente) y pueden tener apariencia nodular. El exámen histológico de las lesiones muestra típicamente hiperqueratosis. En algunos casos puede hacerse evidente la atipia celular, figuras mitóticas o células epidermales extensamente vacuolizadas (Black y cols., 1967; Tay y cols., 1974; Rahman y cols., 1992, Alain y cols. 1993).

Efectos gastrointestinales y hepáticos

En exposiciones agudas o subagudas (mg/día) el As puede generar alteraciones gástricas que pueden ir desde dolor abdominal y diarrea hasta gastroenteritis hemorrágica asociada al choque. Severa o moderada necrosis hepatocelular ha sido también encontrada incrementándose los niveles de transaminasas séricas.

En exposiciones crónicas a arsénico generalmente los síntomas gastrointestinales están ausentes. La hipertensión portal no cirrótica es una manifestación poco común pero relativamente específica asociada con la ingestión crónica de As. Se ha encontrado en individuos crónicamente expuestos a As en la Región Lagunera de México hiperbilirrubinemia y un incremento en la actividad de alanina aminotransferasa (ALT) sugiriendo la presencia de colestasis en los individuos expuestos (Hernández-Zavala y cols., 1998). Los exámenes histopatológicos del hígado en individuos crónicamente expuestos a elevadas concentraciones de As (0.2-2.0 µg/L) muestran la presencia de fibrosis en el tracto portal que ocasionalmente causan hipertensión y sangrado de várices esofágicas (Mazumder y cols., 1988; Piontek y cols., 1989).

La acumulación del arsénico se da de manera importante en el hígado. El contenido de citocromo p-450 disminuye y también se ve afectada la cantidad de oxidasas de función mixta (OFM), la disminución de ambos sistemas es dosis-dependiente (Albores y cols., 1992). Otras alteraciones comúnmente asociadas a la intoxicación por arsénico son la fibrosis (Morris y cols.,1974), cirrosis (Franklin y cols., 1950, Lin y Chen, 1986), hipertensión portal (Piontek y cols., 1989) así como la presencia de angiosarcoma (Falk y cols. 1981; Pershagen, y cols. 1983) y daño venooclusivo (Labadie y cols.,1990).

Efectos cardiovasculares.

En las exposiciones agudas o subagudas a arsénico inorgánico en el rango de mg-g/día se presentan rápidamente manifestaciones cardiovasculares que incluyen, hipotensión, alteraciones congestivas y arritmias cardíacas. La ingestión crónica de agua o vino contaminados con arsénico se ha asociado con el desarrollo de alteraciones vasculares periféricas como la conocida como la enfermedad del pie negro, de la cual se reportaron alrededor de 1000 casos en el suroeste de Taiwan, en gente que bebía agua contaminada con arsénico desde inicios de 1900 hasta 1950-1960 (Tseng y cols., 1961, 1977).

Efectos hematológicos

En exposiciones agudas y crónicas al arsénico se han observado la presencia de anemia, leucopenia y trombocitopenia. Los efectos en estos linajes celulares pueden ser simultáneas y pueden hacerse patentes a partir de la semana de exposición aguda a elevadas dosis. La anemia a consecuencia de la hemólisis o de la supresión en la médula ósea, puede ser normocítica o megaloblástica. La leucopenia puede estar caracterizada por neutropenia o linfopenia. En general la

mayor parte de las alteraciones hematológicas son reversibles y la normalización de la mayoría de los linajes celulares se da en las siguientes semanas después de terminada la exposición. (Eichner, 1984; Rezuke y cols., 1991).

Efectos pulmonares

Los posibles efectos de arsénico en la génesis de alteraciones no malignas por el arsénico han sugerido problemas de tos crónica, fibrosis pulmonar ligera. El incremento en la frecuencia de la obstrucción de las vías aéreas y de efisema fue significativo en aquellas áreas endémicas de hidroarsenicismo en los Estados Unidos de Norteamérica, (Engel y Smith, 1994).

Efectos inmunológicos

Se han evidenciado efectos inmunomoduladores e inmunotóxicos de arsénico en diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha propuesto un efecto inmunoestimulador del arsenito y arseniato de sodio en las concentraciones bajas de 2 μM y 5 μM respectivamente. El incremento en los cultivos estimulados con fitohemaglutinina (PHA) fue de hasta 49% y 19% respectivamente. Mientras que a

concentraciones superiores el crecimiento fue inhibido (McCabe y cols., 1983). Se ha reportado un retraso en la proliferación celular relacionado con la dosis en linfocitos humanos tratados *in vitro* con concentraciones 0.001 μM , 0.01 μM y 0.1 μM de arsenito y arseniato de sodio (Gonsebatt y cols., 1992 y 1994).

La disminución en el número de células T (CD8+), células B, macrófagos, células asesinas (NK) así como alteración en la secreción de interleucinas han sido efectos atribuidos a la exposición crónica de arseniuro de galio (Burns y Munson, 1993).

Efectos neurológicos

Hay evidencias de neuropatía central y periférica en ingestiones subagudas de arsénico (10 mg/ml) y en personas ocupacionalmente expuestas afectando fibras motoras, sensoriales y generando desmielinización axonal (Feinglass, 1973, Hinsmarsh y McCurdy, 1986).

Efectos endocrinológicos

Se reconocen los efectos inhibitorios del complejo enzimático de piruvato deshidrogenasa y los consecuentes efectos del metabolismo de carbohidratos y de la respiración celular en intoxicaciones agudas de arsénico (Stocken y Thompson, 1949). Hipoglucemia y alteraciones en la tolerancia a la glucosa son otros signos de la exposición a arsénico (Boquist y cols. 1988).

Efectos en el desarrollo y reproductividad

Existen pocos estudios enfocados al estudio de los efectos reproductivos en humanos. Sin embargo, se ha asociado un incremento en la frecuencia de abortos espontáneos y de productos de bajo peso en personas que residen cerca de plantas esmaltadoras con altas emisiones de arsénico y en gente que ingiere agua contaminada con arsénico (60-270 µg/l) (Nordstrom y cols, 1978 a,b; Desí, 1992).

3.6 Mecanismos moleculares de carcinogénesis para el arsénico

La exposición crónica a formas arsenicales inorgánicas a través del agua para beber está asociada con neoplasias de la piel, pulmón riñón, vejiga e hígado. Los mecanismos involucrados en la formación de estas neoplasias por el arsénico en contraste con otros químicos carcinógenos en humanos, no están bien establecidos en parte a la falta de predictividad en modelos animales para este agente. De ahí que se enfatice la importancia de los estudios bioquímicos y de biología celular para encontrar respuestas a los mecanismos de acción responsables de los efectos tóxicos del metal (IARC, 1992).

Para el arsénico no se ha observado capacidad mutagénica (Jacobson-Kram y cols., 1985) sin embargo, el arsénico es co-mutagénico con la radiación ultravioleta, rayos X ó agentes alcalinos e induce intercambio de cromátidas hermanas (SCEs) y aneuploidías en linfocitos humanos *in vitro* e *in vivo* (Lee y cols., 1985; Ostrosky-Wegman y cols, 1991; Ramírez y cols.,1997).

La alta afinidad del As^{3+} por grupos sulfhidrilos permite su acumulación y retención persistente en tejidos ricos de queratina como cabello y piel y los niveles en estos tejidos han sido utilizados

como un indicador cuantitativo de exposición humana a este agente (Molin y cols., 1976).

La elevada capacidad del As^{3+} por interactuar con grupos sulfhidrilo se ha evidenciado a nivel molecular por la alteración en la funcionalidad de un gran número de enzimas y proteínas. Algunas de ellas involucradas en la reparación del ADN (ligasas) e incluso en la organización y polimerización del citoesqueleto (p.ej.tubulina) (Li, y Chou, 1992, Ramírez y cols. 1997).

Se ha propuesto que el arsénico puede inducir inflamación o tumorigénesis por modulación de citocinas promotoras de inflamación y crecimiento respectivamente. Citocinas quimiotácticas o mediadoras de inflamación o crecimiento como la interleucina 1α (IL- 1α), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e IL-8, el factor de crecimiento de transformación (TGF- α) y el factor estimulador de crecimiento de colonias de macrófagos (GM-CSF) se relacionan con varios procesos patológicos como son la hipersensibilidad por contacto, psoriasis y neoplasias. En particular la sobreexpresión de TGF- α se ha asociado con procesos patológicos de transformación neoplásica en la piel y es rápidamente secretada en cultivos celulares después de transformación con virus y oncogenes celulares o por tratamiento con

promotores tumorales (Gottlieb y cols., 1988; Luger y Schwartz, 1990; Vasunia y cols., 1994; Imamoto y cols., 1991). A este respecto el arsénico ha probado recientemente inhibir la diferenciación en queratinocitos a través de la inhibición de un marcador de diferenciación celular conocido como involucrina (Kachinskas y cols., 1994).

Se ha reportado sabe también que el Asi induce la síntesis de varias proteínas, incluidas las de estrés (hsp 70), la hemo oxigenasa, la queratina, la metalotioneina, la actina, la tubulina y el gen de resistencia múltiple a antibióticos (MDR1) (Albores y cols., 1992; Chin y cols., 1992; Darasch 1988; Kutty y cols., 1992; Yu y cols., 1993, Menzel y cols., 1999).

La administración oral de DMA en ratones se ha asociado a la inducción de daño al ADN específicamente de pulmón en donde se ha encontrado la generación de rompimientos cromatídicos y un incremento en el contenido de heterocromatina nuclear (Yamanaka y cols., 1993). Se especula que estos efectos son consecuencia de la producción de radicales libre incluyendo a las especies reactivas de oxígeno generadas en el metabolismo del DMA. Se ha propuesto que el radical peróxido de dimetilarsénico $[(CH_3)_2AsOO\cdot]$ sea la especie

reactiva causante del daño cromatídico e incluso de los entrecruzamientos ADN-proteínas entre la histona H1 o entre proteínas no histonas encontrados en células humanas y de ratón (Yamanaka y cols., 1993).

CAPITULO IV

MÉTODO CIENTIFICO

4.1 Planteamiento del problema

Existen pocos estudios encaminados a investigar los aspectos citotóxicos de los entrecruzamientos ADN-proteínas inducidos por agentes ambientales, especialmente por metales o metaloides y si estos efectos resultan característicos de cada elemento, o si existen patrones comunes, así como las bases, los aminoácidos y los mecanismos involucrados.

Hay evidencias que indican que el As induce entrecruzamientos ADN-proteínas (Costa y cols., 1996). Estos entrecruzamientos podrían ocurrir con algunas proteínas de la matriz nuclear y/o celular, originando el daño cromosómico observado *in vivo* e *in vitro*. Considerando que los procesos de bioactivación y detoxificación del As ocurren en el hígado, nos interesa conocer si el arsénico induce entrecruzamientos ADN-proteínas *in vitro* e *in vivo* en células hepáticas, así como identificar algunas de las proteínas involucradas en los DPC. De igual manera nos interesa saber si la exposición a As induce la síntesis de glutatión el cual está considerado como el principal reductor celular de naturaleza no proteica que protege a la

célula de radicales libres, especies de oxígeno reactivas y de otras sustancias o agentes tóxicos (Denke y Fanburg, 1989).

El estudio y la caracterización de este tipo de efectos, contribuirá a profundizar en la toxicidad de este elemento y permitirá resolver preguntas acerca del papel de los entrecruzamientos en el daño genético y si existe o no una unión preferencial de determinada proteína dada su actividad biológica.

4.2 Hipótesis

El arsenito de sodio induce entrecruzamientos ADN-proteínas de una manera dosis dependiente.

4.3 Objetivos de trabajo

4.3.1 Objetivo general

Investigar la inducción *in vitro* e *in vivo* de entrecruzamientos “cross-links” ADN-proteínas por arsénico.

4.3.2 Objetivos particulares

Determinar la capacidad que presenta el arsenito de sodio para inducir DPC en las células “WRL-68” derivadas de hepatocitos fetales humanos.

Caracterizar algunas de las proteínas involucradas en los DPC inducidos por el arsenito de sodio mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y con anticuerpos monoclonales.

Determinar la sensibilidad y especificidad en la inducción *in vitro* de los DPC por arsenito de sodio al compararla con cromo.

Determinar la capacidad que presenta el arsenito de sodio para inducir DPC en el hígado de ratones de la cepa BALB/c.

CAPITULO V.

MATERIALES Y METÓDOS

5.1 Cultivos y tratamiento de la línea celular hepática.

La línea celular WRL-68 derivada de hepatocitos fetales humanos, presenta una morfología similar a los hepatocitos y a cultivos primarios de hepatocitos. Estas células preservan características estructurales y de actividad enzimática de enzimas como la alanina aminotransferasas, aspartato aminotransferasas, γ -glutamiltanspeptidasa y fosfatasa alcalina, además expresan un patrón de citoqueratinas similar a otros cultivos hepáticos ofreciendo un modelo *in vitro* para estudiar el efecto de xenobióticos (Gutierrez y cols., 1984).

Las células se mantuvieron en cultivo en medio Dulbecco Eagle modificado y suplementado con 8% de suero fetal bovino (Gibco), 1% de aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ hasta confluencia. Los tratamientos con arsenito se iniciaron en esta fase para evitar la generación de DPC durante la fase S. Las células se trataron durante 16 horas con diferentes concentraciones de arsenito de sodio (Sigma, St. Louis,

MO) 1, 10, 10^2 y 10^4 nM. Las soluciones se prepararon justo antes de iniciar el tratamiento para evitar la oxidación del arsenito.

Un cultivo sin tratamiento y uno tratado con dicromato de potasio 10^3 nM fueron los controles negativos y positivos respectivamente.

Transcurrido el período de tratamiento, las células se colectaron con un rastrillo y se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2. La evaluación de la citotoxicidad se realizó utilizando el método de exclusión de azul tripano en donde las células viables son impermeables al colorante mientras que aquellas no viables incorporan el colorante por alteraciones en la membrana celular. (Kaltenbach y cols., 1953). Para cada tratamiento, la viabilidad celular siempre fue superior al 75%.

5.2 Determinación intracelular de arsénico.

La cantidad de especies arsenicales intracelulares se determinó mediante el método de generación de hidruros por espectroscopía de absorción atómica después de la separación cromatográfica de arsénico inorgánico (iAs) y sus metabolitos. La cuantificación está basada en la medición de la luz absorbida a 193.7 nm por la

excitación de los átomos de arsénico hacia una lámpara de descarga sin electrodos (Crecelius y cols., 1986).

5.3 Determinación de glutatión reducido.

La determinación de glutatión reducido (GSH) se realizó mediante el método descrito por Hissin y Hilf, 1976. 2×10^6 células se cultivaron y se trataron con arsenito de sodio como fue previamente descrito. Las células se colectaron y resuspendieron en amortiguador PBS/EDTA (0.1 M de fosfato de sodio, 0.005 M EDTA, pH 8.0). Las proteínas totales se precipitaron utilizando una solución 2.5% de ácido perclórico y posterior centrifugación por 10 min a 4°C. 0.1 ml del sobrenadante, 1.8 ml de solución PBS/EDTA, pH 8.0 y 0.1 ml de 1% de o-ftalaldehído (Sigma) se mezclaron e incubaron en un tubo de ensayo por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La solución se transfirió a la celda de cuarzo. La fluorescencia se determinó a 420 nm con una excitación a 350 nm.

5.4 Aislamiento de los DPC

La precipitación de los DPC se desarrolló empleando el método descrito por Zhitkovich y colaboradores (1992). En breve, después de la determinación de la viabilidad, las células se lisaron utilizando 0.5 ml de una solución de SDS 2% y se congelaron a -70 °C. Las células se descongelaron en un baño de agua a 37°C y el ADN se fragmentó pasando la solución por una aguja de acero calibre 21. Los lisados se vaciaron a un tubo Eppendorf ejerciendo cierta presión y evitando al máximo la formación de burbujas. Se adicionaron 0.5 ml de solución de KCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 (Solución **B**), y se mezcló en un vortex.

Las muestras se incubaron a 65°C por 10 min, luego cada tubo se invirtió 3 veces y se colocó en hielo durante 5 min, para permitir la formación del precipitado KCl-SDS-proteína(s)-ADN.

Los precipitados se colectaron por centrifugación a 6000 g por 5 min a 4°C. Los sobrenadantes se descartaron y las pastillas se resuspendieron en 1 ml de solución **C** (100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5). Las muestras se calentaron y se lavaron 3 veces como se describió anteriormente. Después del último lavado se resuspendió la pastilla en 250 µl de solución **D** (100 mM KCl, 10 mM EDTA, 20 mM

Tris-HCl, pH 7.5). Se guardaron 50 μ l para realizar la caracterización de las proteínas que pueden estar involucradas en la formación de los complejos. La cantidad de ADN total y de los complejos se detectó utilizando colorante Hoechst 33258, la fluorescencia se determinó utilizando un filtro de excitación de 365 nm y se midió la fluorescencia emitida a 450-460 nm (Labarca y Paigen, 1980). Como blanco se utilizó una solución de albúmina sérica bovina (BSA).

Para evaluar la persistencia de los DPC después del tratamiento, los cultivos controles y las células tratadas se lavaron con PBS y se pusieron a cultivar en medio sin arsénico durante 2, 6, 12 y 24 horas para luego colectarse de la manera antes descrita. La determinación de la viabilidad celular y el aislamiento de los complejos se realizó de manera similar a lo anteriormente descrito

5.5 Caracterización de las proteínas

Los DPC fueron digeridos durante 1 h a 37°C con nucleasa (25 μ g/ml DNasa I, sp.act.1872 U/mg) (Wedrychowsky y cols. 1984) en preparación para la electroforesis en geles de acrilamida-SDS. Las muestras digeridas se sometieron a electroforesis como describe Laemmli(1970). La separación de las proteínas se hizo en geles al 4%

de bis-acrilamida para el gel concentrador y al 10% de bis-acrilamida para el gel separador bajo condiciones reductoras (25mM β -mercaptoetanol (Bio-rad) o 10 mM de ditioneitol (Bio-rad). Las proteínas se visualizaron utilizando el método de azul de Coomassie y/o por Western-Blott, para revelar las proteínas en este último caso se utilizó un cóctel de anticuerpos monoclonales anti-Pan citoqueratinas que reconocen las citoqueratinas humanas 1,4-6,8,10,13,18 y 19 (Sigma) y un anticuerpo monoclonal específico que reconoce a la citoqueratina 18 (CK18) y (Neomarkers, Lakeside, NY). Se realizó un análisis densitométrico de las inmunotransferencias utilizando el sistema de imagen óptico AMBIS (Scanalytics). El software utilizado fue RSLPSCAN versión 2.1.

