



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

J. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

PROFESORADO DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de Exámenes Profesionales

**"ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INDUCTORA IN VIVO DE
ADUCTOS
ADN-PROTEINAS POR EFECTO DEL ARSENICO"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :
SANDRA ARTEAGA LOPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMIREZ NOGUERA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

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

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

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

Aductos ADN-Proteínas por efecto del Arsénico.

que presenta 1a pasante: Sandra Arteaga López
con número de cuenta: 94600375 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Agosto de 2003

PRESIDENTE	<u>Dr. Ricardo V. Santiago Díaz</u>	
VOCAL	<u>Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Patricia Ramírez Noguera</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M.enC. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B Rene Damián Santos</u>	

DEDICATORIAS

A MI DIOS

“Principio y fin de todas las cosas”

*Por regalarme la vida, por tu infinita
Bondad y por la dicha inmerecida de fijar
tu mirada en mí.*

*Sigue moldeando mi vida
con tus manos amorosas de magistral alfarero*

A MI FAMILIA

*Que son mi más grande tesoro
y la razón que me impulsa a alcanzar mis mas lejanos sueños*

PAPI

*Gracias por tu fortaleza,
por inculcarme ese espíritu
de superación ,pero sobre todo
por tu cariño, paciencia
y confianza en mi*

MAMI

*Gracias por el inmenso amor y cuidados
que me has prodigado desde antes de nacer,
gracias por tus consejos, tu entrega
y por tu valentía en los momentos más difíciles,
Gracias por que siempre has creído en mi*

*Gracias Papas por traerme al mundo, por todos sus sacrificios, tanto amor y
por que son mi máximo orgullo y ejemplo
Dios quiera que siempre cuente con sus regazos para descansar mi carga al
final de cada día*

A MIS HERMANAS

YADIRA, MIRIAM, CARINA, NAGIELI

*Gracias por todo su cariño y apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, por tantas risas y llantos que hemos compartido juntas
Y por que aunque somos tan diferentes como los dedos de una mano, nacimos de una misma raíz y es un mismo motor el que nos mueve
Las quiero y admiro infinitamente
"Cada logro mío es un logro nuestro"*

A MI NEGRITO (EDGAR)

*Gracias por enseñarme que las cosas más simples son las más bellas de la vida, por inyectarme de tu vitalidad cuando me han faltado fuerzas para seguir andando, por tu cariño, tu ternura y tu genialidad
Gracias a Dios por regalarnos tu presencia que vino a iluminar aún más nuestra casa*

A MIS MEJORES AMIGOS

LUPITA, JAQUE, BETY, ROCIO, ARA, TOÑO, RUTH, ISMAEL, ANGEL

Gracias por su amistad invaluable, por estar siempre allí cuando los he necesitado, y por iniciar conmigo este viaje

Bety, Rocio y Ara

Mis amigas del alma, gracias por ser las mejores amigas que ha podido poner dios en mi camino, gracias por tantas locuras colectivas y por todos los momentos buenos y malos que hemos superado juntas.

ISMA R.C.

Gracias por todos los momentos mágicos, por mostrarme tu filosofía de la vida, por tu honestidad y sencillez, por que siempre estas dispuesto a escucharme, por tus jalones de oreja, por que se que cuento contigo en todo momento, por creer en mi y por que siempre buscas mi bienestar

GISELA

Gracias Gis por tu amistad, tu cariño y por ser tan especial y única.

A CESAR OLAF

Gracias por tu amistad, tu cariño y apoyo incondicional durante la realización de esta tesis, gracias por ser un ejemplo de lucha y superación que me alienta para alcanzar mis metas, nada en esta vida sucede por casualidad

Sino como parte de un propósito divino.

Gracias a dios que me permitió la dicha de conocerte

AGRADECIMIENTOS

A LA UNAM Y A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

Gracias a la máxima casa de estudios por permitirme el honor de pertenecer a la familia universitaria, gracias a mis maestros y a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en mi formación académica.

A MI DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA RAMIREZ NOGUERA

Gracias por confiar en mí para este proyecto sin siquiera conocerme, gracias por su orientación, paciencia y consejos, por compartir conmigo de sus conocimientos, por ser un ejemplo a seguir y por contagiarme de su amor a la investigación

*Gracias por todo el apoyo, pero más que nada por esa gran calidad humana que le caracteriza
¡Mil gracias Maestra!*

AL LABORATORIO DE LA DRA. GONSEBATT M.E. DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENOMICA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA UNAM

Gracias a la doctora Gonsebatt por su interés, disposición y por todas las facilidades otorgadas para la realización experimental de este trabajo.

AL LABORATORIO DE TOXICOLOGIA CELULAR DE LA FES-CUAUTITLAN VERO, AMBAR, ISRRA, IRIS, NIDIA, ARLETTE, LILIAN, MIRNA, MARTHA (Gracias por iniciar conmigo esta gran aventura)

*Muchas gracias por todas las vivencias durante el desarrollo de este trabajo, por sus consejos, sugerencias y sobre todo por ser unas personas grandiosas.
Gracias por brindarme de su amistad.*

IRIS

Gracias por todas las complicidades que hemos compartido y por que además de una gran persona eres una excelente amiga.

A MIS SINODALES

Gracias por su atención, su tiempo y su valiosa contribución durante la revisión de este trabajo.

INDICE GENERAL	PAGINA
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	5
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
CAPITULO I	
INTRODUCCION	10
GENOTOXICIDAD	11
BIOMARCADORES	12
INTERACCIONES ADN-PROTEINAS	15
DPC COMO BIOMARCADORES DE DAÑO TEMPRANO AL ADN	16
CAPITULO II	
GENERALIDADES DEL ARSENICO	18
TRANSPORTE Y DISTRIBUCION EN EL AMBIENTE	19
NIVELES DE CONTAMINACION AMBIENTAL Y	20
EXPOSICION HUMANA	
FUENTES CONTAMINANTES DE ARSENICO	23
FUENTES NATURALES	23
FUENTES ANTROPOGENICAS	25
EXPOSICION AL ARSENICO	27
VIAS DE ENTRADA	
DISTRIBUCION	28
BIOTRANSFORMACION	28

	PAGINA
VIAS DE ELIMINACION	32
BIOMARCADORES DE EXPOSICION A ARSENICALES	
CARCINOGENESIS	
CO-CARCINOGENESIS Y CO-MUTAGENESIS	39
DEL ARSENICO	
ALTERACIONES MOLECULARES ASOCIADAS A LA	40
TOXICIDAD DE ARSENICO	
ABERRACIONES CROMOSOMICAS	41
ESTRES OXIDATIVO	43
ALTERACION EN LA REPARACION DEL DNA	45
ALTERACION EN LOS PATRONES DE METILACION	46
DEL DNA	
ALTERACION EN LOS FACTORES DE CRECIMIENTO	47
INDUCCION DE LA PROLIFERACION CELULAR	47
TRANSFORMACION CELULAR	49
PROMOCION/PROGRESION DE CANCER	50
AMPLIFICACION DE GENES	52
SUPRESION DE p53	52
INTOXICACION POR INGESTION DE ARSENICO	
EN MEXICO	53

CAPITULO III	PAGINA
TOXICIDAD DE ARSENICO	55
MECANISMOS DE LA TOXICIDAD DEL ARSENICO	55
ARSENICO TRIVALENTE	56
ARSENICO PENTAVALENTE	56
INTOXICACION CON ARSENICO	57
INTOXICACION AGUDA	
INTOXICACIÓN CRONICA	
EFFECTOS DE LA TOXICIDAD DEL ARSENICO	58
EFFECTOS RESPIRATORIOS	
EFFECTOS PULMONARES	
EFFECTOS CARDIOVASCULARES	
EFFECTOS GASTROINTESTINALES	59
EFFECTOS HEMATOLOGICOS	
EFFECTOS HEPATICOS	
EFFECTOS RENALES	60
EFFECTOS DERMATOLOGICOS	
EFFECTOS INMUNOLOGICOS	61
EFFECTOS NEUROLOGICOS	
EFFECTOS TERATOGENICOS DEL ARSENICO	
EFFECTOS DEL ARSENICO SOBRE OTROS ORGANISMOS DEL AMBIENTE	64

CAPITULO IV	PAGINA
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
OBJETIVO GENERAL	66
OBJETIVO PARTICULAR	
HIPOTESIS	
CAPITULO V	
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	67
MATERIALES Y METODOS	
ADMINISTRACION Y TRATAMIENTO	
AISLAMIENTO DE LOS NUCLEOS	
PRECIPITACION DE DPC	68
DETERMINACION DE GLUTATION REDUCIDO (GSH)	69
CAPITULO VI	
RESULTADOS	70
CAPITULO VII	
DISCUSION	83
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	88
CAPITULO VIII	
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	89

INDICE DE FIGURAS TABLAS Y GRAFICAS

PAGINA

FIGURAS

FIGURA 1: ¿Qué ocurre cuando un organismo se expone a un agente tóxico y que tipo de biomarcador es más útil?	14
FIGURA 2: Biotransformación del arsénico	30
FIGURA 3: Las rutas posibles que sigue un tóxico como el arsénico en el organismo	33
FIGURA 4: Mecanismo de acción de la carcinogénesis del arsénico	38

TABLAS

TABLA A: Fuentes naturales de exposición al arsénico y sus derivados.	24
TABLA B: Fuentes antropogénicas de exposición al As y sus derivados.	26
TABLA C: Absorción de arsénico.	27
TABLA D: Correlación entre exposición a arsénico y Cáncer humano.	37
TABLA E: Carcinogénesis del DMA en roedores.	51
TABLA F: Intoxicación por Ingestión de arsénico en México.	54
TABLA G: Síntomas observados en exposición a arsénico en Coahuila, México.	54
TABLA H: Efectos teratogénicos del arsénico	63

TABLA 1: Aductos ADN-Proteína (DPC) en hígado de ratones de la cepa BALB/c	72
TABLA 2: Glutación en hígado de ratones de cepa BALB/c	74
TABLA 3: Inducción de aductos ADN-proteínas (DPC) en riñón de ratones de la cepa BALB/c	76
TABLA 4: Glutación en riñón de ratones de la cepa BALB/c	78
TABLA 5: Correlación de la inducción de DPC con GSH en hígado de ratones de la cepa BALB/c	80
TABLA 6: Correlación de la inducción de DPC con GSH en riñón de ratones de la cepa BALB/c	82
TABLA 7: Registro de peso de los ratones BALB/c durante los 9 días de tratamiento	82

GRAFICAS

GRAFICA1: Inducción de DPC por arsenito de sodio en hígado de ratones BALB/c.	71
GRAFICA 2: Inducción de glutación en hígado de ratones BALB/c con arsenito de sodio.	73
GRAFICA 3: Inducción de DPC por arsenito de sodio en riñón de ratones de la cepa BALB/c.	75
GRAFICA 4: Inducción de glutación en riñón de ratones BALB/c con arsenito de sodio.	77
GRAFICA 5: Correlación de la inducción de DPC con GSH en Hígado de ratón de la cepa BALB/c.	79
GRAFICA 6: Correlación de la inducción de DPC con GSH en riñón de ratones BALB/c.	81

ABREVIATURAS

AC	Aberraciones cromosómicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
DPC	Aductos ADN – Proteínas
Asi	Arsénico inorgánico
As³⁺	Arsénico trivalente
KCl	Cloruro de potasio
DMA	Dimetil arsénico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
ROS	Especies reactivas de oxígeno
GSH	Glutatión reducido
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
MN	Micronúcleos
MMA	Monometil arsénico
ODC	Ornitina descarboxilasa
NO	Oxido Nítrico
UVR	Rayos Ultra Violeta
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosil-metionina
PBS	Solución Buffer de fosfatos pH=8

RESUMEN

El arsénico (As) es un metaloide con dos estados de oxidación de importancia biológica As^V y As^{III} , ingresa a la biosfera primariamente por formaciones geológicas, en poblaciones expuestas se ha asociado con un incremento en la incidencia de cáncer en hígado, piel, pulmón y vejiga. El As inorgánico (As_i) es rápidamente absorbido hacia el torrente sanguíneo y transportado primariamente al hígado en donde es metilado a dos derivados arsenicales, el ácido monometilarsénico (MMA), y el ácido dimetilarsínico (DMA), los cuales junto con la especie no metilada son excretados en la orina.

Estudios previos han mostrado la capacidad *in vitro* del metaloide de inducir en células hepáticas un tipo de daño genético que asocia a las citoqueratinas con de ADN formando aductos ADN-Citoqueratinas (DPC) y sugieren que estos DPC pueden ser empleados como biomarcadores de exposición a carcinógenos en la estimación del riesgo.

En el presente trabajo nos propusimos determinar si el arsénico es capaz de inducir aductos ADN-proteínas (DPC) *in vivo* en hígados y riñones de ratones de la cepa BALB/c después de una exposición subcrónica de 9 días con dosis diarias de arsenito de sodio a las siguientes concentraciones

(2.5, 5.0 y 12.5 mg/Kg de peso), después del tratamiento se extrajeron los órganos de interés (hígado y riñón), se aislaron y lisaron los núcleos con soluciones de SDS y KCl y se procedió a la precipitación de los DPC según la técnica descrita por Zhitkovich y cols., 1992.

Los resultados indican que el Arsénico indujo la síntesis de DPC tanto en el hígado como en el riñón de los ratones y estas inducciones no son dependientes de las dosis de arsénico, encontrándose el mayor porcentaje de DPC en la dosis intermedia del

tratamiento (5.0 mg As /Kg peso) donde hasta un 11% y un 6% del DNA total se haya complejo con proteínas en el hígado y riñón respectivamente, se observó también un aumento significativo en la síntesis de Glutathión reducido (GSH) en ambos órganos y el efecto es dependiente de las concentraciones evaluadas de arsenito de sodio. El incremento en los niveles celulares de GSH nos sugiere la puesta en marcha de los mecanismos de protección celular contra el daño ocasionado por la exposición a arsénico.

CAPITULO I

INTRODUCCION

A pesar de los esfuerzos de concientización que realizan los organismos reguladores del medio ambiente (EPA/WHO, 2001) y la sociedad civil, siguen siendo importantes los niveles de los agentes tóxicos que se encuentran dispersos contaminando el ambiente. Algunos compuestos químicos tanto orgánicos como inorgánicos, se encuentran en forma natural y otros más como resultado de la actividad antropogénica y estos pueden ocasionar impactos adversos en la salud humana (Mandal y cols., 2002; Rosen y cols., 2002).

En nuestro país y en la mayoría de los países industrializados, a pesar de los avances en prevención y tratamiento, el cáncer es una de las dos principales causas de muerte. Enfermedad compleja y con diversas manifestaciones, cuya causa última aún no se conoce con exactitud.

El desarrollo de sistemas experimentales *in vitro* e *in vivo* nos permite determinar el daño, enfermedad e incluso el cáncer que se asocia a la interacción del agente xenobiótico y el organismo humano.

GENOTOXICIDAD

El ADN contiene toda la información que nos define como seres humanos y puede ser susceptible a la acción de agentes tóxicos, a los estudios de esta interacción se les denomina genotoxicidad, y pueden realizarse a poblaciones en riesgo o usar modelos experimentales en donde se diseña un sistema para hacer patente dicha genotoxicidad.

El genoma de todos los organismos vivos es constantemente sujeto de daño por una serie de agentes químicos y físicos, generados dentro y fuera de la célula (Steege y cols., 2001).

Los agentes químicos, a través de los hábitos personales (tabaco y alcohol), la dieta y la exposición profesional, son responsables de la inmensa mayoría de los cánceres en el mundo (Mandal y cols., 2002). Pueden ser iniciadores por su acción genotóxica (bis-clorometil-eter BCME, cloruro de vinilo, o el benzopireno) o actuar como promotores (dietilestilbestrol, los ésteres de forbol, los ácidos biliares secundarios o el etanol).

Los agentes químicos reaccionan con proteínas celulares, ARN o ADN, y se piensa que su interacción con el ADN es fundamental en el inicio de la lesión celular. Ejercen su acción mutagénica formando aductos con el ADN mediante enlaces covalentes, y es posible que las interacciones con proteínas puedan tener un papel modulador de los efectos sobre el ADN (Hoffman y cols., 1991). El daño sobre los ácidos nucleicos determina la activación de protooncogenes o la inactivación de genes supresores de tumor (Mandal y cols., 2002). La estructura química de estos carcinógenos condiciona los cambios moleculares que producen. Es posible por tanto, establecer asociaciones entre el tipo de lesión molecular y el carcinógeno que la ocasiona (Vega y cols., 2001).

Cuando el daño generado al DNA no es eficientemente reparado, puede derivarse una serie de mutaciones y dependiendo del sitio específico y del gen dañado, las

mutaciones pueden producir cambios en los procesos metabólicos, muerte celular, alteraciones cromosómicas, proliferación celular incontrolada y cáncer (Steeg y cols., 2001).

BIOMARCADORES

Los marcadores biológicos o biomarcadores son cambios medibles, ya sean estos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición a un tóxico (Kopplinn, 2001).

Los indicadores biológicos se utilizan para detectar la presencia de agentes tóxicos en un organismo, se clasifican como indicadores o marcadores de exposición cuando sirven para demostrar en cualquier tejido biológico (sangre, orina, saliva etc.) su presencia. Un marcador de efecto se refiere a datos biológicos que permiten demostrar que el agente ha inducido un (efecto) cambio en el organismo, en su DNA, en la bioquímica de sus células inhibiendo enzimas, o a nivel molecular, induciendo la expresión de genes de estrés oxidativo (FIGURA 1). En el caso que un organismo sea más sensible que otros cuando se expone a un agente tóxico (mujeres embarazadas, niños, ancianos etc.) entonces se pueden describir en él marcadores de susceptibilidad (Gonsebatt, 2003).

Estos sistemas de prueba miden la habilidad de una sustancia para producir un efecto genotóxico cualitativo, de modo que éstos indican un probable riesgo para el hombre.

Los biomarcadores se utilizan para:

- detectar la presencia de una exposición
- determinar las consecuencias biológicas de la exposición
- detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico
- identificar a los individuos sensibles de una población
- fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental

En el diseño de una rutina de muestreo es necesario considerar lo siguiente:

- especificidad y sensibilidad del biomarcador
- dificultad del muestreo
- cinética de la formación del biomarcador y
- estabilidad del biomarcador.

(Kopplin , 2001)

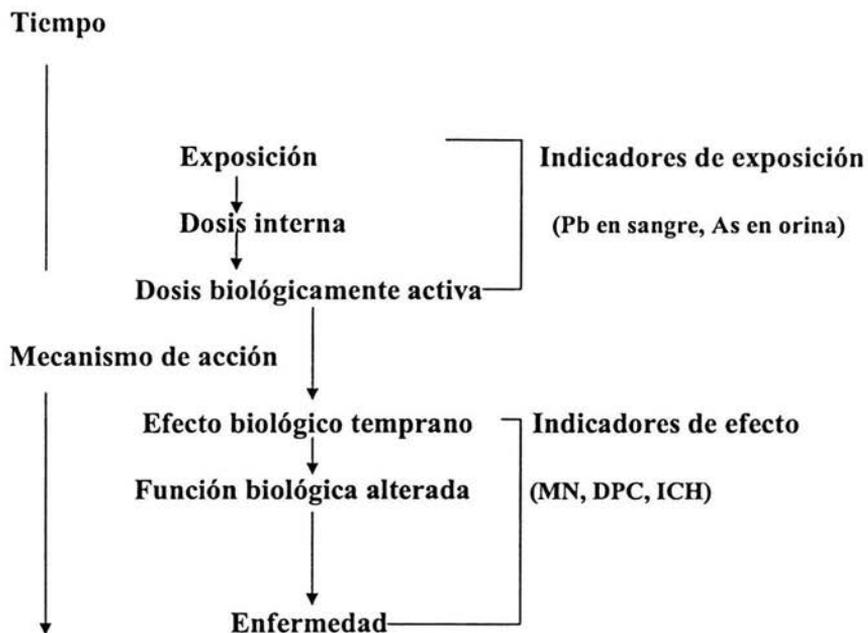


FIGURA 1: ¿Qué ocurre cuando un organismo se expone a un agente tóxico y que tipo de biomarcador es más útil? (Gonsebatt, 2003)

INTERACCIONES ADN-PROTEINAS

Las interacciones ADN-Proteínas han sido implicadas en muchos aspectos en la expresión de genes y la herencia (Stein y cols., 1979).

