



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MODULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR
SPIRULINA EN EL HÍGADO DE RATONES
CD-1 TRATADOS CON ARSENITO DE SODIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

CESAR VALDOVINOS FLORES



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTORA
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en colaboración con la Profesora Belkis Martínez de la Universidad de la Habana durante su estancia en este Laboratorio

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
Valdovinos
Flores
Cesar
56 07 94 82
Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de Ciencias
Biología
098064649
2. Datos del Tutor
Dra.
Gonsebatt
Bonaparte
María Eugenia
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Vanegas
Pérez
Ruth Cecilia
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Del Razo
Jiménez
María de la Luz
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Rubio
Lightbourn
Julieta
6. Datos del sinodal 4
Biol.
Limón
Pacheco
Jorge Humberto
7. Datos del trabajo escrito
Modulación transcripcional por
Spirulina en el hígado de ratones
CD-1 tratados con arsenito de
sodio
61 p
2007

Para ellos de quien vengo
y por quien voy...

Voilà c'est fini.
merci a tous...
...à mort la mort...
...merci la vie...
Merci a tous,
encore une fois
d' être arrivés jusque la...
... éternellement reconnaissant
a tous ceux qui nous ont aider...
...donné des forces...
...et des idées...
... on se retire...
... sans trop partir...
...ça continue...
... sans nous déjà...

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, siempre presentes, tantas cosas por enseñar y tan pocas he aprendido... pero el camino aún es largo, no pierdan la calma.

A aquellos investigadores que lograron poner la semilla de la duda en mi pensar, varios son, pero en especial con quienes conocí ese arduo labor de hacer ciencia, Ceci y Seb, el sendero de caminos que se bifurcan tras la mejor aproximación de los hechos.

A los invertebrados muertos en la búsqueda del conocimiento, infructuoso hoy... pero aún tengo su DNA! Ya verán, ya verán... Nada es en vano.

A todos los que conforman el Laboratorio de Toxicología Ambiental: Roxana, Elsa, Wendy, Alicia, Rebeca, Miriam, Danny, Dannia, Mariana, Paty, la Dra. Rubio, Gerardo, Luisrael y Manuel; pero sobre todo a quienes me ayudaron, con quienes trabajé y aprendí: a Belkis, por quien es posible observar el presente trabajo; a Jorge, quien siempre se toma el tiempo para divagar sobre asuntos de ciencia y otros que no lo son tanto; al Dr. Pavel Petrosian quien presto su ayuda durante el comienzo de los experimentos pero sobre todo siempre estuvo presente con su peculiar y grata manera de observar el mundo y; finalmente a la Dra. Gonsebatt quien confió en mi y me ha guiado por el sendero de la biología, gracias.

A aquellos que siempre me han acompañado, mi familia, mis hermanos Mauricio y Anahi, y a esos que el tiempo a escogido y preservado para la posteridad, Ingrid y Pablo, así como también a la Banda de la fac., Bety, Ricardo, Montse, Gris, Fel, Alicia, las múltiples Ale's, y tantos otros que por la premura he olvidado mencionar, qué hubiera sido de la carrera sin ustedes? Quizás mas estudio y menos de lo demás... gracias

A quien me ha mostrado la fuerza del ser, la hermosa mujer de cabellos largos largos como el río Po, Lindsay, gracias por ser quien eres y más que mi agradecimiento, mi enorme reconocimiento y admiración a quien me enseñó que claudicar nunca es opción, Anahi.

Y claro, a la Universidad Nacional Autónoma de México, cuna del conocimiento, gracias a ella he tenido acceso a la que considero la mejor educación que hubiese podido tener.

Índice

Abreviaturas	VIII
Figuras	X
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Usos del iAs.	1
1.2. Rutas de exposición a iAs.	2
1.3. Concentraciones de iAs en el agua.	3
1.4. Efectos tóxicos de la exposición a iAs.	3
1.5. Metabolismo del iAs.	6
1.5.1. Incorporación del iAs.	7
1.5.2. Metilación del iAs.	8
1.5.3. El glutatión y enzimas antioxidantes relacionadas.	9
1.5.4. Excreción y eliminación del arsénico.	15
1.6. Mecanismos de acción del iAs y sus metabolitos.	16
1.7. Estudios realizados para evitar o revertir los daños ocasionados por iAs.	17
1.8. La Spirulina (<i>Arthrospira</i> sp).	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	21
3. HIPÓTESIS.	22

4. OBJETIVO GENERAL.	23
4.1. Objetivos particulares.	23
5. MÉTODO.	24
5.1. Exposición de organismos.	24
5.2. Extracción de RNA total.	25
5.3. RT-PCR semicuantitativo.	26
5.4. Análisis estadístico.	28
6. RESULTADOS.	29
7. DISCUSIÓN.	37
8. CONCLUSIONES.	44
9. PERSPECTIVAS.	46
10. REFERENCIAS.	47

Abreviaturas

Ado-Met	S- Adenosyl- L- Metionina
AP-1	Proteína activadora 1
AQP	Aquagliceroporinas
AQP9	Aquagliceroporina 9
As(GS) ₃	Arsénico triglutatión
As3MT	Arsénico (III) metiltransferasa
ASK1	Cinasa reguladora de señales de apoptosis 1,
BAL	Dimercaprol
BSO	L-butionin-[S,R]-sulfoximina
CAT	Catalasa
Cu	Cobre
DHLA	Ácido dihidrolipoico
DMA(GS)	Dimetilarsénico glutatión
DMPS	2,3-Dimercapto-1-propanosulfónico
DMSA	Ácido meso-2,3-dimercatosuccínico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fe	Fierro
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GGT	γ-Glutamil transpeptidasa
GP _x	Glutatión peroxidasa
GRX	Glutarredoxina

GSH	γ -Glutamil-cisteinilglicina, glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado
GSSG-Rd	Glutati3n reductasa
GST	Glutati3n-S-transferasa
iAs	Ars3nico inorg3nico
JNK	Cinasa del amino terminal de c-Jun
MA(GS) ₂	Metilars3nico diglutati3n
mRNA	RNA mensajero
MRP2	Prote3na de resistencia a m3ltiples f3rmacos 2
NADPH	Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato
NF- κ B	Factor de necrosis kappa B
Nrf2	Factor 2 relacionado a NF-E2
p38	Prote3na activada por mit3genos p38
p53	Prote3na supresora de tumores p53
Pb	Plomo
RNA	3cido ribonucleico
SOD	Super3xido dismutasa
TGF- β	Factor de crecimiento transformante
TRX	Tiorredoxina
TRXR	Tiorredoxin reductasa
Zn	Zinc
γ -GCS	γ -Glutamil-ciste3n sintetasa
γ -GCS _H	Subunidad pesada de la γ -Glutamil-ciste3n sintetasa
γ -GCS _L	Subunidad ligera de la γ -Glutamil-ciste3n sintetasa

Índice de Figuras

1. Cuerpos de agua en el mundo contaminados con iAs
2. RNA extraído de hígado de ratones CD-1
3. Muestra de la manera en que se corrieron los PCR's obtenidos por tratamiento
4. Efecto en el nivel de mRNA de *AQP9*
5. Efecto en el nivel de mRNA de *MRP2*
6. Efecto en el nivel de mRNA de γ -*GCS_I*
7. Efecto en el nivel de mRNA de *GRX1*
8. Efecto en el nivel de mRNA de *TRX1*
9. Correlación entre el nivel de mRNA de *MRP2* con *AQP9* y *TRX1* con *GRX1*
10. Correlación entre el nivel de mRNA de la γ -*GCS_I* con la concentración de GSH
11. Efecto en el índice GSH/GSSG. Tomado de Martínez, *et al.* (2007, en preparación)

1. INTRODUCCIÓN

El arsénico inorgánico (iAs) es un metaloide ampliamente distribuido en nuestro planeta de manera natural o bien de manera antrópica. Es un carcinógeno (IARC, 1987), teratógeno y co-mutágeno (Albores, *et al.*, 1997), cuya toxicidad sistémica asemeja a la del mercurio (Hg), y a la del plomo (Pb). El periodo de latencia para inducir cáncer en individuos ambientalmente expuestos es de 30 a 50 años (Tapio, y Grosche, 2006). De manera natural se encuentra en el agua, el aire, la corteza terrestre, el suelo y el sedimento en varios estados de oxidación, aunque los biológicamente importantes son las formas +3 y +5 (Mandal, *et al.*, 2002). Se encuentra formando cerca de doscientas formas minerales, siendo la más común la arsenopirita (Onishi H., 1969)

1.1. Usos del iAs

A través del tiempo el arsénico ha sido empleado con distintos propósitos, por ejemplo en la elaboración de cosméticos, en la agricultura como herbicida, fungicida y pesticida, como pigmento (el Paris Green) y en la industria para elaborar conservadores de madera y pinturas. En la actualidad se emplean los cristales de arseniuro de galio en la fabricación de semiconductores, transistores y láseres (Albores *et al.*, 1997).

También se ha usado como agente terapéutico, Hipócrates describió su uso medicinal contra el tratamiento de úlceras cutáneas desde el año 400 A.C.; durante el siglo XIX la solución inyectable Fowler, que contenía 1% de trióxido de iAs, fue utilizada

ampliamente, así, en 1958 el manual británico *Pharmaceutical and Therapeutic Products* menciona su uso contra la leucemia, las enfermedades de la piel, la estomatitis y la gingivitis en infantes, además de prescribirse como tónico de la salud, lo cual generó hemangiosarcoma (Regelson, *et al.*, 1968) y angiosarcoma (Lander, *et al.*, 1975) en aquellos expuestos crónicamente a dicha solución. También se usó como tratamiento primario contra la sífilis y algunos protozoarios hasta la Segunda Guerra Mundial. Hoy en día se emplea sólo en ciertos padecimientos como por ejemplo, el trióxido de arsénico (Trisenox[®]) que fue aprobado como quimioterapéutico contra la leucemia promielocítica aguda, por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos, en el año 2000 (Gurr, *et al.*, 2003)

1.2. Rutas de exposición a iAs

En el humano, las rutas de exposición a iAs son por inhalación: en el ámbito laboral en el proceso de fundición de metales no ferrosos como cobre (Cu), zinc (Zn) y Pb; por otra parte, en el campo por su uso como pesticida o herbicida. También se ha demostrado la absorción por piel, sobre todo de arsénico (III) ya que es más liposoluble que el arsénico (V) (Winship, K. A.1984). Sin embargo, la forma en que más seres humanos se exponen al iAs es por el consumo de agua contaminada en cuerpos de agua ricos en depósitos minerales de iAs de manera natural o antrópica (producto del enriquecimiento por lixiviación del iAs extraído de minas o pesticidas; Tapio, y Grosche, 2006).

1.3. Concentraciones de iAs en el agua

El agua posee de forma natural concentraciones de entre 1-10 µg/L de iAs, tanto en agua marina como dulce, sin embargo, en aguas ricas en minerales arsenicales la concentración puede alcanzar de 100-5000 µg/L (Smedley, *et al.*, 1996; Mandal, *et al.*, 2002) y en aguas geotermales llega hasta 8.5mg/L (Mandal, *et al.*, 2002). Las regiones con mayor concentración de arsénico en agua son Calcuta, en India (5-23000 µg/L), Bangladesh (>1000 µg/L), la Pampa y Córdoba, en Argentina (100-3810 µg/L), Xinjiang, en China (0.05-850 µg/L), y la zona norte de México (8-624 µg/L), entre otros (Figura 1; Mandal, *et al.*, 2002). La Organización Mundial de la Salud recomienda como concentración límite permisible en agua 10µg/L (WHO, 1998). Sin embargo, en México el límite actual es de 25 µg/l (Diario Oficial de la Federación, NOM-127-SSA1, 2002).