5.6 Efecto del NaCl sobre los DPC inducidos por As.

Para conocer que tan fuerte era la asociación del ADN y la CK18 los DPC aislados se lavaron con 2.5 M de NaCl (concentración final) y se resuspendieron en 100 mM de KCl, 100 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl y después se dializaron utilizando membranas de diálisis con un poro molecular de 12,000-14,000 contra PBS pH 7.2, por 24 hs. Una vez

dializados los DPC se prepararon para SDS-PAGE con o sin la digestión con nucleasa como se describió anteriormente.

5.7 Inmunohistoquímica

Las células WRL-68 se crecieron en cubreobjetos estériles de vidrio hasta semiconfluencia. En este estado, los cultivos fueron tratados con concentraciones de arsenito de sodio en el rango de $1-10^4$ nM por 16 horas. Después del tratamiento, las células sobre los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS pH 7.2, y entonces se fijaron y permeabilizaron por 90 min en 95% de etanol a 0°C. Los cubreobjetos se lavaron 2 veces con PBS pH 7.2 por 5 minutos y enseguida se bloquearon durante 30 minutos con BSA al 3% (w/v) en PBS, seguida de una incubación de 1 h con los anticuerpos monoclonales contra la CK18. Los cubreobjetos se lavaron 2 veces por 5 min y se incubaron una hora más contra el anticuerpo anti-IgG-FITC (1:100) preparado en amortiguador de bloque. Finalmente las células, se lavaron 3 veces durante 10 min con PBS, se montaron en glicerol y se observaron en microscopio para epifluorescencia (Nikon E 400) y en microscopio confocal Odissey Noran 3.2. Las células fueron fotografiadas utilizando una película ASA 400 y la intensidad de fluorescencia se determinó utilizando un sistema computarizado 1.3 MetaMorph. Los testigos negativos se prepararon utilizando un cultivo

al que se le agregó medio de cultivo en lugar de anticuerpos monoclonales.

5.8 Experimentos *in vivo*.

Grupos de 6 ratones machos de la cepa BALB/c que pesaban entre 25-30 g, fueron expuestos a arsenito de sodio en las siguientes dosis: 4.5 mg de arsenito de sodio/kg de peso (34.6 $\mu\text{M}/\text{kg}$ peso); 9 mg de arsenito de sodio/kg de peso (69.23 $\mu\text{M}/\text{kg}$ peso) y 12 mg de arsenito de sodio/kg de peso (92.3 $\mu\text{M}/\text{kg}$ de peso). El testigo positivo, dicromato de potasio, se administró a los ratones en una dosis de 40 mg/kg y el testigo recibió solución salina. Las soluciones de tratamiento se prepararon antes de tratar a los animales para evitar su oxi-reducción.

Después de transcurridas 3 horas de la administración de Asi (periodo en el que el As es metabolizados y los metabolitos son detectados en la orina) (Del Razo y cols., 1999), se les sacrificó por dislocación cervical. Rápidamente se obtuvo el hígado y se colocó sobre una caja petri estéril inmersa en hielo con buffer de fosfatos pH 8/PMSF 1mM frío.

5.9 Aislamiento de los núcleos

La obtención de los DPC se realizó a partir de los núcleos aislados del hígado. Los núcleos se aislaron de la siguiente manera:

Una vez extraído el hígado, se homogenizó en 3 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 8 suplementado con inhibidores de proteasas :PMSF 10 mg/ml (10 μ l/ml), Azida de sodio 0.5 M (30 μ l/ml) y ortovanadato de sodio 100 mM (10 μ l/ml). Los tubos se mantuvieron siempre en hielo. El homogenado se diluyó 1:10 en amortiguador de sacarosa manteniéndose en hielo. Transcurridos cinco minutos se centrifugó a 15,000g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y se resuspendió la pastilla en la solución A. La calidad de los núcleos fué verificada al microscopio. Se prepararon alícuotas en tubos Eppendorff con 500 μ l de resuspensión y se congelaron a -70°C para proceder a la precipitación de los complejos.

6.0 Precipitación de los complejos ADN-proteína

Un volumen de 500 μ l de núcleos lisados se descongeló a 37°C, por cada ratón tratado. Los núcleos fueron lisados, pasando la suspensión cuatro veces a través de una jeringa con aguja calibre 21. Los lisados se mantuvieron en hielo durante este proceso. Se tomaron alícuotas

de 3.5 μ l que se aforaron a 1 ml con solución **D** y se utilizaron para determinar ADN total mediante fluorometría como se describe en la sección 5.2. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su cuantificación. Al resto se adicionó 0.5 ml de la solución **B** y se continuó con la precipitación de los DPC de la manera anteriormente descrita en el aislamiento de los complejos inducidos *in vitro*.

6.1 Análisis de datos.

El promedio, la desviación estándar y el error estándar se calculó a partir de los datos cuantitativos obtenidos de al menos 3 experimentos por duplicado en las condiciones experimentales antes señaladas para las células WRL-68. El análisis estadístico se desarrolló utilizando un ANOVA en una vía y las pruebas de Dunnett o de Neuman-Keuls para las comparaciones múltiples con un nivel de significancia de 5%. Se usaron correlaciones lineales para los estudios de efectos dosis-respuesta.

Los datos obtenidos de los estudios *in vivo* se analizaron aplicando un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, el nivel de significancia fué de 5%. La relación dosis-efecto se analizó por medio de una correlación simple.

CAPITULO VI

6.0 RESULTADOS

En este trabajo, se estudió la inducción de complejos ADN-proteínas (DPC) por arsénico en células humanas derivadas de hepatocitos fetales (WRL-68) y en el hígado de ratones BALB/c tratados con arsenito de sodio en dosis única.

La inducción de los DPC en las células WRL-68, guardó un comportamiento lineal respecto a las concentraciones evaluadas de arsenito de sodio. El incremento en la formación de DPC fue significativo en todas las concentraciones de As, incluso fue mayor a la que presentó la inducción provocada por el cromo como se puede observar en la Tabla I (ANOVA $F=13.7$, $P=0.0025$) y en la (Figura 1) (coeficiente de correlación $r=0.9527$, $p<0.05$). La proporción de DPC máxima observada se presentó en la concentración 10^4 nM Tabla I). La viabilidad de las células WRL-68 tratadas con Asi 1, 10, 10^2 , 10^4 nM) siempre fue superior al 75%.

Tabla I. Entrecruzamientos ADN proteínas inducidos por arsenito de sodio en células WRL-68 tratadas durante 16 horas.

Arsenito de sodio (nM)	Promedio	+/- error estándar
0	3.62	0.10
1	5.61*	0.08
10	5.54*	0.08
100	6.47*	0.17
10000	7.49*	0.31
Cromo	5.10*	0.25

*Significativo

ANOVA, F=13.7, P=0.0025

Prueba Dunnett post hoc P<0.05

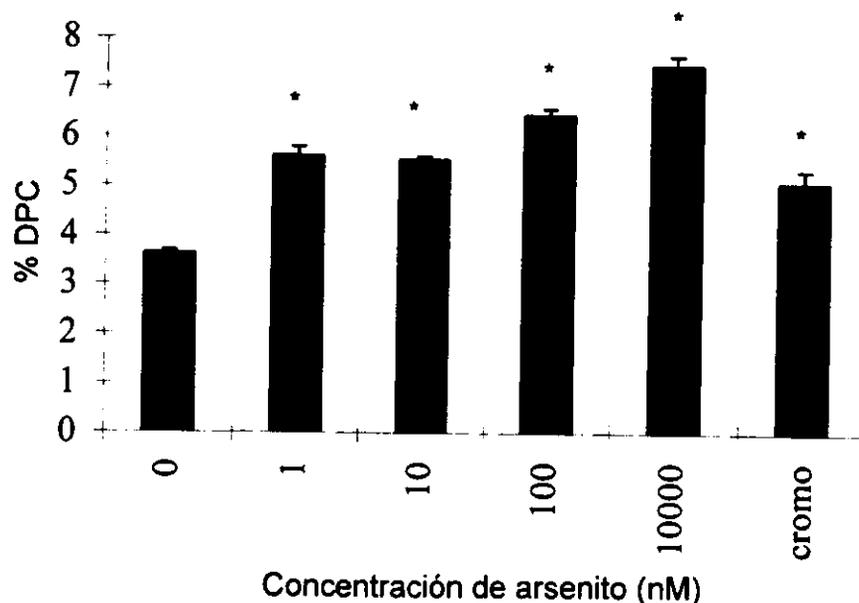


Figura 1. Inducción de DPC en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio.

(ANOVA, F=13.7, P=0.0025; Prueba de Dunnett *post hoc* P<0.05; Coeficiente de correlación r=0.9527, p< 0.05). Promedio de 3 experimentos por duplicado +/- error estándar. * Significativamente diferentes respecto al testigo negativo.

Para conocer la incorporación del arsénico a las células WRL-68, se determinó su concentración intracelular por métodos de espectroscopía de absorción atómica. Los resultados muestran la captación de Asi por las células fue dependiente de la dosis de tratamiento (Tabla II).

Tabla II. Especies de arsénico determinadas mediante espectroscopia de absorción atómica en cultivos de células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio durante 16 horas.

Intracelular (Pastilla celular, 2×10^6 células)				
Arsenito de sodio (nM)	As ³⁺ (ng/ml)*	As ⁵⁺ (ng/ml)	MMA(ng/ml)	DMA(ng/ml)
0	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
1	2 +/- 0	<0.5	<0.5	<0.5
10	8 +/- 0	<0.5	<0.5	<0.5
100	15 +/- 0	<0.5	<0.5	<0.5
10000	88.3 +/- 0	<0.5	<0.5	<0.5

*Promedio +/- error estandar

Extracelular (Medio de cultivo)				
Arsenito de sodio (nM)	As ³⁺ (ng/ml)*	As ⁵⁺ (ng/ml)	MMA(ng/ml)	DMA(ng/ml)
0	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
1	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
10	6.75 +/- 0.176	<0.5	<0.5	<0.5
100	61 +/- 1.0	<0.5	<0.5	<0.5
10000	680.5 +/- 8.5	<0.5	<0.5	<0.5

*Promedio +/- error estándar

La proporción de DPC en las células WRL-68 correlaciona linealmente con la concentración intracelular de Asi (Figura 2).

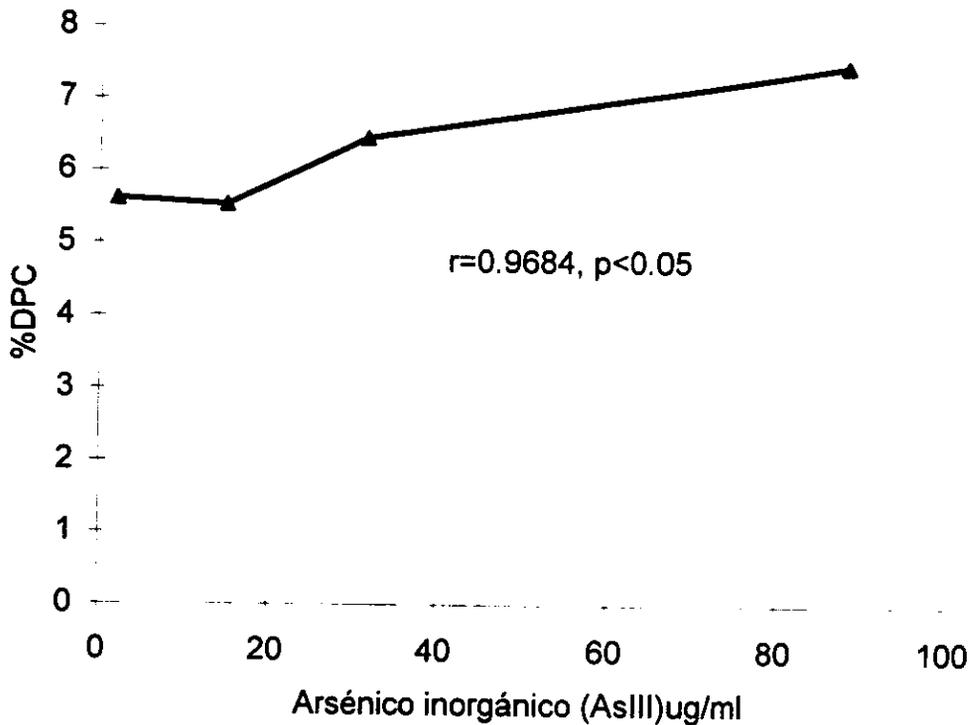


Figura 2. Correlación entre la inducción de DPC en células WRL-68 y la concentración de arsénico inorgánico intracelular. ($r=0.9684$, $P<0.05$), (ANOVA $H=12.9$, $P=0.0011$).

En las condiciones experimentales usadas las células WRL-68 no biotransformaron el Asi ya que no se detectó la presencia de especies metiladas (MMA y DMA) de arsénico. Por otra parte se observó un aumento significativo de GSH dependiente de la concentración de Asi, ($r=0.9522$, $P<0.05$; ANOVA $H=16.2$, $P=0.00276$), (Tabla III y Figura 3)

Tabla III. Glutación (GSH) inducido en células WRL-68 después de su tratamiento durante 16 hrs con arsenito de sodio

Arsenito de sodio (nM)	Promedio (ng/ml)	+/- error estandar
0	4.115	0.0648
1	4.085	0.1864
10	4.707*	0.0706
100	5.045*	0.1284
10000	5.325*	0.1887

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANOVA H=16.2, P=0.00276

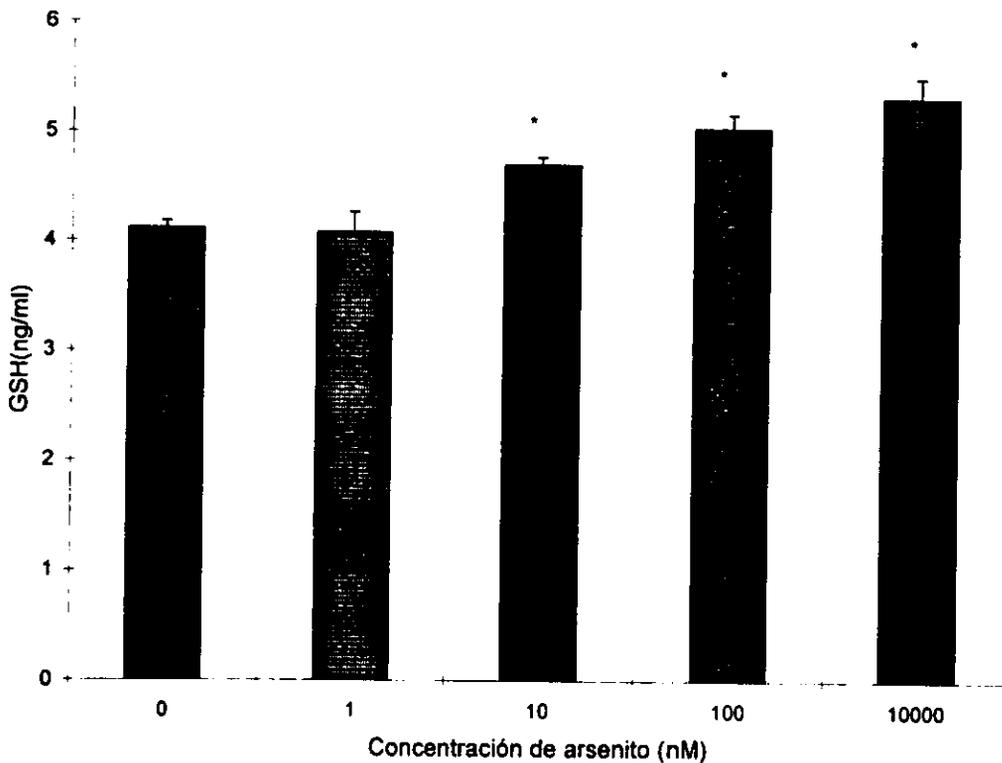


Figura 3. Inducción de glutatión en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio. Coeficiente de correlación lineal simple, $r=0.9522$, $P<0.05$; ANOVA $H=16.2$, $P=0.00276$). Promedio de 3 experimentos por duplicados +/- error estándar. * Significativamente diferentes respecto al testigo negativo.

Cuando se evaluó la persistencia de los DPC inducidos se observó una disminución significativa en la proporción de los DPC (ANOVA, $F=8.66$, $P=0.005$). La mayor remoción de los DPC se observó en las concentraciones menores (1 nM y 100 nM) y 24 horas después los niveles de DPC eran similares a los basales, con la excepción de la concentración 1 nM cuyos niveles siempre se mantuvieron por debajo de los porcentajes observados en los testigos (Figura 4 y Tabla IV).

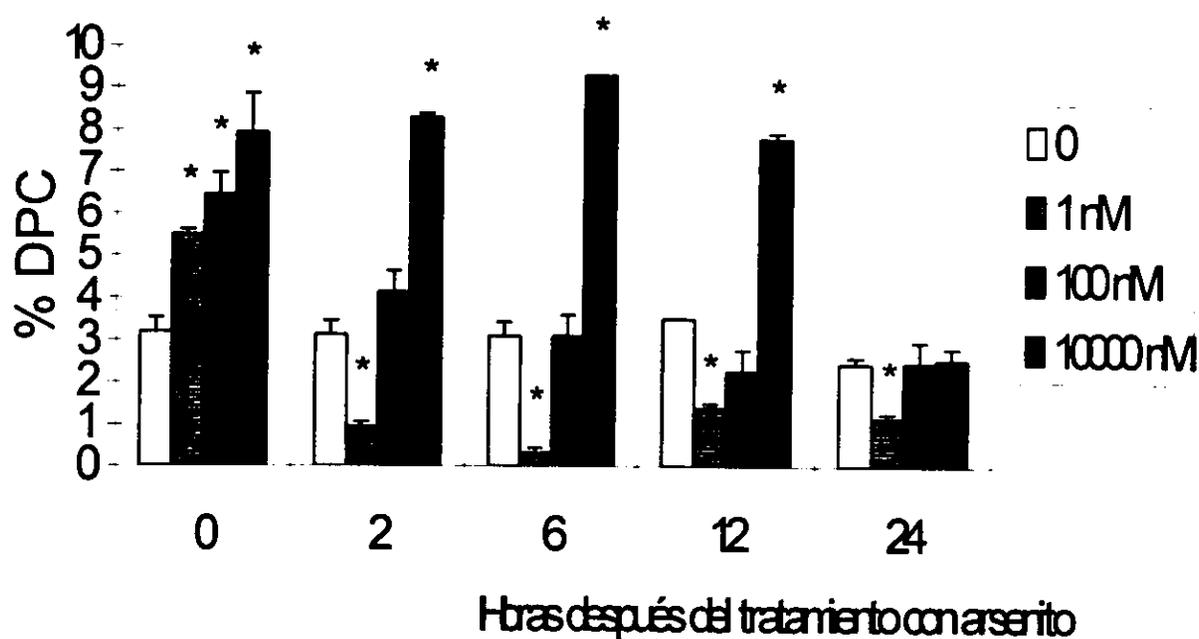


Figura 4. Persistencia de los DPC inducidos en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio. Promedio de 2 experimentos por duplicado +/- error estándar. * Significativamente diferentes ($P<0.05$) respecto a las células tratadas en cada período de tiempo de recuperación (ANOVA, $F=8.66$, $P=0.00512$; Prueba de Dunnet *post hoc* $P<0.05$).