En el núcleo celular el material genético interacciona constantemente con proteínas, la unión ADN-proteínas esta implicada en procesos de expresión génica, reparación, replicación, recombinación, transcripción y en mantener la organización estructural del material genético (Minko y cols.,2001). Estas proteínas ejercen su función mediante interacciones no-covalentes con las moléculas de ADN, se colocan en el sitio de acción, realizan el trabajo y al terminar se desplazan hacia otro lugar para repetir el proceso (Costa y cols., 1993).

Las proteínas interactúan con secuencias específicas de DNA activando y desactivando genes (Hunter y cols., 1992), y por regla general estas uniones de proteína-DNA son reversibles (Neuer y cols., 1985). Existen evidencias de que algunos agentes químicos clasificados como carcinógenos pueden inducir que ciertas proteínas reguladoras se unan por medio de enlaces covalentes al DNA formando aductos ADN-Proteínas (**DPC**) (Costa y cols., 1993; Ramírez y cols., 2000; Voitkun y cols., 1999), en ellos se combinan bases nitrogenadas o fosfatos del ADN con residuos de aminoácidos de las proteínas como la cisteína, ácido glutámico, histidina, treonina, tirosina y lisina. (Costa y cols., 1993; Rosen B. y cols., 2002).

La generación de entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas con las que interacciona (**DPC**) pueden producir interrupciones en las hebras de ADN, originando deleciones importantes durante su síntesis y reparación, lo que puede ocasionar la inactivación o pérdida de genes como los involucrados en la supresión de tumores o en secuencias teloméricas cuya preservación resulta esencial en el mantenimiento de la integridad cromosómica (Ramírez y cols., 2000).

Los **DPC** pueden interrumpir genes de expresión, lo cual puede llevar a aberraciones durante la replicación del material genético, ya que algunas lesiones no son eficientemente reparadas (Costa y cols., 1993).

DPC COMO BIOMARCADORES DE DAÑO TEMPRANO AL ADN

Los **DPC** son un tipo de indicadores biológicos que resultan de la exposición a una variedad de agentes físicos y químicos carcinogénicos (Minko y cols., 2001).

Se ha observado un incremento dramático en los niveles de **DPC** después de la exposición a agentes como la luz UV (Shetlar y cols.,1980), radiación ionizante (Oleinick y cols.,1987), B-propiolactona (Nietert y cols.,1974), aldehidos (Voitkun y cols., 1999; Conaway y cols.,1996), arsenito (Ramírez y cols.,2000), nitrilotriacetato ferrico (Toyokuni y cols.,1995), cromatos (Miller y cols.,2001), Níquel (Chakrabarti y cols.,2001), y otros, agentes terapéuticos como el cis-platino (Millar y cols.,1991), bis-platino (Van Houten y cols.,1993), y neocarzinostatina (Hashimoto y cols., 2001).

El significado biológico de los aductos ADN-Proteínas en términos de carcinogenicidad, citotoxicidad y mutagenicidad está poco estudiado a pesar de existe un gran número de agentes inductores de este tipo de aductos como primera lesión genotóxica. Los aductos ADN-Proteínas son una de las lesiones primarias inducidos en células expuestas a Ni y Cr. El níquel induce aductos ADN-proteínas a través de radicales de oxígeno (Patierno y Costa, 1985; Costa y cols., 1993).

La formación de aductos ADN-Proteínas se han detectado en concentraciones no citotóxicas o carcinogénicas de formaldehído y representa uno de los efectos genotóxicos tempranos en tejidos blanco en donde la concentración de formaldehído es proporcional a la inducción de estos aductos y existe una correlación entre ambos

parámetros y la incidencia de tumores en esos tejidos por los que se sugiere a la formación de aductos ADN-Proteínas como un marcador biológico de la evaluación de riesgo al cáncer inducido por formaldehído (Casanova y cols., 1991; Casanova y cols., 1994).

La inducción de aductos ADN-Proteínas por exposición a diversos agentes carcinógenos (entre los que se encuentran los arsenicales) ha sido propuesto como un indicador de daño temprano al ADN (Ramírez y cols., 2000; Costa y cols., 1997; Costa y cols., 1993).

CAPITULO II

GENERALIDADES DEL ARSENICO

El arsénico (As) inorgánico es considerado como un agente potencialmente carcinógeno para el hombre (NRC, 1999; IARC, 1987). En poblaciones expuestas el As es asociado a tumores de hígado, piel, pulmón y vejiga (Goering y cols., 1999; NRC, 1999; Kitchin y cols., 2001; Basu y cols., 2001; Ahmad y cols., 2002).

El As se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, tanto en el aire como en el agua, en su forma metaloide o formando parte de diversos compuestos químicos (Mandal y cols., 2002). 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.

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 (Rosen y cols., 2002 ; Kitchin y cols., 2002).

El As entra a la atmósfera primariamente por formaciones geológicas (Rosen y cols., 1999) , se ha reportado que la concentración de As en la tierra se incrementa a profundidades menores de 22m y decrece a profundidades mayores de 22m , incidentes por contaminación del As en el agua han sido reportados en Taiwán, México, Chile, Argentina , Tailandia, Bangladesh e India, otros casos de toxicidad crónica por arsénico en menor cantidad han ocurrido en Polonia, USA, Canadá, Hungría y Japón (WHO, 2001).

Según la WHO, los niveles permitidos de As en agua son de 0.01mg/L y el máximo permisible es 0.05mg/L. (Basu y cols., 2001).

El As es también un contaminante industrial, el trióxido de arsénico se usa en la manufactura de vidrio, diversos compuestos de arsénico son usados como

semiconductores, pesticidas, preservadores de madera, empleados en la manufactura de azúcar y liberados en procesos de combustión de fósiles, de incineración, etc.

(Nriagu y cols., 1990; Rosen y cols., 2002).

La mayoría de los humanos están expuestos crónicamente a bajas concentraciones de As, principalmente por la ingestión continua de comida y agua contaminada con este metaloide y sus derivados y algunos más por la inhalación de As el aire del ambiente. Las manifestaciones clínicas por envenenamiento crónico con As son muchas, las más comunes incluyen lesiones en piel, melanosis, conjuntivitis, queratosis, hiperqueratosis, casos de gangrena y neoplasias malignas en diversas partes del cuerpo (Guha- Mazumder y cols., 2001; Yeh y cols., 1968; Tsen y cols., 1977).

Transporte y distribución en el medio ambiente

El arsénico se libera en la atmósfera mediante procesos de alta temperatura, como los de las centrales eléctricas alimentadas con carbón, la combustión de vegetación y los volcanes. El proceso natural de biometilación y reducción a arsinas a baja temperatura también libera arsénico en la atmósfera. La mayor parte del arsénico se libera en la atmósfera como As_2O_3 , y se mantiene sobre todo adsorbido sobre la materia particulada. El viento dispersa estas partículas, que vuelven a la tierra mediante deposición húmeda o seca. Las arsinas que se liberan de fuentes microbianas en el suelo o los sedimentos se oxidan en el aire, reconvirtiendo el arsénico en formas no volátiles que vuelven a la tierra. Entre las formas de arsénico disueltas en la columna de agua figuran el arseniato, el arsenito, el ácido metilarsónico y el ácido dimetilarsínico. En aguas y sedimentos bien oxigenados, casi todo el arsénico presente se encuentra en estado pentavalente, termodinámicamente más estable (arseniato). Algunas especies de arsenito y arseniato pueden intercambiar

el estado de oxidación en función del potencial de oxidación-reducción, el pH y los procesos biológicos, otras especies del arsenito tienen afinidad por las superficies con minerales de la arcilla y la materia orgánica y esto puede afectar su comportamiento en el medio ambiente. Es posible la emisión de arsénico cuando se producen fluctuaciones en el potencial de oxidación-reducción, el pH, la concentración de arsénico soluble y el contenido orgánico de los sedimentos. La erosión del viento o el agua puede transportar rocas y suelo meteorizados. Muchos compuestos de arsénico tienden a adsorberse en el suelo, y con la lixiviación suelen recorrer distancias cortas en este medio (IPCS, 2003)

Niveles en el ambiente y exposición humana

Las concentraciones medias de arsénico total en el aire de zonas rurales oscilan entre 0,02 y 4 ng/m³, las concentraciones medias de arsénico total en las zonas urbanas oscilan entre 3 y unos 200 ng/m³; se han medido concentraciones mucho más altas (> 1000 ng/m³) en las proximidades de fuentes industriales, aunque en algunas zonas están disminuyendo gracias a las medidas de reducción de la contaminación. Las concentraciones de arsénico en alta mar suelen ser de 1-2 µg/litro. El arsénico está ampliamente distribuido en el agua dulce superficial, siendo normalmente las concentraciones en ríos y lagos inferiores a 10 µg/litro, aunque en muestras aisladas se puedan alcanzar hasta 5 mg/litro cerca de fuentes antropogénicas. Los niveles de arsénico en el agua freática son como promedio de alrededor de 1-2 µg/litro, excepto en las zonas con rocas volcánicas y depósitos de minerales de sulfuro, donde los niveles de arsénico pueden llegar a 3 mg/litro. Las concentraciones medias de arsénico en los sedimentos oscilan entre 5 y 3000 mg/kg, correspondiendo los niveles más altos a zonas contaminadas. La concentración de fondo en el suelo varía de 1 a 40 mg/kg, con valores medios frecuentes de alrededor de 5 mg/kg. Las concentraciones naturales elevadas de arsénico pueden estar asociadas con

determinados sustratos geológicos, tales como las menas de sulfuro. Los suelos contaminados por actividades humanas pueden tener concentraciones de arsénico de hasta varios gramos por 100 ml.

Los organismos marinos suelen contener residuos de arsénico que oscilan entre < 1 y más de 100 mg/kg, predominantemente en forma de especies de arsénico orgánicas, como arsenoazúcares (macroalgas) y arsenobetaina (invertebrados y peces). En los organismos acuáticos se produce una bioacumulación de compuestos de arsénico orgánicos, tras su biogénesis a partir de las formas inorgánicas. Los factores de bioconcentración para los compuestos de arsénico son más bajos en los invertebrados y los peces de agua dulce que en los organismos marinos. No se ha observado bioamplificación en las cadenas alimentarias acuáticas. Las concentraciones de fondo de arsénico en la biota de agua dulce y terrestre son normalmente inferiores a 1 mg/kg (peso fresco). Las plantas terrestres pueden acumular arsénico por absorción radicular del suelo o mediante la adsorción del arsénico que deposita el aire en las hojas. Las concentraciones de arsénico son más elevadas en las muestras de biota recogidas en fuentes antropogénicas o en zonas con actividad geotérmica. Algunas especies acumulan niveles importantes, con concentraciones medias de hasta 3000 mg/kg en zonas con minas arsenicales.

La exposición humana no ocupacional al arsénico en el medio ambiente se produce fundamentalmente a través de la ingestión de alimentos y de agua. De éstos, suelen ser los alimentos los que más contribuyen a la ingesta diaria de arsénico total. En algunas zonas, el arsénico que contiene el agua de bebida es una fuente importante de exposición al arsénico inorgánico. En estos casos, el agua de bebida es con frecuencia lo que más contribuye a la ingesta de arsénico diaria. Los suelos contaminados, por ejemplo con desechos de minas, son también una fuente potencial de exposición al arsénico. La ingesta diaria de arsénico total a partir de los alimentos y las bebidas

oscila generalmente entre 20 y 300 $\mu\text{g}/\text{día}$. Los limitados datos disponibles indican que alrededor del 25% del arsénico presente en los alimentos es inorgánico, pero esto depende sobre todo del tipo de alimentos ingeridos. Los niveles de arsénico inorgánico en los peces y los mariscos son bajos (< 1%). Productos alimenticios como la carne, los productos lácteos y los cereales tienen niveles más elevados de arsénico inorgánico. De la exposición pulmonar pueden proceder hasta alrededor de 10 $\mu\text{g}/\text{día}$ en un fumador y en torno a 1 $\mu\text{g}/\text{día}$ en una persona no fumadora, siendo más elevados los valores en las zonas contaminadas. La concentración de metabolitos de arsénico inorgánico en la orina (arsénico inorgánico, ácido metilarsénico y ácido dimetilarsénico) refleja la dosis absorbida de arsénico inorgánico con carácter individual. En general, oscila entre 5 y 20 μg de arsénico/litro, pero puede incluso superar los 1000 $\mu\text{g}/\text{litro}$.

En lugares de trabajo con prácticas de higiene ocupacional actualizadas, la exposición generalmente no supera los 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (promedio ponderado por el tiempo de ocho horas). Sin embargo, en algunos lugares se han notificado concentraciones de arsénico atmosférico en los recintos de trabajo de hasta varios mg por metro cúbico (IPCS, 2003).

Fuentes contaminantes de Arsénico

Dadas las variadas fuentes de arsénico, tanto naturales como antropogénicas, no resulta extraño que los vegetales y animales lo capten y que llegue al hombre a través de los alimentos y agua contaminada (Mandal y cols., 2002; Rosen y cols., 2002).

Fuentes naturales

El arsénico está presente en más de 200 especies minerales, de las cuales la más común es la arsenopirita. Se ha estimado que alrededor de un tercio del flujo atmosférico de arsénico es de origen natural (TABLA A). La actividad volcánica es la fuente natural más importante de arsénico, seguida de la volatilización a baja temperatura. En el agua freática utilizada como agua de bebida en varias partes del mundo, por ejemplo en Bangladesh (Basu y cols., 2001) hay arsénico inorgánico de origen geológico. Los compuestos orgánicos de arsénico, por ejemplo la arsenobetaina, la arsenocolina, las sales de tetrametilarsonio, los arsenoazúcares y los lípidos con arsénico se encuentran fundamentalmente en organismos marinos, aunque también se han detectado algunos de estos compuestos en especies terrestres (IPCS,2003).

TABLA A: Fuentes Naturales de exposición al Arsénico y sus derivados

Fuente:

Suelo, Rocas
Agua, sales
vegetales
Tejidos Animales (mariscos Hígado de cerdo)

Formas principales del Arsénico encontradas en la Naturaleza (generalmente Pentavalente).

Compuesto	Fórmula
Arsenolita	As_4O_6
Rejalgar	As_2S_2
Oropimento	As_2S_3
Mispíckel	$AsFeS$
Cobaltita	$AsCoS$
Arseniuros	$AsCo_2$ As_3F_4 $AsNi$ $AsNiS$

(Basu Y cols., 2001)

Fuentes antropogénicas

El arsénico elemental se obtiene por reacción del trióxido de arsénico (As_2O_3) con carbón vegetal. El As_2O_3 es un subproducto de las operaciones de fundición de metales. Se ha estimado que el 70% de la producción mundial de arsénico se utiliza en el tratamiento de la madera como arseniato de cobre y cromo, el 22% en productos químicos de uso agrícola y el resto en la obtención de vidrio, productos farmacéuticos y aleaciones no ferrosas (IPCS, 2003). La mayor parte del arsénico que existe en el agua y en el ambiente proviene de la actividad humana (TABLA B). Estas sustancias pasan al ambiente durante su empleo como insecticidas o herbicidas, en cultivos tan variados como la vid, el algodón, verduras, tomates, café, cocoa, etc. También se emplean como esterilizantes del suelo, como preservadores de maderas o como antiparasitarios para ovejas y cabras. El arsénico metálico se usa en aleaciones de plomo y cobre y en la fabricación de semiconductores. Debido a su frecuente presencia en los minerales, no es de extrañar que se produzcan descargas intensas de arsénico al ambiente a partir de los gases de chimeneas y líquidos de descarga industrial provenientes de fundiciones de minerales, especialmente los no ferrosos, tales como cobre, estaño y cobalto, entre otros (Mandal y cols., 2002).

TABLA B: Fuentes Antropogénicas de exposición al As y sus derivados

Forma (generalmente Pentavalente)	Fuente Antropogénica
As_2O_5	Preparación de arseniatos que se usan como defoliantes; Plaguicidas, preservadores de madera.
As_2O_3	Insecticida en viñedos, baños para cabras y ovejas(funjicida), esterilizante de suelos; decoloración de vidrios
Arsenicales Orgánicos	Terapéutica humana y veterinaria
As	Subproducto de fundición de metales aleaciones con Pb y Cu

(Mandal y cols., 2002)

Exposición a Arsénico

Vías de entrada

Como se sabe, cuanto más liposoluble sea un compuesto, más fácilmente penetrará las distintas membranas biológicas. Desde este punto de vista, los arsenicales orgánicos como la lewisita (de naturaleza iónica) y los fenilarsenóxidos, que son liposolubles, penetran rápidamente, en cambio, los arsenicales inorgánicos, lo hacen con mayor dificultad (WHO, 2001). No obstante, se absorben por inhalación, ingestión y en cierta proporción, a través de la piel (TABLA C).

TABLA C: Absorción de Arsénico

Vía de entrada	Exposición	Absorción
Pulmonar	Ocupacional	50%
Gastrointestinal	Ambiental	Variable
Cutánea	Ocupacional	Poca

(Weste y cols., 1993)

Distribución

La distribución del arsénico depende de la perfusión sanguínea, el volumen tisular, coeficiente de difusión, características membranales y afinidad tisular (Mandal y cols., 2002).

Una vez absorbidos, el arsénico o sus derivados se distribuyen entre los distintos compartimentos corporales. El modo de distribuirse es importante en relación a los efectos y depende del compuesto, de la especie y del tiempo después de la administración o la incorporación en que se efectúa la medida de la distribución.

Esto último se debe a que, a tiempos cortos, los valores reflejan las distintas velocidades de irrigación de los diferentes órganos, en tanto que a tiempos más largos, reflejan principalmente las distintas permeabilidades tisulares y la capacidad de cada órgano de interactuar con el arsénico. Esta interacción se verifica fundamentalmente, en la fracción proteica del tejido en cuestión y se cree que ocurre con los grupos sulfhidrilo.

En el organismo humano, el arsénico se concentra en los leucocitos y se acumula fundamentalmente en hígado, riñón, pelo, dientes, uñas y piel (Marafante y cols., 1982).

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 metabolizado por una secuencia de procesos que involucran 2 electrones para la reducción de As pentavalente a As trivalente, seguida de la metilación oxidativa a dos derivados arsenicales metilados, el ácido monometilarsénico (MMA) y el ácido dimetilarsénico (DMA) (FIGURA 2), los cuáles junto con la especie no metilada de arsénico son excretadas en la orina (Moore y cols., 1997; Sordo y cols., 2001). La metilación de arsénico es considerado un

mecanismo de detoxificación (Ahmad y cols.,2002), cabe mencionar que algunos estudios demuestran que los metabolitos metilados del As son más citotóxicos y genotóxicos que el arsénico inorgánico(Brown y cols.,1997; Ahmad y cols.,1999 ;Petrick y cols.,2000 ;Mass y cols.,2001)..

En mamíferos el As es metabolizado a las especies mono y dimetiladas por enzimas metiltransferasas, para estas reacciones se requiere S-adenosyl-metionina (SAM) como cofactor, la diversidad de especies y en el mecanismo de la metiltransferasa explica la amplia variabilidad en la sensibilidad a la toxicidad al arsénico entre animales y el hombre (Le y cols., 2000).