1.4. Efectos tóxicos de la exposición a iAs.

Los efectos tóxicos del iAs se conocen a través de estudios clínicos en individuos expuestos o de estudios epidemiológicos, en distintas poblaciones alrededor del mundo (Tapio, y Grosche, 2006). Asimismo se ha profundizado en los mecanismos de acción y sus efectos tóxicos mediante el uso de modelos animales. La toxicidad del iAs depende de la vía de exposición, de la duración de la misma, así como del estado de oxidación del metaloide. Una vez ingerido (ruta oral), cerca del 95% del iAs es absorbido por el tracto gastrointestinal (Saha, *et al.*, 1999) y transportado al hígado, que es el principal órgano responsable del metabolismo o bioactivación del As, para finalmente ser excretado a través

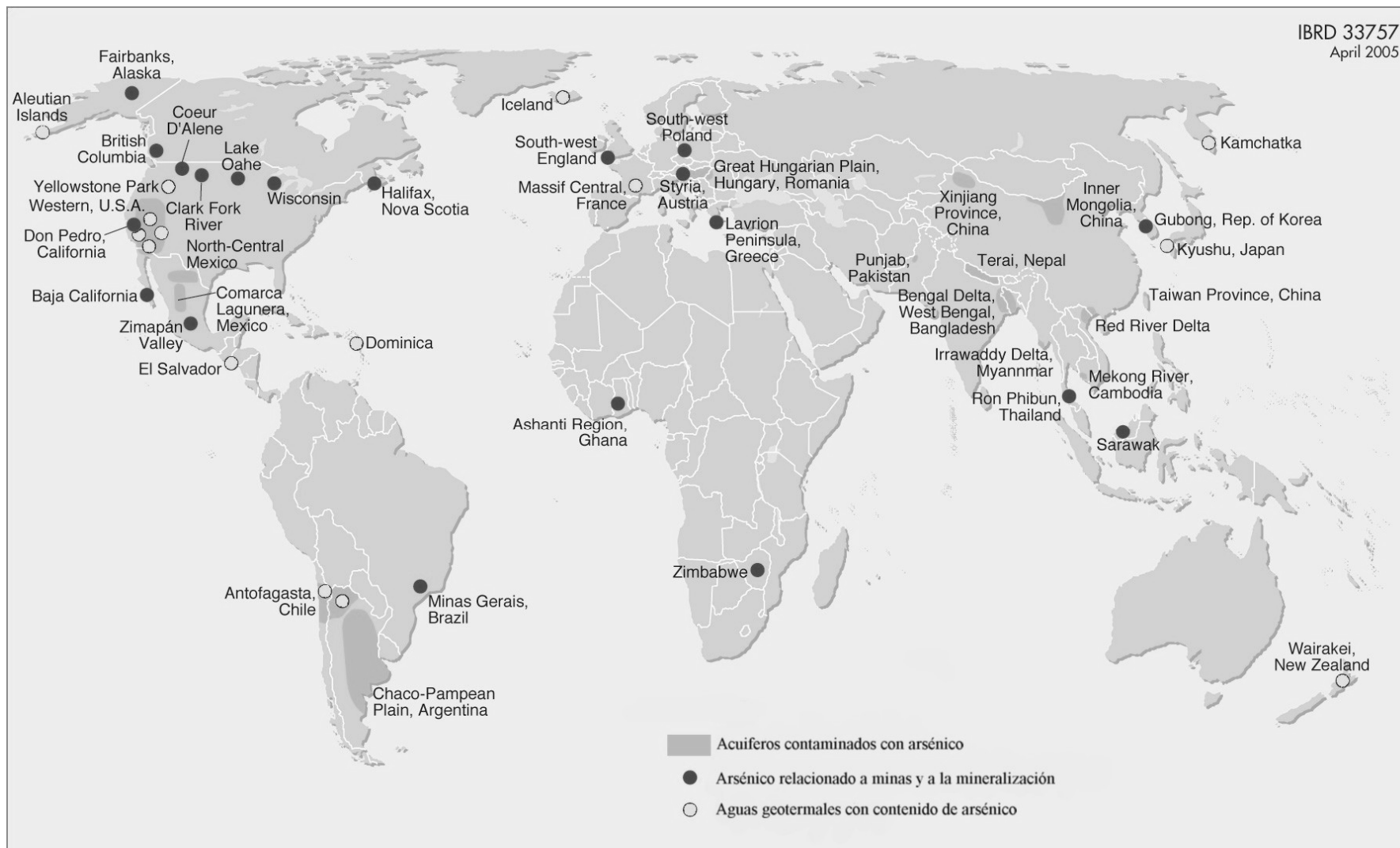


Figura 1. Cuerpos de agua en el mundo contaminados con iAs. Modificado de British Geological Survey, 2005, <http://www.bgs.ac.uk>

de la orina (cerca del 70%) y la bilis, o bien es bioacumulado en tejidos como el hígado, el riñón, el pulmón, el corazón, el bazo (Klaassen, 1996), y en zonas ricas en queratina como las uñas y el cabello (Ratnaike, 2003).

La exposición crónica a concentraciones elevadas de iAs se ha asociado al desarrollo de cáncer en varios tejidos como la piel, el hígado, la vejiga, el pulmón y el riñón (Tapio, y Grosche, 2006). En la piel la exposición a concentraciones mayores a 0.005-0.08 mg de iAs/kg/día (ATSDR, 2000) genera melanosis, queratosis y descamación, estas últimas, sobre todo en extremidades. Aunado a ello, la queratosis eventualmente puede transformarse en un carcinoma de células escamosas (Pershagen, 1981). En países en desarrollo se ha observado una asociación significativa entre el estado nutricional y la generación de leucopenia y anemia por exposición a iAs (Westhoff, *et al.*, 1975).

En el tejido pulmonar se observa daño bajo una exposición oral y por inhalación (≥ 0.015 -0.08 mg de iAs/kg/día, ATSDR, 2000), la cual provoca irritación de las membranas mucosas que resulta en laringitis, bronquitis, y rinitis (Dekundt, *et al.*, 1986). La exposición a altas concentraciones de arsénico puede generar hemorragias alveolares y edemas pulmonares, así como bronquitis asmática (Saha, 1995).

A nivel cardiovascular la exposición por agua contaminada con iAs (≥ 0.002 -0.0067 mg/kg/día, ATSDR, 2000) genera arritmias y despolarización de las células cardiacas (Fennel, y Stacy, 1981; Goldsmith, y From, 1986). Por otra parte, exposición a concentraciones bajas también ocasiona daño vascular como la enfermedad endémica de

Taiwán denominada enfermedad del pie negro (Tseng, 1977) o la enfermedad de Raynaud en Chile (Zaldivar, 1974).

También se han observado alteraciones en el sistema nervioso central como cambios en el comportamiento, confusión, pérdida de la memoria, enfermedades cerebrovasculares y neuropatías periféricas, así como efectos inmunotóxicos (Waalkes, *et al.*, 2004; Ratnaike, 2003).

Los síntomas tempranos de una exposición aguda son: la debilidad, el dolor muscular, la hiperpigmentación, la aparición de erupciones rojizas en la piel, diarrea, cólicos y daño a nivel capilar que conlleva a la vasodilatación generalizada (Saha, *et al.*, 1999). De igual manera se pueden presentar calambres musculares y entumecimiento en manos y pies. Si la exposición es por concentraciones altas de iAs (≥ 1 mg/kg/día, Saha, *et al.*, 1999) se genera daño renal y hepático por insuficiencia circulatoria, además de manifestaciones cardíacas como la cardiomiopatía aguda y hemorragias subendocardial (Ratnaike, 2003).

1.5. Metabolismo del iAs

Como ya se ha mencionado, el iAs es incorporado al organismo en dos estados de oxidación, +3 y +5, siendo el hígado el principal metabolizador del iAs, aunque otros órganos como el riñón y el cerebro también lo metabolizan. (Zakharyan *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2005).

1.5.1. Incorporación del iAs

Los mecanismos de incorporación a las células dependen de su estado de oxidación. El arsénico (V) es incorporado por transportadores de fosfatos como Pit y Pst en *Escherichia coli* (Rosenberg, *et al.*, 1977) y, aunque no ha sido demostrado, se piensa que en humanos ocurre lo mismo (Peraza, *et al.*, 1998). Por otra parte, Sanders *et al.* (1977) demostraron en *E. coli* el transporte de un metaloide trivalente, el antimonio (III) (Sb), a través de la aquagliceroporina (AQP) GlpF; puesto que el antimonio (III) presenta gran similitud química con el arsénico (III), surgió la hipótesis de que las AQP eran las responsables de su incorporación al interior de las células, lo cual fue primero demostrado con la AQP Fps1 en *Saccharomyces cerevisiae* (Wysocki, *et al.*, 2001) y más tarde en mamíferos por la AQP9, la AQP7 y la AQP3 preferentemente (Liu, *et al.*, 2002) debido a que en pH neutro el arsénico (III), existe como $\text{As}(\text{OH})_3$, que es reconocido por las AQP como un soluto neutro similar al glicerol (Liu, *et al.*, 2004). Finalmente, también se ha comprobado la capacidad de la AQP9 para permitir el paso de arsénico (III) monometilado en pH neutro, en ambos casos, de manera dependiente al gradiente de concentración (Liu, *et al.*, 2006).

Las AQP son una subfamilia de proteínas involucradas en el metabolismo de grasas (Verkman, 2005) y en funciones de permeabilidad y migración celular (Agre, *et al.*, 2002). Pertenecen a la familia de las AQP, que son proteínas de membrana, de bajo peso molecular (24-30 kDa), que son poros selectivos al agua y canales multifuncionales que transportan glicerol, urea y otros solutos, siendo estas últimas las AQP, que en mamíferos incluyen a las AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10 (Borgnia, *et al.*, 1999). De éstas, la AQP9 es

la que brinda permeabilidad a la mayor cantidad de solutos, incluyendo carbamidas, purinas y pirimidinas (Tsukaguchi, *et al.*, 1998) y se expresa en pulmón, hígado y leucocitos (Tsukaguchi, *et al.*, 1999).

1.5.2. Metilación del iAs

Una vez que el iAs ha entrado a la célula blanco es metilado por la arsénico (III) metiltransferasa (As3MT) que emplea como sustrato formas de arsénico trivalente y como donador de grupos metilo a la *S- Adenosyl- L- Metionina* (Ado-Met). Si bien, dicho proceso fue descrito desde 1933 por Challenger y colaboradores, la enzima As3MT, responsable de la biotransformación, fue identificada en 2002 (Lin, *et al.*, 2002) y su proceso aún hoy en día no se ha logrado dilucidar en su totalidad, existiendo dos propuestas:

- a) La metilación oxidante del arsénico propuesta por Challenger y colaboradores (1945, 1951) en la cual se lleva a cabo la metilación oxidante de compuestos de arsénico (III) alternados con la reducción de arsénico (V) a arsénico trivalente, por lo que se generan en secuencia las especies mono-, di- y trimetiladas de arsénico, además de comprender las especies trivalentes como metabolitos intermediarios y postular la necesidad de un sistema reductor. Esta hipótesis se ha probado *in vitro* con varios reductores como los son la tiorredoxina (TRX) la glutarredoxina, (GRX) y el ácido dihidrolipoico (DHLA) (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Waters y colaboradores (2004) en ensayos *in vitro* mostraron que el sistema TRX/TRXR/NAPDH en buffer de fosfatos (100 mM) y 1 mM de Ado-Met es el mayor estimulante de la actividad catalítica de la As3MT, generando sólo

compuestos trimetilados pero también dimetilados en la presencia de 5 mM de glutatión (GSH); por otra parte con el sistema de GRX/GSSG-Rd/NAPDH la actividad catalítica es menor y dependiente de GSH, aunque es posible observar metabolitos monometilados de arsénico.