Tabla IV. Persistencia de los DPC inducidos por arsénico en células WRL-68.

Arsenito de sodio (nM)	Tiempo después del tratamiento*			
	2 horas	6 horas	12 horas	24 horas
0	3.2+/-0.01	3.1+/-0.015	3.51+/-0.01	2.45+/-0.21
1	5.5+/-0.05	0.32+/-0.12	1.4+/-0.17	1.16+/-0.19
100	6.46+/-0.18	3.09+/-0.11	2.26+/-0.12	2.46+/-0.50
10000	7.92+/-0.1	6.23+/-0.18	7.8+/-0.12	2.51+/-0.47

*Promedio +/- error estándar.

Considerando que el arsenito de sodio fue capaz de inducir una proporción significativa de las proteínas fuertemente unidas al ADN en una línea celular hepática, se procedió a estudiar esta capacidad en estudios *in vivo*, usando ratones de la cepa BALB/c. Los resultados mostraron que el Asi III induce significativamente la formación de DPC en estudios *in vivo*, aunque este efecto no fue dependiente de la concentración probada (Figura 5 y 6). La magnitud de formación de DPC fue similar a la obtenida en ratones expuestos a cromo (Figura 5 y Tabla V).

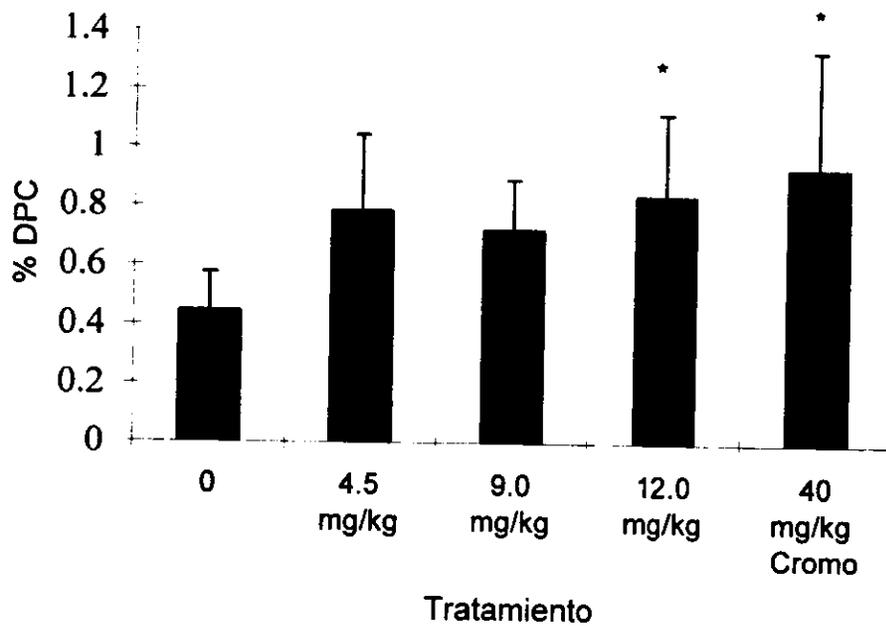


Figura 5. Inducción de DPC en ratones BALB/c tratados con arsenito de sodio. (ANOVA, Kruskal-Wallis $p < 0.05$). Promedio de 3 experimentos por duplicado +/- error estándar. * Significativamente diferentes respecto al testigo negativo.

Tabla V. Inducción de DPC en ratones BALB/c tratados con arsenito de sodio

TRATAMIENTO	PROMEDIO % DPC	+/- E.EST.
Controles	0.45	0.13
Arsénico 4.5 mg/kg	0.79	0.26
Arsénico 9.0 mg/kg	0.72	0.17
Arsénico 12.0 mg/kg	0.84*	0.28
Cromo 40 mg/kg	0.94*	0.40

* Significativos

Kruskall-Wallis, $p=0.046$, Análisis de Dunn.

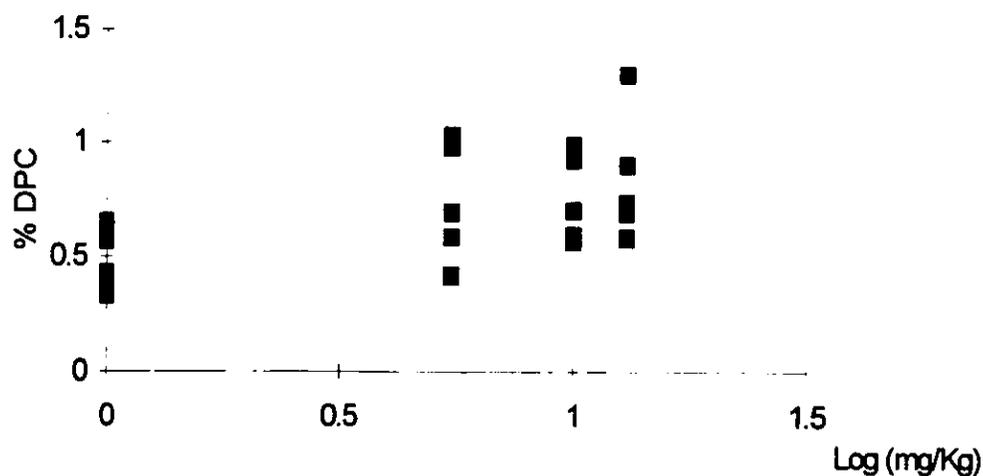


Figura 6. Proporciones de DPC inducidos en hígado de ratones BALB/c tratados con arsenito de sodio. Ratones machos fueron tratados con dosis única vía intraperitoneal con arsenito de sodio durante 3 horas, transcurrido el periodo de tratamiento fueron sacrificados y se les extrajo el hígado para que a partir de los núcleos se precipitaran los DPC utilizando soluciones de SDS-KCl.

Con el fin de caracterizar las proteínas involucradas en los entrecruzamientos ADN-proteínas en las células WRL-68. Los complejos aislados se digirieron con nucleasa (DNAsa I) y se sometieron a electroforesis en geles de bis/acrilamida (SDS-PAGE) con condiciones desnaturalizantes utilizando β -mercaptoetanol o ditioneitol. Se observaron patrones electroforéticos similares de las proteínas constituyentes de los DPC tanto en células no tratadas como en las que se trataron con arsénico y con cromo. La intensidad de las bandas fue menor en las células no tratadas en comparación con aquellas que habían sido tratadas con arsenito o cromo (Figura 7).

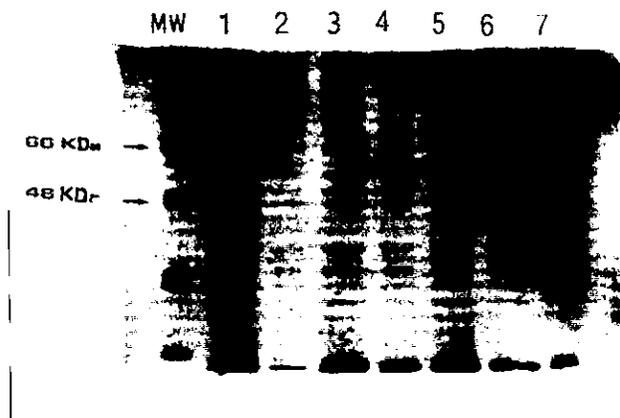


Figura 7. Electroforesis de los DPC inducidos en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio. El número en la líneas corresponde a : 1) 10^3 nM $K_2Cr_2O_7$, 2) testigo negativo (cultivo sin tratamiento) , 3) arsenito 1nM; 4) arsenito 10 nM; 5) arsenito 10^2 nM; 6) arsenito 10^4 nM; 7) 30 μ g de proteínas obtenidas de lisado de células WRL-68.

Dentro de las proteínas entrecruzadas al ADN identificamos a las CK mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y por inmunotransferencia. Observamos la presencia de al menos 5 CK en los DPC inducidos por arsénico en células hepáticas humanas. con un PM aproximado de 54,50,48,46 kDa en las células tratadas con arsenito: 1, 10 y 10^2 nM; mientras que en las células tratadas con la máxima concentración (10^4 nM) y en el control positivo se presentó una banda extra de 45 kDa, (Figura, 8).

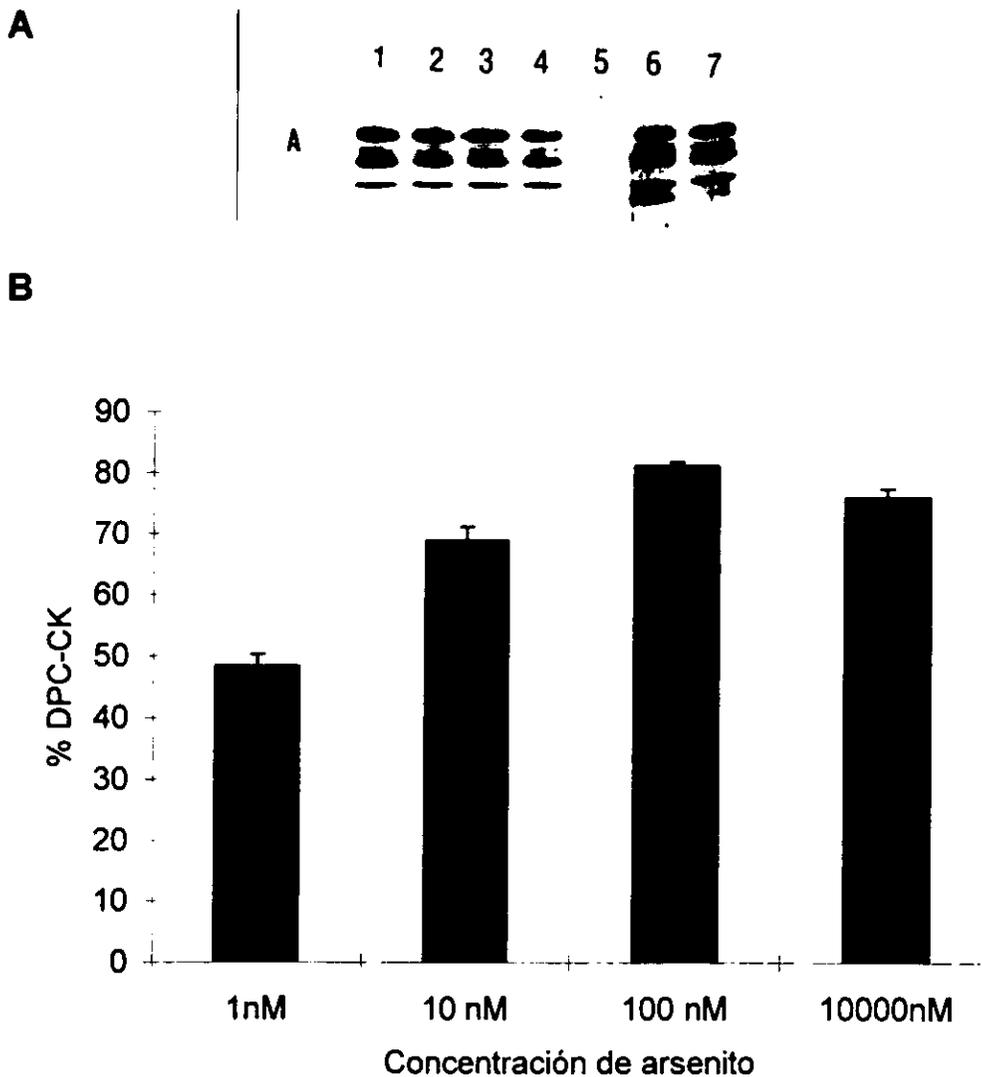


Figura 8. DPC-CK inducidos en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio. A) DPC-CK aislados a partir de las células WRL-68 tratadas durante 16 horas con arsenito de sodio. El número en la líneas corresponde a : 1) testigo negativo (cultivo sin tratamiento); 2) arsenito 1nM; 3) arsenito 10 nM; 4) 10^2 nM; 5) línea vacía; 6) arsenito 10^4 nM; 7) $K_2Cr_2O_7$ 10^4 nM.

B) Densitometría de los DPC inducidos por arsenito. Las barras representan el promedio de los valores densitométricos \pm error estándar obtenidos de 3 réplicas del experimento por duplicado. El porcentaje está expresado en relación a los valores obtenidos en los testigos negativos (cultivos sin tratamiento).

La mayor cantidad de citoqueratinas entrecruzadas por acción del arsénico se presentó en la máxima concentración evaluada (Tabla VI).

Tabla VI. Densitometrías de los entrecruzamientos ADN-citoqueratinas inducidos por arsenito de sodio en células WRL-68 tratadas durante 16 horas.

Arsenito de sodio (nM)	% CK*	+/- error estándar
1	48.45	1.35
10	68.94	1.61
100	81.2	0.43
10000	76.02	1.05
Cromo	84.02	0.96

* Proporción promedio de CK entrecruzada respecto al control (Control 100%).
(F=9555.9, P<0.001)

Específicamente, dentro de las citoqueratinas asociadas con el ADN se identificó la citoqueratina 18 (CK18) proteína característica en el hígado, (Figura, 9).

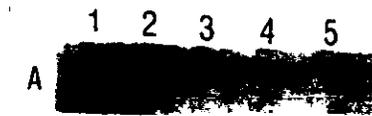
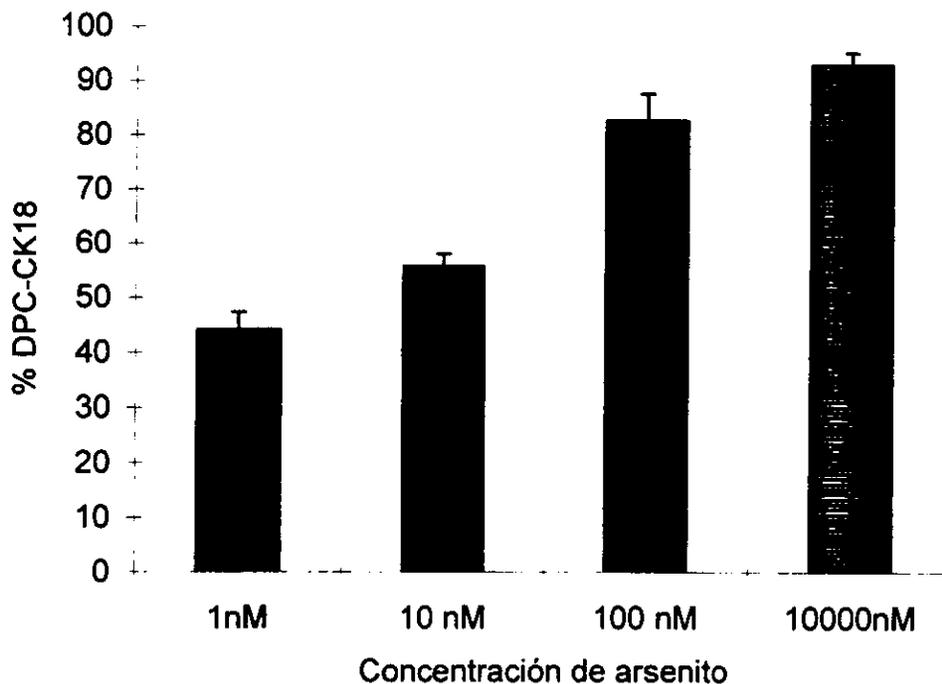
A**B**

Figura 9. DPC-CK18 inducidos en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio. Un duplicado del gel que dio origen a la figura 8 se incubó con anticuerpos monoclonales anti-CK18. **A)** DPC-CK18 aislados a partir de las células WRL-68 tratadas durante 16 horas con arsenito de sodio. El número en la líneas corresponde a : 1) testigo negativo (cultivo sin tratamiento); 2) arsenito 1nM; 3) arsenito 10 nM; 4) arsenito 10^2 nM; 5) arsenito 10^4 nM.

B) Las barras representan el promedio de los valores densitométricos +/- error estándar, obtenidos de 3 réplicas del experimento por duplicado (uno de ellos es el que se muestra en A. El porcentaje está expresado en relación a los valores obtenidos en los testigos negativos (cultivos sin tratamiento).

La cantidad de la CK18 entrecruzada con el ADN se incrementó en relación a la dosis hasta un 45% respecto al testigo negativo en la concentración menor (1 nM, Tabla VII).

Tabla VII. Densitometrías de los entrecruzamientos ADN-citoqueratina 18 (CK18) inducidos por arsenito de sodio en células WRL-68 tratadas durante 16 horas.

Arsenito de sodio (nM)	% CK*(promedio)	+/- error estándar
1	44.22	2.24
10	55.87	1.57
100	82.79	3.52
10000	93.06	1.56
Cromo	85.06	1.11

*Proporción promedio de CK18 entrecruzada respecto al testigo negativo (Control 100%). (F=299.5, P<0.001)

Por otra parte, con el fin de caracterizar el tipo de unión en los complejos ADN-citoqueratinas inducidos en las células hepáticas humanas (WRL-68) se observó que cuando los DPC no eran digeridos con nucleasa y/o si se sometían a condiciones reductoras, la CK18 no se podía detectar mediante inmunotransferencia. Su detección solo era posible cuando los DPC eran lavados con NaCl 2.5 M (Figura 10).

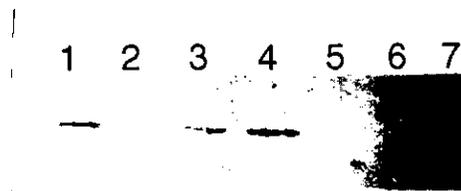


Figura 10. DPC tratados con cloruro de sodio (2.5 M) inducidos en células WRL-68

El número en las líneas de la inmunotransferencia corresponde a los complejos aislados de las células WRL-68 tratadas con: 1) 10^3 nM de $K_2Cr_2O_7$, 2) sin tratamiento, 3) arsenito 1 nM, 4) arsenito 10 nM, 5) arsenito 10^2 nM sin lavados con NaCl, 6) arsenito 10^4 nM sin lavado con NaCl, 7) sin tratamiento con As y NaCl.