Estudios *in vitro* han mostrado que el glutatión (GSH) es requerido para la reducción de arseniato a arsenito (Buchet y cols., 1985).

Se sabe que en algunos procesos biológicos, el arseniato puede tomar el lugar de fosfato y competir con éste debido a su similitud con él. Por ejemplo en la formación de ATP, el arseniato parece reemplazar a los fosfatos en los ésteres para dar arsenal-ADP, el cual es inestable y se degrada (Aposhian y cols., 1989; Mandal y cols., 2002).

También hay una interacción competitiva del arseniato con el fosfato en la absorción tubular. Se ha postulado que el arsénico podría sustituir erróneamente al fósforo durante la síntesis de ácidos nucleicos y causar, de este modo uniones débiles en el ADN.

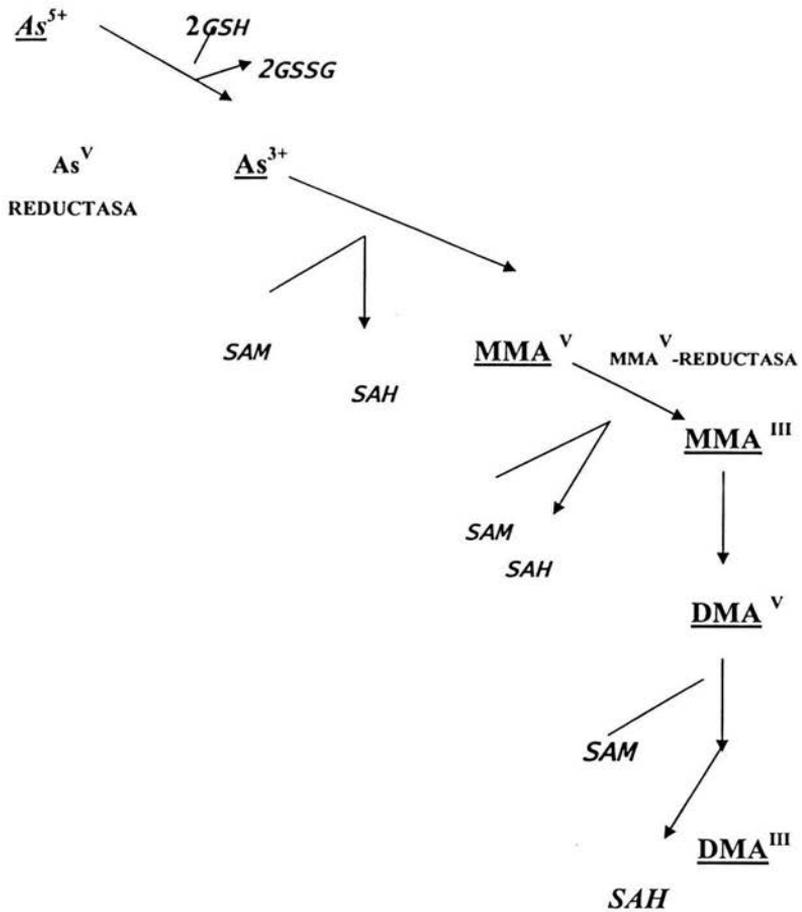


FIGURA 2: Biotransformación del Arsénico

(Fig. Modificada de: Groering y cols., 1999; Kitchin y cols., 2001)

Destoxificación bioquímica del Arsénico

Todos los organismos vivos tienen un sistema de detoxificación del arsénico,

Dentro de los más estudiados encontramos:

- a) Conversión de As^V a arsenato por medio de transportadores de fosfato
- b) Reducción de As^V a As^{III} por arsenato reductasas
- c) Mecanismo de secuestro de As^{III}

(Rosen y cols., 2002).

Se cree que aunque un mecanismo en la biotransformación del arsénico como lo es la metilación puede en ocasiones incrementar su toxicidad, se apoya más el hecho de que sea un camino para su detoxificación (Rosen y cols., 2002).

El procarionte *E.Coli* y el eucariote *Sacharomyces cerevisiae* tienen dos transportadores de fosfato, Pit y Pst (Rosenberg ,1977; Styblo ,2002). Existen experimentos realizados por (Willsky y cols., 1980) que sugieren que en ambos tipos de células estos transportadores de fosfato tienen una participación activa en el proceso de detoxificación del As (Bun-Ya y cols., 1996; Yompakdee y cols., 1996). De esto podría asumirse que el arsenato tiene un mecanismo similar en los mamíferos, pero esto no ha sido aún demostrado (Rosen y cols., 2002).

Vías de eliminación

El arsénico y sus compuestos difieren bastante entre sí en cuanto a las velocidades y las vías de excreción (FIGURA 3).

La eliminación del arsénico inorgánico puede depender de su valencia, sobre todo cuando se trata de dosis elevadas. Los estudios en animales de laboratorio indican que la administración de arsénico inorgánico trivalente, como el As_2O_3 y el arsenito, produce inicialmente en la mayoría de los tejidos niveles más altos que la administración de arsénico pentavalente. Sin embargo, la forma trivalente se metila en mayor medida, dando lugar a una excreción prolongada semejante. Los compuestos órganoarsenicales ingeridos, como los ácidos metilarsónico y dimetilarsínico y la arsenobetaína, se metabolizan mucho menos y se eliminan con mayor rapidez en la orina que el arsénico inorgánico, tanto en animales de laboratorio como en el ser humano (IPCS, 2003).

Por ejemplo, los arsenicales pentavalentes se excretan rápidamente por el riñón, lo cual se debe a que interactúan poco con los tejidos. En cambio, los trivalentes se excretan más lentamente, lo cual es posible en la medida en que el compuesto se libera de forma combinada en que se encuentra en los tejidos (Mandal y cols., 2002).

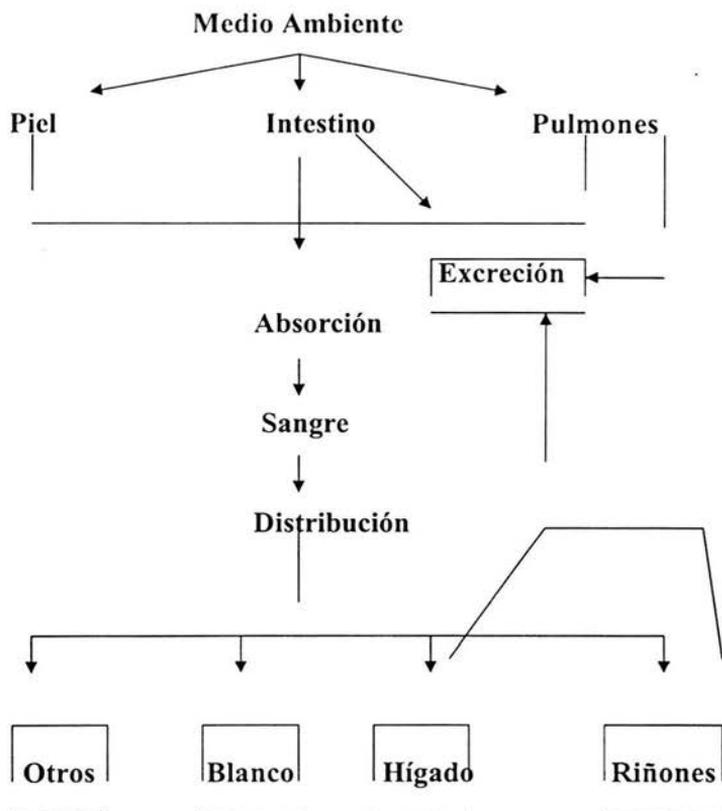


FIGURA 3: Las rutas posibles que sigue un tóxico como el Arsénico en el organismo (Kopplin, 2001)

Biomarcadores de exposición a Arsenicales

Los niveles de arsénico o de sus metabolitos en la sangre, el pelo, las uñas y la orina se utilizan como biomarcadores de la exposición al arsénico. El arsénico en sangre es un biomarcador útil solamente en el caso de intoxicación aguda por arsénico o de exposición crónica estable elevada. El arsénico se elimina de la sangre con rapidez y la especiación de su forma química en la sangre es difícil. Su presencia en el pelo y las uñas puede ser un indicador de una exposición anterior al arsénico, siempre que se tenga la precaución de impedir la contaminación de las muestras con arsénico externo. El arsénico en el pelo se puede utilizar también para estimar el período de tiempo relativo desde una exposición aguda. La especiación de los metabolitos en la orina expresados como arsénico inorgánico o bien como la suma de los metabolitos (arsénico inorgánico + ácido metilarsónico + ácido dimetilarsónico) proporciona la mejor estimación cuantitativa de la dosis de arsénico absorbida recientemente. Sin embargo, el consumo de ciertos alimentos marinos, principalmente algas y algunos bivalvos, puede confundir en la estimación de la exposición al arsénico inorgánico, debido al metabolismo de los arsenozúcares para dar lugar a ácido dimetilarsónico en el organismo o a la presencia de ácido dimetilarsónico en los alimentos marinos. Dichos alimentos deberían evitarse durante dos o tres días antes del muestreo de la orina para vigilar la exposición al arsénico inorgánico. Hay diversas técnicas instrumentales para la determinación del arsénico. Entre ellas figuran la espectrometría de absorción atómica (AAS), la espectrometría de fluorescencia atómica (AFS), la espectrometría electrónica de Auger de plasma con acoplamiento inductivo (ICP-AES), la espectrometría de masas de plasma con acoplamiento inductivo (ICP-MS) y la voltametría. Algunas de éstas (por ejemplo, la espectrometría de masas de plasma con acoplamiento inductivo) pueden servir como detectores específicos del elemento cuando se combinan con técnicas de separación

cromatográficas (por ejemplo, la cromatografía líquida de alto rendimiento y la cromatografía de gases). Estos métodos que combinan la cromatografía con la espectrometría se utilizan para determinar especies concretas de arsénico. Con frecuencia se puede conseguir una mayor sensibilidad para una serie limitada de compuestos de arsénico mediante el uso de técnicas de generación de hidruros. En Bangladesh se está utilizando actualmente un estuche de pruebas basado en la reacción coloreada de la arsina con el bromuro mercuríco para el análisis de las aguas freáticas, con un límite de detección de 50-100 µg/litro en las condiciones que se encuentran sobre el terreno (IPCS, 2003).

Carcinogénesis

En cuanto a estos efectos, lo primero que llama la atención es que los estudios epidemiológicos en humanos y los estudios experimentales en modelos de laboratorio. son contradictorios entre sí, ya que mientras los efectos carcinogénicos en humanos son nítidos (TABLA D) (Morales y cols.,2000; WHO,1992) , en animales la mayor parte de los estudios son negativos (Wang y cols., 2002; NRC,1999).

Aunque los resultados epidemiológicos de humanos expuestos a arsenicales en áreas endémicas o por exposición ocupacional son suficientes para demostrar los efectos carcinogénicos del arsénico y sus metabolitos donde han sido ampliamente asociados con cáncer de piel, pulmón, riñón y vejiga (IARC, 1987; IPCS/WHO,2001; Rossman y cols.,2001; Kitchin y cols.,2001), y que existan diversas teorías para explicar los principales eventos que suceden

en la exposición de As para la generación de un cáncer (FIGURA 4).

los mecanismos involucrados en la formación de neoplasias por el As en contraste con otros carcinógenos humanos no se conoce bien. esto se debe en parte a que el

metaloide no induce mutaciones en células bacterianas o en células de animales (Rossman y cols.,1980), aunado a esto existe una falta de predictividad en modelos experimentales para este agente, probablemente por las diferencias metabólicas entre especies y la marcada variación Inter-Individual en el metabolismo del arsénico (Vahter y cols.,1999;Vahter y cols.,2002).

Para entender la carcinogénesis del arsénico, se han realizado experimentos en varias especies animales entre las más estudiadas encontramos ratones, ratas, hamsters y primates etc. (Wang y cols., 2002). , sin embargo aún se desconoce la respuesta exacta a esa pregunta,

Respecto al mecanismo de acción hay quienes creen que el arsénico podría suprimir los factores de resistencia en el huésped y así facilitar la supervivencia de tumores espontáneos, otros más plantean que es un carcinógeno débil, como lo sugiere el largo período de latencia y la alta concentración de As necesaria para desarrollar los tumores en humanos. (Groering y cols., 1999).

TABLA D: Correlación entre exposición a arsénico y cáncer humano

Fuente	Tipo de Cáncer
Contaminación del agua de consumo	Piel, Pulmón, Gastrointestinal
Pacientes Tratados con solución de Fowler	Piel
Empleados de fabricas de baños antiparasitarios de ovejas y cabras	Piel y pulmón
Trabajadores de minas y fundiciones de metales	Pulmón
Usuarios de insecticidas arsenicales	Piel, Pulmón e hígado
Fundidores de Cobre	Colón y Nariz

(Morales y cols., 2000)

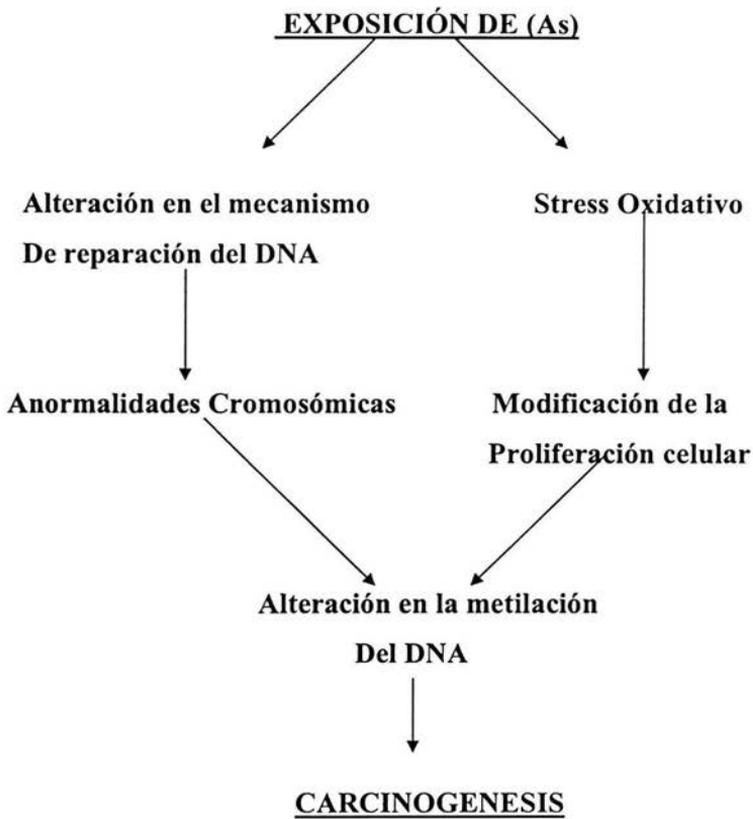


FIGURA 4: Mecanismo de acción de la Carcinogenesis del Arsénico (Groering y cols., 1999)

Falta página

N° 39

El arsénico inorgánico (arsenito y arsenato) es un agente co-mutagénico con diversos agentes químicos (Wiencke and Yager, 1991) y con radiaciones electromagnéticas (Jha y cols., 1992) en células humanas, donde la frecuencia de entrecruzamientos ADN-proteínas y de aberraciones cromosómicas se ven potencializadas después de la exposición a arsenito de sodio (Hughes y cols., 2002).

En un estudio realizado en células ováricas de hámster chino administradas con arsénico y expuestas a radiaciones UV, se demostró un incremento sinérgico en la inducción de aberraciones cromosómicas y en la mutación del locus HPRT (Lee y cols., 1985; Okui and Fujiwara, 1986; Li y cols., 1991).

Se ha encontrado también que concentraciones bajas de arsenito de sodio (carcinógeno ambiental no-mutagénico) puede tener un efecto sinérgico en la mutagenicidad de otros agentes como los alquilantes y las radiaciones UV y este efecto co-mutagénico parece resultar de la inhibición de la reparación del DNA por arsénico (Rossman y cols., 2001).

Alteraciones moleculares asociadas a la exposición de As

Dentro de las teorías más aceptadas del (los) posible (s) modo (s) de acción de carcinogénesis del Arsénico tenemos las siguientes:

- A) Aberraciones cromosómicas
- B) Estrés oxidativo
- C) Alteraciones en la reparación del DNA
- D) Alteración en los patrones de metilación del DNA
- E) Alteración en los Factores de Crecimiento
- F) Inducción de la proliferación celular
- G) Transformación celular
- H) Promoción/Progresión de Cáncer
- I) Amplificación de Genes

J) Supresión de p53

(Kitchin y cols; 2001).

Aberraciones Cromosómicas

Históricamente se ha tenido la idea de que el As es un carcinógeno “No-Genotóxico”, esta creencia esta siendo sepultada por los recientes trabajos que demuestran una fuerte actividad biológica y genotóxica de los metilados trivalentes del arsénico (Kitchi y cols., 2003).

El arsénico es reconocido generalmente como un carcinógeno no mutagénico, por que el arsenito de sodio induce daño al DNA solo a altas concentraciones.

En un estudio se demostró que concentraciones alrededor de 0.2Mm de Arsénico puede inducir daño al DNA ,cambios cromosómicos, estructurales y numéricos transformación celular y el desarrollo de cáncer en células de humano y en células ováricas de hámster chino (Tsu-Shing Wang y cols.,2001; Basu y cols., 2001).

El arsénico y sus metabolitos pueden inducir daño al DNA en múltiples pruebas y ensayos *in vitro* (Basu y cols., 2001). Algunos reportes indican que el Arsénico promueve el daño genético en gran manera por la inhibición de la síntesis del DNA (Rossman y cols., 2002) y el retardo de la replicación del DNA (Shannon y cols., 1989 ;Bencko y cols.,1988).

El arsenito induce entrecruzamientos DNA-Proteínas y la expresión de citoqueratinas en células hepáticas humanas WRL-68 (Ramírez y cols., 2000).

En los ensayos de exposición a arsénico se han observado aberraciones cromosómicas (AC), intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y formación de micronúcleos (MN) *in vitro* e *in vivo* en células humanas y de roedores (Kitchin y cols., 2001; Gurr y cols., 1998; Biggs y cols., 1997; Liu y cols., 1997, NRC, 1999).

Por otro lado se demostró que los niveles de MN pueden disminuir al remplazar el agua de bebida por otra que contenga concentraciones mínimas de As (Moore, 1997).

En los linfocitos periféricos de personas consumidoras de agua contaminada con 400ug/L de arsénico se ha observado un aumento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas (Beckman y cols., 1977; Nordenson y cols., 1978, Petres y cols., 1977). También se encontró un aumento en la frecuencia de (MN) en células exfoliativas uroteliales (Warner y cols., 1994) y en células exfoliativas epiteliales de vejiga y cavidad oral (Gonsebatt y cols., 1997), de humanos expuestos a altos niveles de As en el agua de bebida.

Ensayos de citogenicidad en ratones demuestran también la presencia de aneuploidias y arresto mitótico causado por diversos arsenicales, se sugiere que el arsénico causa endoreduplicación por inhibición en la actividad de la proteína fosfatasa e hiperdiploidia por la disrupción de la función del microtubulo (Bernstam y cols., 2000; Eguchi y cols., 1997).

Los arsenicales son altamente clastógenos (Kitchin y cols., 2001), experimentos realizados por Barrett (1989) indican que el arsénico trivalente es un agente clastogenico más potente que la forma pentavalente.

Li y Rossman (1989) sugieren que la clastogenicidad del arsénico ocurre por la alta afinidad del arsénico por los grupos sulfhídricos y la interacción del As con la proteína tubulina.

Se ha propuesto que la carcinogénesis ocurre subsecuentemente al efecto clastogénico inducido por el arsénico, pero a pesar de los esfuerzos realizados la relación entre la demostrada clastogenicidad del As y la generación del cáncer todavía no ha sido descubierta (Kitchin y cols., 2001).