- b) La metilación dependiente de complejos arsénico-glutatión, propuesta por Hayakawa y colaboradores (2005), postula que los complejos de arsénico con GSH son el único sustrato de la As3MT, y que la actividad catalítica no es oxidante. Debido a ello, la generación de compuestos metilados es en secuencia y las especies trivalentes se consideran como metabolitos finales, los cuales son oxidados en ambientes extracelulares. En ensayos *in vitro* en buffer de fosfatos 25 mM con 1 mM de Ado-Met y varias concentraciones de GSH se demostró la generación de compuestos mono y dimetilados de arsénico (III), así como dimetilados de arsénico (V) de manera dependiente a la concentración de GSH. Por otra parte, en un ensayo *in vivo*, la exposición a arsenito de sodio de ratones deficientes de γ -glutamil transpeptidasa (GGT) enzima responsable del catabolismo y recaptura del GSH en el túbulo contorneado proximal de la nefrona, se observó la excreción urinaria de arsénico triglutatión $As(GS)_3$ y de metilarsénico diglutatión $MA(GS)_2$, pero no de dimetilarsénico glutatión $DMA(GS)$ (Kala, *et al.*, 2004).

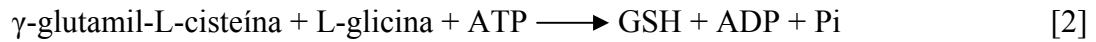
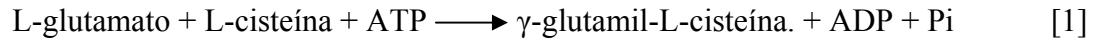
1.5.3. El glutatión y enzimas antioxidantes relacionadas

Los modelos de metilación antes descritos presentan en común el uso del poder redox intracelular proporcionado por GSH, el sistema TRX/TRXR/NAPDH o bien el

sistema GRX/GSH/GSSG-Rd/NAPDH para metabolizar el iAs, lo que concuerda con la generación de estrés oxidante por la exposición a dicho metaloide y realza la importancia de estudiar la función de estas enzimas, además de determinar su modulación por arsénico.

El GSH, γ -glutamil-cisteinilglicina, es el tiol intracelular más abundante, cuyas principales funciones son: servir como antioxidante, participar en el metabolismo de xenobióticos como desintoxicante, ser un reservorio y transportador de cisteínas, modular la proliferación celular, ayudar a mantener el potencial redox celular y participar en la síntesis de ribonucleótidos (Lu, 1999). La oxidación del grupo sulfhidrilo (-SH), presente en el residuo de cisteína del glutatión, le permite existir en forma reducida (GSH) u oxidada, como un complejo disulfuro (GSSG) (DeLeve, *et al.*, 1991), el cual es reducido a GSH por la flavoenzima NAPDH dependiente, glutatión reductasa (GSSG-Rd). En estado basal existe una relación entre GSH y GSSG de 10:1 (Meister, 1988b), cambiando ya sea por el consumo de GSH o bien el aumento de GSSG, lo cual proporciona un buen estimado del estado redox celular (Dalton, *et al.*, 2004); en ambientes más reducidos se observa proliferación celular, en ambientes oxidados, células diferenciadas o que no están proliferando y, en ambientes muy oxidados se observan mecanismos de muerte celular como necrosis y/o apoptosis (Schafer, *et al.*, 2001).

El hígado es el órgano con la mayor cantidad de GSH, alcanzando concentraciones de hasta 10 mM (Meister, 1988a), aunque es producido a partir de sus precursores en prácticamente todas las células (DeLeve, *et al.*, 1991). La síntesis, a partir de sus precursores L-glutamato, L-cisteína y L-glicina, implica dos pasos dependientes de ATP:



En la biosíntesis de GSH, el primer paso es el limitante y es catalizado por la γ -glutamil-cisteín sintetasa (γ -GCS), la cual es un heterodímero dependiente de Mg^{2+} o Mn^{2+} , compuesto por una subunidad catalítica pesada (γ -GCS_H, 73 kDa) y otra regulatoria ligera (γ -GCS_L, 31 kDa), las cuales se encuentran unidas por un enlace disulfuro, que puede ser modulado por GSH, generando una regulación no alostérica (Huang, *et al.*, 1993). Por otra parte, la concentración de la enzima se debe en gran medida a la concentración de su RNA mensajero (mRNA), ya sea por el aumento en su transcripción o bien por el cambio en su estabilidad (Wild, *et al.*, 2000). Su actividad o transcripción es inducida por una gran variedad de factores, dentro de los que se encuentran: el estrés oxidante, las citocinas, la radiación ionizante, el estrés calórico, la inhibición de la γ -GCS, el consumo de GSH o su conjugación, la prostaglandina A₂, la presencia de metales pesados, los antioxidantes y la insulina (Lu, 2000; Townsend, *et al.*, 2003). En contra parte, una deficiencia proteica en la dieta, el tratamiento con dexametasona, la eritropoietina, el factor de crecimiento transformante TGF- β , la hiperglicemia y la fosforilación de la γ -GCS, inhiben su actividad o transcripción (Wild, *et al.*, 2000).

Como ya se ha mencionado, el GSH es capaz de encontrarse en forma reducida u oxidada, en forma del complejo disulfuro GSSG, sin embargo, también es posible encontrar complejos de GSH con proteínas, evento denominado glutationilación, el cual es un mecanismo de protección contra la oxidación irreversible de sulfhidrilo en proteínas y

como reservorio de GSH ante un estrés oxidante, además de jugar un papel clave en la regulación celular ya que las proteínas glutationiladas son inactivadas (Ghezzi, 2005a; Niwa, 2007). Los primeros en observar dichos complejos fueron Brigelius *et al.* (1983; 1982) quienes mostraron que en hígado cerca del 1% del GSH total se encuentra formando complejos con proteínas, además dependiendo del estado redox celular es posible encontrar del 20 al 50% del GSH formando dichos complejos (Gilbert, 1984). Existen varios mecanismos para la formación de proteínas glutationiladas, el principal es:



donde PSH es una proteína con una cisteína libre. Este mecanismo implica que el cociente GSH/GSSG es determinante para la glutationilación.

Aunado a éste, existen otros mecanismos como el de oxidación directa; oxidación del grupo sulfhidrilo de proteínas a ácidos sulfénicos, formación a partir de S-nitrosoglutación o bien; por el ataque del radical hidroxilo (OH^\cdot) al grupo sulfhidrilo de una proteína:



La reacción [5] es particularmente importante ya que se ha observado que es llevada a cabo por la GRX (Starke, D.W. *et al* 2003).

Como lo muestra la reacción [3], dichos complejos son inestables y es posible revertirlos por medio de la acción enzimática de oxidorreductasas como GRX y TRX, las cuales se caracterizan por poseer el motivo CysXXCys en su sitio activo, y son reducidas a su vez por GSH/GR y TR, respectivamente (Holmgren, 1989; Ghezzi, 2005b). Las GRX o tioltransferasas, son una familia de enzimas de bajo peso molecular con funciones de oxidorreductasa, peroxidasa y glutatión-S-transferasa (Niwa, 2007), que son altamente específicas para la reducción de proteínas glutationiladas, donde la reacción es:



En mamíferos se conocen dos isoformas de GRX_s, la GRX1, citosólica, que, además de su función en el mecanismo de glutationilación, está involucrada en la síntesis de DNA, en la regulación de factores de transcripción y en procesos apoptóticos (Holmgren, *et al.*, 2005) y la GRX2, mitocondrial, que protege del daño provocado por la cadena fosforilativa (Holmgren, *et al.*, 2005).

Como se muestra en la reacción [3], las cisteínas libres de las proteínas interactúan con GSSG, de manera dependiente de la concentración de este último, sin embargo, también es posible que los residuos de cisteínas formen enlaces disulfuro inter e intra proteínas, lo que trae consigo un cambio conformacional y la inhibición de su actividad. Las enzimas encargadas de conservar los grupos sulfhidrilos libres son las GRXs y las TRXs, aunque la eficiencia de la TRX es varios órdenes de magnitud mayor en reducir este tipo de enlaces (Arnér, *et al.*, 2000).

Las TRXs son proteínas de bajo peso molecular (12 kDa) que se encuentran en todos los organismos vivos (Stefankova, *et al.*, 2005). En mamíferos se han descrito dos isoformas, la TRX1, citosólica y nuclear, y la TRX2, mitocondrial. La TRX1 es cofactor de las peroxirredoxinas, encargadas de la reducción del peróxido de hidrógeno (Watson, *et al.*, 2004); asimismo está involucrada en la síntesis y reparación de DNA, es cofactor de las metionina sulfóxido reductasas y de las sulfato reductasas (Powis *et al.*, 2001); regula factores de transcripción como NF- κ B, procesos apoptóticos (Hayashi, *et al.*, 1993; Saitoh, *et al.*, 1998) y es la responsable de mantener un ambiente reductor en el núcleo, lo que permite que factores de transcripción se unan al DNA (Watson, *et al.*, 2004).

En condiciones basales, cerca del 95% de la TRX1 citoplasmática y nuclear se encuentra en estado reducido (Nkabyo, *et al.*, 2002; Watson, *et al.*, 2003); además, puesto que su concentración es mucho menor que la del GSH, se ha postulado que su principal función se encuentra en procesos de señalización celular (Watson, *et al.*, 2004). Por otra parte, estudios realizados por Nkabyo y colaboradores (2002), así como por Trotter y Grant (2003) muestran que el estado redox del GSH y de la TRX se regulan de manera independiente, puesto que TRX se mantiene reducida aun bajo condiciones en que el GSH ha sido consumido y oxidado; aunque, también se ha demostrado, que TRX1 puede ser glutationilada, inhibiendo su actividad, lo cual señala cuando menos una conexión entre ambos reductores (Casagrande, *et al.*, 2002).

1.5.4. Excreción y eliminación del arsénico

Una vez que el iAs ha sido metabolizado en el hígado, es excretado hacia la bilis y hacia el torrente sanguíneo. La excreción hacia la bilis se realiza en forma de conjugados con glutatión. El arsénico (III) triglutatión, $\text{As}(\text{GS})_3$, y el monometilarsénico (III) diglutatión, $\text{MA}(\text{GS})_2$ (Kala, *et al.*, 2000) son excretados a través de transportadores como la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2, MRP2. Un transportador ATP dependiente, ubicado en la membrana canalicular de los hepatocitos y que pertenece a la superfamilia de transportadores ABC. (Kala, *et al.*, 2000). MRP2 se encarga de excretar aniones orgánicos como glucurónidos, bilirrubina, complejos glutatiónilados, y complejos sulfatados. (Vernhet, *et al.*, 2001).

Por otra parte, la excreción de arsénico al torrente sanguíneo se lleva a cabo en parte por otros transportadores MRP's (Kala, *et al.*, 2004) y aunado a ello el arsénico (III) monometilado, como ya se ha mencionado, sale de las células a través de la AQP9 (Liu, *et al.*, 2006).

Finalmente, el arsénico es eliminado del torrente sanguíneo por el riñón. En la orina humana se encuentran metabolitos metilados como el dimetil arsénico (V), DMA, en una proporción de 50 a 70; el monometil arsénico (V), MMA entre 10 y 15% y una pequeña porción de iAs (20%) (Aposhian *et al.*, 1997). Sin embargo, en la mayoría de las especies animales, se eliminan cantidades menores de MMA (<4%; Hughes, 2006).