Si el arsenito de sodio induce la formación de complejos ADN-CK, ¿Se inducirá también la síntesis de CK?. Para responder esta pregunta, se prepararon lisados celulares totales obtenidos de cultivos en confluencia tratados durante 16 horas con las concentraciones inductoras de DPC. Los resultados mostraron que el arsenito de sodio modifica la síntesis de la de CK18. Aunque la expresión de CK no guardo relación con la dosis su expresión se incrementó hasta un 45% respecto al control (Figura 11).

A

B

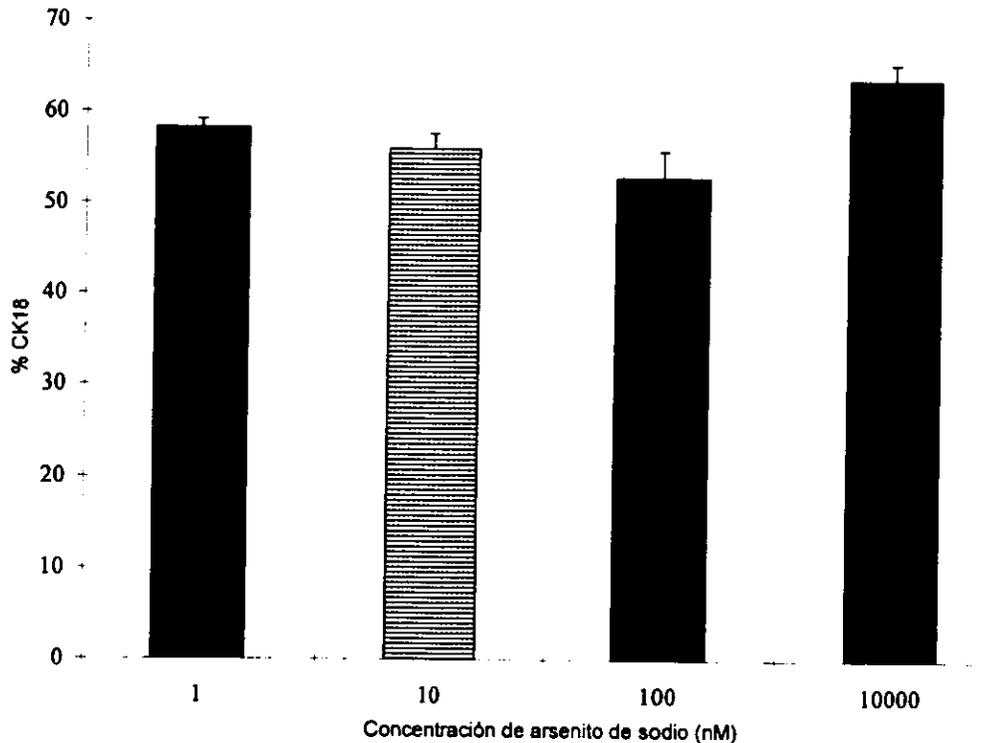


Figura 11. CK18 en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio. A) Inmunotransferencia de la CK18 a partir de lisado total de células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio los números sobre los carriles corresponden a: 1) : 1) células WRL-68 sin tratamiento, 2) arsenito 1 nM, 3) arsenito 10 nM, 4) arsenito 10^2 nM 5) arsenito 10^4 nM. **B)** Promedio de los valores densitométricos obtenidos a partir de 3 réplicas del experimento por duplicado +/- error estándar. La proporción se expresa respecto al testigo negativo.

En complemento a las evidencias anteriores se estudió la distribución y expresión de la CK18 mediante inmunotinciones fluorescentes utilizando anticuerpos específicos contra la proteína y un anticuerpo anti IgG-FITC. Una vez teñidas las células *in situ* se visualizaron en el microscopio confocal determinando la intensidad fluorescente y organización en cada muestra. Los filamentos se localizaron en el citoplasma y alrededor del núcleo incluso dentro del núcleo. Observamos una intensidad fluorescente mayor en las células tratadas con arsenito de sodio respecto al control negativo y semejante a la que presenta el control positivo (Figuras 12). En las figuras 12 podemos apreciar también una desorganización de los filamentos en las células tratadas y una mayor intensidad fluorescente en el núcleo.

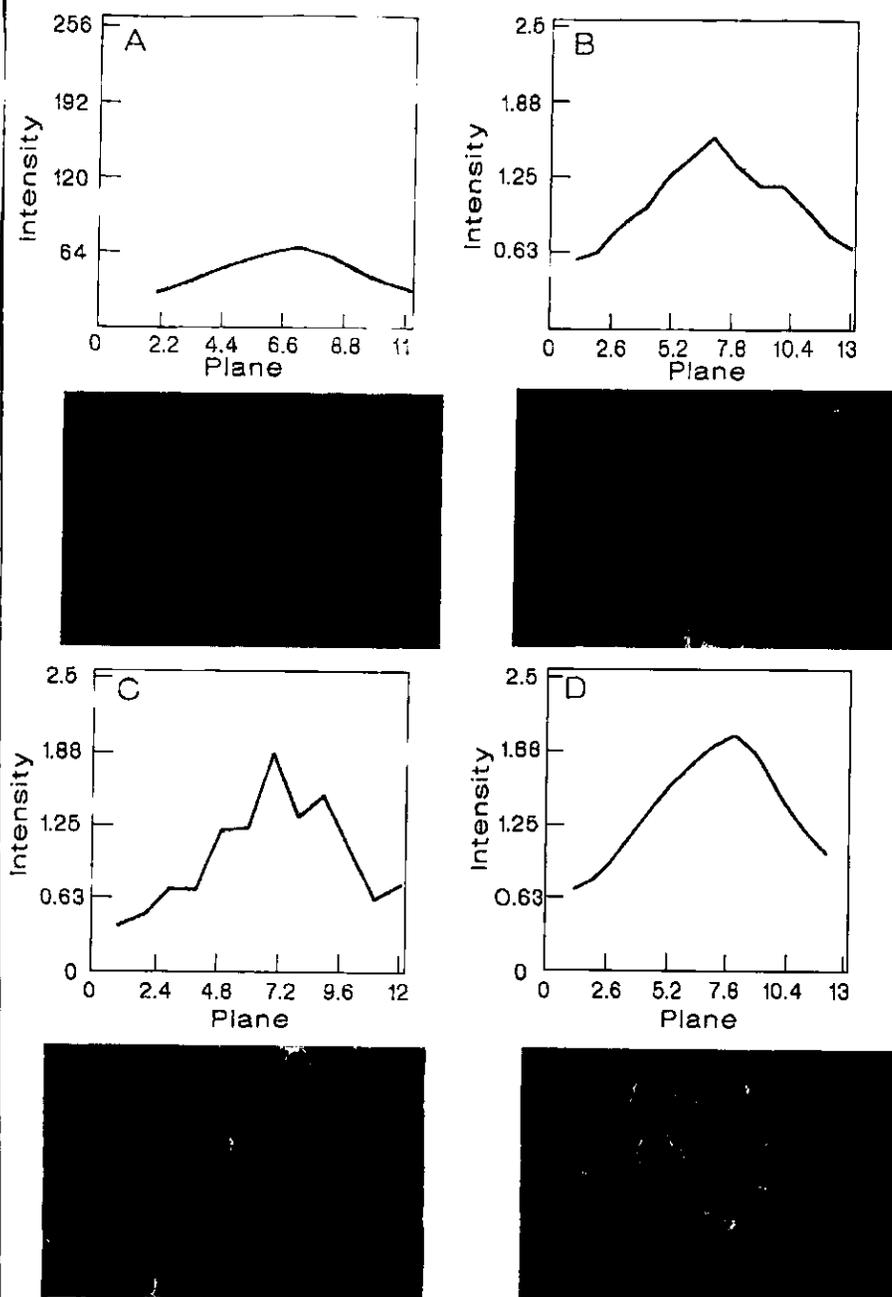


Figura 12. Análisis confocal de la CK18 en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio. Inmunotinción indirecta de la CK18 utilizando anticuerpos monoclonales específicos anti-CK18 y anti-IgG de ratón-FITC. El análisis de las muestras se realizó mediante microscopía fluorescente y confocal. Las células fueron tratadas con: A) testigo negativo (cultivo sin tratamiento); B) arsenito 1 nM; C) arsenito 10 nM; D) arsenito 10^4 nM.

Aunque la síntesis de la CK18 se incrementó en relación al control, su incremento no correlacionó con la inducción de DPC por arsénico (Figura 13).

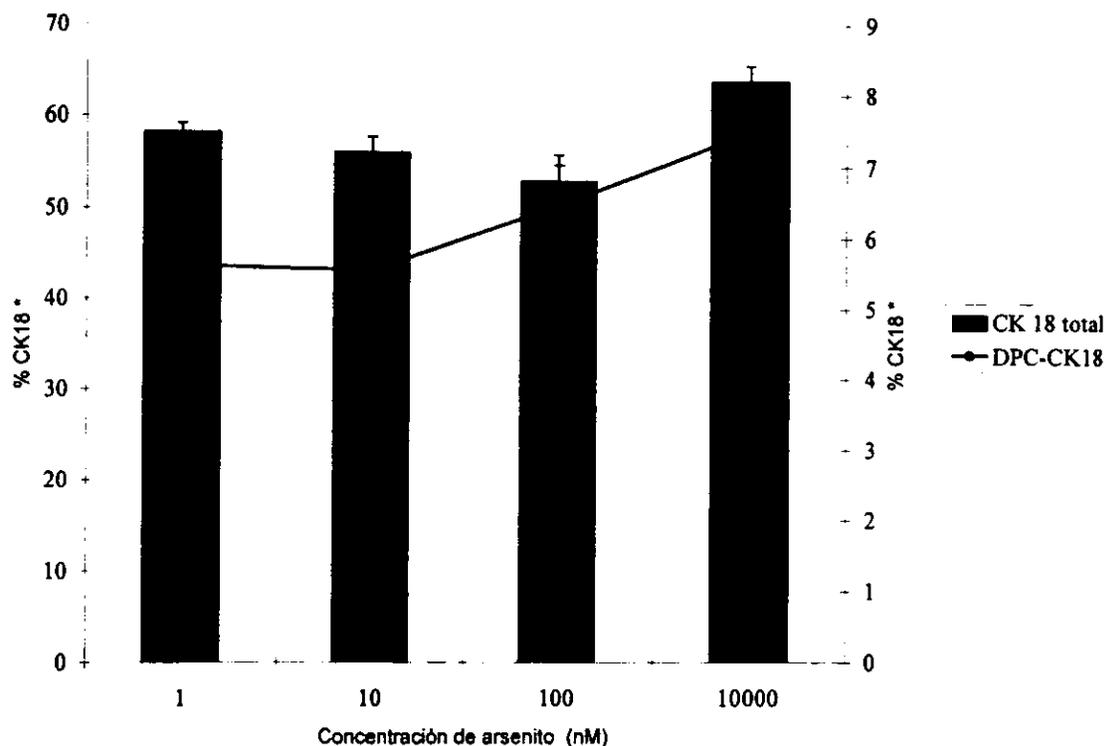


Figura 13. Cantidad de CK18 entrecruzada al ADN y total en células WRL-68 tratadas con arsenito de sodio. Los puntos representan el promedio de los valores densitométricos +/- error estándar. * El porcentaje está expresado respecto al testigo negativo.

CAPITULO VII

DISCUSIÓN

Los DPC representan un tipo de daño genético cuyo significado biológico es escaso y que han sido propuestos como biomarcadores en la estimación de riesgo por exposición a agentes carcinógenos como el formaldehído y para algunos metales como el cromo. El estudio de las características de los DPC con el fin de dilucidar el significado biológico de esta lesión al ADN, resulta relevante dado el elevado número de agentes xenobióticos que pueden ser o generar reactivos electrofílicos (Tabla C) que ataquen al ADN y/o a las proteínas. Además, si agentes carcinógenos como el arsénico inducen DPC, la determinación de sus características ayudará a conocer aspectos acerca de los mecanismos de acción.

En este trabajo, demostramos que el arsenito de sodio induce la formación de entrecruzamientos ADN-proteínas (DPC) *in vitro* en las células WRL-68 e *in vivo* en el hígado de ratones de la cepa BALB-C. La formación de los DPC *in vitro* estuvo relacionada linealmente con la dosis de tratamiento (Figura 1). Con estos resultados se puede afirmar que el arsenito de sodio induce entrecruzamientos ADN-proteínas en células derivadas de hepatocitos humanos y que la vinculación del

ADN con proteínas que normalmente no se encuentran asociadas a él, se propicia por la presencia del arsenito de sodio (Figura 7).

Los resultados *in vitro* sugieren que la inducción de DPC es un efecto debido a la concentración intracelular de (As^{3+}) ya que al realizar estudios de especiación de arsénico (Tabla II), se observó que el arsénico inorgánico (As_i) no sufrió oxidación a especies pentavalentes y que éstas no se convirtieron a sus formas metiladas, la cantidad de GSH (agente reductor, tiol no proteico) se incrementó (Tabla III). El incremento en la cantidad de GSH observado, estuvo en relación con la dosis de tratamiento y sugiere la puesta en marcha de los mecanismos protectores de detoxificación por parte de las células WRL-68. Considerando la elevada afinidad del arsénico por residuos sulfhidrilo, es importante mencionar que el GSH por sus propiedades químicas (tripeptido: γ -Glu-Cys-Gly), puede unirse al As^{3+} reduciendo la probabilidad de interacción entre el arsenito y los grupos sulfhidrilo de enzimas o proteínas susceptibles a constituir los DPC. Si esto ocurrió en las células WRL-68, su atribución pudo enmascarar en parte, la interacción del ADN y las proteínas o participar directamente en la formación de aductos GSH-ADN, como se ha probado en el caso del cromo y cis-platino (Miller y cols., 1991; Costa y cols., 1997). a la

interacción del ADN y las proteínas no fue la suficiente para enmascarar el efecto dosis-respuesta en la inducción de DPC por el arsénico.

El hecho de que las células WRL-68 acumularon arsenito (As^{3+}) del medio de cultivo es importante desde el punto de vista toxicológico ya que se sabe que el metabolismo del arsénico está afectado por la dosis y el tipo de estirpe celular. Se ha observado que en dosis elevadas, la metilación del arsénico se inhibe o puede saturarse aumentando la cantidad de la especie inorgánica en el tejido (Styblo y cols., 1999). Considerando lo anterior y la propuesta de que el hígado es el principal sitio de metilación del arsénico no resultaría extraño que existiera en este órgano una gran acumulación del elemento. Estos hallazgos apoyan la idea de que, la inducción de los entrecruzamientos (DPC) son dependientes de la presencia de As^{3+} y al menos para el arsenito la inducción de DPC podría ser considerada como un indicador en la estimación de dosis efectiva y de daño temprano inducido por arsénico.

Además, las células WRL-68 ofrecen un sistema de prueba adecuado en el estudio de los efectos tóxicos del As inorgánico (Asi), ya que como no son capaces de biotransformar al Asi se puede descartar la

presencia de especies intermedias trivalentes que pudieran tener una toxicidad adicional o diferente.

El comportamiento relacionado linealmente con la concentración en la inducción de entrecruzamientos ADN-proteínas en las células WRL-68, no fue el mismo que se observó en los ratones. Los ratones fueron capaces de formar DPC en un tiempo corto de exposición (3h). Sin embargo esta inducción no parece ser dependiente de la dosis. Este efecto no puede ser atribuido a la rápida biotransformación de Asi en ratones ya en estudios toxicocinéticos de exposición a dosis únicas de Asi (30 μ M), la presencia de compuestos arsenicales en el hígado de ratones es de 58% como Asi, 8% como MMA y de 34% como DMA (Kenyon y cols.,1999), lo que demuestra que el Asi es la principal especie presente en el hígado. La máxima inducción de DPC en los ratones BALB/c se presentó en la mayor concentración evaluada (12 mg/kg) (Tabla V, Figura 5).

Cuantitativamente, el efecto observado en la inducción de DPC fue similar al obtenido con dicromato de potasio, reconocido carcinógeno humano. La curva dosis efecto obtenida *in vivo*, se ajusta significativamente en un 60% a una correlación simple (Figura 6). En los ratones, la proporción de DPC inducida por As, parece estar

relacionada sublinealmente con la dosis probablemente por la puesta en marcha de los mecanismos de defensa por parte del huésped.

El comportamiento en la inducción de DPC por el As^{3+} en los ratones es similar a lo observado para el formaldehído en tejido nasal de ratas en donde la formación de los DPC fue sublinear con la dosis apareciendo como una lesión temprana dentro de los efectos genotóxicos atribuidos al agente (Conaway y cols. 1996). En el caso del formaldehído se muestra una clara correlación entre la inducción de los DPC después de una exposición de 6 hrs y la incidencia de tumores malignos en ratas Fisher 344 después de una exposición de 24 meses (Tabla C).

La cinética de la presencia de las CK, especialmente en el hígado de los ratones expuestos a diferentes dosis de As podría ayudar a conocer más acerca de la cinética de formación de los DPC.

La presencia de proteínas fuertemente asociadas al ADN por acción de xenobióticos, puede provocar incluso por simple efecto estérico, alteraciones en los procesos de replicación, reparación y transcripción dependientes necesariamente, de ADN y proteínas estructural y funcionalmente íntegras. Con estos resultados podemos concluir que el arsenito de sodio además de inducir DPC *in vitro* en células

hepáticas humanas es capaz también de inducir significativamente rápido los DPC *in vivo* en el hígado de ratones, órgano que representa el principal sitio de biotransformación del arsénico.

La generación de entrecruzamientos ADN-citoqueratinas (DPC-CK) en los hepatocitos de ratón por arsenito de sodio evidencia la presencia de eventos tóxicos muy tempranos en la exposición única; Por ello, resulta importante diseñar estudios de exposición crónica que permitan conocer las relaciones entre la inducción de DPC y efectos tóxicos posteriores, así como sus consecuencias biológicas en tejidos blanco.

En cuanto a la persistencia de los DPC se ha considerado que esta lesión genotóxica en general es pobremente reparada ya que su presencia ha sido detectada en intervalos de tiempo grandes después de la remoción del agente entrecruzador (Costa y cols.1997, Friedberg y cols., 1995; Speit y cols., 2000). En el caso de los entrecruzamientos inducidos por arsenito de sodio en las células WRL-68 los DPC fueron removidos después del tratamiento y este efecto fue independiente de la concentración (Figura 4). En aquellos cultivos tratados con las concentraciones menores de As la remoción de los complejos fue rápida lo que no se observó en las concentraciones

mayores de arsenito (Tabla IV). El hecho de que a menor concentración de arsenito de sodio se removieran los DPC de manera más eficiente, alcanzando proporciones menores que las basales, es un fenómeno similar a lo que se observa cuando se induce daño a dosis bajas y puede considerarse un ejemplo de la eficiencia de los sistema(s) de reparación celular, como ocurre en el caso de agentes que dañan directamente al ADN como la luz UV, las radiaciones ionizantes, (Oleinick y cols., 1987).