Estrés Oxidativo

Estudios epidemiológicos indican que el arsénico es un carcinógeno humano, que puede tener más de un mecanismo para producir el efecto carcinogénico (Kitchin y cols., 2003).

El arsénico interviene en las señalizaciones celulares, induce stress oxidativo, con daño al DNA que alteran la transcripción del material genético con una cascada de eventos adversos, como son su proliferación celular incontrolada, desregulación de la apoptosis (Hossain y cols., 2000; Chen y cols., 1998) y la inhibición de la reparación del DNA (Hughes y cols., 2002).

Varios mecanismos han sido propuestos en la dilucidación del fenómeno de carcinogénesis inducida por As, muchos de ellos asocian el daño encontrado con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La presencia de estas en el metabolismo del As se ha relacionado con la inducción de un tipo de aducto entre el ADN y algunas proteínas (DPC) en células humanas y de ratón así como en la activación o inactivación de factores de transcripción que promueven la carcinogénesis (Yamanaka y cols., 1993.)

Las especies ROS han sido detectados en cultivos híbridos de células humano-hámster a los 5 minutos después de la exposición a arsénico de sodio (Liu y cols., 2001).

Existen evidencias que indican que el arsénico induce estrés oxidativo

In vitro e *in vivo* y las especies reactivas generadas pueden reaccionar con constituyentes celulares, alterar el estado redox de las células y presentar un estado de toxicidad celular (Kitchin y cols., 2003; Keyse y Tyrell, 1989; Brown y Rush, 1984)

El arsenito de sodio eleva los niveles de súper oxido en células humanas de músculo liso, causando daño oxidativo al DNA (Lynn y cols., 2000). El daño al DNA ocurre

como resultado del incremento de la producción de óxido nítrico (Tsu-Shing Wang y cols., 2001; Liu y cols., 1998).

Para investigar el papel de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en la inducción de ODA y DPC, se realizaron experimentos en dos líneas celulares, NB4 y HL60, los resultados revelan que existe una disminución en la inducción de ODA y DPC cuando se adicionan a los medios de cultivo inhibidores de óxido nítrico sintetiza y superóxido dismutasa, lo cual sugiere que el óxido nítrico está participando en la inducción por Arsénico de ODA y DPC (Hughes y cols., 2002; Tsu-Shing Wang y cols., 2001).

También se ha observado que el estrés oxidativo ocasionado por el As en cultivos de células neuronales es revertido por antioxidantes como la vitamina C, E y el ácido dimercaptosuccínico (DMSA), indicando que existe una posible protección de estos agentes antioxidantes ante la toxicidad del As (Chattopadhyay y cols., 2002)

El As inorgánico induce la síntesis de varias proteínas incluidas las de estrés, la hemo oxigenasa, las queratinas CK-18, la metalotioneína, la actina, la tubulina y el gen de resistencia múltiple a antibióticos MDR1 (Albores y cols., 1992)

El arsénico como agente inductor de estrés oxidativo en el hígado, presenta una capacidad variable en la expresión de proteínas de choque térmico (hsp70 y hsp90 principalmente), de moléculas señalizadoras como el factor nuclear kappa-B (NF-kB), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la ciclooxigenasa (Cox-2); entre otras moléculas asociadas con procesos de inflamación vascular y de proliferación celular (Del Razo, 2001).

Los arsenicales trivalentes orgánicos inhiben la GSH reductasa (Styblo y cols., 1997) y la tioredoxin reductasa (Lin y cols., 1999), y de la inhibición de estas enzimas puede resultar un deterioro en la habilidad de las células en la protección ante agentes oxidantes. La expresión de genes puede verse también afectada por la disminución en los niveles de tioredoxin, ya que esta proteína tiene un papel importante en regular la

unión de factores de transcripción al DNA (Arrigo y cols., 1999, Powis y cols., 2000).

Alteración en los procesos de reparación del DNA

Se sabe que el arsénico se une a los grupos sulfhidricos activos por medio de uniones covalentes inhibiendo la actividad de más de 200 enzimas (Abernathy y cols., 1999). Esto puede ocasionar cambios en el sistema redox, adición de este complejo (As-Proteína) con otras moléculas (azúcares) o entidades celulares, lo que altera el buen funcionamiento celular. La teoría de que el arsénico inhibe los mecanismos de reparación de DNA, es particularmente atractiva, ya que este tipo de daño llevaría a mutaciones en el material genético y la subsecuente producción del cáncer (Kitchin y cols., 2001).

Algunos trabajos concernientes a la reparación del DNA, muestran que las enzimas DNA ligasas I y II son inhibidas hasta en un 55% por el arsenito.(Li and Rossman,1989; Lee-Chen y cols.,1993), y que esta inhibición no es directa (Li and Rossman,1989), se ha sugerido que el arsenito puede indirectamente inhibir la actividad de la DNA ligasa, alterando los niveles redox celulares , afectando las señales de transducción y los caminos de la fosforilación de proteínas (Hu y cols.,1998). Otros estudios con enzimas de reparación purificadas de (células T/ linfoma) humano, revelan que el arsenito incrementa la actividad de la DNA-polimerasa beta, *O*-methyl-guanina-DNA methyltransferase y las DNA ligasa I, II y III (Hu y cols., 1998) e inhibe en un 50% la actividad de poly-ADP-ribosa-polimerasa (PARP) y un 80% en la viabilidad celular (Yager y Wiencke, 1997). Esta enzima tiene dos grupos sulfhídricos vecinos, y el arsenito puede unirse a uno o ambos grupos y de esa manera inhibir su actividad enzimática (Hughes y cols., 2002). En células eucariotas en respuesta al rompimiento en la cadena de DNA inducido por As, hay una estimulación de la enzima poly-(ADP-ribosa) polimerasa y esta enzima

puede tener un papel importante en los efectos de reparación del DNA (Berg y cols., 1985, Grube y cols., 1991)

Otros investigadores han observado que el mecanismo de reparación por excisión de nucleótidos (NER) es inhibida por la presencia de arsénico inorgánico en el medio de cultivo de fibroblastos humanos (Okui and Fujiwara, 1986).

Alteración en los patrones de metilación del DNA

La alteración en los procesos de metilación del DNA causados por el arsénico puede tener un papel muy importante en el desarrollo de la carcinogénesis (Counts and Goddman., 1995; Mass and Wang ,1997).

Los cambios en los estados de metilación normal del DNA pueden alterar la expresión de genes y llevar a la aparición del cáncer (Kitchin y cols., 2001).

En el DNA de hígados de ratas se observo una hipometilación y ese efecto fue dependiente de la dosis y el tiempo de exposición con arsenito de sodio y en estas células los niveles del metil-donador SAM están disminuidas (Zhao y cols., 1997).

La hipometilación e hipermetilación del DNA fueron demostradas en células pulmonares de humano después de la exposición ocupacional severa de arsenito de sodio y en diferentes líneas celulares humanas de riñón y pulmón asociadas a la exposición de As. (Zhong y Mass., 2001)

Aunque los efectos y los mecanismos de la alteración en la metilación del DNA no están bien esclarecidas, los resultados indican que ambos estados, hipermetilación e hipometilación y un aumento en la actividad de la DNA-metiltransferasa pueden encontrarse en células tratadas con arsénico (Kitchin y cols., 2001).

Alteración en los Factores de crecimiento

Se ha observado en queratinocitos humanos expuestos a arsénico un incremento en los niveles de mRNA y un aumento en la secreción del factor de crecimiento transformante-alfa (TGF- α), del factor estimulante de colonia-Granulocita Macrofaga (GM-CSF), y en el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). (Germolec y cols., 1997), un incremento en la proliferación celular de estos queratinocitos.

Un estudio posterior en queratinocitos humanos expuestos a tres metilados trivalentes de As; (Arsenito), (MMA^{III}), y un conjugado (DMA^{III}-GSH), obteniendo como resultado un incremento en la secreción de GM-CSF, TNF- α , Interleucina-6 y en la proliferación celular (Vega y cols., 2001).

Estos autores sugieren que el As induce la producción de ROS, de lo cual resulta la activación de los factores de transcripción (AP-1, c-fos, y NF κ B), la sobre secreción de factores pro inflamatorios, citocinas, resultando un incremento en la proliferación celular y finalmente la carcinogénesis (Kitchin y cols., 2001; Simeonova y Luster, 2000).

Inducción de la Proliferación celular

Un cáncer aparece en parte a la falta de control en la proliferación celular esto puede ocurrir como resultado de procesos citotóxicos (Cohen y cols., 1990).

Se dice que el arsénico interfiere en los procesos de señalización de las células, induciendo proliferación, diferenciación y transformación celular (Ostrosky-Wegman y cols., 1991; Huang y cols., 1999; McCabe y cols., 2000).

Una serie de experimentos *in vitro* demuestran que en exposiciones crónicas a arsénico se induce una pérdida en el control del crecimiento celular (Steeg y cols., 2001), lo cual sugiere que el arsénico actúa sobre las moléculas reguladores de esta función (Rossman y cols., 2001; Barchowsky y cols., 1999).

La exposición de células al arsenito de sodio, muestran un aumento en la expresión de reguladores positivos de proliferación (c-myc and E2F-1) y una disminución en los reguladores negativos de proliferación celular (MAP kinasa fosfatasa-1 y p27 kipi) (Hughes y cols., 2002).

Múltiples genes y proteínas que intervienen en la proliferación celular y que participan en las señalizaciones durante la mitogénesis se vieron afectados después de la administración de arsenito de sodio por 8 semanas en fibroblastos murinos (Trouba y cols., 2000).

La inducción de ornitina descarboxilasa (ODC) un indicador de la proliferación celular, fue observado en hígado de rata después de la administración de arsenito de sodio (1.6 mg/Kg) (Brown and Kitchin,1996), en hígado de rata después de la exposición de 10ppm de DMA (Wanibuchi y cols.,1997), en queratinocitos humanos expuestos a (0.001 uM) de arsenito de sodio (Germolec and cols.,1996;Germolec y cols.,1997 ; Vega y cols., 2001) y en células humanas de vejiga expuestas a (40ppm y 500ppm de arsenito de sodio) (Popovicova y cols.,2000).

Por otra parte se comprobó un incremento en la proliferación de células renales de rata después de 8 semanas de administrar DMA^v (100 ppm) en el agua de bebida (Wanibuchi y cols.,1996 ; Yamamoto y cols.,1995), en vejiga de rata después de la administración oral de DMA^v (57-113 mg/kg) diariamente durante 5 días (Murai y cols.,1993). Por otra parte (Arnold y cols., 1999) demostraron que hay una inducción en la proliferación de células uroteliales de ratas después de la administración de 40-100ppm de DMA^v y los efectos fueron reversibles tras quitar el DMA^v de la dieta.

Un evento común de la proliferación celular es la estimulación mitogénica, ya que la toxicidad y muerte celular inducida por As trata de ser compensada con la regeneración de las células, esto puede acarrear errores a nivel replicación de DNA, y si estos daños no son reparados, se producen mutaciones en el material genético.

Que la proliferación celular por As produzca mutación eventual en el DNA es una teoría difícil de afirmar ya que aún no conocemos si este efecto sigue una secuencia de eventos genotóxicos o no genotóxicos (Kitchin y cols., 2001).

Transformación Celular

El arsenato y el arsenito de sodio induce transformación celular dosis-dependiente en células embrionarias de hámster sirio (Lee y cols., 1985b) y en células BALB/3T3 (Bertolero y cols., 1987; Saffioto and Bertolero, 1989).

El arsenito es de 4 a 10 veces más potente que el arsenato para inducir transformación celular (Bertolero y cols., 1987).

En células de hámster el arsénico induce daño genético en loci ATPasa y PRET con lo cual se produce transformación celular (Lee y cols., 1985b).

Un análisis citogenético de células transformadas muestran endoreduplicación, aberraciones cromosómicas e ICH después de la exposición a arsenito de sodio (Hughes y cols., 2002).

El arsenito indujo transformación en una línea celular de hígado de rata (TRL 1215) las células fueron transformadas después de 8 semanas o más de exposición a arsenito de sodio (Zhao y cols., 1997).

Promoción/Progresión de Cáncer

En la carcinogénesis inducida por arsénico estos dos términos promotor y progresión son definidos operacionalmente, por que ambos términos son muy difíciles de incluir en los pasos del mecanismo particular de la iniciación de la carcinogénesis. (Kitchin y cols., 2001).

La carcinogénesis ha sido clasificada como un mecanismo que obedece un modelo mutacional/proliferación celular (Moolgavkar y cols., 1986; Clayson and Kitchin, 1999).

La proliferación celular es un mecanismo importante en la promoción del cáncer; y la mutación es un evento crucial en la iniciación y en la progresión de ese cáncer ya que de esto depende el potencial metastático y malignidad de ese daño. (Kitchin y cols., 2001).

Diversos bioensayos realizados en animales de laboratorio expuestos a arsenito y arsenato, han mostrado hasta hoy resultados negativos en cuanto a la carcinogénesis inducida por As (NRC, 1999). Lo anterior ha sido observado en tratamientos agudos con ratones a los que se les administró (250ppm de arsenito y 400ppm de arsenato) y en tratamientos crónicos en Hámster administrados con (0.3mg/Kg As₂O₃) durante 425 días y en monos cynomologus (0.1mg/Kg de arsenato) en dosis de 5 días a la semana, durante 15 años). (NRC, 1999).

Por otra parte, basados en múltiples estudios algunos investigadores demostraron que el DMA a diferencia del arsenato y arsenito si es un promotor de cáncer (Yamamoto y cols., 1995, Wanibuchi y cols., 1997) y también un cancerígeno completo (Life Science Research, 1989, Wei y cols., 1999) en vejiga de ratas y de ratones.

Este órgano (vejiga) es posiblemente el más estudiado y probablemente el mejor modelo para explicar la carcinogénesis inducida por arsénico (Kitchin y cols., 2001), sin embargo cuatro estudios realizados separadamente y resumidos en la siguiente

tabla (TABLA E) muestran resultados semejantes en otros órganos (piel, pulmón, riñón, tiroides e hígado) tanto de ratas como de ratones.

TABLA E: Carcinogénesis del DMA en Roedores

	Especies	Carcinogeno Completo	Promotor de Cáncer	DMA(ppm) /Agua	Referencia
PIEL	RATON	-	SI	1000	Yamanaka 2000
PULMON	RATON	-	SI	200	Yamanaka;1996
	RATON	SI	-	400	Hayashi;1998
VEJIGA	RATA	-	SI	50	Yamamoto;1995
	RATA	-	SI	25	Wanibuchi;1996
	RATA	SI	-	50	Wei;1999
	RATA	SI	-	100	Life.Sci.Res;1989
RIÑON	RATA	-	SI	200	Yamamoto;1995
HIGADO	RATA	-	SI	200	Yamamoto;1995
	RATA	-	SI	50	Wanibuchi;1997
TIROIDES	RATA	-	SI	400	Yamamoto;1995

Amplificación de Genes

Le y cols (1988) describen que el arsénico amplifica el gen que codifica para la enzima dihidrofolato reductasa en células de raton 3T6, estas células presentaron un incremento de 2-11 veces mas en el número de copias para este gen. La concentración efectiva de As para producir amplificación genética va de un rango de 0.2 a 0.8 uM (Arsenito), y 1 a 4 uM (arsenato).

Otros estudios muestran que el As induce la amplificación del gen de la dihidrofolato reductasa en células SHE (Woloson y cols., 1990) y en el tripanosomas arsenito-resistentes (Katakura y Chang, 1989).

Se ha demostrado que altas concentraciones de arsenato y arsenito aumentan los niveles de amplificación genética y también disminuyen marcadamente la supervivencia celular (Kitchin y cols., 2001).

Se ha sugerido que la amplificación genética inducida por As tiene un papel importante en la carcinogenesis. Si tomamos en cuenta que el arsénico no produce mutaciones puntuales y que algunos resultados revelan que los oncogenes son amplificados en los tumores de animales y humanos expuestos a As (Hughes y cols., 2002).

Supresión de p53

Experimentos *in vitro*, en tres líneas celulares (Hhela, Jurkat, y Linfoblastos) administrados con 1-50 uM de arsenito de sodio, mostraron un incremento en los niveles de la proteína p53. (Salazar y cols., 1997).

En un estudio epidemiológico realizado en una población (39 casos) de Taiwán, que fueron expuestos a arsénico, se encontró mutaciones en p53 en el 39% de los casos con enfermedad de Bowens, 29% de los casos con carcinomas de células basales y en 56% de los casos con carcinomas de células escamosas. (Hsu y cols., 1999).

Por otra parte un estudio reveló que el 30% de los pacientes que presentaron lesiones malignas en la piel tras la administración terapéutica de arsénico, presentaron también mutaciones en p53. (Castren y cols., 1998).

Intoxicación por Ingestión de Arsénico en México

En los casos de intoxicación por la ingestión crónica del arsénico contenido en el agua de consumo, se ha dicho que éste es únicamente de origen natural; sin embargo, no puede asegurarse que éste sea el caso en la comarca Lagunera en México, ya que en ella se ha usado por largo tiempo, plaguicidas que contienen arsénico en los mismos campos de donde se obtiene el agua que consumen los habitantes.

En un estudio realizado en la comarca lagunera se tomaron dos poblados: uno (Salvador de arriba, Coahuila.) Con una concentración de 0.5 mg/l de arsénico, 10 veces superior a la máxima permisible y, el otro, (San José de Viñedo, Durango). Con 0.001mg/l, lo que está dentro de la máxima permisible, por lo que se usó como control.

Se encontró que en Salvador de arriba había una incidencia de siete afecciones cutáneas de las cuales la discromía y la hiperqueratosis palmoplantar alcanzaban porcentajes de 31.7 y 14.8%.

(Mandal, 2002)

TABLA F: Intoxicación por Ingestión de Arsénico en México

Síntomas y signos
Equimosis
Petequias
Hiperqueratosis palmoplantar
Discromías
Estrías semilunares transversales en uñas
Zonas verrugosas
Atrofia cutánea

TABLA G: Síntomas observados en exposiciones humanas a arsénico en Coahuila, México.

Náuseas	Cefalea
Dolor epigástrico	Edema
Diarrea	Anemia
Estreñimiento	Conjuntivitis
Adinamia	Síndrome catarla
Astenia	Trastornos sensoriales

CAPITULO III

TOXICIDAD DEL ARSENICO

Mecanismos de toxicidad del arsénico

Las formas químicas y estados de oxidación del As son muy importantes en la toxicidad de este elemento. La toxicidad también depende de otros factores como son; estado físico, tamaño de partícula, capacidad de absorción y eliminación dentro de las células, naturaleza química de los metabolitos intermediarios y el estado nutricional del paciente (Mandal y cols., 2002).

La toxicidad de los compuestos arsenicales decrece en este orden:

Asi^{III} > MMAO^{III} > DMA^{III} GS > DMA^V > Asi^V (Vega y cols., 2001).

Estudios en animales de laboratorio y en líneas celulares de humanos sugieren que la toxicidad de los arsenicales trivalentes son más tóxicos que los arsenicales pentavalentes (Maeda y cols., 1994, United Nations Síntesis Report on Arsenic in drinking Water, 2001).

Generalmente se acepta que la metilación es el principal camino de detoxificación del arsénico, estudios más recientes sugieren que los metabolitos metilados pueden ser particularmente responsables de los efectos adversos asociados a la exposición del As (Vega y cols., 2001).

La exposición de Asi es extensivamente metabolizado en humanos y de la exposición crónica a arsénico resulta una exposición crónica a los metilados arsenicales.

Experimentos en hepatocitos humanos demostró que el MMA^{III}, metabolito de la biotransformación del arsénico inorgánico es 20 veces más tóxico que el arsenito inorgánico (Petrick y cols., 2000).