1.6. Mecanismos de acción del iAs y sus metabolitos

Resulta importante destacar que las formas metiladas trivalentes han mostrado una mayor toxicidad que las especies inorgánicas, por lo que el proceso de metilación se considera en realidad como un proceso de bioactivación (Thomas, *et al.*, 2001). Se ha demostrado que el iAs y sus metabolitos metilados, participan en una amplia gama de procesos dentro de las células entre los que podemos mencionar:

- Alterar el balance entre la generación de especies reactivas de oxígeno y las enzimas y elementos antioxidantes, mejor conocido como la generación de estrés oxidante (Barchowsky, *et al.*, 1999). La bioactivación del arsénico consume el principal antioxidante no proteico, el GSH (Hei y Filipic, 2004); induce la NADPH oxidasa, que genera superóxido ($O_2^{\cdot-}$) el cual libera el hierro (Fe) de la ferritina generando radicales hidroxilo a partir de la reacción de Fenton (Kessel, *et al.*, 2002; Halliwell, y Gutteridge, 1992; Applegate, *et al.*, 1991), genera daño oxidante en DNA, proteínas y lípidos (Kessel, *et al.*, 2002). En contraparte, activa factores de transcripción relacionados con la inducción de enzimas antioxidantes como Nrf2, NF- κ B y AP-1 (Pi, *et al.*, 2003; Barchowsky, *et al.*, 1996; Hu, *et al.*, 2002).
- La mayor parte de los eventos celulares como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis son coordinados y mediados por transducción de señales, debido a ello cualquier modificación en dichos procesos traerá consigo alteraciones en las distintas actividades de la célula. El iAs y sus metabolitos son capaces de generar cambios en estos procesos, pues aumenta la fosforilación de cinasas de tirosina de

manera dosis dependiente (Hossain, *et al.*, 2000), así como de cinasas ser/thr (PKC), aunque la cinasa modulada y su efecto cambia según la dosis y el tejido estudiado (Qian, *et al.*, 2003; Bode, *et al.*, 2002).

- Inhibe la disponibilidad de óxido nítrico en plasma, donde funciona como dilatador de vasos sanguíneos, lo que conlleva a desórdenes del sistema vascular periférico y cardíaco (Gurr, *et al.*, 2003).
- Finalmente, la exposición a iAs genera en el DNA aberraciones cromosómicas como la formación de micronúcleos, deleciones, intercambio de cromátidas hermanas y aneuploidías (Vega, *et al.*, 1995; Mahata, *et al.*, 2003; Hackett, *et al.*, 2001), además de inhibir la reparación de éste y generar uniones DNA-proteínas (Gonsebatt, *et al.*, 1997; Ramírez, *et al.*, 2000)

1.7. Estudios realizados para evitar o revertir los daños ocasionados por iAs

A nivel mundial, el número de seres humanos expuestos a concentraciones de iAs que rebasan la normatividad en agua es de alrededor de 10 millones. En varias áreas geográficas con esta problemática se están haciendo esfuerzos por interrumpir esta exposición. Sin embargo, estas medidas son costosas y llevan tiempo en llevarse a cabo. Por esta razón es necesario investigar acerca de estrategias que permitan aliviar o revertir los efectos en el organismo de la exposición previa o que aceleren su eliminación.

Existen una amplia gama de trabajos en los que se describen los efectos del empleo de diversos compuestos quelantes. Ante una exposición aguda se han empleado agentes como el dimercaprol (BAL), el ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS) y el ácido meso-2,3-dimercatosuccínico (DMSA) aunque sus efectos ante una exposición crónica son controversiales porque pueden modificar el metabolismo del iAs favoreciendo la formación de metabolitos mas tóxicos como el MMA(III) (Aposhian *et al.*, 1997). Por otra parte, el empleo de retinol fue descrito desde los años cuarenta (Hall, 1946) y más recientemente retomado por Thiaprasit (1984) con el cual se observan mejorías clínicas e histológicas. Otros métodos son la combinación de vitaminas con minerales o con DMSA para acelerar la excreción de arsénico (Ahmad, *et al.*, 1998; Bangladesh Arsenic Control Society, 2003) además del empleo de melatonina, debido a sus propiedades antioxidantes (Pal, *et al.*, 2005); o de compuestos que activan la transcripción de enzimas antioxidantes, como el sulforafano (Shinkai, *et al.*, 2006), y la ingestión de folato, debido a que es el precursor del Ado-Met, el cual es indispensable para la metilación del iAs (Gamble, *et al.*, 2006). Finalmente, Misbahuddin y colaboradores (2006) emplearon por 16 semanas extractos del alga *Spirulina* adicionada con Zn como método para aumentar la excreción de iAs de pobladores de Bangladesh que habían estado expuestos crónicamente, observando una mejoría en las lesiones en piel así como una disminución en la concentración de este metaloide en uñas y cabello, aunado a un aumento en la eliminación por orina. Estos antecedentes son la base de interés de nuestro estudio.

1.8. La Spirulina (*Arthrospira* sp)

La *Spirulina* (*Arthrospira* sp) es una cianobacteria fotosintética filamentosa, no diferenciada, que presenta pared celular Gram-negativa y que se reproduce por fisión binaria transversal (Rippka, *et al.*, 1979). Habita cuerpos de agua con pH alcalino, ricos en depósitos de bicarbonato de sodio y con una salinidad elevada (Vonshak, *et al.*, 2000).

Ha sido empleada como fuente alimenticia por poblaciones de México desde épocas prehispánicas (Ramírez, *et al.*, 2006). Su composición es rica en nutrientes, como proteínas, vitaminas, minerales y carbohidratos, por lo que en la actualidad se emplea como suplemento alimenticio (Xue, *et al.*, 2002). Un estudio realizado por Babadzhanov *et al.* (2004) demostró que el contenido de proteínas en *Spirulina* es del 65 % del peso seco, las cuales contienen todos los aminoácidos esenciales; además contiene compuestos fenólicos, glicolípidos, polisacáridos sulfatados, ácido fólico, ácido γ -linoeico, una amplia gama de vitaminas como la C, la B₁, la B₂, la B₆, la B₁₂, la E y la D y pigmentos como lo son los carotenoides, la clorofila y la ficocianina.

Diversos estudios de toxicidad crónica han demostrado que es inocua (Chamorro *et al.*, 1985; Chamorro, *et al.*, 1995). En modelos de roedor el consumo subcrónico de 30 % del peso del organismo de *Spirulina* por machos, hembras vírgenes, hembras preñadas y por crías de hasta 21 días no estuvo asociado con efectos adversos durante el tiempo de gestación, ya que no se observaron alteraciones en marcadores histológicos, hematológicos, ni en la sobrevivencia, el crecimiento y la fertilidad (Salazar, *et al.*, 1996; Salazar, *et al.*, 1998). Premkumar, *et al.* (2001), observaron un aumento en la concentración de GSH, así

como de la actividad de enzimas antioxidantes por la ingestión de 0.025 % peso/peso de *Spirulina* durante cinco días en ratones Swiss albino, además de observar una disminución significativa en la genotoxicidad, evaluada por el índice de micronúcleos, generada por una exposición a ciclofosfamida y mitomicina-C. Se observó también este efecto antígenotóxico dado por el suplemento de 0.1% peso/peso de *Spirulina* en ratones Swiss albino expuestos a cisplatino (Premkumar, *et al.*, 2004). Ruiz Flores *et al.* (2003) demostraron el efecto anticlastogénico de la *Spirulina* ante la hidrazida maleica por el bioensayo de *Tradescantia*. Además se ha mostrado que es capaz de ejercer efectos inmunomodulatorios tanto en roedores como en humanos, aumentando la producción de anticuerpos y de interferón gamma (Hirahashi, *et al.*, 2002). La administración de *Spirulina* tiene capacidades hipoglucemiantes (Mani, *et al.*, 2002; Kato, *et al.*, 1984).

Finalmente, cabe señalar que los elementos encontrados en la *Spirulina* a los que se les ha adjudicado efectos benéficos incluyen a los compuestos fenólicos, carotenoides, clorofila, y principalmente la ficocianina (Miranda, *et al.*, 1998; Jaime, *et al.*, 2005; Vadiraja *et al.*, 2000; Chamorro *et al.*, 2002; Peto, *et al.*, 1986; Bhat, *et al.*, 2000).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a sus potenciales propiedades antioxidantes, hepatoprotectoras, así como el aumento en la eliminación del arsénico, nos interesa investigar en un modelo animal, el efecto del pretratamiento con *Spirulina* sobre la transcripción de genes de enzimas antioxidantes y de transportadores que participan en el transporte, metabolismo y eliminación del arsénico.

3. HIPÓTESIS

Con base a estudios previos donde se observa una modulación positiva de los sistemas antioxidantes por la ingesta de *Spirulina*, además de evitar el efecto provocado por ciertos agentes tóxicos en modelos animales e *in vitro* se espera que module negativamente la transcripción de los genes que participan en el transporte y/o positivamente la transcripción de genes antioxidantes y de eliminación del arsénico.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto sobre la transcripción de genes de enzimas relacionadas con el metabolismo del iAs en ratones CD-1 expuestos a diferentes dosis de arsenito de sodio previamente tratados con *Spirulina*.

4.1. Objetivos particulares

Evaluar en tejido hepático los niveles de RNA mensajero (mRNA) de: *AQP9*, *MRP2*, γ -*GCS_i*, *GRX1* y *TRX1* en ratones tratados con 0, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día de arsenito de sodio durante 9 días.

Evaluar en tejido hepático los niveles de mRNA de: *AQP9*, *MRP2*, γ -*GCS_i*, *GRX1*, y *TRX1* en ratones que ingirieron 2g/kg/día de *Spirulina* durante 30 días.

Evaluar en tejido hepático los niveles de mRNA de: *AQP9*, *MRP2*, γ -*GCS_i*, *GRX1*, y *TRX1* en ratones tratados con 2g/kg/día de *Spirulina* por 30 días y que al día 21 de este tratamiento recibieron 2.5, 5 y 10 mg/kg/día de arsenito de sodio durante 9 días.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1. Tratamiento de organismos

Se usaron ratones machos CD-1 de 4 semanas de edad de 30 ± 1 g, dispuestos aleatoriamente en grupos de 3 organismos por caja. Se aclimataron por una semana con un fotoperíodo de 12 h luz, 12 h de oscuridad y alimentados *ad libitum* con croquetas Teklad Global 2018S (Harlan[®]) en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Posteriormente, fueron tratados con arsenito de sodio, *Spirulina* y arsenito de sodio más *Spirulina* del siguiente modo:

- a) Como control positivo, tres grupos (de tres organismos cada uno) fueron tratados respectivamente con 2.5, 5 y 10 mg de arsenito de sodio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) por kg de peso, por día, vía oral (por medio de sonda gástrica) durante 9 días, con base al método de exposición propuesto por Rodríguez *et al.* (2005);
- b) Como control de los efectos de la *Spirulina* (*Spirulina* sp. en polvo, GENIX[®]) se dosificó un grupo con 2 g kg^{-1} de peso por día, vía oral, durante 30 días;
- c) Para determinar el posible efecto protector de la *Spirulina* sobre una exposición a arsenito de sodio, tres grupos recibieron el tratamiento con *Spirulina* y a partir del día 21 se sumó la dosificación de arsenito de sodio antes mencionada;
- d) Un grupo analizado como control negativo recibió agua desionizada como tratamiento.

Tanto las soluciones de arsenito de sodio como las de *Spirulina* fueron preparadas diariamente usando como disolvente agua desionizada. Para determinar de manera precisa las dosis administradas, los animales fueron pesados diariamente; cabe aclarar que durante el tiempo de exposición el acceso al alimento y agua fue *ad libitum*.

Un día después de la última dosis de cada tratamiento los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. El hígado fue extraído, lavado con solución salina al 0.9 %, para remover el exceso de sangre, y congelado a -80° C para su manejo posterior.

5.2. Extracción de RNA total

La extracción de RNA fue llevada a cabo conforme al protocolo general del Trizol[®] Reagent, Invitrogen[®] (Chomczynski *et al.*, 1987; Chomczynski, 1993). Brevemente, se homogenizó cerca de 50 mg de hígado en 1 mL de Trizol[®] y se incubó durante 15 min; posteriormente se eliminó el material insoluble por centrifugación a 12,000 g por 10 min a 4° C; se añadieron 0.2 mL de cloroformo, se agitó la muestra por 15 seg, se incubó a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó a 12,000 g por 30 min a 2° C; seguido, para precipitar el RNA, se recuperó la fase acuosa, se le agregó 0.5 ml de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 2° C; se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75 %, posteriormente se centrifugó a 7,500 g por 5 min a 2° C; finalmente se dejó secar el pellet de RNA a temperatura ambiente, se disolvió en 15 µL de agua libre de RNAsas previamente calentada a 45° C y se guardó a -20° C.