Con el fin de identificar algunas de las proteínas involucradas en los DPC y considerando la capacidad que presenta el arsénico de unirse a proteínas ricas en grupos sulfhidrilo (-SH-) como las citoqueratinas (CK), procedimos a detectarlas en los DPC. Se encontraron al menos 5 citoqueratinas asociadas a la formación de los DPC en las células WRL-68. Además identificamos específicamente a la CK18 (Figuras 8 y 9), que se expresa principalmente en células hepáticas. El hecho de que proteínas como las citoqueratinas aparecen fuertemente unidas al ADN por acción del arsenito, sugiere que formas trivalentes de arsénico podrían estar involucradas directamente en la unión de las proteínas en parte por la elevada afinidad a este tipo de estructuras químicas.

Alteraciones en la expresión y organización de éstas proteínas han sido asociados también a efectos de otros agentes como el alcohol etílico y el cobre. Problemas de cirrosis por ingestión de alcohol y por acumulación de cobre en el hígado han sido vinculados con la formación en el hígado de estructuras características conocidas como cuerpos de Mallory que están constituidos específicamente de CK18 (Haschek y Rousseaux, 1996).

Uno de los signos característicos observados en el caso de exposiciones crónicas al arsénico es la hiperqueratosis palmo-plantar y la fibrosis hepática que son signos asociados a la elevada afinidad del arsénico por residuos sulfhidrilo (Black, 1967; y Morris y cols., 1974) y que resultan predominantes en las citoqueratinas. No resultaría extraño que en el hígado pudieran formarse éste tipo de estructuras por acción del arsénico considerando que el arsénico es capaz de acumularse en éste tejido (Styblo y cols., 1999). Si consideramos que la adecuada función estructural de las proteínas depende en gran medida de su integridad, la formación de los DPC en este tejido, modificaría considerablemente la función de las citoqueratinas en el órgano.

Si el arsenito de sodio induce entrecruzamientos ADN-citoqueratina 18 en las células WRL-68, ¿ Modificará la síntesis de esta proteína en las células WRL-68?. Para responder a esta pregunta, cuantificamos la CK 18 a partir de un lisado total. Observamos que su cantidad está incrementada por efecto del arsenito de sodio como lo muestran los análisis de inmunotransferencia y de inmunotinción (Figuras 11 y 12). El incremento en la cantidad de la CK18 no se comportó de manera lineal con las dosis empleadas, a diferencia de lo ocurrido en los entrecruzamientos ADN-CK18 en donde se presentó una relación lineal dosis-efecto. Estos hallazgos sugieren el hecho de que la inducción de DPC correlaciona más directamente con la cantidad de As^{3+} intracelular que con la cantidad de CK18 intracelular o susceptible a estar entrecruzada al ADN (Figura 13).

El arsenito de sodio pudiera estar induciendo la síntesis de la CK18 de manera similar a la que se presenta con otros factores de crecimiento y proteínas por ciertas especies de arsénico. Se sabe que el arsénico induce la síntesis de factores de crecimiento como la involucrina (marcador de diferenciación celular), el factor estimulador del crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos (G-CSF), el factor transformador del crecimiento ($TGF-\alpha$) y de una citocina

proinflamatoria el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Germolec, y cols, 1992). Incluso, se ha observado la inducción de proteínas de estrés y alteraciones en la expresión de al menos 5 genes, proteínas de choque térmico, hemo oxigenasa, citoqueratinas, metalotioneina y del gen de resistencia múltiple a drogas (MDR1) (Albores y cols., 1992; Chin y cols., 1990; Darasch y cols., 1988; Goyon y cols., 1994; Kutty y cols., 1992; Yu y cols., 1993; Menzel 1999).

Los entrecruzamientos ADN-CK18 fueron sensibles a elevadas concentraciones de sales (NaCl 2.5 M) similares a las que se emplean en el aislamiento del ADN de las proteínas de la matriz nuclear. Estudios previos han reportado la presencia de las queratinas de \approx 39, 49 y 52 kDa en los núcleos de células de hepatoma ascítico de Novikoff lo que sugiere que éstas proteínas guardan una estrecha relación con los filamentos citoplasmáticos, la matriz nuclear y los cromosomas de células mitóticas e incluso forman parte de la matriz nuclear (Wedrychowsky y cols, 1986). El hecho de que los filamentos intermedios pueden estar contenidos en el complejo nuclear poro-lamina y que en la envoltura nuclear existan centros organizadores de filamentos intermedios hacen susceptibles a estas estructuras proteicas a los efectos del arsénico como inductor de DPC (Darnell,

1995). Dentro de las proteínas susceptibles a estar en posibilidades de entrecruzarse con el ADN están las proteínas asociadas a los filamentos intermedios como es el receptor de lamina B que se encuentra en el núcleo (Darnell, 1995).

Los resultado de este trabajo mostraron que además de alterar la síntesis de la CK18, el arsenito provoco alteraciones en su organización. Se observó mediante microscopía confocal y de fluorescencia, zonas muy ricas en CK18 localizadas alrededor del núcleo y en el citoplasma incluso dentro del núcleo lo que puede repercutir en una inadecuada organización del citoesqueleto. Con los resultados de este trabajo y considerando estudios previos en donde se muestra la capacidad del arsenito de sodio de inducir la formación de células aneuploides a través de la desorganización de la tubulina (Ramírez y cols., 1997), se confirma el hecho de que el arsénico tiene como blanco celular elementos del citoesqueleto ricos en grupos sulfhidrilos y que estas alteraciones pueden estar afectando su organización por disrupción en la estructura no tan solo de la tubulina sino de los filamentos intermedios.

Finalmente, el arsénico como inductor de DPC puede provocar alteraciones en la replicación del ADN impidiendo el desplazamiento

de la DNA polimerasa de tal manera que se originen segmentos o “huecos” sin replicar que pudieran resultar en rompimientos cromosómicos o cromatídicos (Soigneur, 1989) como los observados en poblaciones expuestas a arsénico (Gonsebatt, 1997). Incluso la proteína unida al ADN podría provocar alteraciones en los procesos de reparación y transcripción por el simple efecto estérico sobre la hebra de ADN.

Los DPC son un tipo de daño que pudiera ser empleado como biomarcador de exposición y daño a la exposición a arsénico y estar relacionado con las lesiones tempranas de los procesos mutagénicos y carcinogénicos asociados al arsénico y a otros xenobióticos con elevada ubicuidad.

El estudio de la capacidad inductora de DPC por agentes tóxicos como el arsénico, provee de evidencias en la disección del significado biológico de este tipo de daño genético y ofrece una opción viable en el entendimiento de los efectos celulares del metal.

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES

1. El arsenito de sodio induce entrecruzamientos ADN-proteínas en células WRL-68 y en hígado de ratones machos BALB/C.
2. Los entrecruzamientos ADN-proteínas inducidos por arsenito de sodio en células WRL-68 son removidos eficientemente y esta remoción depende de la concentración.
3. Entre las proteínas entrecruzadas con ADN se encuentran las citoqueratinas.
4. La citoqueratina 18 forma entrecruzamientos con el ADN de manera dosis-dependiente en las células WRL-68 por acción de arsenito de sodio
5. El arsenito de sodio altera la síntesis y organización de la citoqueratina 18 en células WRL-68.
6. Los entrecruzamientos ADN-citoqueratina 18 son sensibles al cloruro de sodio (NaCl) 2.5 M.

CAPITULO IX.

PERSPECTIVAS

Considerando los hallazgos obtenidos acerca de la capacidad inductora de complejos ADN-proteínas (DPC) por arsénico *in vitro* e *in vivo* así como de la escasa información acerca de su significado biológico y de las consecuencias de su formación, es importante continuar con el estudio de los mecanismos involucrados en su formación.

En cuanto a la propuesta de utilizar a los DPC como biomarcadores de efecto, considero que se debe continuar con el estudio de más agentes potencialmente inductores de DPC tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* en exposiciones crónicas y agudas para dilucidar como es la inducción de DPC en relación a la dosis efectiva del agente en el tejido blanco. Esto permitiría entre otras cosas, encontrar alguna correlación en cuanto a la presencia de DPC (como daño genotóxico primario) y alguno de los efectos observados como consecuencia de la exposición como el caso del formaldehído en el que se muestra una clara correlación entre la inducción de DPC y la incidencia de tumores malignos después de la exposición crónica al agente (Casanova y cols., 1994).

Es importante estudiar la generación de DPC por exposiciones crónicas al arsénico para concluir más acerca de su capacidad inductora en estudios *in vivo* y estudiar si bajo estas condiciones experimentales existe reparación del daño así como la identificación de proteínas susceptibles a formar DPC.

El hecho de que el arsénico genere DPC *in vitro* ofrece la posibilidad de estudiar (*in vitro* o *in vivo*) si existe alguna correlación entre este tipo de daño al ADN y otros biomarcadores de efecto asociados a la exposición crónica humana al arsénico en el agua de bebida como la formación de micronúcleos, aberraciones cromosómicas o intercambio de cromátidas hermanas como ocurre en el caso del formaldehído (Gonsebatt y cols., 1997, Speit y cols., 1999).

Considerando que en las células WRL-68 el arsénico inorgánico trivalente fue la especie química responsable de la formación de los DPC dada su incapacidad por metabolizar el arsénico a derivados metilados (MMA y DMA), resulta interesante estudiar la posibilidad acerca de que en modelos capaces de metabolizar el arsénico (*in vitro* y/o *in vivo*) exista una inducción de DPC diferente a la observada en este estudio. Las diferencias en la inducción de DPC podrían ser debidas por ejemplo, a las especies reactivas del arsénico como el

radical peroxidimetil arsénico. Además se puede determinar si el As^{3+} está participando directamente en la formación de los DPC como lo hacen otros agentes entrecruzadores como es el cromo y el cisplatino.

En cuanto a la formación específica de complejos ADN-CK18 se pretende conocer cuales es (son) el(los) principal(es) mecanismo(s) involucrados en la reparación de este tipo de daño al ADN por efecto del arsénico. La información al momento indica que de los mecanismos involucrados en la reparación de DPC, la reparación por escisión es el principal mecanismo involucrado. A partir de este postulado y de las evidencias acerca de que agentes como el formaldehído pueden tener vías alternas de reparación (Speit y cols., 2000), cabe la posibilidad de que la(s) proteína(s) por simple efecto estérico no permita(n) el acceso al sitio dañado lo cuál “forzaría” o no a la célula a reparar el daño por otras vías como podría ser la reparación no programada del ADN.

Otras de las áreas de investigación que pueden continuarse considera el estudio de las secuencias del ADN involucradas en la formación de los DPC por arsénico para determinar si existe alguna “susceptibilidad” por formar o no DPC. El hecho de que exista cierta

“susceptibilidad” del ADN por la formación de DPC podría traer como consecuencia que ciertos genes: oncogenes, genes supresores de tumores entre otros; puedan verse comprometidos en su función y organización por efecto del arsénico.

El hecho de que el arsenito de sodio induzca la expresión de CK18 es importante ya que las CK son proteínas involucradas en los procesos de diferenciación de células epiteliales y cuya integridad, organización y cantidad repercutan en una adecuada organización del citoesqueleto que es una estructura importante en la proliferación celular. Dilucidar los mecanismos involucrados en la sobreexpresión de CK18 resulta importante ya que uno de los signos característicos observados en exposiciones crónicas al metal por su ingestión en el agua de bebida es la hiperqueratosis palmoplantar (Gonsebatt y cols., 1997) además de que alteraciones de este tipo (formación de cuerpos de Mallory) se han observado en exposiciones a cobre y etanol vinculados con problemas de cirrosis (Haschey y Rousseaux, 1996).

Los DPC representan un tipo de daño genético poco entendido que pudiera utilizarse como biomarcador de efecto en exposiciones a arsénico. Sus repercusiones a nivel celular y/o tisular requieren de estudio para apoyar la posibilidad de considerárseles lesiones

genéticas tempranas en el marco del proceso carcinogénico asociado a exposiciones arsenicales.

Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line

P.Ramírez, L.M.Del Razo¹, M.C.Gutierrez-Ruiz² and M.E.Gonsebatt³

Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, AP 70228, Ciudad Universitaria, Mexico 04510 DF, México, ¹Toxicología Ambiental CINVESTAV, IPN, 07000 DF, México and ²Laboratorio de Fisiología Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 DF, México

³To whom correspondence should be addressed
Email: margen@servidor.unam.mx

The induction of DNA-protein crosslinks (DPC) has been proposed as an indicator of early biological effects due to the fact that known or suspected carcinogens induce an increased proportion of proteins tightly bound to DNA. Arsenic, a human carcinogen, is reduced and methylated mainly in liver cells generating a number of intermediate reactive forms which could lead to the formation of DNA-protein crosslinks. The induction of DPC by arsenite [As(III)] was investigated in the WRL-68 human hepatic cell line, testing the possibility that cytokeratins or cytokeratin-like proteins, due to their high content of SH groups, could participate in DPC. The formation and decay of DPC was dose-related. Arsenite was the only intracellular species present since no methylated As forms could be detected. Thus, DPC can be attributed to the presence of arsenite, an important species present in liver during As exposure, whose permanence in the tissue would depend on the methylation rate of the organism. Several cytokeratins were identified by immunoblotting among the proteins crosslinked with DNA, including cytokeratin 18 (CK18), a specific liver intermediate filament. An augmented presence of CK18 was detected in treated cultures by immunoblotting of total protein PAGE. In liver cells cytokeratin synthesis is tightly correlated with differentiation programs, thus arsenite could not only be damaging DNA but also modifying differentiation patterns in this tissue.

Introduction

The induction of DNA-protein crosslinks (DPC) has been proposed as an indicator of early biological effects due to the fact that known or suspected carcinogens, such as formaldehyde, β -propiolactone and UV light, chemotherapeutic agents, such as cisplatin and mytomycin C, and some metal compounds, like nickel sulfate, arsenic oxide and potassium dichromate, among others, induce the formation of crosslinks between proteins and DNA (1-4). Moreover, the level of DPC appears to be directly related to the carcinogenicity of formaldehyde in target tissues such as rat nasal cells, where they seem to be the primary genotoxic effect (5,6). For these

Abbreviations: CK18, cytokeratin 18; DPC, DNA-protein crosslinks; GSH, reduced glutathione; iAs, inorganic arsenic; PBS, phosphate-buffered saline.

reasons DPC were used to estimate the formaldehyde effective dose (6). Another human carcinogen, arsenic, which induces skin, lung, bladder and liver cancers (7-9), is reduced and methylated mainly in liver cells through a series of reactions that require reduced cellular glutathione (GSH), generating a number of intermediate reactive forms (11,12) that could lead to the formation of DPC. To investigate and characterize mechanisms of As carcinogenicity, DPC were isolated from arsenite-treated WRL-68 human hepatic cells, a non-tumorigenic cell line derived from fetal liver that preserves the activity of some characteristic or specific liver enzymes (13). Furthermore, since trivalent As species are thought to accumulate in tissues with a high keratin content due to its affinity for thiol groups (14), and keratins and keratin-like proteins have been identified in the nuclei of Novikoff ascites hepatoma and rat liver cells (15-17), the presence of cytokeratins among the proteins bound to DNA was also investigated. To separate proteins from DNA, DPC were treated enzymatically or with reducing agents or under high salt conditions. Dose-related induction and removal of DPC were observed after arsenite treatment of confluent cell cultures. Cytokeratins were identified among the proteins crosslinked with DNA; this crosslinking was sensitive to nuclease digestion and to high salt conditions.

Materials and methods

Hepatic cell line culture and treatment

The human hepatic cell line WRL-68 has a morphological structure similar to hepatocytes and hepatic primary cultures. Derived from fetal liver, WRL-68 cells secrete α -fetoprotein and albumin, preserve the activity of some characteristic or specific liver enzymes (i.e. alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, γ -glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase) and exhibit a cytokeratin pattern similar to other hepatic cultures, providing an *in vitro* model to study the toxic effects of xenobiotics (13). Cells were grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 8% fetal bovine serum (Gibco), 1% non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 95% air, 5% CO₂. Approximately 2×10^6 cells/plaque were plated in 6-well culture plates and left to reach confluence. Arsenite treatments were initiated in this phase to avoid the generation of DPC during S phase. Cells were treated over 16 h with different concentrations of arsenite (sodium salt; Sigma, St Louis, MO): 1, 10, 10² and 10⁴ nM. Untreated cells and cells treated with 10³ nM K₂Cr₂O₇ (Sigma) served as negative and positive controls, respectively. After treatment cells were scraped and washed with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. To determine the cytotoxicity of the doses employed, cell viability was determined by the trypan blue exclusion method in each experiment; cell viability was always >75%.

Intracellular As determination

The amount of intracellular As species was determined by atomic absorption spectrometry using hydride generation after column chromatographic separation of inorganic arsenic (iAs) and its metabolites. Quantification is based on the measurement of light absorbed at 193.7 nm by ground state atoms of As from an electrodeless discharge lamp source (10).

GSH determination

Determination of GSH was performed by a modification of the method described by Hissin and Hilf (18). Aliquots of 2×10^6 cells were cultured and treated with arsenite as described before. The cells were scraped and resuspended in phosphate/EDTA buffer solution (0.1 M sodium phosphate, 0.005 M EDTA buffer, pH 8.0). Total protein was precipitated using 2.5%

perchloric acid solution. The samples were then centrifuged for 10 min at 4°C. A volume of 0.1 ml of the supernatant plus 1.8 ml PBS/EDTA, pH 8.0, and 0.1 ml of 1% *o*-phthalaldehyde (Sigma) were mixed and incubated in a glass tube for 15 min in the dark at room temperature. The solution was transferred to a quartz cuvette. Fluorescence at 420 nm was determined with activation at 350 nm.

DPC isolation

DPC precipitation was performed as described by Zhitkovich and Costa (3). Briefly, after viability determination, cells were lysed with a solution containing 2% SDS and then frozen at -70°C. To initiate the isolation of DPCs, the samples were thawed at 37°C and the DNA was sheared by passage of the lysates through a 21 gauge needle. The lysates were expelled into a tube by applying high pressure. A volume of 0.5 ml of 100 mM KCl containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 (solution A) was added and mixed by vortexing. The samples were then incubated at 65°C for 10 min, inverted and then placed on ice for 5 min to form the KCl-SDS-protein-DNA precipitates. The precipitates were collected by centrifugation at 6000 *g* for 5 min at 4°C. The supernatant was removed and the pellet resuspended in solution A. Samples were heated and washed three times as described above. DNA was detected using Hoechst 33258 dye. Fluorescence was assessed by excitation at 365 nm and the emitted light was measured at 450-460 nm. A bovine serum albumin solution was used as the standard blank. To evaluate the persistence of DPC after treatment, control and treated confluent cells were washed with PBS and incubated in fresh medium for 2, 6, 12 and 24 h at 37°C in an atmosphere of 95% air, 5% CO₂, after which they were washed with PBS and scraped from the bottles. Cell viability (75-80%) was determined by the trypan blue exclusion method. DPC isolation was performed as described above.