Otros estudios realizados in vitro en líneas celulares humanas de hepatocitos, epitelio bronquial, y queratinocitos epidermales muestran que los metilados trivalentes del arsénico MMA^{III} y DMA^{III} son más reactivos y más tóxicos que el (Asi) para

producir daño al DNA (Mass y cols., 2001, Styblo y cols., 2000; Vega y cols., 2001).

Arsénico trivalente

La toxicidad del As^{3+} se ha asociado a la capacidad que presenta de unirse o inactivar sistemas enzimáticos y proteínas que contienen residuos sulfhídricos. 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 As^{III} , diversos trabajos muestran la particular afinidad del metal hacia proteínas con alto contenido en grupos sulfhídrico como la tubulina (Li y Chou, 1992; Ramírez y Cols., 1997). Otros estudios indican que el Arsénico induce dosis-dependiente la inhibición de la polimerización de la tubulina (Carré y cols., 2002).

Arsénico pentavalente

El arsenato puede remplazar al fosfato en algunas reacciones bioquímicas, por que tienen una estructura y propiedades similares (Dixon y cols., 1997).

El arsenato reacciona *in vitro* con la glucosa y el gluconato para formar glucosa-6-arsenato y 6-arsenogluconato (Lagunas, 1980; Gresser, 1981).

Glucosa-6 arsenato es un sustrato para glucosa-6 fosfato dehidrogenasa, y puede inhibir hexocinasa y esto no ocurre con glucosa-6-fosfato. El arsenato puede también remplazar al fosfato en la bomba de sodio. (Lagunas y cols., 1980).

Se sugiere que el metabolismo de este metaloide (As) tiene un papel importante en los efectos toxicológicos. Hay evidencias de la alta toxicidad producida por MMA^{III} tanto en experimentos *in vivo e in vitro*. (Yamanaka y cols., 1996). Los efectos carcinogénicos y tumorales del DMA^V y la acción genotóxica directa del MMA^{III} y

DMA^{III} *in vitro* sugieren que la metilación del As puede no solamente ser un mecanismo de detoxificación (Hughes y cols., 2002).

INTOXICACION CON ARSENICO

Intoxicación aguda

La intoxicación aguda es relativamente rara, aunque puede producirse cuando hay una exposición ocupacional elevada, una ingestión accidental o ingestión con fines suicidas u homicidas.

Los efectos por intoxicación aguda con As se manifiestan rápidamente, evolucionan a formas graves de la enfermedad y ocasionalmente pueden llegar a producir la muerte (Chen y cols., 1998).

Intoxicación crónica

La intoxicación crónica se presenta después de un periodo de tiempo largo y se debe principalmente a la exposición ocupacional y/o la ingestión continua a través de los alimentos o el agua de bebida contaminada con Arsénico.

En la toxicidad crónica se observa una acumulación del As y sus metabolitos, los cuales pueden provocar a largo plazo diversas alteraciones en el organismo (Vahter y cols., 2002).

Las manifestaciones clínicas ocasionadas por la exposición crónica a compuestos arsenicales es multisistémica (Hughes y cols., 2002).

EFFECTOS DE LA TOXICIDAD DEL ARSENICO

Efectos respiratorios

Las personas expuestas a arsénico de manera natural y/o ocupacional han sido asociados con diversos efectos a nivel respiratorio como laringitis, bronquitis, rinitis, faringitis, congestión nasal y perforación de fosas nasales (Nagv y cols.,1994, Milton y cols.,2001)

Efectos Pulmonares

La ingestión crónica de arsénico se ha asociado con enfermedades pulmonares y cáncer de pulmón (Guha y cols., 1999; Chen, 1992). Los casos de exposición a arsénico y sus derivados por vía inhalatoria y su relación con cáncer de pulmón incluyen estudios en obreros de fundiciones de cobre (Costa y cols., 1993) trabajadores de fábricas donde se producen plaguicidas arsenicales, y en los pacientes que recibieron tratamiento con derivados arsenicales (Mandal y cols., 2002).

Efectos cardiovasculares

Tanto el corazón como las arterias comúnmente manifiestan efectos a la toxicidad del arsénico, dentro de las principales se encuentran el infarto al miocardio, arritmias cardíacas, oclusiones vasculares (Dixon y cols., 1997).

Estudios realizados en Taiwán demuestran claramente que la exposición a arsénico en el agua de bebida se asocia con la enfermedad del pie negro (BFD) (W.H.O, 2001) la cual se caracteriza por la progresiva disminución de la circulación sanguínea en las extremidades, aparición de gangrena y la amputación del miembro (Nagv .1994 : Tsen y cols.,1977).

Tiempos prolongados en la exposición a arsenicales induce hipertensión en humanos (Chen y cols., 1995; Arman y cols., 1999).

Otros estudios revelan que poblaciones de Taiwán presentan un alto riesgo de muerte por enfermedades cerebrovasculares asociados con altos niveles de exposición a arsénico (Chiou y cols., 1997).

Efectos Gastrointestinales

La eficiencia en la absorción de los arsenicales inorgánicos a través del tracto gastrointestinal depende de la dosis administrada de As.

Las manifestaciones de una exposición aguda son, náusea, dolor abdominal, diarrea moderada.

La ingestión crónica provoca irritación gastrointestinal, esofagitis, gastritis, colitis, anorexia, mala absorción y pérdida de peso. (Goebel y cols., 1990).

Efectos Hematológicos

El sistema hematopoyético es afectado por la exposición aguda o crónica a arsénico, los efectos más comúnmente reportados como resultado de exposiciones a As son anemia normocromica, normocitica, aplastica y megaloblastica y leucopenia granulocitopenia, trombocitopenia, mielodisplasia mieloiode (Franzblau y cols.,1989; Armstrong y cols.,1984).

El As actúa como un hemolítico directo o como un citotóxico en las células sanguíneas (Lerman y cols., 1980), se ha encontrado que altas dosis de As causa depresión de la actividad de la médula ósea en humanos (EPA, 1984).

Efectos Hepáticos

El hígado es uno de los principales órganos donde se acumula el arsénico (Winsky y cols., 1998), la exposición crónica a arsénico induce cambios en los hepatocitos, los cuales se manifiestan en cirrosis, hipertensión portal, degeneración del tejido graso y neoplasias, daño en la función mitocondrial y en el metabolismo de las porfirinas

(Nagvi y cols., 1994; Guha y cols., 2001; Santra y cols., 2000), además de infiltración de lípidos, colangitis y colecistitis (Winship y cols., 1987).

Los análisis de sangre periférica revelan que los niveles de enzimas hepáticas se hayan muy por encima de los valores normales (Franzblau y cols., 1989).

Efectos Renales

Una de las principales vías de excreción del arsénico es la vía renal. En humanos se ha visto que los principales sitios de daño ocasionado por arsenicales son los capilares renales, túbulos y glomérulo.

Resultados de análisis clínico revelan hematuria y proteinuria. Oliguria, shock y deshidratación con alto riesgo de falla renal, necrosis cortical y cáncer (Hoppenhay-Rich, 1998; Chen y cols., 1992).

Efectos Dermatológicos

La exposición crónica a arsénico por ingestión o inhalación puede producir una variedad de efectos en la piel como son melanosis, leucomelanosis, queratosis, hiperqueratosis, enfermedad de Bowen y cáncer (Vahter y cols., 2002). Estos efectos han sido observados en personas que consumen agua contaminada con dosis de As que van de 0.01 a 0.1 mg As/Kg de peso por día o más (United Nations Síntesis Report on Arsenic in Drinking Water, 2001; NRC, 1999; Saha y cols., 2001; Mazumder y cols., 2001).

Una característica de la intoxicación con arsénico son las conocidas marcas transversales en las uñas, llamadas también líneas de Mess o líneas de Mess-Aldrich (Adams y cols., 1990).

Efectos Inmunológicos

Estudios realizados en hombres consumidores de arsénico en el agua de bebida en concentraciones de 37mg/L, los niveles de linfocitos en sangre se ven incrementadas con respecto a los controles (Gonsebatt y cols., 1994).

Efectos Neurológicos

La exposición aguda de arsénico en dosis altas (1mg As/Kg de por día o más) causan encefalopatías, cefalea, letargía, confusión mental, alucinaciones, convulsiones y coma, de la exposición crónica de As resulta la neurotoxicidad (Chen y cols., 1998).

La exposición crónica y subcrónica de As (0.05 a 0.5 mg/Kg por día) causa neuropatía simétrica periférica, debilidad muscular, motora y pérdida de reflejos. (Bansal y cols., 1991).

Efectos Teratogénicos del Arsénico

La teratogénesis consiste en una alteración estructural y funcional del desarrollo que impide la formación armónica del producto de la concepción, en casos extremos puede conducir a la muerte del embrión.

En contraste con lo que sucede en cuanto al cáncer, se ha demostrado que el arsénico y sus derivados tienen capacidad teratogénica tanto en humanos como en animales (TABLA H). Estudios epidemiológicos indican presencia de As en tejidos fetales asociados a la contaminación de arsénico en el agua de bebida (Chattopadhyay y cols., 2002).

Diversos estudios realizados en animales de laboratorio expuestos a arsénico demuestran que el As atraviesa barrera placentaria (Concha y cols., 1998).

Experimentos realizados en ratas hembras muestran que el incremento en las concentraciones de arsénico en el agua de bebida durante el proceso de gestación, incrementaba también la incidencia de abortos (Aschegrau y cols., 1989).

En explantes de cerebro fetal humano expuestos a As, se encontró un incremento en la peroxidación de lípidos, inducción en la generación de óxido nítrico (NO), inducción en las especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la apoptosis (Li y cols., 1998).

TABLA H: Efectos teratogénicos del arsénico

<i>Compuesto</i>	<i>Especie</i>	<i>Efecto</i>
Arseniato de Na	Oveja	Disminución de tamaño
	Hámster	Exencefalia. Deformación de orejas, anormalidades genito-urinario, paladar hendido, labio leporino , agenesia renal, resorción fetal.
	Embrión de pollo	Exencefalia.
Arsénico	Humano	Malformaciones, disminución de tamaño, muerte perinatal y fetal, abortos espontáneos.
Arsenito de Sodio	Ratón	Aumento de resorciones fetales, fusión o bifurcación de costillas, exencefalia, mandíbula acortada, anoftalmia.
	Ratas	Exencefalia, agenesia gonadal o renal, defectos en los ojos, anormalidades en costillas y vértebras.

(Chattopadhyay y cols., 2002)

Efectos del As sobre otros organismos en el ambiente

La sensibilidad de la biota acuática y terrestre para las distintas especies de arsénico es muy variable. Depende de factores biológicos y abióticos. En general, los compuestos arsenicales inorgánicos son más tóxicos que los orgánicos, y el arsenito es más tóxico que el arseniato. El mecanismo de la toxicidad y el sistema de absorción del arseniato por los organismos varían considerablemente de unos a otros. Esto puede explicar las diferencias interespecíficas en la respuesta de los organismos al arseniato y el arsenito. Se considera que el mecanismo primario de la toxicidad del arsenito se deriva de su unión a los grupos sulfhídricos de las proteínas. Se sabe que el arseniato afecta a la fosforilación oxidativa, porque compite con el fosfato. En condiciones en las cuales la concentración de fosfato es alta, la toxicidad del arseniato para la biota es generalmente reducida. Como el arseniato es análogo al fosfato, los organismos que viven en presencia de una concentración elevada de arseniato deben adquirir el fósforo nutritivo, pero evitando la toxicidad del arsénico. Los compuestos de arsénico provocan efectos agudos y crónicos en las personas, las poblaciones y las comunidades a concentraciones que oscilan entre unos microgramos y miligramos por litro, dependiendo de la especie, el tiempo de exposición y los efectos finales medidos. Estos efectos incluyen la letalidad, la inhibición del crecimiento, de la fotosíntesis y de la reproducción y efectos de comportamiento. Las zonas contaminadas con arsénico se caracterizan por una abundancia y diversidad limitadas de especies. Si los niveles de arseniato son suficientemente altos, sólo es posible la presencia de especies resistentes (IPCS, 2003).

CAPITULO IV

METODO CIENTIFICO

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.

Considerando que el arsénico es un agente tóxico que se asocia con procesos de transformación celular y neoplasias en el hígado. Resulta interesante conocer si el arsénico puede inducir aductos ADN-Proteínas en ratones de la cepa BALB/c después de una exposición subcrónica.

Asimismo nos interesa saber si la exposición a arsénico 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 reactivas de oxígeno y de otras sustancias o agentes tóxicos (Denke y Fanburg, 1989).

El estudio de las alteraciones en la funcionalidad y estructura de las biomoléculas como el ADN y las proteínas permitirá abundar en los mecanismos de acción del arsénico *in vivo* y relacionar estas alteraciones celulares con el significado biológico de la formación de aductos ADN-Proteínas formados en órganos blancos por agentes tóxicos. Este estudio sentará las bases para profundizar en la caracterización de este tipo de daño, considerando que se ha propuesto como un biomarcador de daño temprano en poblaciones expuestas a formaldehído en donde su presencia se anticipa en tiempo al desarrollo de tumores malignos en tejido blanco.

OBJETIVO GENERAL

Investigar la inducción *in vivo* de aductos ADN-Proteínas por arsénico

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la capacidad del arsenito de sodio para inducir la formación de aductos ADN-Proteínas en hígado y riñón de ratones de la cepa BALB/c después de 9 días de tratamiento.

Conocer si la exposición a arsénico promueve la síntesis de glutatión (GSH) en el hígado y riñón de ratones de la cepa BALB/c

HIPOTESIS

El arsenito de sodio en las concentraciones de 2.5, 5.0 y 12.5 mg/Kg de peso es capaz de inducir la formación de aductos ADN-Proteínas en el hígado y riñón de ratones de la cepa BALB/c

CAPITULO V

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

MATERIALES Y METODOS

Tratamiento y Administración

A 5 lotes de 5 ratones macho de la cepa BALB-c que pesaban entre 20 y 30 gramos se les administró As^{3+} en las siguientes dosis 2.5, 5.0 y 12.5mg de Arsenito de sodio /Kg de peso, al control positivo se administró 40 mg de K_2CrO_4 /kg de peso y el control negativo recibió agua.

La alimentación de los ratones consistió de nutricubos Ad libitum Harlan y agua destilada. Los nutricubos se encontraban en perfectas condiciones nutritivas y de almacenamiento. Los ratones se pesaron diariamente para llevar un control de su peso. Todas las soluciones de tratamiento se prepararon el mismo día de la administración para evitar su oxi-reducción.

La duración del tratamiento de dosis diarias fue de 9 días, transcurrido el tiempo de administración, se sacrificaron los ratones por dislocación cervical, se procedió después a la extracción del hígado y riñón, inmediatamente después se colocaron en cajas petri estéril inmersa en hielo con buffer de fosfatos pH=8/PMSF 1mM frío, seguido del aislamiento de los núcleos y a la precipitación de los complejos ADN-Proteínas.

Aislamiento de los núcleos

La obtención de los DPC se realizó a partir de los núcleos aislados del hígado y riñón respectivamente.

Los núcleos se aislaron de la siguiente manera:

Una vez extraído el órgano de interés, se homogenizó en 3 ml de buffer de fosfatos Ph= 8 suplementado con inhibidores de proteasas : PMSF 10 mg/ml (10 μ l/ml), Azida de sodio 0.5M (30 μ l/ml) y ortovanadato de sodio 100mM (10 μ l/ml). Los tubos se

mantuvieron siempre en hielo. El homogenado se diluyó 1:10 en buffer 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 (SDS 2%, TrisHCL 20Nm, PMSF 1Mm, Ph=7.5). Se prepararon alícuotas en tubos eppendorff con 500ml de resuspensión y se congelaron a -70°C para proceder a la precipitación de los complejos.

Después de la extracción se evaluó la calidad de los núcleos al microscopio de luz considerando principios generales (Brillo, forma refringencia etc).

Precipitación de los complejos ADN-proteína

Un volumen de 500 ml de núcleos lisados se descongeló a 37°C, por cada ratón tratado. Los núcleos fueron lisados, pasando la suspensión a través de una jeringa con aguja calibre 21 cuatro veces. Los lisados se mantuvieron en hielo durante este proceso. Se tomaron alícuotas de 3.5 µl que se aforaron a 1ml con solución (250ul/ KCl 100mM, EDTA 20mM, Tris-HCl 20mM, pH= 7.5), y se utilizaron para determinar ADN total mediante fluorometría (Labarca y Paigen, 1980). Las muestras se congelaron a -20°C hasta su cuantificación. Al resto se adicionó 0.5 ml de la solución (5ml/ KCl 100mM, Tris-HCl 20mM, pH= 7.5)

Determinación de Glutación reducido (GSH)

Para determinar una posible correlación entre la inducción de aductos ADN-Proteínas y la cantidad de glutación. Se determinó la concentración de GSH mediante el método descrito por Hissin y Hilf (1976) a una muestra del homogenado preparado con PBS/EDTA (0.1M de fosfato de sodio, 0.005M EDTA, pH 8.0), las proteínas totales se precipitaron utilizando una solución 2.5% de ácido perclórico y posterior centrifugación por 10 minutos a 4°C. 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 350nm.

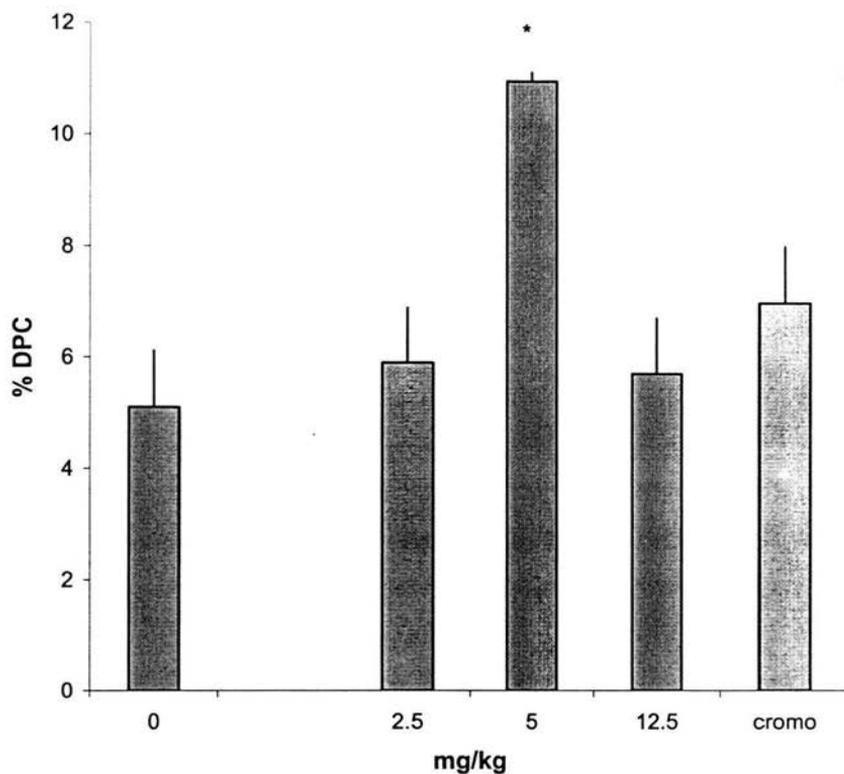
CAPITULO VI

RESULTADOS

En este trabajo se estudió la inducción de aductos ADN-Proteínas (**DPC**) por arsénico en hígado y riñones de ratones de la cepa BALB/c tratados con arsenito de sodio en las siguientes dosis (2.5, 5.0 y 12.5 mg/Kg de peso).

Una vez concluido el período de tratamiento, los animales que conformaban cada uno de los lotes fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajeron el hígado y riñón de cada ratón, para después homogenearlos y aislar los núcleos por gradientes de sacarosa.