Para determinar la integridad del RNA (con base a la observación de las bandas correspondientes al 28 S y 18 S del RNA ribosomal) así como el grado de contaminación con DNA, se analizó 1 μ L de cada muestra en un gel de agarosa al 1 % además de realizar un PCR con oligonucleótidos para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, GAPDH (más adelante se especifica la secuencia de éstos).

5.3. RT-PCR semicuantitativo

Con el RNA extraído se empleó la técnica de RT-PCR con oligonucleótidos Oligo(dT) para obtener cDNA. La enzima empleada para ello fue la Transcriptasa Reversa del virus de leucemia Murina (M-MVL RT, Promega[®]) conforme al método del proveedor. Brevemente, en un microtubo se colocó 1 μ L de Oligo(dT), 3 μ g de RNA total, 1 μ L de dNTPs 10 mM y se llevó a un volumen final de 12 μ L con agua desionizada; se calentó la mezcla a 65° C por 5 min, se colocó inmediatamente en hielo y se dio un pulso en la microcentrifuga; después se añadieron y mezclaron 6 μ L del buffer de reacción 5X M-MLV RT (Promega[®]), se incubó a 37° C por 2 min y; finalmente se añadió 1 μ L de la M-MVL RT, se incubó 50 min a 37° C, se inactivó la reacción calentando a 50° C por 5 min y se guardó a 4° C.

A continuación, se analizó el nivel de expresión de mRNA de proteínas implicadas en la internalización, metabolismo y excreción de arsenito de sodio en el hígado como son: la *AQP9*, la γ -*GCS*, la *TRX1*, la *GRX1* y la *MRP2*. Como referencia se utilizaron los niveles de mRNA de la *GAPDH*. Para ello se empleó la Platinum[®] Taq DNA Polymerase de

Invitrogen®. Las condiciones utilizadas, así como las secuencias de los oligonucleótidos para dichos experimentos se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos y condiciones empleadas en la determinación de niveles de expresión de mRNA para distintos genes de interés.

Gen	Oligonucleótidos	Tm (° C)	Ciclos	Amplicón (pb)	MgCl ₂ [mM]
<i>GAPDH</i>	F: tga agg tcg gtg tga acg gat t R: cat gta ggc cat gag gtc cac c	60	30	940	2
<i>AQP9</i>	F: cag cgg tgt ctt ttg caa tg R: atc aga agg agg aac atg gta	61	25	271	2
<i>γ-GCS_I</i>	F: agg agc ttc ggg act gta tt R: tgg gct tca atg tca ggg at	55	35	600	2
<i>TRX1</i>	F: cgt ggt gga ctt ctc tgc tac gtg gtg R: ggt cgg cat gca ttt gac ttc aca gtc	60	30	100	2
<i>GRX1</i>	F: tgc aga aag acc caa gaa atc ctc agt ca R: tg gaga tta gat cac tgc atc cgc cta tg	60	30	100	2
<i>MRP2</i>	F: act gga caa gcc aca att cc R: ctg cag gag tgc tcg tat ca	61	25	250	2

Una vez realizado el PCR se prosiguió a analizar las muestras en geles de agarosa al 2 %, a 100 V por una hora. Posteriormente, se tiñó con bromuro de etidio al 0.01 % y se obtuvo la imagen con el fotodocumentador Gel Logic 200, Imaging System® (Kodak®) para su análisis densitométrico con el software ImageJ® versión 1.36b (National Institutes of Health) ajustando los valores obtenidos con la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad óptica de la banda} = \text{Log}_{(10)}(255/x)$$

donde x es el valor dado por el programa al seleccionar la banda, que corresponde al amplicón obtenido de cada PCR.

Una vez conocida la densidad óptica para cada amplificación, la expresión relativa se obtuvo del cociente de cada experimento entre su control interno (*GAPDH*) y, por último, los valores obtenidos se dieron en porcentaje respecto al control negativo.

5.4. Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del tratamiento con *Spirulina*, la exposición con iAs per se, así como la co-exposición de iAs con *Spirulina*, se utilizó la prueba de análisis de varianza de dos vías con la prueba posterior de Holm-Sidak usando el software SigmaStat (SigmaStat versión 3.10 para Windows, Systat Software). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.5$.

Además, en vías de determinar alguna función en la modulación de la expresión de mRNA de dos genes, se prosiguió con un análisis de correlación con la prueba de r de Pearson a través del software GraphPad (GraphPad InStat versión 3.05 para Windows 95, Software, San Diego California USA, www.graphpad.com), la asociación se consideró significativa cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

La extracción por medio del método de Trizol[®] permitió obtener RNA total en condiciones óptimas y con baja contaminación de DNA, como lo demuestra el PCR realizado como control positivo con oligonucleótidos para la GAPDH (Figura 2), donde sólo en la muestra 3 (Figura 2, derecha) es posible determinar contaminación. Para dicha muestra se volvió a extraer RNA.

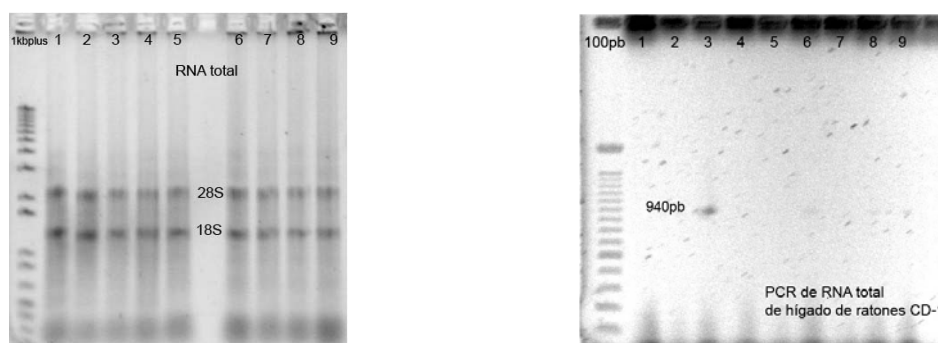


Figura 2. RNA extraído de hígado de ratones CD-1 tratados con distintas dosis de arsenito de sodio, *Spirulina* o ambas. Izquierda: el RNA total, se observan las bandas del 28 S y 18 S ribosomal; derecha: PCR de GAPDH con RNA total.

Debido al número de tratamientos empleados, se analizaron en conjunto los mRNA de las 5 proteínas estudiadas por cada tratamiento, como es posible observar en la figura 3.

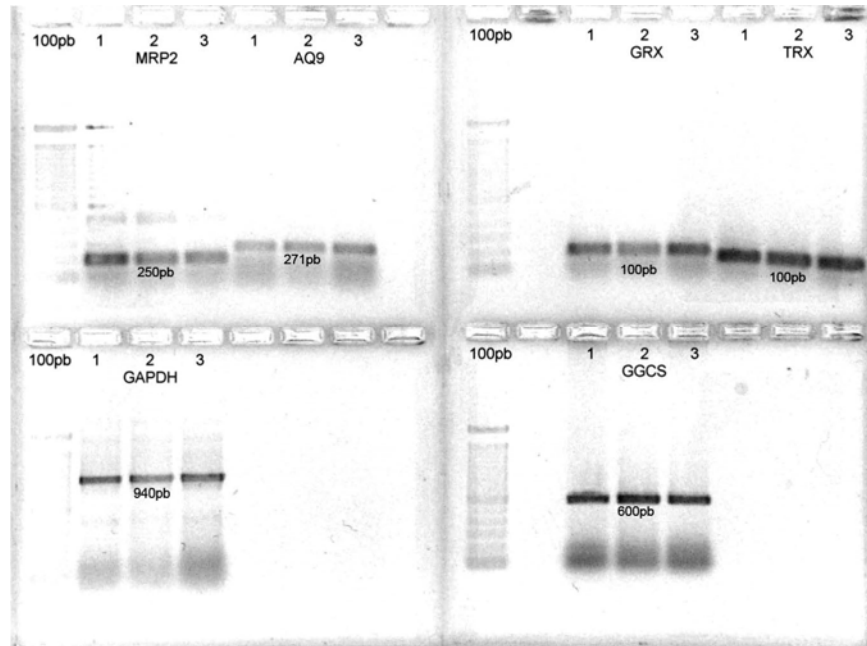


Figura 3. Muestra de la manera en que se analizaron los PCR's obtenidos por tratamiento. Gel de agarosa al 2 % para el cDNA amplificado por PCR del control interno y las 5 proteínas estudiadas, del tratamiento dosificado con *Spirulina* 2 g/kg/día por 30 días y 2.5 mg/kg/día de arsenito de sodio durante nueve días.

Interesantemente, el efecto del arsenito de sodio sobre la transcripción de AQP9, gen de la proteína encargada de su transporte, se vio inducida significativamente sólo a la dosis de 10 mg/kg/día cuadruplicando los niveles del grupo control ($p < 0.013$). Por otra parte, los animales tratados sólo con *Spirulina* no presentaron cambios en sus niveles, sin embargo, en el tratamiento conjunto es posible observar que la *Spirulina* no sólo evitó la inducción observada en la dosis mayor ($p < 0.05$), sino que lo mantuvo en niveles cercanos al control (Figura 4).

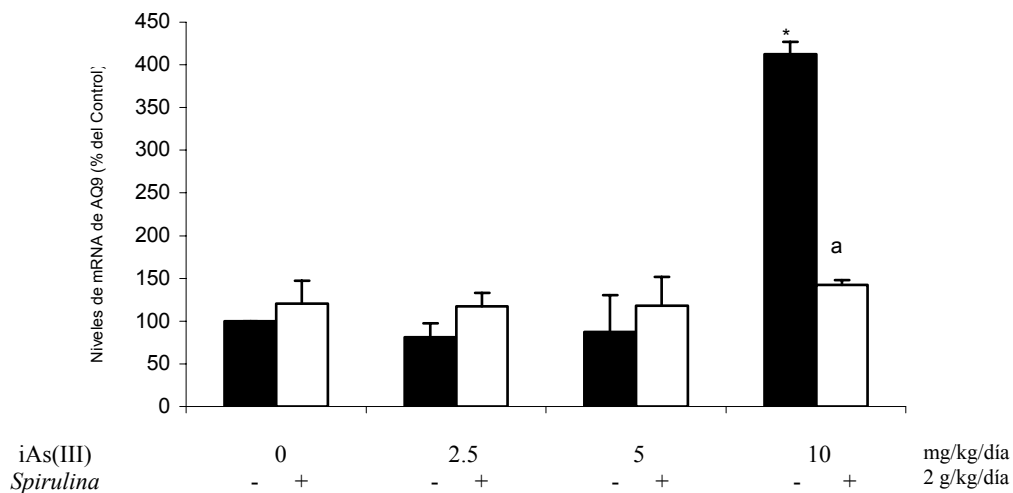


Figura 4. Efecto en el nivel de mRNA de *AQP9* en hígado de ratones CD-1 expuestos por nueve días a distintas dosis de arsenito de sodio con o sin *Spirulina*. El control negativo recibió agua desionizada. Los valores se muestran en porcentajes respecto al control negativo. Cada valor representa la media \pm S.D. * $p \leq 0.05$ respecto al control negativo; a $p \leq 0.05$ respecto al control positivo. La barra vacía corresponde al grupo expuesto a arsenito de sodio con tratamiento de *Spirulina*

El mRNA del transportador de membrana MRP2, al igual que el de AQP9, mostró una inducción significativa sólo a la dosis mayor de arsenito de sodio ($p < 0.009$), y dicha inducción fue evitada, permaneciendo con valores cercanos al control, cuando se administró previamente *Spirulina* ($p < 0.05$). Por otra parte, aunque en los tratamientos expuestos a 2.5 mg/kg/día de arsenito de sodio con o sin *Spirulina* mantienen niveles transcripcionales cercanos al control, entre ellos se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$; Figura 5).