Protein identification

The isolated DPCs were nuclease digested for 1 h at 37°C with nuclease (25 µg/ml DNase I, sp. act. 1872 U/mg) (17) in preparation for SDS-PAGE. The nuclease-digested samples were electrophoresed as described by Laemmli (19). Four percent stacking gels and 10% running gels under reducing conditions [25 mM β-mercaptoethanol (Bio-Rad) or 10 mM dithiothreitol (Bio-Rad)] were used. The proteins were visualized using either the Coomassie blue method or by western blotting. Monoclonal anti-Pan cytokeratin antibodies recognizing human cytokeratins 1, 4-6, 8, 10, 13, 18 and 19 (Sigma) and monoclonal antibodies against human cytokeratin 18 (CK18) (Neomarkers, Lakeside, NY) were used. Densitometry analysis of blots was performed using an AMBIS Optical Image System densitometer (Scanalytics). The software used was RSLPSCAN v.2.1.

NaCl treatment

Isolated DPC were washed with 2.5 M NaCl (final concentration) and resuspended in 100 mM KCl, 100 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, then dialyzed using a molecular pore size 12 000-14 000 dialysis membrane against PBS, pH 7.2, for 24 h. The dialyzed DPC were digested and prepared for SDS-PAGE with and without DNase treatment as described before.

Immunofluorescence

WRL-68 cells were grown on sterile glass coverslips until semi-confluent. The cells were treated with arsenite in the concentration range 1-10⁴ nM for 16 h. After incubation, the cells on coverslips were washed twice with PBS, pH 7.2, then fixed and permeabilized for 90 min in 95% ethanol at 0°C. They were then washed in PBS twice for 5 min and blocked for 30 min with 3% (w/v) bovine serum albumin in PBS, followed by incubation for 1 h with anti-CK18 monoclonal antibodies. The coverslips were then washed twice for 5 min and incubated for a further 1 h with FITC-conjugated anti-IgG, diluted 1:100 in blocking buffer. Finally, the cells were washed three times for 10 min in PBS, mounted in glycerol and viewed with a Nikon E 400 epifluorescent microscope and with an Odyssey Noran 3.2 confocal microscope. The cells were photographed using ASA 400 Hyperfilm and the fluorescence intensity was determined using MetaMorph system 1.3. Negative controls were prepared using culture medium instead of monoclonal antibodies.

Data analysis

Average, standard deviation and standard error were calculated from quantitative data obtained for at least three replicate experimental conditions. Statistical analyses were performed using one way ANOVA and Dunnett's test or the Student Newman-Keuls test for multiple comparisons, with the level of significance set at 5%. Simple linear correlations were used to study dose-response effects.

Results

Arsenite induced dose-dependent DPCs in confluent cell cultures of WRL-68 cells treated for 16 h with different

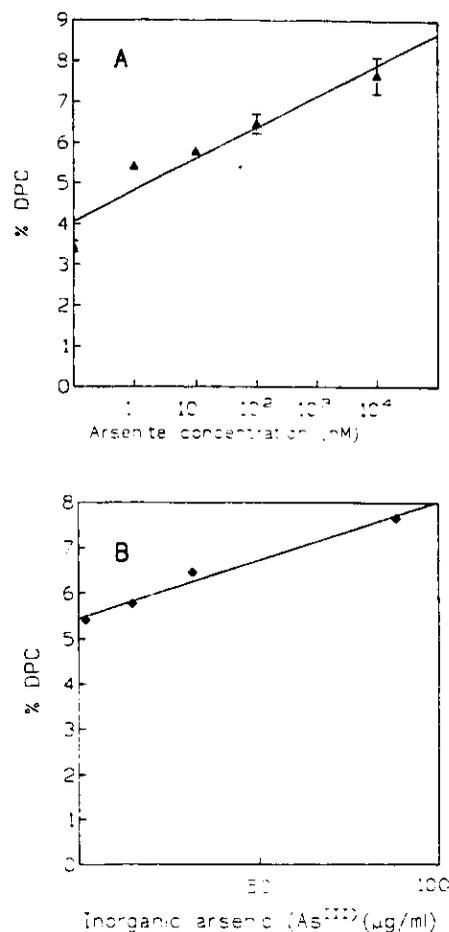


Fig. 1. DPC induced by sodium arsenite. (A) WRL-68 cells were treated for 16 h in complete medium with arsenite. After scraping and washing, cells were subjected to SDS-KCl precipitation of DPC. Significant effects were observed at all doses (ANOVA, $F = 13.7$, $P = 0.0025$; Dunnett's *post hoc* test $P < 0.05$; simple linear correlation coefficient $r = 0.9527$, $P < 0.05$). (B) Correlation between DPC and intracellular iAs(III) ($r = 0.9684$, $P < 0.05$). The intracellular arsenite concentration was determined by atomic absorption spectrometry after cell lysis (ANOVA $H = 12.9$, $P = 0.0011$).

concentrations of arsenite (Figure 1A). The proportion of DPC correlated linearly with intracellular concentration of trivalent iAs (Figure 1B). Although the presence of methylated forms of As could not be detected in the cells, induction of GSH synthesis was observed ($P = 0.0267$, Figure 2). To separate crosslinked proteins, DPC were nuclease digested and then electrophoresed under reducing conditions with β-mercaptoethanol or dithiothreitol. Similar, although less dense, band patterns were observed in PAGE of DPC proteins from untreated cells compared with arsenite- and chromate-treated cells (Figure 3). When arsenite was removed from the cultures, we observed a dose-related decay of DPC. The fastest disappearance of DPC was observed at the lowest doses tested (Figure 4) and 24 h after treatment all cultures showed background levels of DPC, except for those treated with 1 nM arsenite ($P < 0.05$).

At least five cytokeratins were identified by western blotting among the proteins crosslinked with DNA. At the lower doses (1, 10 and 100 nM) of arsenite four cytokeratins with molecular masses of ~46, 48, 50 and 54 kDa were observed, while at the highest concentration evaluated

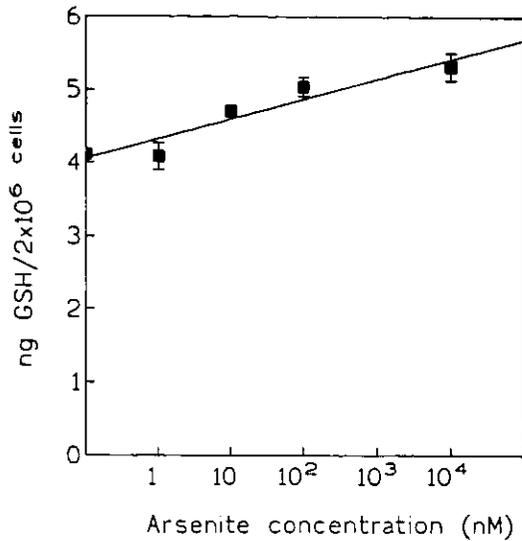


Fig. 2. GSH induction by arsenite in WRL-68 cells. Aliquots of 2×10^6 cells were cultured and treated with different concentrations of arsenite. Cells were then lysed with perchloric acid and resuspended in PBS/EDTA, pH 8.0, buffer. The GSH concentration was determined using 1% *o*-phthalaldehyde. Fluorescence at 420 nm was determined with activation at 350 nm. (Simple linear correlation coefficient $r = 0.9522$, $P < 0.05$; ANOVA $H = 16.2$, $P = 0.00276$).

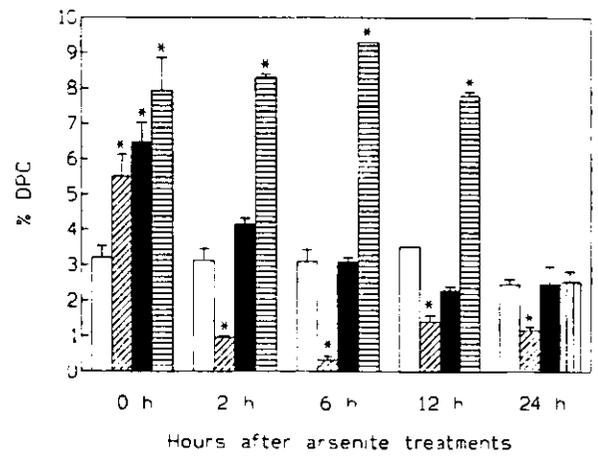


Fig. 4. DPC persistence. WRL-68 cells were treated for 16 h in complete medium with arsenite. After the treatment period the culture medium with As was removed and the cultures were incubated for 2, 6, 12 and 24 h at 37°C in 5% CO₂. Then the cells were scraped, washed and subjected to SDS-KCl precipitation of DPC. Empty bars, untreated cultures; diagonal bars, 1 nM arsenite; full bars, 100 nM; horizontal bars, 10⁴ nM. *Significantly different ($P < 0.05$) from untreated cells at each recovery time (ANOVA, $F = 8.66$, $P = 0.00512$; Dunnett's *post hoc* test $P < 0.05$).

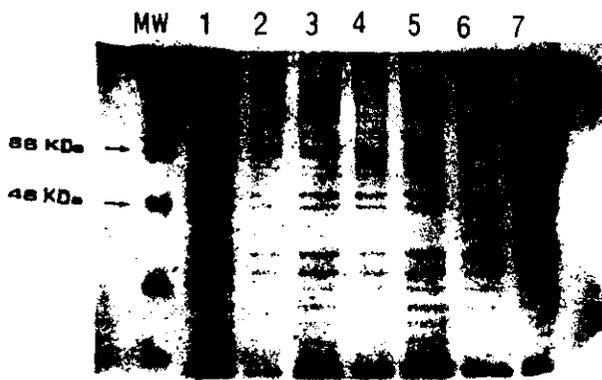


Fig. 3. Electrophoresis of DPC proteins. DPC were DNase treated and separated by SDS-PAGE under reducing conditions using β -mercaptoethanol. One thousand micrograms of protein were loaded in the lanes. The gel was stained with Coomassie blue. The lane numbers correspond to proteins isolated from DPC induced by: (1) 10³ nM K₂Cr₂O₇; (2) control; (3) 1 nM arsenite; (4) 10 nM arsenite; (5) 10² nM arsenite; (6) 10⁴ nM arsenite; (7) 30 μ g of proteins from lysed WRL-68 cells.

(10⁴ nM) and in the positive control an extra band with a lower molecular mass of ~45 kDa was detected (Figure 5). As shown in Figure 6, CK18 was identified by immunoblotting among the proteins isolated from DPC. The amount of CK18 crosslinked with DNA increased with dose, being 45% higher than controls at the lowest (1 nM) treatment dose (Figure 6). When isolated DPC were not digested with DNase, even after β -mercaptoethanol or dithiothreitol treatment, CK18 protein could not be detected until high salt conditions were employed (Figure 7). Also, an increase in CK18 expression was observed by densitometry analysis of immunoblots of total cell protein content. This effect was not dose-related (Figure 8). A similar result was observed when cells were immunostained with monoclonal antibodies against CK18. Higher immunofluorescence was determined by confocal analysis in treated cultures, indicating overexpression of CK18 (Figure 9). Fila-

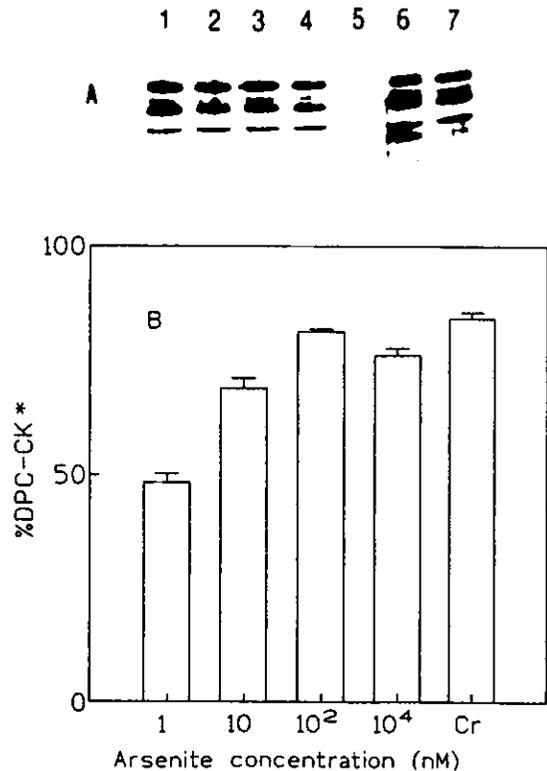


Fig. 5. Immunoblot to identify the presence of cytokeratins in DPC. (A) DPC were isolated by SDS-KCl precipitation. DPC were DNase treated and separated by SDS-PAGE under reducing conditions using β -mercaptoethanol. Seventy micrograms of protein were loaded in the lanes. Gel proteins were then electrotransferred to a nitrocellulose membrane. The lane numbers correspond to DPC proteins isolated from cultures treated with: (1) untreated cultures; (2) 1 nM arsenite; (3) 10 nM arsenite; (4) 10² nM arsenite; (5) empty lane; (6) 10⁴ nM arsenite; (7) 10³ nM K₂Cr₂O₇. (B) Bars represent average densitometry values \pm SE obtained in analysis of immunoblots from three replicate treatments, one of which is shown in (A) ($F = 955.9$, $P < 0.001$). *The percentage is expressed with respect to values obtained in untreated cultures.

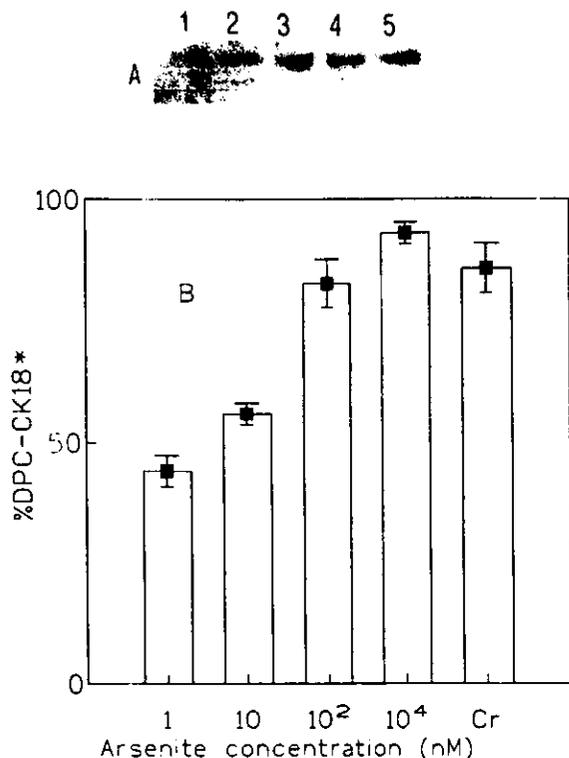


Fig. 6. Identification of CK18 by immunoblotting. (A) A duplicate of the gel shown in Figure 5 was electrotransferred to a nitrocellulose membrane and then incubated with anti-CK18 monoclonal antibodies. The lane numbers correspond to DPC proteins isolated from cultures treated with: (1) untreated; (2) 1 nM arsenite; (3) 10 nM arsenite; (4) 10² nM arsenite; (5) 10⁴ nM arsenite. (B) Bars represent average densitometry values \pm SE obtained in analysis of immunoblots from three replicate treatments, one of which is shown in (A) ($F = 299.5$, $P < 0.001$). *The percentage is expressed with respect to values obtained in untreated cultures.

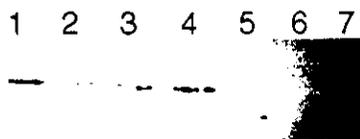


Fig. 7. High salt treatment of DPC. Isolated DPC were or were not washed with 2.5 M NaCl, resuspended in KCl/EDTA/Tris-HCl solution then dialyzed in PBS buffer, pH 7.6. Seventy micrograms of protein were loaded on a polyacrylamide gel under reducing conditions. The separated proteins were electrotransferred and anti-CK18 monoclonal antibodies used to identify CK18. The lane numbers correspond to DPC isolated from cultures treated with: (1) 10² nM K₂Cr₂O₇; (2) untreated; (3) 1 nM arsenite; (4) 10 nM arsenite; (5) 10² nM arsenite without NaCl wash; (6) 10⁴ nM arsenite without NaCl wash; (7) untreated without NaCl wash.

ments were located in the cytoplasm, around the nuclear envelope and inside the nucleus. Images also showed disruption or alteration of the thread-like pattern of CK18 in treated cells (Figure 9).

Discussion

Trivalent iAs was not oxidized to pentavalent species in the cells, which was proved by speciation analysis. The results of As metabolism experiments indicated that WRL-68 hepatic cells accumulate arsenite from the culture medium but do not convert arsenite to methylated forms. DPC formation was linearly related to intracellular As, indicating that they represent the effect of the intracellular dose of As(III) (Figure 1A and

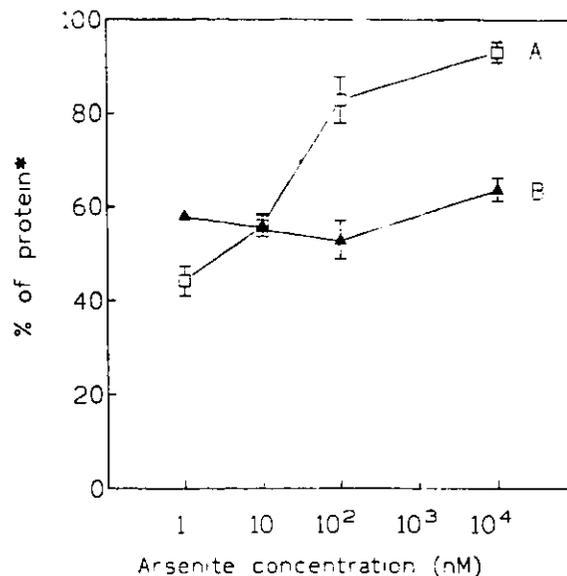


Fig. 8. Densitometry analysis of immunoblots using anti-CK18 antibodies of (A) total cell protein PAGE and (B) DPC protein PAGE. Points represent average densitometry values \pm SE obtained in analysis of immunoblots from three replicate treatments. *The percentage is expressed with respect to values obtained in untreated cultures.