Comprobada la calidad de los núcleos por observación microscópica con objetivo de 40x, se procedió a precipitar los aductos ADN proteínas mediante el método descrito por Zhitkovich y cols., 1992. Los resultados mostraron que el arsenito de sodio en una dosis de 5.0 mg/kg peso administrado diariamente por vía oral durante 9 días es capaz de inducir significativamente en las células del hígado de ratón aductos ADN-proteínas. La inducción de DPC, no presentó un comportamiento lineal respecto a las dosis evaluadas de arsénico, se observó la mayor inducción de **DPC** con la dosis intermedia de tratamiento (5.0mg As /Kg) (GRAFICA 1, TABLA 1). El arsenito de sodio indujo la unión fuerte entre DNA y proteínas hasta un 11% del DNA total en el hígado. Aunque en las concentraciones de 2.5 mg/kg y 12.5 mg/kg de peso no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles, cabe mencionar que existió una tendencia a incrementarse la proporción de aductos ADN-Proteínas con dichas dosis en relación con el control negativo.



GRAFICA 1: INDUCCION DE DPC POR ARSENITO DE SODIO EN HIGADO DE RATONES DE LA CEPA BALB/C.

(ANOVA $p < 0.05$; $F = 4.8$).

Promedio de dos experimentos por quintuplicado.

*significativamente diferentes respecto a los controles.

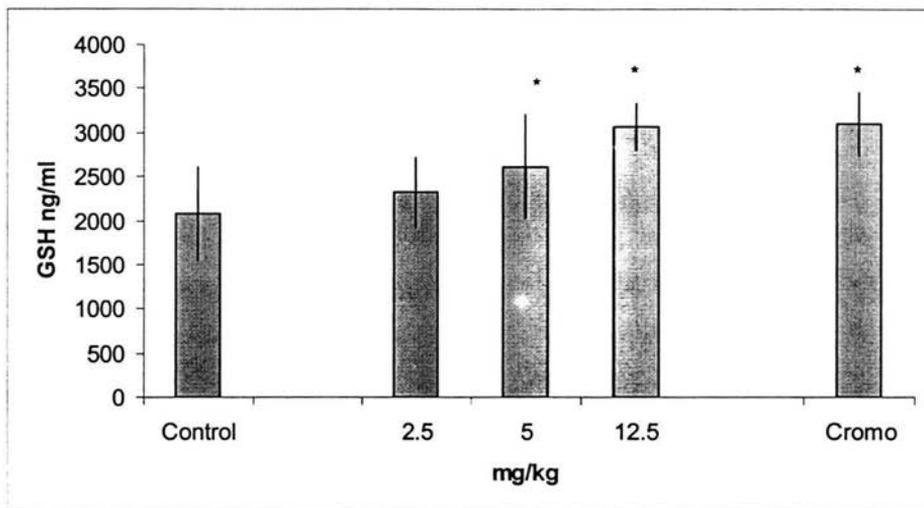
TABLA 1: ADUCTOS ADN-PROTEINAS (DPC) EN HIGADO DE RATONES DE LA CEPA BALB/c

Lote	Arsenito de Sodio (mg/Kg de peso)	%DPC
1	0	5.1
2	2.5	5.9
3	5.0	10.95 *
4	12.5	5.7
5	Cromo	6.97

(ANOVA $p < 0.05$; $F = 4.8$) Promedio de dos experimentos por quintuplicado.

***significativamente diferentes respecto a los controles.**

El arsenito de sodio indujo significativamente la síntesis de glutatión en el hígado de ratones BALB/c en todas las dosis evaluadas. La inducción de glutatión presentó un comportamiento lineal respecto a la dosis de tratamiento, (GRAFICA 2, TABLA 2).



GRAFICA 2: INDUCCION DE GLUTATION EN HIGADO DE RATONES BALB/c CON ARSENITO DE SODIO

ANOVA $P < 0.05$, $r = 0.9979$.

Promedio de dos experimentos por quintuplicado

*Significativamente diferentes respecto al testigo negativo

Prueba de Tukey

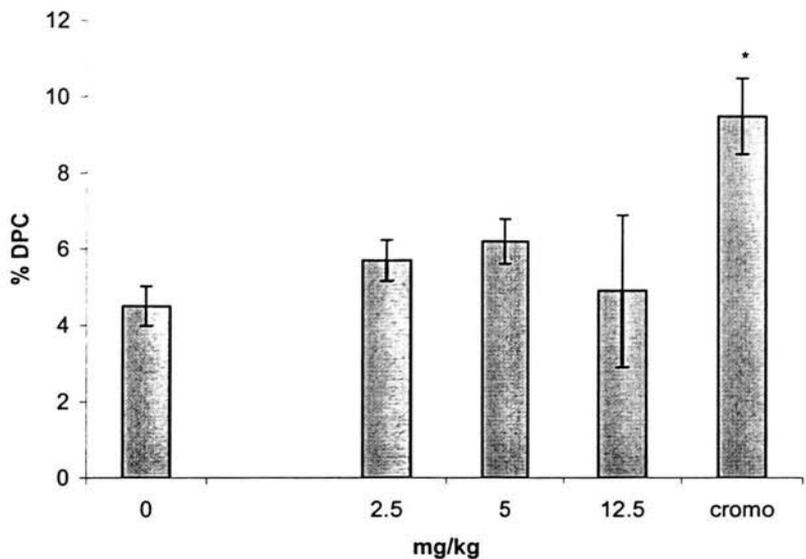
TABLA 2. GLUTATION (GSH) EN HIGADO DE RATONES DE LA CEPA BALB/c

Lote	Arsenito de Sodio (mg/Kg de peso)	GSH (ng/ml)
1	0	2074
2	2.5	2320*
3	5.0	2516*
4	12.5	3059*
5	Cromo	3093*

ANOVA $P < 0.05$, $r = 0.9979$. Promedio de dos experimentos por quintuplicado

***Significativamente diferentes respecto al testigo negativo**

Con respecto a la capacidad del arsenito de sodio de inducir en el riñón complejos ADN proteínas encontramos que se presenta un incremento no significativo en la proporción de DPC en las células del riñón y este efecto no es dependiente de la dosis administrada de arsénico, encontrándose en la dosis intermedia (5.0 mg As/Kg de peso) que hasta un 6% del DNA total se haya complejado en este órgano (GRAFICA 3, TABLA 3).



GRAFICA 3: INDUCCION DE DPC POR ARSENITO DE SODIO EN RIÑON DE RATONES DE LA CEPA BALB/c

(ANOVA P<0.05). * Estadísticamente significativo. Prueba de Tukey

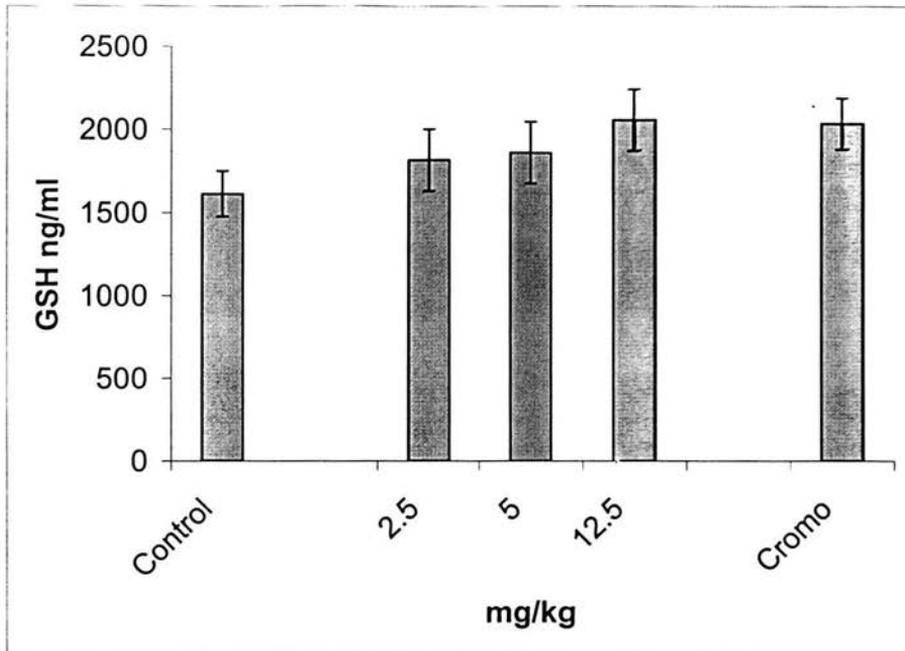
TABLA 3. INDUCCIÓN DE ADUCTOS ADN-PROTEINAS (DPC) EN RIÑÓN DE RATONES DE LA CEPA BALB/c

Lote	Arsenito de Sodio (mgAs/Kgpeso)	%DPC
1	0	4.5
2	2.5	5.7
3	5.0	6.2
4	12.5	4.9
5	Cromo	9.5*

(ANOVA P<0.05). Promedio de dos experimentos por quintuplicado.

*** Estadísticamente significativo. Prueba de Tukey**

En lo que respecta a la inducción de la síntesis de glutatión, observamos que en los núcleos extraídos de las muestras de riñón, hay un incremento no significativo en la proporción de DPC (GRAFICA 4, TABLA 4).



GRAFICA 4: INDUCCION DE GLUTATION EN RIÑON DE RATONES BALB/c CON ARSENITO DE SODIO
ANOVA $P < 0.05$, $r = 0.9576$

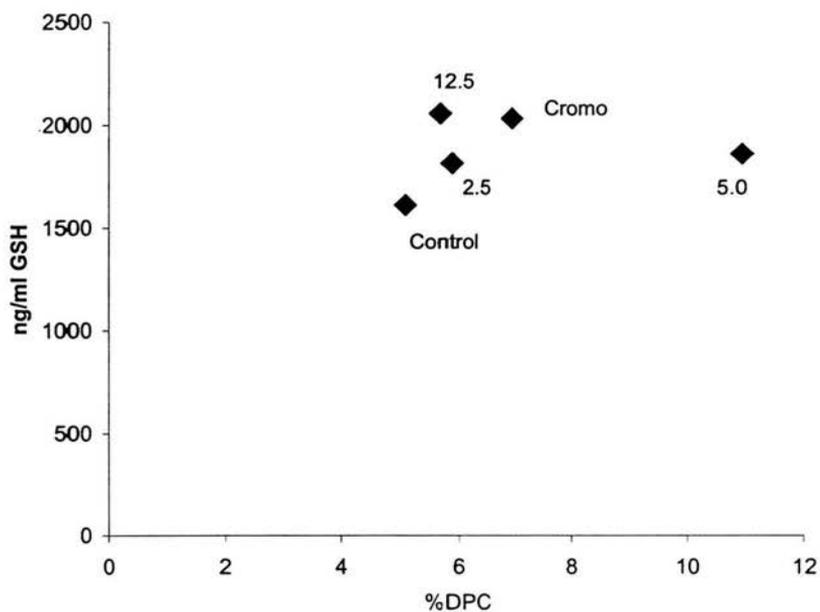
Tabla 4: GLUTATION EN RIÑÓN DE RATONES DE LA CEPA BALB/c.

Lote	Arsenito de Sodio (mg/Kg de peso)	Promedio (ng/ml)
1	0	1613
2	2.5	1815
3	5.0	1861
4	12.5	2059
5	Cromo	2035

ANOVA $P < 0.05$, $r = 0.9576$.

Prueba de Tukey

Se encontró cierta correlación entre la inducción de glutatión y la formación de los DPC *in vivo* en hígado de ratones machos de la cepa BALB/c (GRAFICA 5).



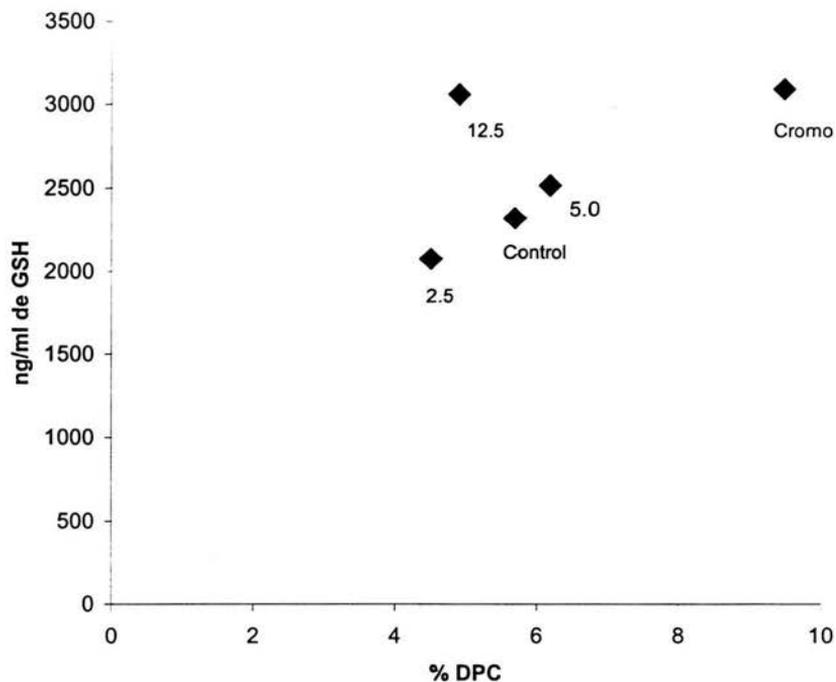
GRAFICA 5: CORRELACION DE LA INDUCCION *IN VIVO* DE DPC CON GSH EN HIGADO DE RATON DE LA CEPA BALB/C

$$r^2 = 0.5775$$

TABLA 5: CORRELACIÓN DE DPC CON GSH EN HÍGADO DE RATON BALB/c.

Lote	Arsenito de Sodio (mgAs/Kgpeso)	DPC (%)	GSH Promedio (ng/ml)
1	0	4.5	2074
2	2.5	5.7	2320
3	5.0	6.2	2516
4	12.5	4.9	3059
5	Cromo	9.5	3093

Se hizo la correlación entre la inducción de glutatión y la formación de DPC in vivo en riñón de ratones de la cepa BALB/c, y observamos que no existe una dependencia entre ambos efectos (GRAFICA 6).



GRAFICA 6: CORRELACION DE LA INDUCCION DE DPC CON GSH EN RIÑÓN DE RATONES DE LA CEPA BALB/c

$r = 0.3944$

TABLA 6: CORRELACION DE DPC CON GSH EN RIÑON DE RATON BALB/c

Lote	Arsenito de Sodio (mgAs/Kgpeso)	DPC Promedio (%)	GSH Promedio (ng/ml)
1	0	4.5	1613
2	2.5	5.7	1815
3	5.0	6.2	1861
4	12.5	4.9	2059
5	Cromo	9.5	2035

Con el fin de llevar un control de peso, los ratones fueron pesados diariamente, al termino del tratamiento los ratones de los 5 lotes registraron una perdida de menos de 1.0 gramo de su peso inicial, a excepción de dos ratones del lote 4 (12.5 mg As/Kg), los cuales registraron una perdida de 2.3 gr de peso, cabe mencionar que uno de estos 2 ratones murió al cuarto día del tratamiento con arsenito de sodio.

TABLA 7: REGISTRO DE PESO DE LOS RATONES BALB/c DURANTE LOS 9 DIAS DEL TRATAMIENTO

LOTES	PERDIDA DE PESO
1 (Control -)	< 1gr
2 (2.5mgAs/Kg)	< 1gr
3 (5.0mgAs/Kg)	< 1gr
4 (12.5mgAs/Kg)	< 1gr (3 ratones) >2 gr (2 ratones)
5 (Control +)	< 1gr

CAPITULO VII

DISCUSION

Los aductos ADN-proteínas (**DPC's**) son un tipo de daño al DNA que ha sido propuesto como un biomarcador de exposición a diferentes agentes tóxicos entre ellos el arsénico (As). Esta propuesta, se basa en que en exposiciones a agentes carcinógenos como el formaldehído la presencia de este daño genético, se anticipa al desarrollo del proceso carcinogénico en el pulmón (Casanova y cols., 1994).

Es de gran importancia estudiar los efectos que tiene el arsenito de sodio en la formación de **DPC** con el fin de dilucidar el mecanismo por el cual este metal genera daño en el DNA, compromete la viabilidad celular y afecta la salud humana.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que el arsenito de sodio es capaz de inducir significativamente en hígado de ratones BALB/c la formación de aductos ADN-Proteínas. En el riñón existió una tendencia al aumento de la presencia de **DPC** en los ratones tratados con arsenito de sodio, sin embargo la inducción no fue significativa.

La capacidad inductora en cada órgano fue diferente en cada una de las dosis evaluadas (GRAFICAS 1 y 2), este hecho es relevante porque hasta ahora no existían datos reportados al respecto y por que cada uno de ellos metabólicamente desempeña diferentes funciones en la biotransformación del carcinógeno y por lo tanto los signos y síntomas asociados a la exposición por arsénico son diferentes.

La diferencia en las proporciones inducidas de **DPC** puede deberse a que el efecto inducido por el arsenito de sodio depende en gran medida de la respuesta metabólica en el órgano blanco, la dosis administrada del tóxico, y del tiempo de permanencia del As y sus metabolitos en cada tejido. Se ha comprobado que la biotransformación del arsénico tiene un papel fundamental en los efectos toxicológicos de este metaloide (Hughes y cols., 2002) y que la enzima encargada de la metilación del As

(As-metiltransferasa) se haya en diversos órganos entre los que se encuentran el hígado y el riñón (Goering, 1999).

Tomando en cuenta que el hígado es el principal órgano de metilación del arsénico (Marafante,1985) y que los metabolitos reactivos resultantes en la biotransformación, son liberados en el sitio de metilación (Styblo,1997) hacia órganos de eliminación como el riñón, podríamos sugerir que es también en el hígado donde hay una mayor acumulación de este metaloide, y si el tiempo de permanencia de un tóxico aumenta la probabilidad de su interacción con los constituyentes celulares podemos entender la diferencia en la proporción de inducción de **DPC** entre hígado y riñón, y suponer que a pesar de que la principal vía de eliminación de este metaloide y sus componentes es la renal, en este tipo de tratamiento (sub-crónico) no hubo una elevada acumulación de As en riñón (para comprobar lo anterior será necesario la determinación intracelular del As y sus metabolitos en ambos órganos o determinar su concentración después de una exposición crónica).

En la gráfica 1 se puede observar que la máxima formación de **DPC** en el hígado se presenta en la dosis intermedia del tratamiento (5.0mg As/Kg de peso) y que en la dosis más alta (12.5 mg/kg), donde se podría esperar una mayor inducción de aductos ADN-Proteínas; el porcentaje de **DPC** (5.7%), fue menor hasta de un 54% con respecto a la dosis intermedia.

Cabe mencionar que en la mayor dosis evaluada el porcentaje de **DPC** fue menor a la proporción basal de los ratones estudiados. Estas observaciones, pueden deberse a que en estas células se pusieron en marcha una serie de mecanismos de respuesta al estrés celular inducido por As, los cuales; pretendían regular los efectos asociados a la toxicidad del metaloide. Tal es el caso comprobado de la inducción de glutatión (GSH) molécula antioxidante y necesaria en el metabolismo del As (TABLAS 3 y 4). El aumento significativo en la síntesis de GSH en hígado y riñón está relacionado linealmente con las dosis evaluadas (GRAFICAS 3 y 4). Las inducciones registradas

llegaron a ser superiores hasta un 47% y 27% respecto al control negativo en hígado y riñón respectivamente. Esto confirma la capacidad de los órganos de responder al estrés celular por exposición a arsénico sintetizando GSH.