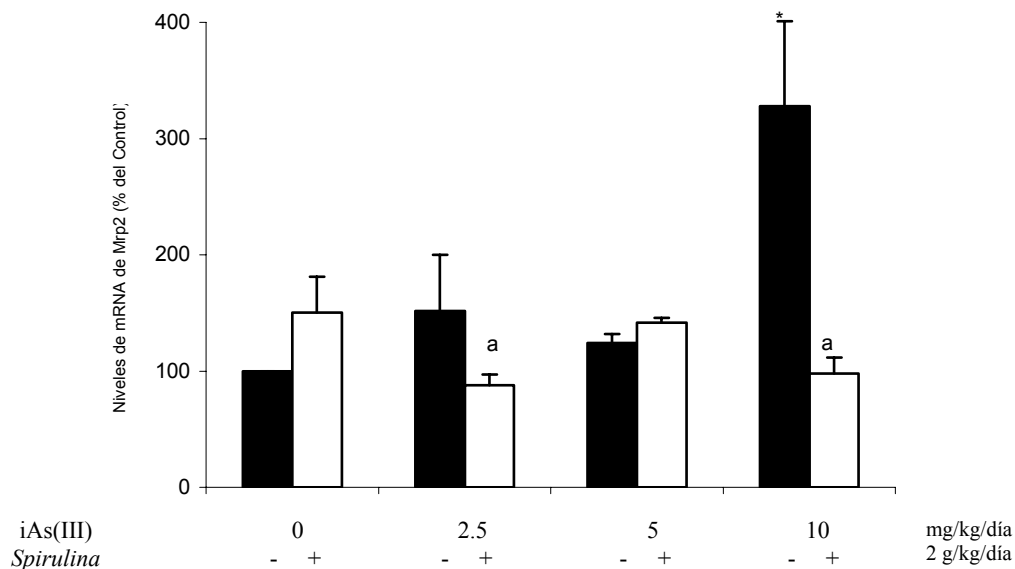


Figura 5. Efecto en el nivel de mRNA de *MRP2* en hígado de ratones CD-1 expuestos a distintas dosis de arsenito de sodio con o sin *Spirulina*. El control neg. recibió agua desionizada. Los valores se muestran en porcentajes respecto al control negativo. Cada valor representa la media \pm S.D. * $p \leq 0.05$ respecto al control negativo; a $p \leq 0.05$ respecto al control positivo. La barra vacía corresponde al grupo expuesto a arsenito de sodio con tratamiento de *Spirulina*

La transcripción de la subunidad ligera de la γ -GCS fue inhibida en todas las dosis de arsenito, observándose el mayor efecto en la dosis de 2.5mg/kg/día ($p < 0.009$). Por el contrario los ratones tratados por un mes con *Spirulina* mostraron un incremento significativo en la transcripción ($p < 0.05$), mientras que en el caso de los animales que recibieron el tratamiento de *Spirulina* y arsenito de sodio mostraron un decremento dosis dependiente, logrando en las dosis de 2.5 y 10 mg/kg/día una inhibición aún mayor que sólo con arsenito de sodio ($p < 0.05$; Figura 6)

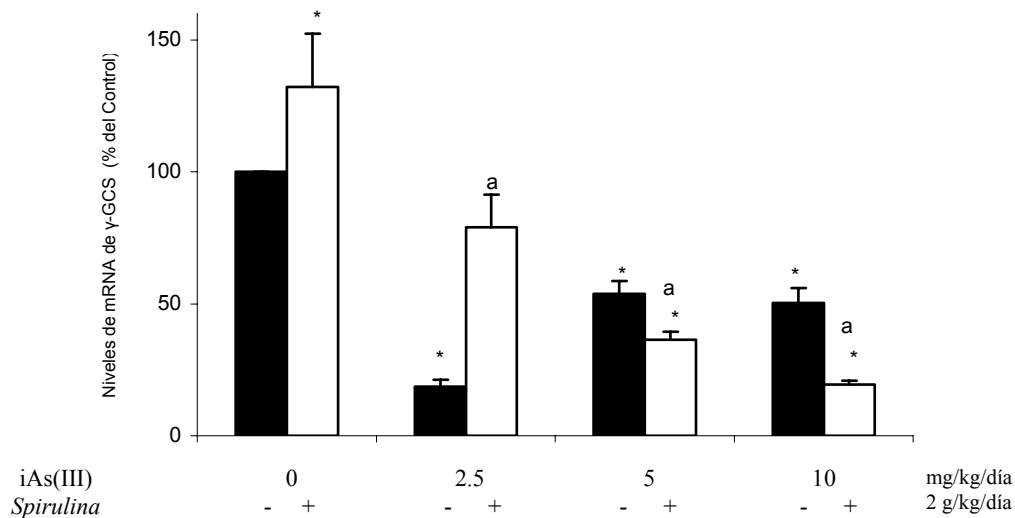


Figura 6. Efecto en el nivel de mRNA de γ -GCS₁ en hígado de ratones CD-1 expuestos a distintas dosis de arsenito de sodio con o sin *Spirulina*. El control negativo recibió agua desionizada. Los valores se muestran en porcentajes respecto al control negativo. Cada valor representa la media \pm S.D. * $p \leq 0.05$ respecto al control negativo; ^a $p \leq 0.05$ respecto al control positivo. La barra vacía corresponde al grupo expuesto a arsenito de sodio con tratamiento de *Spirulina*

El arsenito de sodio indujo la transcripción de *GRX1* cuando los animales fueron tratados con 2.5mg/kg/día de arsenito de sodio, mientras que dosis mayores inhibieron esta inducción. Por el contrario, la *Spirulina* indujo la transcripción dos veces con respecto al control ($p < 0.05$), pero cuando los animales fueron tratados con *Spirulina* y arsenito de sodio se observa una disminución de los niveles de mRNA por debajo de los niveles control y a los grupos tratados sólo con arsenito de sodio (Figura 7).

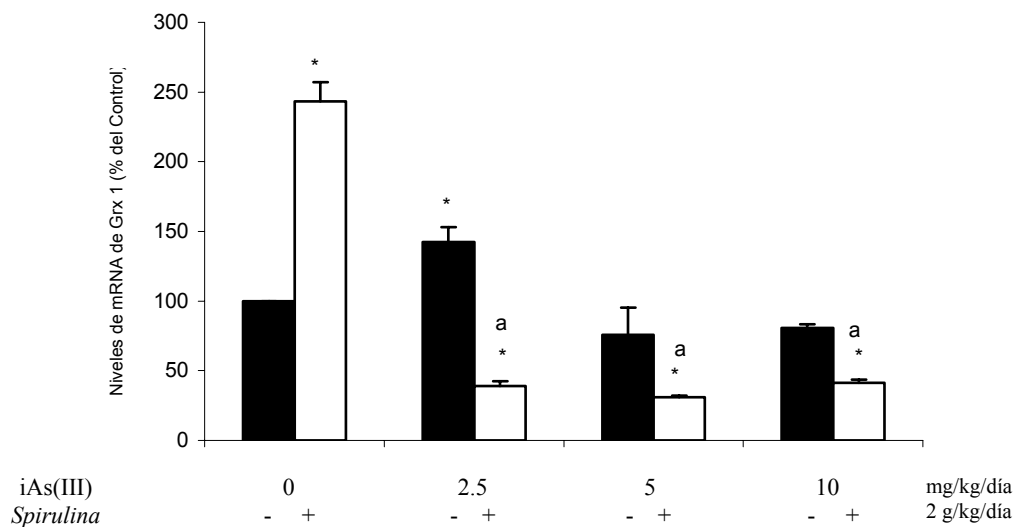


Figura 7. Efecto en el nivel de mRNA de *GRX1* en hígado de ratones CD-1 expuestos a distintas dosis de arsenito de sodio con o sin *Spirulina*. El control negativo recibió agua desionizada. Los valores se muestran en porcentajes respecto al control negativo. Cada valor representa la media \pm S.D. * $p \leq 0.05$ respecto al control negativo; a $p \leq 0.05$ respecto al control positivo. La barra vacía corresponde al grupo expuesto a arsenito de sodio con tratamiento de *Spirulina*

Con respecto a la transcripción de la *TRX1*, sólo la dosis de 5mg/kg/día de arsenito de sodio aumentó significativamente la cantidad de mRNA ($p < 0.009$), mientras que la *Spirulina* indujo su transcripción ($p < 0.05$). De igual manera que lo observado con *GRX1*, los tratamientos de *Spirulina* más arsenito, muestran una inhibición de la transcripción respecto al control y a los grupos tratados sólo con arsenito (Figura 8).

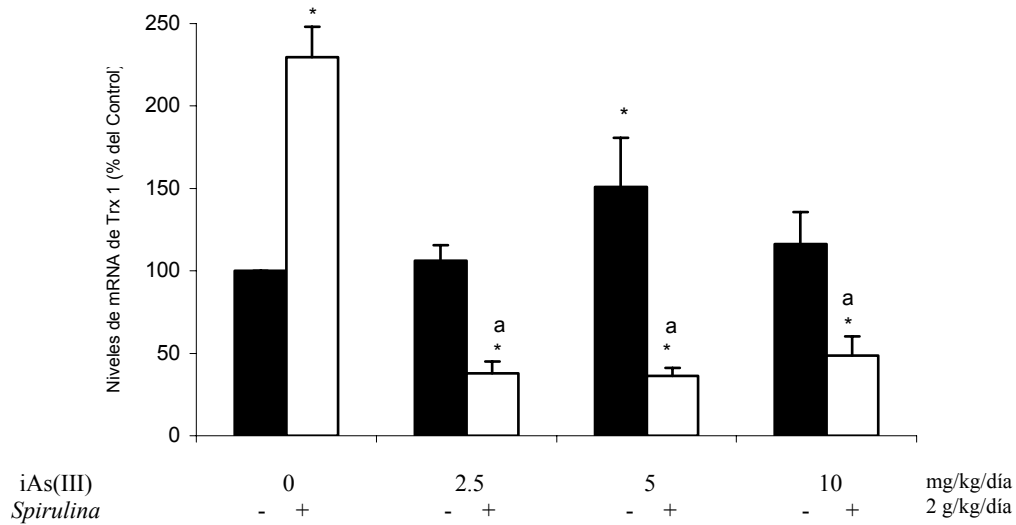


Figura 8. Efecto en el nivel de mRNA de *TRX1* en hígado de ratones CD-1 expuestos a distintas dosis de arsenito de sodio con o sin *Spirulina*. El control negativo recibió agua desionizada. Los valores se muestran en porcentajes respecto al control negativo. Cada valor representa la media \pm S.D. * $p \leq 0.05$ respecto al control negativo; a $p \leq 0.05$ respecto al control positivo. La barra vacía corresponde al grupo expuesto a arsenito de sodio con tratamiento de *Spirulina*

Con base en los resultados obtenidos, se investigaron asociaciones en la modulación del mRNA de los genes estudiados bajo los distintos tratamientos.

El nivel de mRNA de *MRP2* correlaciona de manera positiva y significativa con los niveles de mRNA de *AQP9* en los tratamientos dosificados sólo con arsenito de sodio ($r = 0.8894$, $p < 0.001$; Figura 9A). Por otra parte, se observó una correlación positiva y significativa en la modulación de los niveles de mRNA de *TRX1* y *GRX1*, en los

tratamientos de *Spirulina* más arsenito de sodio ($r = 0.9962$, $p < 0.0001$, Figura 9B). Para el resto de los genes estudiados no se encontró correlación significativa alguna (Datos no mostrados).