B). Methylation of iAs is an important step in the elimination of As because pentavalent methylated arsenicals are rapidly excreted and not retained (20,21). However, iAs accumulation also plays an important role in the toxic effects caused by As since metabolism of As is affected by the dose (22–24). High doses can saturate or inhibit As methylation (25), increasing the presence of trivalent As in the tissue. The liver has been proposed to be the main site of As methylation; it is plausible that this organ accumulates As. Hepatic WRL-68 cells offer a good opportunity for the study of the toxic effects of iAs without a contribution of the toxic effects attributable to putative more toxic trivalent intermediates.

The removal or decay of DPC after treatment was dose-related (Figure 4). Cultures treated with the lowest dose (1 nM) showed the fastest decay, maintaining significantly lower levels of DPC than untreated cultures, even after 24 h, an effect that is not observed at higher arsenite concentrations. The efficient removal of DPC at low doses suggests the induction of repair mechanisms. Increased amounts of CK18 were detected in treated cells by immunoblotting and immunostaining. While this effect was not dose-related, crosslinking of this protein to DNA was augmented with dose (Figure 8), strengthening the idea that the formation of DPC is dependent on the presence of arsenite and could be used to estimate effective dose and early damage.

Trivalent As is known to induce the synthesis of many stress proteins and growth factors (26,27), so the higher amount of CK18 could be explained by a similar effect on cytokeratin expression. Several cytokeratins were identified among the proteins crosslinked with DNA, CK18, which is a specific liver intermediate filament, among them (28) (Figures 5 and 6). Crosslinks between DNA and CK18 were sensitive to high salt conditions, similar to those required to isolate DNA from nuclear matrix proteins (Figure 7) (28). Other keratins of ~39, 49 and 52 kDa were previously identified in the nuclei of Novikoff ascites hepatoma cells, as were keratin-like proteins in the nuclei of rat liver cells (15,16,29), suggesting that these proteins are part of the nuclear matrix

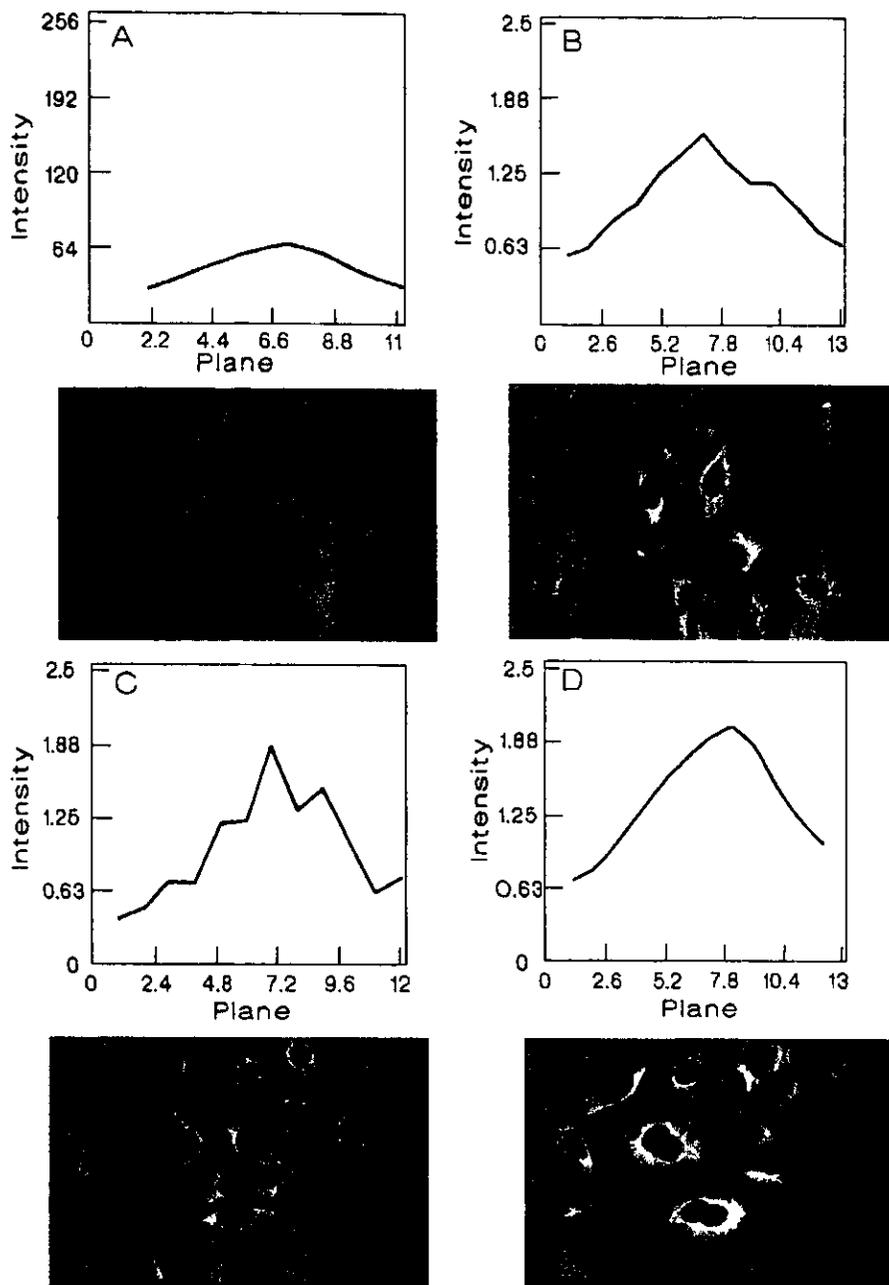


Fig. 9. Immunostaining of CK18 in WRL-68 cells. Cells were cultured on glass coverslips and treated with NaAsO_2 . Indirect immunostaining of the cells was done using anti-CK18 monoclonal antibodies and anti-mouse IgG-FITC antibodies. Analysis of the samples was done using fluorescence and confocal microscopy. Cells were treated with: (A) untreated; (B) 1 nM arsenite; (C) 10 nM arsenite; (D) 10^4 nM arsenite. Fluorescence intensity is given with respect to the intensity emitted in the untreated cultures.

and in crosslinking distance of DNA. Confocal microscopic analysis of immunostained cells with monoclonal anti-CK18 antibodies showed the presence of these filaments in the cytoplasm, around the nuclear envelope and inside the nucleus, thus DNA could interact with perinuclear or nuclear cyokeratin filaments to originate DPC. Also, alterations of the CK18 thread-like pattern observed in controls were seen in arsenite-treated (Figure 9A–D) and chromate-treated (data not shown) cells. Disruption of the polymerization of microtubules, another important cytoskeletal component rich in thiol groups, has been observed in human lymphocytes treated with sodium arsenite (30). Arsenite disruption of microtubules and micro and intermediate filaments could explain the *in vitro* loss or

gain of chromosomes (aneugenic effect) and the increased micronucleus frequencies observed in buccal and bladder cells from humans exposed to As in the drinking water (9,30,31). Increased immunofluorescence (Figure 9) coincided with an augmented presence of CK18 detected by immunoblotting of total protein PAGE (Figure 8).

Cytokeratin synthesis is tightly correlated with differentiation programs of various epithelial cell types, among them liver cells (28), thus As could not only be damaging DNA but also modifying differentiation patterns in tissues where it accumulates (12). Interestingly, hyperkeratinization of stratified epithelia, the skin of the palms and soles of the feet, is a clinical manifestation of As poisoning (12).

Arsenite-induced DPC could impair DNA replication, leaving unreplicated stretches that might result in chromosome and chromatid-type aberrations and generating aneuploid cells through the disruption of cytoskeletal proteins observed at the concentrations employed in this work (31). DPC is a type of DNA damage that could be used as a biomarker of As exposure related to primary or early lesions of the carcinogenic process. Also, the fact that thiol-rich proteins such as cyokeratins appear strongly bound to DNA could indicate that trivalent forms of As could be directly involved in binding of the proteins.

Acknowledgements

We would like to thank Tzype Govezensky for technical assistance in the densitometry analysis. Isabel Perez Montfort corrected the English version of the manuscript. This work was partially sponsored by PAPIIT IN207196 and by the Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP). Patricia Ramirez received a scholarship from CONACYT and DGAPA.

References

- Nietert, N.C., Kellicutt, L.M. and Kubinski, H. (1974) DNA-protein complexes produced by a carcinogen, β -propiolactone. *Cancer Res.*, **34**, 859-864.
- Miller, C.A., Cohen, M.D. and Costa, M. (1991) Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by *cis*-diaminodichloroplatinum(II) and chromium compounds. *Carcinogenesis*, **12**, 269-276.
- Zhitkovich, A. and Costa, M. (1992) A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and *in vivo*. *Carcinogenesis*, **13**, 1485-1489.
- Toyokuni, S., Mori, T., Hiai, H. and Dizdaroglu, M. (1995) Treatment of wistar rats with renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, causes DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in their renal chromatin. *Int. J. Cancer*, **62**, 309-313.
- Casanova, M., Morgan, K.T., Steinhagen, W.H., Everitt, J.I., Popp, J.A. and Heck, H.J.A. (1994) DNA-protein cross-links and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **23**, 525-536.
- Conaway, C.C., Whysner, J., Verna, L.K. and Williams, G.M. (1996) Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation. *Pharmacol. Ther.*, **71**, 29-55.
- IARC (1980) *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Vol. 23. *Some Metal and Metallic Compounds*. IARC, Lyon.
- Chen, C.-J., Chen, C.W., Wu, M.-M. and Kuo, T.-L. (1992) Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br. J. Cancer*, **66**, 888-892.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Salazar, A.M., Montero, R., Guzman, P., Blas, J., Del Razo, L.M., Garcia-Vargas, G., Albores, A., Cebrián, M.E., Kelsh, M. and Ostrosky-Wegman, P. (1997) Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res.*, **386**, 219-228.
- Crecelius, E.A., Bloom, N.S., Cowan, C.E. and Jenne, E.A. (1986) Determination of arsenic species in limnological samples by hydride generation atomic absorption spectroscopy. In *Speciation of Selenium and Arsenic in Natural Waters and Sediments*. Arsenic Speciation, Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA. Vol. 2, pp. 1-28.
- Styblo, M. and Thomas, D.J. (1995) *In vitro* inhibition of glutathione reductase by arsenotriglutathione. *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 971-977.
- Clewell, H.J., Gentry, P.R., Barton, H.A., Shipp, A.M., Yager, J.W. and Andersen, M.E. (1999) Requirements for a biologically realistic cancer risk assessment for inorganic arsenic. *Int. J. Toxicol.*, **18**, 131-147.
- Gutiérrez-Ruiz, M.C., Bucio, L., Souza, V., Gomez, J.L., Campos, C. and Cárabez, A. (1994) Expression of some hepatocyte-line functional properties of WRL-68 in culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **30A**, 366-371.
- Squibb, K.S. and Fowler, B.A. (1983) The toxicity of arsenic and its compounds. In B.A. Fowler (ed.) *Biological and Environmental Effects of Arsenic*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 223-269.
- Ward, W.S., Schmidt, W.N., Schmidt, C.A. and Hnilica, L.S. (1984) Association of cyokeratin p39 with DNA in intact Novikoff hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 419-423.
- Aligüé, R., Bastos, R., Serratos, J., Enrich, C., James, P., Pujades, C. and Bachs, O. (1990) Increase in a 55-kDa keratin-like protein in the nuclear matrix of rat liver cells during proliferative activation. *Exp. Cell Res.*, **186**, 346-353.
- Wedrychowski, A., Schmidt, W.N., Steve Ward, W. and Hnilica, L.S. (1986) Cross-linking of cyokeratins to DNA *in vivo* by chromium salt and cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*, **24**, 1-9.
- Hissin, P.J. and Hilf, R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.*, **74**, 214-226.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Marafante, E. and Vahter, M. (1984) The effect of methyltransferase inhibition on the metabolism of [74As]arsenite in mice and rabbits. *Chem. Biol. Interact.*, **50**, 49-57.
- Hughes, M.F. and Kenyon, E.M. (1998) Dose-dependent effects on the disposition of monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid in the mouse after intravenous administration. *J. Toxicol. Environ. Health*, **53**, 95-112.
- Hughes, M.F., Menache, M. and Thompson, D.J. (1994) Dose-dependent disposition of sodium arsenate in mice following acute oral exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **22**, 80-89.
- Del Razo, L.M., Garcia-Vargas, G.G., Vargas, H., Albores, A., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Ostrosky-Wegman, P., Kelsh, M. and Cebrian, M.E. (1997) Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicosis. A pilot study. *Arch. Toxicol.*, **71**, 211-217.
- Styblo, M., Vega, L., Germolec, D.R., Del Razo, L.M., Luster, M.I., Wang, C., Cullen, W.R. and Thomas, D.J. (1999) Metabolism and toxicity of arsenicals in cultured cells. In Chappell, W.R., Abernathy, C.O. and Calderon, R.L. (eds) *Arsenic Exposure and Health Effects*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 311-323.
- Styblo, M., Del Razo, L.M., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Wang, C., Cullen, W.R. and Thomas, D.J. (1999) Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 560-565.
- Germolec, D.R., Yoshida, T., Gaido, K.J., Wilmer, J.L., Simeonova, P.P., Kayama, F., Burleson, F., Dong, W., Lange, R.W. and Luster, M.I. (1996) Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **141**, 308-318.
- Kachinskas, D.J., Qin, Q., Phillips, M.A. and Rice, R.H. (1997) Arsenate suppression of human keratinocytes programming. *Mutat. Res.*, **386**, 253-261.
- Fuchs, E. (1996) The cytoskeleton and disease: genetic disorders of intermediate filaments. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 197-231.
- Wedrychowski, A., Schmidt, W.N. and Hnilica, L.S. (1986) DNA-protein crosslinking by heavy metals in Novikoff Hepatoma. *Arch. Biochem. Biophys.*, **252**, 397-402.
- Ramirez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P. and Ostrosky-Wegman, P. (1997) Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.*, **386**, 291-298.
- Vega, L., Gonsebatt, M.E. and Ostrosky-Wegman, P. (1995) Aneugenic affect of sodium arsenite on human lymphocytes *in vitro*: an individual susceptibility affect detected. *Mutat. Res.*, **334**, 365-373.

Received June 8, 1999; revised November 2, 1999;
accepted November 29, 1999

CAPITULO X

REFERENCIAS

- Alain, G., Tousingnant, J. y Rozenfarb, E. (1993) Chronic arsenic toxicity. *Int. J. Dermatol.* 32:899-901.
- Alatorre, L.A. (1997) Introducción a la Toxicología Ambiental. Organización Panamericana de Salud (OPS) y Gobierno del Estado de México, Secretaría de Ecología.
- Albores, A., Cebrian, M.E., Bach, P.H., Connelly, J.C. Hinton, R. H. y Bridges, J.W. (1989) Sodium arsenite induced alterations in bilirubin excretion and heme metabolism. *J. Biochem. Toxicol.* 4:73-78.
- Aposhian, H.V.(1997) Enzymatic methylation of arsenic especies and other new approaches to arsenic toxicity. *Ann.Rev.Pharmacol. Toxicol.*,37,397-419.
- Baroni, C., van Esch, G.J. y Saffiotti, U. (1953) Carcinogenesis tests of two inorganic arsenicals. *Arch. Environ.Health*, 7, 668-678.
- Barret, J.C. (1984) Tumor promotion and tumor progression. In: Mass, M.J., Kaufman, D.G., Siegfried, J.M., Steele, V.E. y Nesnow, S., eds.. *Carcinogenesis test of two inorganic arsenicals.* *Arch. Environ. Health*, 7:668-678.
- Black, M.M. (1967) Prolonged ingestion of arsenic. *Pharm. J.* (Dec.9):593-597.
- Board, P., Coogan, M., Johnston, P., Ross, V., Suzuki, T. Webb, G., (1990) Genetic heterogeneity of the human glutathione transferase: a complex of gene families. *Pharmacol. Ther.* 48:357-369.

- Boquist, L., Boquist, S. y Ericsson, I. (1988) Structural B-cell changes and transient hyperglycemia in mice treated with compounds inducing inhibited citric acid cycle enzyme activity. *Diabetes* 37:89-98.
- Boutwell, R. (1974) The function and mechanism of promoters of carcinogenesis. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 2, 418-443.
- Boutwell, R.K. (1963) A carcinogenicity evaluation of potassium arsenite and arsenillic acid. *J. Agric. Food Chem.* 11:381-384.
- Boutwell, R.K., Colburn, N.H. y Muckerman, C.C. (1969) In vitro reaction of β -propiolactone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 163:751-763.
- Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. y Bishop, J.M. (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*, 224:1121-1124.
- Brown, C.C. y Chu, K.C (1989) Additive and multiplicative models and multistage carcinogenesis theory. *Risk Anal.*, 9, 99-105.
- Buchet, J.P. Lauwerys, R., Roels, H. (1981) Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single dose of sodium arsenite monomethyl arsonate or dimethylarsinate in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 48:71-79.
- Buchet, J.P. y Lauwerys, R. (1985) Study of inorganic arsenic methylation by rat liver in vitro. Relevance for the interpretation of observations in man. *Arch. Toxicol.* 57:125-129.
- Buchet, J.P., Lauwerys, R. (1987) Study of factors influencing the in vivo methylation of inorganic arsenic in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1:65-74.

- Butterworth, F.M., Corkum, L.D. y Guzmán-Rincón, J. (1995) Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. Plenum Press, N.Y.
- Cassarett y Doull's Toxicology. (1994) The basic science of poisons, 5th ed., p697. New York Mc. Graw-Hill
- Casanova, M., Morgan, K.T., Gross, E.A., Moss, O.R. y Heck, H. (1994) DNA-protein crosslinks and cell replication of specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. *Fundam. Appl. Toxicol.* 23:525-526.
- Casanova, M., Morgan, K.T., Steinhagen, W.H., Everitt, J., Popp, J.A. y Heck, H. (1991) Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the respiratory tract of Rhesus monkeys: Pharmacokinetics rat-to-monkey interspecies scaling and extrapolation to man. *Fund. Appl. Tox.* 17:409-428.
- Conaway, C.C., Whysner, J., Verna, L.K. y Williams, G.M. (1996) Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation. *Pharmacol. Ther.*, 71:29-55.
- Conolly, R.B., Morgan, K.T. y Andersen, M.E. (1992) A biologically based risk assessment strategy for inhaled formaldehyde. *Comments. Toxicol.* 4:269-293.
- Costa, M., Zhitkovich, A., Gargas, M., Paustenbach, D., Finley, B., Kuykendall, J., Billings R., Carlson, T. J., Wetterhahn, K., Xu, J., Patierno, S. y Bogdanffy, M. (1996) Interlaboratory validation of new assay for DNA-protein crosslinks. *Mut. Res.* 369:13-21.
- Costa, M., Zhitkovich, A., Harris, M., Paustenbach, D., Gargas, M. (1997) DNA protein crosslinks produced by various chemicals in

cultured human lymphoma cells. *J. of Toxicol. Env. Health* 50:433-449.