La inducción de GSH por agentes tóxicos ya ha sido sugerida antes como parte de un mecanismo de destoxificación celular (Lynn y cols., 2001; Gonsebatt y cols., 1992). Lo anterior es importante ya que una de las teorías más fuertes que explican la carcinogénesis inducida por el As, es la que se relaciona con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), estas se generan durante los procesos de metilación del agente lo que puede ocasionar un estado de estrés oxidativo que puede comprometer diversos procesos celulares, lipoperoxidación de membranas, daño directo al DNA etc. (Kitchin y cols., 2003).

Por otro lado observamos que en hígado existe una cierta correlación entre la inducción de GSH y la formación de DPC (GRÁFICA 5) esta dependencia se mantiene hasta la dosis intermedia del tratamiento, en el caso del riñón no existió una correlación significativa entre la proporción de DPC y GSH.

Estos resultados sugieren que existe una susceptibilidad diferente entre el riñón y el hígado a la capacidad del arsenito de sodio de inducir la unión fuerte de proteínas al DNA. Si consideramos la función metabólica que cada uno de estos órganos (hígado y riñón) desempeña en el organismo de individuos expuestos al arsénico, en el caso del hígado, el glutatión es indispensable en la biotransformación del arsénico, no así en el riñón. Podríamos decir entonces que probablemente en el riñón no se observó una clara inducción de aductos ADN-Proteínas por que la concentración en este órgano no fue la suficiente para poder ejercer una concentración cuantificable de DPC o bien por que los mecanismos de destoxificación fueron eficientes para impedir la inducción considerable de DPC.

Algunas evidencias indican que el metabolismo del arsénico tiene un papel fundamental en los efectos tóxicos, ya que durante el proceso de biotransformación

de este metaloide, se generan intermediarios y metabolitos altamente reactivos que pueden causar daño oxidativo al DNA (Liu y cols., 2000) y que estos intermediarios reactivos pueden llevar a la formación de los DPC (Styblo and Thomas,1995) además que el metabolismo del arsénico se ve directamente afectado por las dosis administradas (Styblo and Del Razo, 1999) .

La generación de entrecruzamientos ADN-citoqueratinas (DPC-CK) en los hepatocitos de ratón por arsenito de sodio durante 3 horas, evidencia la presencia de eventos tóxicos muy tempranos a la exposición de arsénico (Ramírez y cols., 2000), en el transcurso de nuestro experimento, al cuarto día de administración de arsénico, hayamos muerto un ratón perteneciente al lote número 4 (12.5 mg As/Kg de peso), esto pudo ocurrir por que el organismo de este ratón fue más susceptible a los efectos tóxicos del arsenito de sodio o por que los mecanismos de reparación fueron ineficientes.

Existe una variabilidad en la respuesta a la toxicidad del arsénico entre tejidos y entre especies (Goering y cols., 1999). Estudios experimentales en animales muestran que hay una marcada variación inter-individual en el metabolismo del arsénico (Vahter y cols.,1999; Vahter y cols., 2002), dentro de los principales factores que pueden intervenir en la respuesta toxica a xenobioticos podemos encontrar los ambientales, genéticos, nutricionales, enzimáticos y metabólicos, cabe mencionar que este ratón al inicio del tratamiento registró un peso menor que los otros ratones del mismo lote y que además al tercer día del tratamiento había perdido 2.3 gramos de su peso inicial.

CONCLUSIONES

I.- El arsenito de sodio induce significativamente aductos ADN-Proteínas (**DPC**) y glutatión reducido (**GSH**) en hígado de ratones machos de la cepa BALB/c.

II.- El arsenito de sodio no induce significativamente aductos ADN-Proteínas (**DPC**) y glutatión reducido (**GSH**) en los riñones de ratones machos de la cepa BALB/c.

III.- Existe una correlación entre la formación de aductos ADN-Proteínas (**DPC**) y glutatión reducido (**GSH**) en hígado de ratones machos de la cepa BALB/c.

IV.- No existe una dependencia significativa entre la proporción de aductos ADN-Proteínas (**DPC**) y glutatión reducido (**GSH**) en los riñones de ratones machos de la cepa BALB/c.

PERSPECTIVAS

Tomando en cuenta que los aductos ADN-Proteínas han sido considerados como biomarcadores de daño primario al DNA y puesto que la formación de estos **DPC's** se ha asociado a la exposición de diversos agentes químicos carcinogénicos entre ellos el arsénico, es de gran relevancia esclarecer su significado biológico para lo cual, sería interesante caracterizar la formación de estos aductos **DPC's** en relación a las proteínas asociadas al DNA, su cinética de formación, el tipo de enlace o interacción que se genera, si existe la reparación *in vivo* de este tipo de daño y conocer mediante que mecanismo se produce y se favorecen las interacciones ADN-proteínas.

La respuesta a estas preguntas, permitirá conocer si la presencia de los **DPC**, pone en riesgo los procesos de diferenciación, replicación y expresión génica, que representan eventos cruciales en la carcinogénesis asociada al arsénico y se abundara en los mecanismos de acción asociados a la exposición *in vivo* a arsénico.

CAPITULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abernathy C.O., Lui Y.P., Longfellow D., Aposhian H.V., Beek B., Fowler B., Goyer R., Menzer R., Rossman T., Thompson C. and Waalkes M. (1999). Arsenic: Health effects, mechanisms of actions and researchs issues. *Environ. Health Perspect.* **107**:593-597.

Adams R.M. (1990). *Occupational Skin Disease*, 2nd ed., Saunders, Philadelphia. P. 147.

Ahmad S., Anderson W.L., Kitchin K.T. (1999). Dimethylarsinic acid effects on six biochemical parameters in B6C3F1 mice. *Cancer Lett.* **139**: 129-135.

Ahmad S., Kitchin K.T., Cullen W.R. (2000). Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* **382**: 195-202.

Ahmad S., Kitchin K.T., Cullen W.R. (2002). Plasmid DNA damage caused by methylated arsenicals, ascorbic acid and human liver ferritin. *Toxicology Letters.* **133**: 47-57.

Aposhian H.V (1997). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 397- 419.

Aposhian H.V. (1989). Biochemical toxicology of arsenic In: Hodgson, E., Bend, J.R., Philpot, R.M. (Eds.), *Reviews In Biochemical Toxicology*. Elsevier, New York, pp. 265-299.

Armstrong C.W., Stroube R.B., Rubio T., Beckett W.S. (1984). *Arch. Environmental. Health.* **39**: 274.

Arnold L.L., Cano M., St. John M., Eldna M., Van Gemert M. and Cohen S.M. (1999). Effects of dietary dimethylarsenic acid on the urine and urothelium of rats. *Carcinogenesis.* **20**: 195-202.

Arrigo A.P. (1999). Gene expression and the thiol redox state *Free Radic Biol. Med.* **27**: 936-944.

Aschengrau A., Zierler S., Cohen A. (1989). Quality a community drinking water and the occurrence of spontaneous abortion. *Arch. Environ. Health.* **49**: 283- 290.

Bansal S.K., Haldar N., Dhand U.K. et al. (1991). *Int. J. Dermatology.* **30**:304

Barchowsky A., Roussel R.R., Klei L.R., James P.E., Ganju N., Smith K.R., Dudek E.J.(1999). Low levels of arsenic trioxide stimulate proliferative signals in primary vascular cells without activating atress effector pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **59**: 65-79.

Barrett J.C., Lamb P.W., Wang T.C., Lee T.C. (1989). *Biol. Trace. Elem. Res.* **21**: 421.

Basu A., Mahata J y cols (2001).Genetic Toxicology of a paradoxical human carcinogen Arsenic: A Review. *Mutation Research.* **488**: 171-194.

Beekman G., Beekman L., and Nordenson I. (1977).Chomosome aberration in Workers exposed to arsenic. *Environ. Health Perspect.* **19**: 145-146.

Benko V., Wagner M., Wagnerova J., Batora J., Hyg J. (1988). *Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **32**: 137.

Berg N.A.(1985). Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat. Res.***101**: 4-15

Bernstam L., Nriagu J. (2000=. *Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* **3**: 293.

Bertolero. F. Pozzi G., Sabbioni E., Saffiotti U.(1987). Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis* **8**: 803-808.

Biggs M.L.,Kalman D., Moore L.E., Höpenhayn-Rich C., Smith M.T., Smith A.H. (1997). Relationship of urinary arsenic to intake estimates and biomarker of effect bladder cell micronuclei. *Mutat. Research.* **386**: 185-195. 22.-Brown J. and Kitchin K.T. (1996). Arsenite, but not cadmium, induces arnithine decarboxylase and heme oxygenase activity in rat liver. Relevance to arsenic carcinogenesis. *Cancer Lett.* **98**: 227-231.

- Brown J. and Kitchin K.T.(1997). Dimethylarsinic acid treatment alters six different rat biochemical parameters: relevance to arsenic carcinogenesis. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **17**: 71-84.
- Buchet J.P, . Lauwerys R., Roels H. (1981). Urinary excretion of inorganic arsenic and metabolites after repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* **48**: 111 – 118.
- Buchet J.P y Lauwerys R. (1985). Study of inorganic arsenic methylation by rat liver in vitro. Relevance for interpretation of observations in man. *Arch. Toxicology.* **57**: 125 – 129.
- Buchet J.P y Lauwerys R. (1988). Role of thiols in the in-vitro methylation of inorganic arsenic by rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 3149 – 3153.
- Bun-Ya M.,Shikata K., Nakade S., Yompakde C., Arracima S. and Oshima Y. (1996). *Curr. Genet.* **29** :344-351.
- Burnichon V.,Jean S., Bellon L., Maraninchi M., Bideau Ch., Orsière T.,Margotat A., Gérolami V., Botta A., Bergé-Lefranc J-L.(2003). Patterns of gene expression induced by arsenic trioxide in cultured human fibroblasts. *Toxicology letters.* **143**: 155-162.
- Carr Antony M. (2002). DNA structure dependent checkpoints as regulators of DNA repair. *Mut. Res.* **1**: 983-993.
- Casanova M., Morgan K.T., Steinhagen W., Everitt J.I., Propp. J.A and Heck H.D (1991). *Fundam. Appl. Toxicol.* **17**: 409-428.
- Casanova M. y cols (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.
- Castren K., Ranki A., Welsh J.A. and Vahakangas K.H. (1998). Infrequent p53 mutations in arsenic-related skin lesions. *Oncol. Research.* **10**: 475-482.

- Cebrian M.E., Albores A., Aguilar M., Blakely E.B (1983). Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum. Toxicol.* **2**: 121-133.
- Chakrabarti S., Bai C. and Subramanian K.S (2001). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **170**: 153-165.
- Chattopadhyay Sukumar y cols (2002). Apoptosis and Necrosis in developing brain cells due to arsenic toxicity an proteccion with antioxidants. *Toxicology Letters.* **136**: 65-76.
- Chen C.J.,Chen C.W.,Wu M.M., Kuo T.L. (1992). Cancer potencial in liver, luna, bladder and kidney due to ingested inorganic in drinking water. *Br. J. Cancer.* **66**: 888-892.
- Chen C.J., Hsueh Y.M., Lai M.S., Shyu M.P., Chen S.Y., Wu M.M., Kuo T.L., Tai T.Y.(1995). *Hypertension* .**25**:53.
- Chen Y.C., Lin-Shiau S.Y.,Lin J.K.(1998). Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J. Cell Physiol.* **177**: 324-333.
- Chiou H.Y., Hsuch. Y.M., Hsich L.L., Hs L.I., Hs Y.H., Hsich F.I., Wu C., Yang M.H., Chen C.J. (1997). Arsenic methylation capacity body retention and null genotype of glutatione S-transferasa M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. *Mutat. Research.* **386**:197-207.
- Cohen S.M., Ellwein L.B.(1990). Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* **249**: 1007 – 1011.
- Clayson D.B. and Kitchin K.T. (1999). Interspecies differences in response to chemical carcinogens. In *Carcinogenicity: Testing predicting, and interpreting Chemical Effects* (K. Kitchin, Ed), pp. 837-880. dekker, New York.
- Conaway C.C y cols (1996). Formaldehyde mechanistic data and risk assessment endogenous protection from DNA adduct formation. *Pharmacol. Ther.* **71**: 29 - 55.
- Concha G., Nermell B., Vahter M. (1998). *Toxicol. Sci.* **44**:185.

- Costa M. , Zhitkovich A. And Toniolo P. (1993). DNA- Protein cross-links in Welders: Molecular implications. *Cancer Research*.**53**: 460-463.
- Costa M., Zhitkovich A. y cols. (1997). DNA-Protein cross-links produced by various chemicals in cultured human lymphoma cells. *J. of Toxicol. Env. Health*. **50**: 433- 449.
- Counts J.L. and Goodman J.I. (1995).Alterations in DNA methylations may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell*. **86**: 13-15.
- Cullen W.R., McBride B.B., Manji H.,Pickett A.W, Reglinski J. (1989). The metabolism of methylarsine oxide and sulfide. *Appl. Organomet. Chem*. **3**: 71 – 78.
- Dixon H.B.F (1997). The Biochemical action of arsenic acids specially as phosphate analogues. *Adv. Inorg. Chem*. **44**: 191-227.
- Eguchi N., Kuroda K., Endo G.(1997). Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicology*. **32**:141-145.
- EPA(1984). Environmental Protection Agency. Health Assessment –document for inorganic arsenic, Final report. EPA 600/8-83-021F, USEPA, Environmental Criteria and Assessment Off, Research Triangle Park, N.C.
- Franzblau A., Lilis R. (1989). *Arch. Environmental Health* **44**: 385.
- Germolec D.R., Yoshida T., Gaido K., Wilmer J.L., Simeonova P.P., Kayama F., Bureson F. ,Dong W., Lange R.W.,Luster M.I.(1996). Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **141**: 308-381.
- Germolec D.R., Spalding T., Yu H.S., Chen G.S, Simeonova P.D., Humble M.C.,Brucoleri A.,Borrman G.A., Foley J.F., Yosida T. and Luster M.I. (1997). Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors. *Mutation Research*. **386**: 209 - 218.
- Goebel H.H., Schmidt P.F., Bohl J., Tettenborn B., Kramer G., guttman L.(1990). *Neuropathol. Exp. Neurol*. **49**: 137.

Goering P.L., Aposhian H.V., Mass M.J., Cebrian M., Beek B.D., Waalkes M.P.(1999). The enigma of Arsenic carcinogenesis: Role of Metabolism. *Toxicological Sciences* **49**: 5- 14.

Gonsebatt M.E., Vega L., Herrera L.A., Montero R., Rojas E., Cebrian M.E and Ostrosky-Wegman P. (1992).Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutation Researcha*. **283**: 91- 95.

Gonsebatt M.E., Vega L., Montero R., Garcia-Vargas G., Del Razo L.M., Albores A., Cebrian C.E. (1994). *Mutation Research*. **313**: 293.

Gonsebatt M.E., Vega L., Salazar A.M., Montero R., Guzman P., Blas G., Del Razo L.M., Garcia-Vargas G., Albores A., Cebrian M.E., Kelsh M., and Ostrosky-Wegman P. (1997). Cytogenic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res*. **386**: 219-228.

Gonsebatt M.E. (2003).

www.biomedicas.unam.mx/htma/mgta/gonsebatt/lineas.htm

Gresser M.J. (1981). ADP arsenate. *J. Biol. Chem*. **256**: 5981-5983

Grube K., Kuper J.H., Burkle A. (1991).Direct stimulation of poly(ADP-ribose) polymerase in permeabilized cells by double-stranded DNA oligomers. *Anal. Biochem*. **193**: 236-239.

Guha D.N. Mazumder., J. Das Gupta., Santra A. y cols.,(1997). Non-cancer effects of chronic arsenicosis with special reference to liver damage, in:C.O. Abernathy, R.L.Calderon, W.R. Chappell (Eds). *Arsenic Exposure and effects*. Chapman and Hall, London p.112.

Guha D.N. Mazumder .,J. Das Gupta.(2001). *Assoc. Phys. India* **49**:650

Gurr J., Liu F., Lynn S., Jan K (1998). Calcium-dependent nitric production is involved in arsenite-induced micronuclei. *Mutat. Res*. **416**: 137-148.

- Hashimoto M., Greenberg M.M., Kow Y.W. Wang J.T and Cunningham R.P (2001). *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 3161 – 3162.
- Hayashi H., Kanisawa M., Yamanaka K. Ito T., Udaka N., Ohji H., Okudela K., Okada S. and Kitamura H.(1998). Dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, has tumorigenicity and progression effects in the pulmonary tumors of A/J mice. *Cancer Lett.* **125**:83-88.
- Healy S.M., Wildfang E., Zakharyan R.A., Aposhian H.V. (1999). Diversity of inorganic arsenite biotransformation. *Biol. Trace Elem.* **68**: 249 – 266.
- Hissin P.J., Hilf R.(1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* **74**: 214- 226.
- Hoffman G.R.(1991). Genetic toxicology, In: M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klaassen (Eds.). *Toxicology*, Pergamon Press, New York. Pp 201-225.
- Hoffman R.Dy cols., (1992) Iodophenylarsine oxide and arsenical affinity chromatography:new probes for dihol proteins. Applications to tubulins and to components of the insulin receptor-glucose transporter signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **267**: 14005-14011.
- Hopenhayn-Rich C., Biggs M.L. and Smith A.H. (1998). Lung and Kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water in cordeba Argentina. *Int. J. Epidemiol.* **27**: 561-569.
- Hossain K., Akhand A.A.,Kato M., Du J., Takeda K., Wu J., Takuchi K., Liu W. Suzuki H. Nakashima I. (2000).Arsenite induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrana raft-linked signaling for activation of c-jun amino-terminal kinase. *J. Immunol.* **165**: 4290-4297.
- Hossain K., Amwarul A., Akhand Y.K., Suzuki H. and Izumi Nakashima. (2002).Caspase activation is accelerated by the inhibition of arsenite-induced, membrane rafts-dependent Akt activation.*Free Radical Biology and Medicene.* University Nagoya Japan. **34**:1-9.

Hsu C.H., Yangs S.A., Wang J.Y. and Lin S.R. (1999). Mutational spectrum of p53 gene in arsenic-related skin cancer from the blackfoot disease endemic area of Taiwan. *Br. J. Cancer.* **80**: 1080-1086.

Hu Y., Su L. and Snow E.T.(1998). Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition on DNA repair enzymes. *Mutat. Res.* **408**:203-218.

Huang C., Ma W.Y., Li j., Goranson A., Dong Z.(1999). Requirement of Erk, but not JNK, for arsenite- induced cell transformation. *J. Biol. Chem.* **274**:14595-15601.

Hughes M.F. y 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 y cols (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters.* **133**: 1-16.

Hunter T. and Karin M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell.* **70**: 375-387.

IARC (International Agency for Research on Cancer) ,(1987). Arsenic and Arsenic Compounds In: An Updating of IARC Monographs 1- 42, Suppl. 7. Lyon, France, International Agency for Research On Cancer, pp 100-206.

IPCS/WHO (International Programme on Chemical Safety),(2001). Environmental Health Criteria 224. Arsenic and Arsenic Compounds, second edition. World Health Organization. Geneva.

IPCS, (2003).

http://www.who.int/pcs/ehc/summaries/ehc_224.html

Jha A.N., Noditi M., Nilsson R., Natarajan A.T. (1992). Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutation Research.* **284**: 215-221.