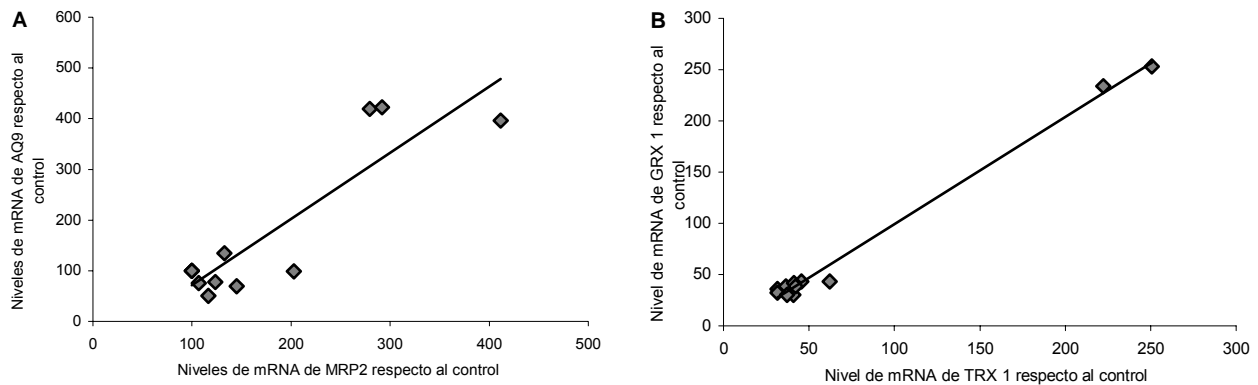


Figura 9. Correlación entre el nivel de mRNA de proteínas en hígado de ratones CD-1 expuestos a distintas dosis de arsenito de sodio con o sin *Spirulina*. A, Correlación entre la proporción de cambio, relativa al control, de *MRP2* y *AQP9* bajo el tratamiento de 0, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día de arsenito de sodio ($r = 0.8894$, $p < 0.001$). B, Correlación entre la proporción de cambio, relativa al control, de *TRX 1* y *GRX1* de los tratamientos expuestos a 0, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día de arsenito de sodio más un pretratamiento de 2 g/kg/día de *Spirulina* por 30 días ($r = 0.9962$, $p < 0.0001$)

7. DISCUSIÓN

Los resultados experimentales de este trabajo confirman hallazgos previos de nuestro laboratorio que sugieren que el arsenito de sodio modula positivamente la transcripción de *AQP9* (Torres M, 2007 en preparación) y como se ha demostrado en otros trabajos también modula positivamente la transcripción de *MRP2* (Figura 9A; Cui, *et al.*, 2004). Por otro lado, nuestras evidencias sugieren que la *Spirulina* podría impedir la entrada del arsenito de sodio a las células inhibiendo la transcripción de *AQP9*, como se ve en la figura 4, en los animales tratados con *Spirulina* y arsenito de sodio. A este respecto se ha observado que la resistencia o sensibilidad a arsenito de sodio de líneas celulares está directamente relacionada con la expresión de *AQP9* (Sanders, *et al.*, 1977; Wysocki, *et al.*, 2001; Liu, *et al.*, 2002; Liu, *et al.*, 2004; Liu, *et al.*, 2006). Kuriyama, *et al.* (2002) demostraron que el gen de la *AQP9* posee un elemento de respuesta negativo a insulina, lo cual provoca que en estado de ayuno se induzca su expresión hasta 20 veces. Sería importante demostrar si se trata del mismo o de otro factor de transcripción el que está modulando la transcripción en ambos casos. Por otro lado, encontramos una correlación significativa entre la expresión de estos dos genes que participan en la entrada y en la eliminación del arsénico a las células, si bien la modulación de la transcripción de los transportadores *MRP2* parece ser sensible a la cantidad de sustrato (Ballatori, *et al.*, 2005). Los factores de transcripción asociados a la modulación de la *AQP9* son poco conocidos, pero en nuestro caso la transcripción del gen parece ser modulada positivamente por arsenito de sodio y negativamente por el alga. Sería importante esclarecer los factores de transcripción involucrados en este proceso.

Con respecto a la transcripción de los genes que intervienen en la respuesta antioxidante, resulta interesante observar que la *Spirulina* induce la transcripción de la subunidad reguladora de la γ -GCS, pero cuando los animales reciben arsenito de sodio se observa una disminución dosis dependiente de la transcripción. Sin embargo la *Spirulina* inhibe el efecto del la dosis más baja de arsenito de sodio, sugiriendo que la ingestión de una mayor cantidad de alga podría proteger de la inhibición provocada por dosis mayores.

Martínez, B. *et al.* (2007, en preparación) midió el contenido de GSH en el hígado de los ratones tratados con arsenito de sodio y *Spirulina*. Cuando comparamos los niveles de mRNA de la γ -GCS_I con los de GSH en los mismos animales se observó una correlación significativa como se puede observar en la figura 10. Si bien es necesario demostrar que la modulación de la transcripción se expresa en una disminución de la cantidad de la enzima, la correlación significativa con los niveles de GSH sugieren que la actividad y/o la cantidad de la enzima están disminuidas por efectos del arsenito de sodio.

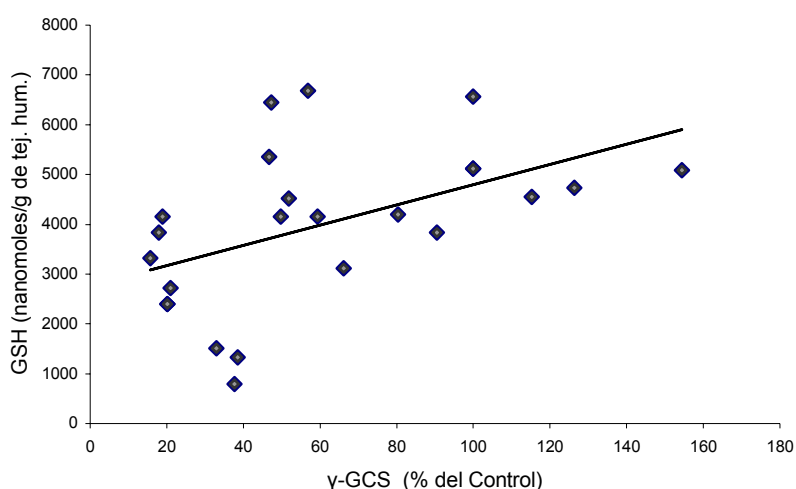


Figura 10. Correlación entre la proporción de cambio, relativa al control en mRNA de la γ -GCS_I y la concentración de GSH (nanomoles/g de tejido húmedo) en hígado de ratones CD-1 expuestos a distintas dosis de arsenito de sodio con y sin *Spirulina*. $r = 0.4968$ $p < 0.01$

Por otra parte, el simple hecho de suplementar la dieta con *Spirulina*, si bien induce la transcripción de la γ -GCS_I, reduce la relación GSH/GSSG observada en los ratones controles (Martínez, en preparación). Esta reducción evidencia la presencia de estrés oxidante (Figura 11) que podría explicar la modulación positiva en la transcripción de la γ -GCS_I en los controles que recibieron *Spirulina* sola. Este índice continúa reducido en el tratamiento conjunto de *Spirulina* y arsenito de sodio, por lo que es muy posible que la metabolización del arsénico esté alterada en estas condiciones de manera similar a lo que ocurre cuando se inhibe la síntesis de GSH por L-butionin-[S,R]-sulfoximina (BSO) (Kala, *et al.*, 2000; Liu, *et al.*, 2001; Liu, *et al.* 2003; Cui, *et al.*, 2004), condición que aumenta la toxicidad y genotoxicidad asociada al iAs. Además, subraya la importancia de la determinación del GSSG y del GSH, puesto que en los trabajos de Cases, J *et al.* (1999), Premkumar, *et al.* (2001) y Misbahuddin, *et al.* (2006), entre otros, se hace mención a la modulación de la *Spirulina* en el contenido de GSH, pero en ningún caso se proporciona el contenido de GSSG, que en nuestro caso resulta importante para entender o discutir el efecto de suplementar la dieta con *Spirulina*.

Existen evidencias que indican que la *Spirulina* es capaz de inducir la actividad de la batería de enzimas antioxidantes como los son la GST (glutación-S-transferasa), la GP_x (glutación peroxidasa), la SOD (superóxido dismutasa) y la CAT (catalasa), además de incrementar el contenido de GSH (Premkumar, *et al.*, 2001; Misbahuddin, *et al.*, 2006). En nuestro caso hicimos observaciones similares ya que los organismos que recibieron *Spirulina* sola expresaron una modulación positiva de la transcripción de GRX y TRX. De manera similar a lo comentado anteriormente, la elevación de los niveles de GSSG (Figura 11) en las células hepáticas de los animales alimentados con *Spirulina*, podría estar

modulando positivamente la transcripción de estas proteínas antioxidantes. Desde este punto de vista la administración de *Spirulina* parece aumentar la transcripción de genes de la respuesta antioxidante, sin embargo no parece proteger a las células hepáticas del efecto del arsenito de sodio ya que en los animales que recibieron primero *Spirulina* y luego arsenito de sodio los niveles de mRNA de estas enzimas disminuyeron de manera similar o mayor a lo observado en los animales tratados sólo con arsenito de sodio (Figura 6 y 7).

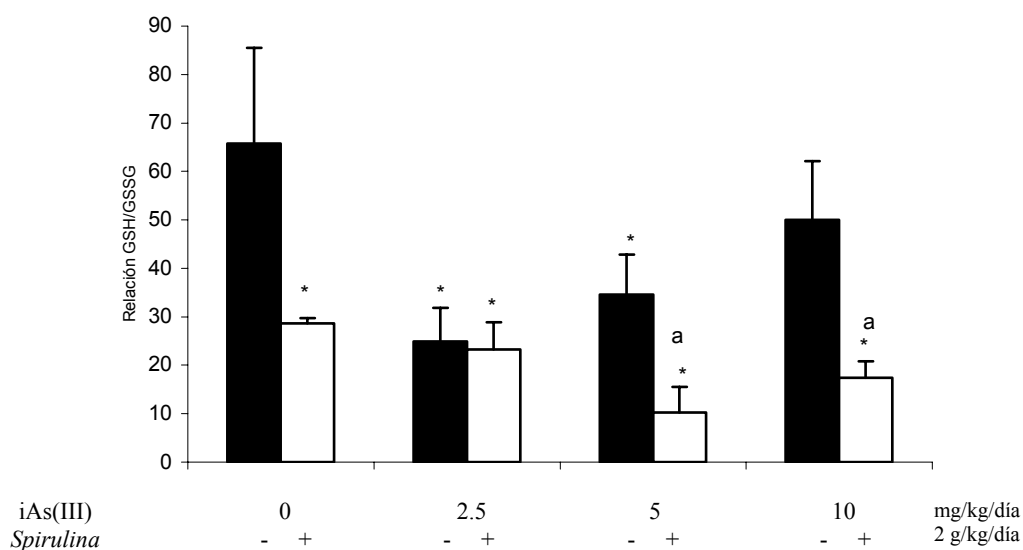


Figura 11. Efecto en el índice GSH/GSSG en hígado de ratones CD-1 expuestos por nueve días a distintas dosis de arsenito de sodio con o sin *Spirulina*. El control negativo recibió agua desionizada. Cada valor representa la media \pm S.D. * $p \leq 0.05$ respecto al control negativo; a $p \leq 0.05$ respecto al control positivo. La barra vacía corresponde al grupo expuesto a arsenito de sodio con tratamiento de *Spirulina*. Tomado de Martínez, *et al.* (2007, en preparación)

Por otro lado observamos que las dosis de 2.5 y 5 mg/kg/día de arsenito de sodio modularon positivamente la transcripción de GRX y TRX respectivamente (Figuras 6 y 7), lo que sugiere que es necesario rebasar cierto nivel de estrés oxidante para inducir su transcripción.

Dicha modulación diferencial concuerda con la inhibición dosis dependiente de la TRXR observada en cultivos celulares de hepatocitos de rata (Shan, *et al.*, 2001). Por otro lado en un modelo murino empleado en un experimento similar a este trabajo, se demostró que el arsenito de sodio a una dosis de 10 mg/kg/día fue capaz de inhibir la expresión y actividad de una flavoenzima oxidorreductasa dependientes de NADPH, la GSSG-Rd, en hígado y cerebro (Rodríguez, *et al.*, 2005).