Crecelius, E.A., Bloom, N.S., Cowan, C.E., Jenne, E.A. (1986) Determination of arsenic species in limnological samples by hydride generation atomic absorption spectroscopy. In: Speciation of selenium and arsenic in natural waters sediments. Vol 2: Arsenic speciation, pp.1-28 Electric Power Research Institute Ed., Palo Alto, California, EA-4641, Project 2020-2.

Chen, G.Q., Zhu, J., Shi, X.G., Zhong, H.J., Si, G. Y., Jin, X.L., Tang, W., Li, X. S., Xong, S.M., Shen, Z. X., Sun, G.L., M.J., Zhang, P., Zhang, T.D., Gazin, C., Naoe, T., Chen, S.J., Wang, Z.Y., y Chen, Z. (1996) In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with down regulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins. *Blood*, 88:1052-061.

Chiou, H.Y., Hsieh, L.L., Hsu, L.I., Hsu, Y.H., Hsieh, f.I., Wei, M.L., Chen, H.C., Yang, h.T., Leu, L.C., Hsueh, Y.M. y Chen, C.J. (1997) Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. *Mut. Res.* 386:197-207.

Darnell, J., Matsudaira, P., Zipursky, S.L., Berk, A., Baltimore, D., Lodish, H. (1995) *Molecular Cell Biology*. Scientific American Book Press.

- Das, D.A., Chatterjee, B.K., Mandal, G., S., y Chakraborti, D. (1995) Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India. The biggest arsenic calamity in the world. Part 2: Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst*. 120:917-924.
- Datta, D.V., (1976) Arsenic and non-cirrhotic portal hypertension. *Lancet* 1:433.
- Dési, I. (1992) Arsenic contamination of drinking water in south-east Hungary. *Geogr.Med.*22:45-53.
- Del Razo, J. M.L.,(1997) Tesis. Biotransformación del arsénico y su relación con las lesiones de piel en individuos expuestos crónicamente al metaloide. CINVESTAV, México, D.F.
- Del Razo, L.M., Kenyon, E.M., Hughes, M.F. y Thomas, D.J. (2000) Comparative distribution between urine and biological tissues in mice exposed to arsenite dose-dependent effect.
- Eichner, E.R., (1984) Erythroid karyorrhexis in the peripheral blood smear in severe arsenic poisoning: A comparison with lead poisoning. *Am. J. Clin. Pathol*, 81:533-537.
- Engel, R.R. y Smith, A.H. (1994) Arsenic in drinking water and mortality from vascular disease: An ecological analysis in 30 counties in the United States. *Arch. Environ. Health* 49:418-427.
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2000 Proposed revision to arsenic drinking water standard. Página Web <http://www.epa.gov/OGWDW/mcl.html>
- Falk, H., Caldwell, G.G. y Ishak, K.G. (1981). Arsenic-related hepatic angiosarcoma. *Am. J. Ind. Med.* 2:43-50.

- Fearon, E.R. y Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767.
- Feinglass, E.J. (1973) Arsenic intoxication from well water in the United States. *N. Engl. J. Med.* 268:828-830.
- Franklin, M., Bean, W. y Harden, R.C. (1950) Fowler's solution as an etiologic agent in cirrhosis. *Am. J. Med. Sci.* 219:589-596.
- Friedberg, C.E., Walker, G.C. Siede, W. (1995) DNA repair and mutagenesis ASM, Press. Washington, D.C.
- Georis, B., Cardenas, A., Buchet, J.P. y Lauwerys, R. (1990) Inorganic arsenic methylation by rat tissue slices. *Toxicol.*63:73-84.
- Germolec, D.R., Spalding, J., Boorman, G.A., Wilmer, J.L., Yoshida, T., Simeonova, P.P., Bruccoleri, A., Kayama, F., Gaido, K., Tenneant, R., Burleson, F., Dong, W., Lang, R.W., y Luster, M.I. (1997) Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors. *Mut. Res.* 386:209-218.
- Glottlieb, A.B., Chang, C.K., Posnett, D.N., Fanelli, B., Tam, J.P. (1988) Detection of transforming growth factor α in normal malignant and hyperproliferative human keratinocytes. *J. Exp. Med.* 167:670-675.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Herrera, L.A., Montero, R., Rojas, E., Cebrian, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. (1992) Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mut. Res.* 283:91-95.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Salazar, A.M., Montero, R., Guzmán, P., Blass, J., Del Razo, L.M. Gacia- Vargas, G. Albores, A., Cebrián,

- M.E., Kelsh, M., Ostrosky-Wegman, P. (1997) Cytogenetics effects in human exposure to arsenic. *Mut. Res.* 386, 219-228.
- Gutierrez-Ruíz, M.C., Bucio, L., Souza, V., Gómez, J.L., Campos, C. y Cárabez, A. (1994) Expression of some hepatocyte-line functional properties of WRL-68 in culture. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 30^a: 366-371.
- Haschek, W.M. y Rousseaux, C.G. (1998) *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. Academic Press. San Diego California, USA.
- Healy, S.M., Zakharyan, R.A., Aposhian, H.V. (1997) Enzymatic methylation of arsenic compounds:IV. In vitro and in vivo deficiency of the methylation of arsenite and monomethylarsonic acid in the guinea pig. *Mutation Res.*, 386,229-239.
- Hernández-Zavala, A., Del Razo, L.M., Aguilar, C., García-Vargas, G.G., Borja, V.H., Cebrián, E.M. (1998) Alteration in bilirubin excretion in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Toxicology Letters* 99, 79-84.
- Hennings, H., Shores, R., Wenk, M.L. Spangler, E.F., Tarone, R. y Yuspa, S.H. (1983) Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumour initiators and unaffected by tumour promoters. *Nature*, 304:67-69.
- Hindmarsh, J.T., McLetchie, O. R., Heffernan, L.P., Hayne, O.A., Ellenberger, H.A., McCurdy, R.F. y Thiebaut, H.J. (1977) Electromyographic abnormalities in chronic environmental arsenicalism. *J.Anal.Toxicol.* 1:270-276.

- Hissin, P.J. y Hilf, R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74:214-226.
- Hughes, K., y Meek, M.E. (1994) Arsenic in the Canadian general environment-evaluation of risks to health. In : Chappel MR Abbernathy, CO. Y Cothorn, C.R. (eds) *Arsenic. Exposure and Health*, Science Reviews Ltd. 40, Norwood, england, pp 257-268.
- IARC (1982) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Suppl.4, Chemicals, Industrial Processes and industries associated with cancer in humans, IARC Monographs Volumes 1 to 29, Lyon.
- IARC (1992) IARC Mechanisms of carcinogenesis in risk identification., Lyon.
- Imamoto, A., Beltran, L.M., DiGiovanni, J. (1991) Evidence for autocrine/paracrine growth stimulation by transforming growth factor- α during the process of skin tumor promotion. *J.Mol. Carcinogen.* 4:52-60.
- Ishinishi, N., Yamamoto, A., Hisanga, A. y Inamasu, T. (1983) Tumorigenicity of arsenic trioxide to the lung in Syrian golden hamster by intermittent installations. *Cancer Lett.*, 21, 141-147.
- Jacobson-Kram, D. y Montalbo, D. (1985) The reproductive effects assessment groups report on the mutagenicity of inorganic arsenic. *Environ. Mutagen.* 7:787-804.

- Kachisnkas, D.J., Phillips, M.A., Qin, Q., Stokes, J.D., Rice, R.H. (1994) Arsenate perturbation of hman keratinocyte differentiation, *Cell Growth Differ.* 5:1235-1241.
- Kaldor, J.M. y Day, N.E. (1987) Interpretation of epidemiological studies in the context of the multistage model of carcinogenesis. In: Barret, J.C., ed., *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis*, Vol.2. Multistep models of carcinogenesis, Boca Raton, FL, CRC Press, pp.21-57.
- Kaltenbach, J.P., Kaltenbach, M.H. & Lyons, W.B. (1958). Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells . *Exp. Cell. Res.* 15:112-117.
- Kenyon, E.M., Del Razo, L.M. y Hughes, M.F. (2000) Tissue distribution of arsenite (AsIII) and its methylated metabolites in mice. Presentación en 39th Annual meeting of Society of Toxicology, Phyladelphia, Pa.
- Kohn, K.W., Ewing, R.A.G., Erickson, L.C., Zwelling, L.A., (1981) Measurement of strand breaks and crosslinks by alkaline elution p 379-401. In Friedberg, F.C. y Hanawalt P.C. (ed.), *DNA repair. A laboratory Manual of Research procedures*. Vol.1B Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kutty, G., Hayden, B., Osawa, Y., Wiggert, B., Chader, G.J., Kutty, R.G. (1992) Heme oxygenase: expression in human retina and modulation by stress in a retinoblastoma cell model system. *Curr. Eye Res.* 11:153-160.
- Labadie, H., Stoessel, P., Callard, P. y Beaugrand, M., (1990) Hepatic venoocclusive disease and perisinusoidal fibrosis secondary to arsenic poisoning. *Gastroenterology.* 99:1140-1143.

- Labarca, C., Paigen, K., (1980) A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102:285-288.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, T.C., Tanaka, N., Lamb, P.W., Gilmer, T.M. y Barret, J.C. (1988) Induction of gene amplification by arsenic. *Science* 241:79-81.
- Li, W. y Chou, I.-N. (1992) Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels in cultures cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114, 132-139.
- Lin, T.M., Tsu, W.T., y Chen, C.J. (1986) Mortality of hepatoma and cirrhosis of liver in Taiwan. *Br. J. Cancer* 54:969-976.
- Luger, T.A. y Schwartz, T. (1990) Epidermal cell-derived cytokines, in: J.D. Bos (Ed.) *Skin Immune System*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 257-291.
- Marafante, E. y Vahter, M. (1984) The effect of methyltransferase inhibition on the metabolism of [⁷⁴As] arsenite in mice and rabbits. *Chem. Biol. Interact.* 50:49-54.
- Mass, M.J. y Wang, L. (1997) Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mut. Res* 386:263-277.
- Mazumder, G., Chakraborty, N., (1988) Chronic arsenic toxicity from drinking tubewell water in rural West Bengal. *Bull. WHO* 66, 499-506.
- McCabe, M.D., Maguire, M. y Nowak, M. (1983) The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocyte mitogenesis in vitro. *Environ. Res.* 31:323-331.

- Menzel, d.B., Lee, E., Vargas, M., Meacher, D.M., Hamedeh, H., Rasmussen, R.E., Thompson, K., Pourmansor, J., Denger, L., Greene, H., Roth, R.N., (1997). A toxicodynamic model of arsenic: activation of nuclear transcription factor and increased gene expression. Speaker Abstracts. Conference on Arsenic. Health Effects, Mechanisms of Actions and Research Issues. Hunt Valley, M.D.
- Miller, C.A. III., Cohen, D.M. y Costa, M. (1991) Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by cis-diamminedichloroplatinum (II) and chromiun compounds. *Carcinogenesis* 12, 269-276.
- Miller III; C. A. III y Costa, M. (1989) Immunological detection of DNA-protein complexes induced by chromate. *Carcinogenesis*, 10, 667-672.
- Molin, L., Wester, P.O. (1976) The estimated daily loses of trace elements from normal skin by desquamation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 36:679-688.
- Morris, J.S., Schmid, M. y Newman, S. (1974) Arsenic and noncirrhotic portal hypertension. *Gastroenterology* 64:86-94.
- Nietert, W.C., Kellicut, L.M. y Kibinski, H. (1974) DNA-protein complexes produced by a carcinogen β -propiolactone. *Cancer Res.* 34:859-864.
- Norsdtrom, S., Beckman, L., Norderson, I. (1978a). Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. I. Variations in birth weight. *Hereditas*, 88, 43-46.

- Norsdtrom, S., Beckman, L. y Nordenson, I. (1978b) . Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. III. Frequencies of spontaneous abortion. *Hereditas* 88:51-54.
- Oleinick, N.K., Chiu, S.M., Ramakrishnan, N. y Xue, L.Y (1987) the formation, identification and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br. J.Cancer*, 55, 135-140.
- Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Esoinosa, J., Palao, A. (1991) Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in México. *Mut. Res.* 250:477-482.
- Paustenbach, D.J., Finley, B.L., Kacew, S. (1996) Biological relevance and consequences of chemical- or metal-induced DNA-cross-linking *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211:3, 21-217.
- Pershagen, G. (1983) The epidemiology of human arsenic exposure In: *Biological and Environmental effects of arsenic. Topics in Environmental Health*, v 6 (eds) Bruce Fowler. Elsevier Science Publisher, New York pp 199-232.
- Pershagen, G., Nordberg, G. Y Bkorklund, N. (1984) Carcinomas of the respiratory tract in hamsters given arsenic trioxide and/or benzo(a)pyrene by pulmonary route. *Environ. Res.*, 34:227-241.
- Piontek, M., Hengels, K.J., Borchard, S., (1989). Noncirrhotic liver fibrosis after chronic arsenic poisoning. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 114, 1653-1657.
- Ramírez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P., Ostrosky-Wegman, P. (1997) Disruption of microtubule assembly and spindle formation

as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mut. Res.* 386: 291-298.

Ratnam, K.V., Espy, M.J. Muller, S.A., Smith, T.F. y Su, W.P. (1992) Clinicopathologic study of arsenic-induced skin lesions: Nondefinite association with human papillomavirus. *J.Am. Acad. Dermatol.* 27:120-122.

Revzin, A. (1990) *The Biology of nonspecific DNA-protein interactions.* Boca, Florida. CRC Press pp1-2.

Rezuke, W.N., Anderson, C., Pastuszak, S.R., Conway, S. R. y (1991) Arsenic intoxication presenting as a myelodysplastic syndrome: A case report. *Am. J. Hematol.* 36:291-293.

Rossmann, T.G. y Wolosin, D. (1992) Differential susceptibility to carcinogen-induced amplification of SV40 and *dhfr* sequences in SV40-transformed human keratinocytes. *Mol. Carcinogen.*, 6,203-213.

Rudnay, P. y Borzsonyi, M. (1981) The tumorigenic effect of treatment with arsenic trioxide. *Magy.Onkol.*,25:73-77.

Schwab, M., Ellison, J. Busch, M., Rosenau, W., Varmus, H.E. y Bishop, J.M. (1984) Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4940-4944.

Shetlar, M.D., Hom, K., Carbone, J., Moy, D., Steady y Watanaba, M. (1984) Photochemical addition of aminoacids and peptides to homopolyribonucleotides of the major DNA bases *Photochem. Photobiol.* 39:135-140.

- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. y McGuire, W.L. (1987) Human breast cancer correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235:177-182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. y Press, M.F. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-712.
- Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Bates, M.N., Goeden, H.M., Hertz-Picciotto, I., Duggan, H.M., Wood, R., Kosnett, M.J., Smith, M.T. (1992) Cancer risk for arsenic in drinking water. *Environ. Health Perspect.* 97:259-267.
- Smith, K.C. y Hanawalt, P.C. (1969) *Molecular Photobiology*. Academic Press, Inc. New, York.
- Soignet, S.L., Maslak, P., Wang, Z.G., Jhanwar, S., Calleja, E., Dardashti, L.J., R.P.Jr. (1998) Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N. Engl.J. Med.*, 339:1341-1348.
- Speit, Gunter, Schutz, P. y Merk, O. (2000) Induction and repair of formaldehyde -induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines *Mutagenesis* 15:85-90.
- Stocken, L.A. y Thompson, R.H.S. (1949) Reactions of British anti-lewisite with arsenic and other metals in living systems. *Physiol. Rev.* 29:168-194.
- Styblo, M., Vega, L., Germolec, D.R., Luster, M.I., Del Razo, L.M., Wang, C., Cullen, W.R. y Thomas, D.J. (1999) *Proceedings of*

the 3rd International conference on the health effects of arsenic,
In press.

- Tardif, G.R. Lohman, M.P.H. y Wogan, N.G. (1994) Methods to assess DNA damage and repair. Wiley, Ed.
- Tay, C.H. (1974) Cutaneous manifestations of arsenic poisoning due to certain Chinese herbal medicine. *Australas. J.Dermatol.* 15(3):121-131.
- Travers, A. (1993) DNA protein interactions. Chapman & Hall, Chapter 1-2
- Travis, C.C. (1992). Use of biomarkers in assessing health and environmental impacts of chemical pollutants.
- Tsapakos, M.J., Hampton, T.H., Wetterhahn, K.E. (1983) Chromium (VI)- induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver and lung. *Cancer Res.* 43:5662-5667.
- Tseng, W.P. (1968) Effects and dose-response relationship of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. *Environ. Health Perspect.* 19:109-119.
- Tseng, W.P. (1977) Effects of dose-response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. *Environ. Health Perspect.* 19:109-119.
- Tseng, W.P., Chen, W.Y., Sung, J.L. y Chen, J.S. (1961) A clinical study of blackfoot disease in Taiwan: An epidemic peripheral vascular disease. *Mem. Coll. Med. Natl. Taiwan Univ.* 7:1-18.
- Vahter, M. (1981) Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats. *Environ. Res.* 25:286-293.
- Vahter, M. y Envall, J. (1983) In vivo reduction of arsenate in mice and rabbits *Environ. Res.* 32:14-24.

- Vahter, M., Marafante, E. (1983) Intracellular interactions and metabolic rate of arsenite and arsenate in mice and rabbits. *Chem. Biol. Interact.* 47:29-44.
- Vasunia, K.B., Miller, M.L., Puga, A., Baxter, C.S. (1994) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is expressed in mouse skin in response to tumor -promoting agents and modulates dermal inflammation and epidermal dark cell numbers. *Carcinogenesis* 15:653-660.
- Wedrychowsky, A., Schimdt, W.N., Hnilica, L.S. (1986) DNA-protein crosslinking by heavy metals in Novikoff hepatoma. *Arch. Biochem. Biophys.* 251:397-402
- Wolffe, A. (1998) Chromatin, structure & function. .Academic Press, p57.
- Yamanaka, K., Tezuka, M., Kato, K., Hasegawa, A. y Okada, S. Crosslink formation between DNA and nuclear proteins by in vivo and in vitro exposure of cells to dimethylarsinic acid (1993) 191:1184-1191.
- Yu, H.S., Chiuo, K.S., Yang, R.C., Chang, S.F. (1993) Progressive alterations of cytokeratin expressions in the process of chronic arsenism. *J. Dermatol.* 20 741-745.
- Zhitkovich, A., y Costa, M. (1992) A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo. *Carcinogenesis*, 13, 1485-1489.