- Katakura K. and Chang K.P. (1989). H. DNA amplification in Leishmania resistant to both arsenite and methotrexate. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**: 189-192.
- Kitchin Kirk T. (2001). Recent Advances in Arsenic Carcinogenesis: Modes of Action, Animal Model Systems, and Methylated Arsenic Metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **172**: 249-261.
- Kitchin K.T y cols., (2003). Oxidative stress as a possible mode of action for Arsenic carcinogenesis. *Toxicology Letters.* **137**: 3-13.
- Kopplin M. (2001). Toxicology. The University of Arizona
<http://superfund.pharmacy.arizona.edu/Toxamb/c2-2-2.html>.
- Lagunas R. (1980). Sugar-arsenite esters: Thermodynamics and biochemical behavior *Arch. Biochem. Biophys.* **205**: 67-75.
- Le X.C., Lu X., Ma M., Cullen W.R., Aposhian H.V and Zheng B. (2000). Speciation of key arsenic metabolic intermediates in human urine. *Anal. Chem.* **72**: 5172-5177.
- Lerman B.B., Ali N., Green D.(1980) *Anal. Clin. Lab. Sci.* **10**:515.
- Lee-Chen S.F., Wang M.C., Yu C.T., Wu D.R. and Jan K.Y.(1993). Nickel chloride inhibits the DNA repair of UV-treated but not methyl methanesulfonate-treated Chinese hamster ovary cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **37**: 39-50.
- Lee T.C., Oshimura M., Barrett J.C. (1985a) Comparison of arsenite-induced cell transformation cytotoxicity. Mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis.* **6**: 1421-1426.
- Lee T.C., Huang R.Y., Jan K.Y (1985a). Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research.* **148**: 83-89.
- Lee T.C., Tanaka N., Lamb P.W., Gilmer T.M., and Barrett J.C. (1988). Induction of gene amplification by arsenic. *Science.* **241**: 79-81.
- Li J. and Rosen B.P.(2000). *Mol. Microbiol.* **35**: 361-367.

- Li J., and Rossman T.G. (1989). Mechanism of comutagenesis of sodium arsenite with N-methyl-N-nitrosourea. *Biol. Trace Elem.* **21**: 373-381.
- Li J.R., Rossman T.G.(1989). Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in Chinese hamster V79 Cells.*Biol. Metals.* **4**: 197-200.
- Li W., Chou I.N., and Chen C.J. (1992). Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels in cultures cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **114**: 132-139.
- Li Y.M., Broome J.D.(1999). Arsenic targets tubulin to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer. Res.* **59**: 776-780.
- Li Y., Yu Z., Zhu H. (1998). Role of programmed cell death in mediating arsenic-induced rat embryo anomalies. *Wei Sheng. Yan Jiu* **27**: 91-94.
- Li Z.S. y cols.,(1996). *Biol. Chem.* **271**: 6509-6517.
- Life Sciences Research Israel (1989). Cacodylic Acid:Combined Chronic Feeding and Oncogenicity Study in the Rat Study PAL/010/CAC. (MRID. 418621-91,HED Documents.009391,010550).
- Liu Y.C., Huang H. (1997). Involvement of calcium-dependent protein kinase C. in arsenite-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *J. Cell. Biochem.* **64**: 423- 433.
- Liu J., Kadiiska M.B., Liu Y., Qu W., Waalkes M.P. (2001). Stress-related gene expression in mice treated with inorganic arsenicals. *Toxicol. Sci.* **61**: 314-320.
- Lynn S. y cols.,(2000). NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Resarch.* **86**: 514 – 519.
- McCabe M.J., Singt K.P., Reddy S.A., Chelladurai B.Pounds J.G., Reiners J.J., Status J.J.(2000)Sensitivity of myelomonocytic leukemia cells to arsenite-induced cell cycle disruption, apoptosis, and enhanced differentiation is dependent on the inter-relationship between arsenic concentration, duration of treatment, and cell cycle

phase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**:724-733.

Maier Andrew y cols., (2002). Arsenic co-exposure potentiates benzo(a) pyrene genotoxicity. *Mutation Research.* **517**: 101- 111.

Mandal B.K., Susuki K.T. (2002). Arsenic round the World: A Review. *Talanta.* **58**: 201- 235.

Marafante E., Bertolero F., Edel J., Pietra R., Sabbioni E. (1982). Intracellular interaction and biotransformation of arsenite in rats and rabbits. *Sci. Total Environ.* **24**: 27-39

Marafante E. y Vahter M. (1984). The effect of methyltransferase inhibition on the metabolism of (74 As) arsenite in mice and rabbits. *Chemical Biology. Interact.* **50**: 49 – 5.

Marafante E. y Vahter M. (1985). The role of the methylation in the detoxication of arsenate in the rabbit. *Chem-Biol. Interact.* **56**: 225-238.

Marafante E. y Vahter M. (1987). Biotransformation of dimethylarsinic acid in mouse, hamster and man. *J. Appl. Toxicology.* **7**: 111- 117.

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. *Mutation Research.* **386**: 263 – 277.

Mass M.J., Tennant A., Roop B.C., Cullen W.R., Styblo M., Thomas D.J., Kligerman A.D.(2001). Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. Accelerated communication for *Chem. Res. Toxicol.* **14**: 355-361.

Miller C.A., Come M.D and Costa M. (1991). *Carcinogenesis.* **12**: 269-276.

Milton A.H., Hasan Z., Rahman A., Rahman M.(2001). *Occup. Health* **43**:136.

Minko Irina G. y cols.,(2001). Insision of DNA- Protein cross-links by UVrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair. *PNAS.* **99**: 1905 - 1909.

Moolgavkar S.H. (1986). *Carcinogenesis modeling: From molecular biology to*

epidemiology. *Annu. Rev. Public. Health.* **7**: 151-169.

Moore LE., Smith A.H., Hopenhayn-Rich C., Biggs M.L., Kalman D.A., Smith M.T (1997). Decrease in bladder cell micronucleus prevalence after intervention to lower the concentration of arsenic in drinking water. *Cancer. Epideol. Biomarkers. Prev.* **6**: 1051-1056.

Moore MM., Harrington-Brock K., Doerr C.L (1997). Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat. Research.* **386**: 279-290.

Morales K.H., ryan L., Kuo T.L., Wu M.M., Chen C.J.(2000). *Environ. Health Perspec.* **108**: 655.

Morales K.A., Ryan L., Kuo T., Wu M., Chen C. (2002). Risk of internal cancers from arsenic in drinking water. *Environ. Health. Perspect.* **108**: 655-662.

Murai T., Iwata H., Otoshi T., Endo G., Horiguchi S. and Fukushima S. (1993). Renal lesions induced in F344/DuCrj rats by 4 weeks oral administration of dimethylarsenic acid. *Toxicol. Lett.* **66**: 53- 61.

Nagvi S.M., Vaishnavi C., Singh H.(1994). Toxicity and metabolism of arsenic in vertebrates, in: J.O. Nriagu (Ed.), *Arsenic in the environmental. Part II: Human Health and Ecosystem Effects*, John Wilwy and Sons, Inc. New York. Pp. 55-91.

Narendra P. Singh (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks DNA-Protein Cross-links and Apoptosis. *Mutation Research.* **455**: 111- 127

Neuer B. and Werner D. (1985). Screening of isolated DNA for sequences released from anchorage sites in nuclear matrix. *J. Mol. Biol.* **181**: 15-25.

Ng J.C., Seawrith A.A., Qi L., Carnett C.M., Moore M.M., Chriswell B. (1998). Tumors in mice inuced by chronic exposure of high arsenic concentration in drinking water (Abstract) In: *Book of abstracts of the Third International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects*. San Diego. Pp.28.

Nietert C., Kellicutt L.M. and Kubinski H. (1974). *Cancer Research.* **34**: 859- 864.

Nordenson I., Beckman G., Beckman L. and Nordstrom S. (1978). Occupational and environmental risks in and around a smelter in Northern Sweden II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. *Hereditas* **88**: 263-267.

Nordstrom S., Beckman L., Nordenson I.(1978). *Hereditas* **88**: 43

NRC. National Research Council,(1999). Mechanisms of toxicity. In *Arsenic in Drinking Water*. Pp 194-196.National Academy of Sciences. Washington D.C.

Nriagu J.O., Azcue J.M .(1990) In: J.O. Nriagu (Ed), *Arsenic in the Environment Part I: Cycling and Characterization*, John Wiley and Sons, Inc, New York, pp. 1-15.

Oleinick N.K., Chiu S.M., Ramakrishnan N., Xues L.Y. (1987). The formation, identification and significance of DNA-Protein cross-links in mammalian cell. *Br. J. Cancer*. **55**: 135 - 140.

Okada S., Yamanaka K. (1994). Induction of lung specific DNA damage by methylarsenics via the production of free radicals. In Nriagu J.O (Ed). *Arsenic in the Environment. Part 2*, Wiley. New York p. 143-157.

Okui T., Fujiwara Y. (1986).Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research*. **172**: 69-76.

Ostrosky-Wegman P., Gonshebbat M.E., Montero R., Vega L., Barba H., Espinosa J., Plao A., Cortinas C., Garcia-Vargas G., Del Razo L.M. (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individual chronically exposed to arsenic in México . *Mutation Research*. **250**: 477-482.

Patierno S.P. and Costa M. (1985). DNA-Protein crosslinks induced by nickel compounds in intact cultured mammalian cells. *Chem-Biol. Interact*. **55**: 75-91.

Pershagen G., Nordberg G., Bjorklund N.E.(1984). Carcinomas of the respiratory tract in hamster given arsenic trioxide and/or benzo(a)pyrene by the pulmonary route. *Environ. Res*. **34**: 227-241.

Petres J., Baron D., and Hagedorn M. (1977). Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation: Cytogenetic and biochemical studies. *Environ. Health Perspect.* **19**: 223-227.

Petrick J.S., Felix F.A., Gollem W.R., Carter D.E., Aposhian H.V (2000). Monomethylarsonous acid MMA III is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **163**: 203-207.

Petrick J.S., Jogadish B., Mash E.A., Aposhian H.V (2001). Monomethylarsonous acid MMA III and arsenite LD 50 in hamsters an in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* **14**: 651-656.

Popovicova J., Moser G.J., Goldsworthy T.L. and Tiee R.R. (2000). Carcinogenicity and co-carcinogenicity of sodium arsenite in p53 +/- male mice. *Toxicologist.* **54**:134.

Powis G., Mustacich D., Coon A. (2000). The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free. Radic. Biol. Med.* **29**: 312-322.

Ramírez P., Laclette D.S., Ostrosky-Wegmen P. (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploidy in cell by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mut. Res.* **386**: 291-298.

Ramírez P., Del Razo L.M, Gutierrez-Ruiz M.N. And Gonshebb M.E.(2000). Arsenite induce DNA-Protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 Human hepatic cell line. *Carcinogenesis* **21**: 701-706.

Ramírez Noguera Patricia (2000). Tesis de Doctorado: Estudio de los Entrecruzamientos (Cross-Links) AND-Proteínas Inducidos por Arsénico. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Rahman M y cols., (1999). *Hipertensión.* **33**:74

Rosen Barry P. (1999) *Trends. Microbiol.* **7**:207-212

Rosen Barry P. (2002). Biochemistry of Arsenic Detoxification. *FEBS Letters.* **120**. 209-219.

- Rosenberg H., Gerdes R.G. and Chegwiddden K. (1997). *J. Bacteriol.* **131**: 505-511.
- Rossman T.G., Stone D., Molina M., Troll W. (1980). Absence of arsenite mutagenicity in *E. Coli* and Chinese hamster cells. *Environ. Mutagen.***2**: 371-379.
- Rossman T.G., Uddin A.N., Burns F.J., Bosland M.C (2001). Arsenite is a cocarcinogen with solar ultraviolet radiation for mouse skin: an animal model for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **176**:64-71.
- Saffioti U., Bertolero F.(1989). Neoplastic transformation of BALB/3T3 cells by metals and the quest for induction of a metastatic phenotype. *Biol. Trace Elem. Res.* **21**: 475- 482.
- Salazar A.M., Ostrosky-Wegman P.,Menendez D., Miranda E., Garcia-Carranca A. and Rojas E. (1997).Induction of p53 protein expreeion by sodium arsenite. *Mutation Research.* **381**: 259-265.
- Sampayo-Reyes A., Zakharyan R.A., Healy S.H., Aposhian H.V (2000). Monomethylarsonic acid reductase and monomethylarsonous acid in hamster tissue. *Chem. Res. Toxicol.* **13**: 1181- 1186.
- Santra A., Maiti A., Chowdhury A., Mazumder D.N. (2000). Oxidative stress in liver of mice exposed to arsenic-contaminated water. *Indian. J. Gastroenterol.* **19**: 112-115.
- Shannon R.L., Strayer D.S.(1989). *Hum. Toxicology* **8**: 198.
- Shetlar M.D (1980). *Photochem. Photobiol. Rev.* **5**: 105-197.
- Simeonova P.P., and Luster M.I.(2000).Mechanisms of arsenic carcinogenicity:Genetic of epigenetic meechanisms?. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **19**: 281-286.
- Sordo M., Herrera L.A., Ostroski-wegman P., Rojas E.(2001). Citotoxic and genotoxic effects of As, MMA, and DMA on leukocytes and stimulated human lymphocytes. *Teratog. Carcinog. Mutag.* **21**: 249-260.
- Steeg Harry Van (2001). The role of nucleotide excision repair and loss of p53 in mutagenesis and carcinogenesis. *Toxicology Letters.* **120**: 209 - 219.

- Stein G.S. AND Kleinsmith L.J. (1979). Chromosomal Protein and Their Role in the Regulation of Gene Expression. New York p. 307.
- Styblo M., Yamauch M., Thomas D. (1995). Comparative in vitro methylation of trivalent and pentavalent arsenicals. Toxicol. Ppl. Pharmacol. **135**: 172 – 178.
- Styblo M., Vega L., Germolec D.R., Luster M.I., Del Razo L.M., Wang C., Cullen W.R., Thomas D.J. (1999). Metabolism and Toxicity of arsenicals in cultured cells. In: Chappell. W.R. Abernathy, C.O. Calderon (Eds) Arsenic Exposure and Health Effects. Elsevier. New York p. 311-323.
- Styblo M., Del Razo L.M., Vega L., Germolec D.R., Le Cluyse E.L., Hamilton G.S., Reed W., Wang C., Cullen W.R., Thomas D.J (2000). Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. Arch. Toxicol. **74**: 289-299.
- Toyokuni S., Mori T., Hiati H. and Dizdaroglu M. (1995). Int. J. Cancer. **62**: 309-313.
- Trouba K.J., Wauson E.M., Vorce R.L. (2000). Sodium arsenite-dysregulation of protein involved in proliferative signaling. Toxicol. Appl. Pharmacol. **164**: 161-170.
- Tseng W.P. (1977). Effects and dose-response relationships of skin cancer and Blackfoot disease with arsenic. Environ. Health perspect **19**: 109-119.
- Tsu-Shing Wang y cols.,(2001). Arsenite induces oxidative DNA adducts and DNA-Protein cross-links in mammalian cells. Free Radical Biology and Medicine. **31**: 321-330.
- United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water,(2001).
- Vahter M. (1994). Species differences in the metabolism of arsenic compounds. Appl. Organomet. Chem. **8**: 141 – 145.
- Vahter M (1999). Variation in human metabolism of arsenic In: Chappell. W.R. Abernathy, C.O. Calderon (Eds) Arsenic Exposure and Health Effects. Elsevier Science. Ltd. Oxford. P. 267-279.

- Vahter M y cols.,(2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* **181**: 211 – 217.
- Van Houten B., Illenye S., Qu Y. and Farrell N. (1993). *Biochemistry* **32**: 11794 – 11801.
- Vega L., Styblo M., Patterson R., Cullen W., Wang C. and Germolec D. (2001). Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (In press).
- Voitkun V. and Zhitkovich A. (1999). *Mutat. Research.* **424**: 97 – 106.
- Wang Z. and Rossman T.G.(1996). The carcinogenicity of arsenic. In. *Toxicology of Metals* (L.W. Chang. Ed) pp. 221-228. CRC. Press. Boca Ratón.
- Wang J.P. , Moore M.R. y cols.,(2002). A review of animal models for the study of Arsenic carcinogenesis. *Toxicology Letters.* **133**: 17-31.
- Warner M.L., Moore L.E., Smith M.T., Kalman D.A., Fanning E. and Smith A.H. (1994). Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. *Cancer Epid. Biomarkers Prevent.* **3**: 583-590.
- Wanibuchi H., Yamamoto S., Chen H., Yoshida K., Endo G., Iiori T., Fukushima S. (1996). Promotion effects of dimethylarsinic acid on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* **17**: 2435 – 2439.
- Wanibuchi H., Hori T., Meenakshi V., Ichihara T., Yamamoto S., Yano Y., Otani S., Nakac D., Konishi Y. and Fukushima S. (1997). Promotion of rat hepatocarcinogenesis by dimethylarsinic acid as assessed in rat in vivo models: A review. *Mutat. Research.* **386**: 353-361.

- Wei M., Wanibuchi H., Yamamoto S., Li W. and Fukushima S. (1999). Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats. *Carcinogenesis*. **20**: 583-590.
- Wester R.C., Maibach H.I., Sedik L., Melendres J., Wade M.(1993). *Fundam. Appl. Toxicol.* **20**: 336.
- WHO, (1992). Guidelines for drinking water quality. Recommendation. Vol. 1, 2nd. Ed. Geneva. p41.
- WHO, (2001). Arsenic Compounds, Environmental Health Criteria 224, 2nd. Ed., World Health Organisation
- Wiencke J.K., Yager J.W.(1991). Specificity of arsenite in potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane. *Environmental Mol. Mutagen.* **19**: 195-200.
- Willsky G.R. and Malamy M.H. (1980). *Bacteriol.* **144**: 356-365.
- Winski S.L., Carter D.E. (1998). Arsenate toxicity in human erythrocytes: characterization of morphologic changes and determination of the mechanism of damage. *J. Toxicol. Environ. Health.* **53**: 345-355.
- Wisnship K.A., Das Gupa B.K. et al. (1999). *Clin. Toxicol.* **38**:305.
- Woloson D,(1990). Gene amplification in SV40 transformed human keratinocytes. Ph.D. Thesis, New York University Medical School, New York.
- Yager J.W. and Wiencke J.K.(1997). Inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase by arsenite. *Mutat. Res.* **386**:345-351.
- Yamamoto S., Konishi Y., Madsuda T., Murai T., Shibata M., Matsui-Yuasa I., Otani S., Kuroda K., Endo G., and Fukushima S. (1995). Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer. Research.* **55**: 1271-1275.
- Yamanaka K., Tezuka M., Kato K., Hasegawa A. y Okada S. (1993). Crosslinks

formation between DNA and nuclear proteins by in vivo and in vitro exposure of cells to dimethylarsinic acid. **191**: 1184 – 1191.

Yamanaka K., Katsumata K., Ikuma K., Hasegawa A., Nakano M. and Okada S.(2000). The role of orally administered dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in the promotion and progression of UVB-induced skin tumorigenesis in hairless mice. *Cancer Lett.* **152**: 79-85.

-Yamanaka K., Ohtsubo K., Hasegawa A., Hayashi H., Ohji H., Kanisawa M. and Okada S.(1996). Exposure to dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, strongly promotes tumorigenesis initiated by 4-nitroquinoline-1-oxide in the lungs of mice. *Carcinogenesis*. **17**:767-770.

Yeh S., How S.W., Lin C.S (1968). Arsenic cancer of Skin-histological study with special reference to Bowen's disease. *Cancer* **21**: 312- 339.

Yompakdee C., Bun-Ya M., Shirata K., Ogawa N., Harishama S. and Oshima Y. (1996). *Gene*. **171**: 41-47.

Zhao C.Q., Young M.R., Diwan B.A., Coogan T.P., Waalkes M.P(1997). Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA*. **94**: 10907-10912.

Zhitkovich A. and Costa M. (1992). A simple Sensitive assay to detect DNA-Protein cross-links in intact cells and in vivo: *Carcinogenesis* **13**: 1485- 1489.

Zhong C.X., Mass M.J.(2001). Both hypomethylation and hypermethylation of DNA associated with arsenite exposures in cultures of human cells identified by methylation sensitive arbitrarily-primed PCR. *Toxicol. Lett.* **122**: 223-234.