TRX y GRX, en estado reducido, regulan negativamente la activación de la cinasa reguladora de señales de apoptosis 1, ASK1, la cual es una proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógenos (MAPKKK) capaz de activar cinasas como p38 y JNK que inician vía de apoptosis (Ichijo, *et al.*, 1997; Song, *et al.*, 2003). Esta regulación se debe a que la TRX1 se encuentra unida al extremo amino terminal y GRX1 al extremo carboxilo terminal de ASK1 inhibiendo su actividad de cinasa y activándola cuando se oxidan éstas. (Saitoh, *et al.*, 1998; Song, *et al.*, 2002). Hansen *et al.* (2006) observaron que una exposición aguda de 10 y 100 μM de arsénico en células HeLa oxida de manera dosis dependiente la TRX1 y que una exposición a 100 μM por cuatro horas, activa ASK1; entonces, la inhibición transcripcional de TRX1 y GRX1 observada en los organismos tratados con *Spirulina* más arsenito de sodio, aunado a su probable oxidación, es factible que activen ASK1 y se inicie un mecanismo apoptótico. Por otra parte, se ha observado que la oxidación de los sistemas que brindan el poder reductor celular, modifica la activación de factores de transcripción, tales como AP-1, p53, Nrf2 y NF- κ B (Horton, *et al.*, 1999; Li, *et al.*, 1999; Biswal, *et al.*, 2003), en gran medida debido a que TRX1 es quien brinda el poder redox necesario que permite la unión de factores de transcripción al DNA nuclear (Nishiyama *et al.*, 2001).

Martínez, B. (2007, en preparación) demostró que la inducción de enzimas antioxidantes generada por *Spirulina* sola se podría deber al efecto oxidante provocado por ella, puesto que el cociente GSH/GSSG se ve ampliamente reducido, sin embargo en trabajos previos se observa un efecto protector y antioxidante de la *Spirulina* ante agentes altamente tóxicos como lo son la ciclofosfamida, la mitomicina-C, la simvastatina y el cloruro de mercurio (Cases, *et al.*, 1999; Premkumar, *et al.*, 2001; Blé-Castillo, *et al.*, 2002; Misbahuddin, *et al.*, 2006). Nuestros resultados no parecen apoyar este efecto protector, sin embargo la *Spirulina* podría generar una estímulo paradójico, en donde una condición prooxidante limitada induce una respuesta adaptativa potencialmente protectora sobre un segundo inductor de estrés oxidativo (Calabrese, *et al.*, 2001).

Ahora bien, en el presente estudio es posible que este efecto no se haya podido observar debido a las dosis empleadas de *Spirulina* o de arsenito de sodio. En el caso de *Spirulina*, la dosis empleada fue mayor a la reportada en la literatura en trabajos enfocados al efecto protector. Por otro lado, debido a la gran cantidad de sustancias nutritivas que posee, es probable que implique un aumento en el metabolismo, y con ello la generación de estrés oxidante. Sin embargo existen estudios de toxicidad con una duración de 13 semanas en los que la *Spirulina* ha resultado ser inocua aún en dietas donde la dosis de *Spirulina* es el 30% del peso de los organismos (Salazar, *et al.*, 1998).

La *Spirulina* contiene elevados niveles de Fe, el cual se absorbe 60% más que el sulfato ferroso y otros complementos, elevando el hierro biodisponible en los organismos (Johnson, *et al.*, 1986; Sánchez, *et al.*, 2003). El Fe en su forma libre es un metal que induce estrés oxidante y que podría participar de manera importante en el mecanismo de

toxicidad del arsénico ya que se ha demostrado que provoca la liberación de Fe de la ferritina (Kessel, *et al.*, 2002).

El trabajo de Misbahuddin, *et al.* (2006) mostró la capacidad del Zn y de la *Spirulina* empleados como suplemento en la dieta para facilitar la excreción de arsénico en personas que habían sido expuestas crónicamente, lo cual concuerda con el efecto observado en el grupo tratado sólo con *Spirulina* en nuestro trabajo, ya que se observa una inducción de los sistemas antioxidantes responsables de la metabolización del iAs. Cuando los ratones fueron tratados con *Spirulina* y arsenito de sodio, observamos una inhibición de la transcripción de los genes de *AQP9* y *MRP2* lo cual disminuiría la entrada y la salida del arsénico a las células por lo que podría alterar la cantidad eliminada de arsenicales, sin embargo no tenemos evidencias a este respecto, por lo que sería interesante comprobarlo en estudios posteriores. Asimismo, sería importante conocer si los niveles de transcripción génica se correlacionan con los niveles y la actividad de las proteínas.

8. CONCLUSIONES

La transcripción de *AQP9* y *MRP2* fue inducida por la exposición a la dosis de 10 mg de arsenito de sodio /kg/día.

La transcripción de γ -*GCS_i* fue inhibida por la exposición al arsenito de sodio. Interesantemente, la menor dosis de arsenito de sodio genera la mayor inhibición de la transcripción de γ -*GCS_i*, y conforme aumenta la concentración se recupera a niveles cercanos al control, entre esas dosis se observa una inducción complementaria de la transcripción de *GRX1* y de *TRX1* para las dosis de 2.5 y 5 mg/kg respectivamente.

La *Spirulina* induce la transcripción de genes de enzimas antioxidantes.

En conjunto con el arsenito de sodio, la *Spirulina* genera cambios en el estado redox a través de la inhibición de la transcripción de γ -*GCS_i*, *TRX1* y *GRX1*, además de disminuir la relación GSH/GSSG, sin embargo, no modifica la expresión basal de *AQP9* y *MRP2*.

Bajo éstas condiciones experimentales, la dosis empleada de *Spirulina* no fue capaz de evitar la generación de estrés oxidante generado por el arsenito de sodio, aún más, lo aumentó.

Aunque no se determinó la capacidad de la *Spirulina* para modular la entrada de arsenito al tejido hepático, con base a la modulación transcripcional observada para las

enzimas evaluadas en este modelo, sugerimos que su participación en la acumulación de arsénico en el tejido hepático sería muy limitada.

9. PERSPECTIVAS

Evaluar el papel de los niveles de proteínas de AQP9, MRP2, GRX, TRX, en el tejido hepático de los animales tratados con arsenito de sodio, *Spirulina* y *Spirulina* más arsenito de sodio.

Evaluar la asociación entre la expresión de las proteínas con la acumulación de arsenito de sodio y sus metabolitos en las células hepáticas.

Evaluar los posibles signos de hepatotoxicidad en los mismos grupos de tratamiento.

10. REFERENCIAS

- Agre, P., King L.S, Yasui M., Guggino W.B., Ottersen O.P., Fujiyoshi Y., Engel A., Nielsen S. 2002. Aquaporin water channels: from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* **542**:3-16
- Ahmad S.K., Faruquee M.H., Sayed M.H.S.U., Khan M.H., Hadi S.A., Khan A.W. 1998. Chronic Arsenic poisoning: management by vitamins A, E, C regimen. *J. Pre Social Med (JOPSOM)*. **17**:19-26
- Albores, A., Vega, B., Del Razo, L.M., Cebrián, M. en Albert, Introducción a la toxicología ambiental, *Hemes impresores*, 1997, 247-261
- Applegate, L. A., Luscher P., Tyrrell R.M. 1991. Induction of heme oxygenase: a general response of oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* **51**:974-978
- Amér, E.S.J., Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Minireview. *Eur. J. Biochem.* **267**:6102-6109
- Aposhian, H.V., Arroyo A., Cebrian M.E., Del Razo L.M., Hurlbut K.M., Dart R.C., Gonzalez-Ramirez D., Kreppel H., Speisky H., Smith A., Gonsebatt M.E., Ostrosky-Wegman P., Aposhian M.M. 1997. DMPS-arsenic challenge test. I: Increased urinary excretion of monomethylarsonic acid in humans given dimercaptopropane sulfonate. *J Pharmacol Exp Ther.* **282**:192-200
- ATSDR, 2000. Toxicological Profile for Arsenic. Atlanta. GA: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*.
- Babadzhanov, A.S., Abdusamatova N., Yusupova F.M., Faizullaeva N., Mezhlumyan L.G., Malikova M.Kh. 2004. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds*, **40**:276-279
- Ballatori, N., Hammond C.L., Cunningham J.B., Krance S.M., Marchan R. 2005. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**:238-255

- Bangladesh Arsenic Control Society. 2003. Double-blind, randomized, placebo-controlled trial of antioxidant vitamins and minerals in the treatment of chronic arsenic poisoning in Bangladesh. *BACS: Dhaka, Bangladesh*. 1-103
- Barchowsky, A.; Dudek E. J, Treadwell M.D., Wetterhahn K.E. 1996. Arsenic induces oxidant stress and NF-kappa B activation in cultured aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **21**:783-790
- Barchowsky, A., Klei L.R., Dudek E.J., Swartz H.M. and James P.E. 1999. Stimulation of reactive oxygen, but not reactive nitrogen species, in vascular endothelial cells exposed to low levels of arsenite. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:1405-1412
- Bhat, V.B., Madyastha K.M. 2000. C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **275**:20-25
- Biswal, S., Maxwell T., Rangasamy T., Kehrer J.P. 2003. Modulation of benzo[*a*]pyrene-induced p53 DNA activity by acrolein. *Carcinogenesis*. **24**:1401-1406
- Blé-Castillo, J.L., Rodríguez-Hernández A., Miranda-Zamora R., Juárez-Oropeza M.A., Díaz Zagoya J.C. 2002. *Arthrospira maxima* prevents the acute fatty liver induced by the administration of simvastatin, ethanol and a hypercholesterolemic diet to mice. *Life Sciences*. **70**:2665-2673
- Bode, A.M. and Dong Z. 2002. The paradox of arsenic: Molecular mechanisms of cell transformations and chemotherapeutic effects. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **42**:5-24
- Borgnia, M., Nielsen S., Engel A., Agre P. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels *Ann. Rev. Biochem* **68**:425-458
- Brigelius R, Lenzen R., Sies H. 1982. Increase in hepatic mixed disulphide and glutathione disulphide levels elicited by paraquat. *Biochem Pharmacol.* **31**:1637-1641
- Brigelius R, Muckel C., Akerboom T.P., Sies H. 1983. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol.* **32**:2529-2534

- Calabrese, V., Scapagnini G., Giuffrida Stella A.M., T.E. Bates, Clark J.B. 2001. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative, disorders and longevity. *Neurochem Res.* **26**:739-764
- Carbrey J.M., Gorelick-Feldman D.A., Kozono D., Praetorius J., Nielsen S., Agre P. 2003. Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**:2945-2950.
- Casagrande, S., Bonetto V., Fratelli M., Gianazza E., Eberini I., Massignan T., Salmons M., Chang G., Holmgren A., Ghezzi P. 2002. Glutathionylation of human thioredoxin: A possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **9**:9745-9749
- Cases, J., Puig M., Caporiccio B., Baroux B., Baccou C.-C., Besancon P., Rouanet J.M. 1999. Glutathione-related enzymic activities in rats receiving high cholesterol or standard diets supplemented with two forms of selenium. *Food Chem.* **65**:207-211
- Challenger, F., Higginbottom C., Ellis L. 1933. The formation of organometalloidal compounds by microorganisms: Part I. Trimethylarsine and dimethylarsine. *J. Chem. Soc.* 1933. 95-101.
- Challenger, F. 1945. Biological methylation. *Chem. Rev.* **36**:315-361
- Challenger, F. 1951. Biological methylation. *Adv. Enzymol.* **12**:429-491
- Chamorro G., Salazar M., Izquierdo E., Salazar S., Ulloa V. 1985. Multi-generation study on reproduction and lactation in rats fed with *Spirulina*. *Archiv. Fur. Hydrobiologic.* **20**:165-171
- Chamorro, G., Salazar-Jacobo M. 1995. Toxicología de la *Spirulina*. *Tecnología de Alimentos.* **30**:13-14
- Chamorro G., Salazar M., Gomes de Lima-Araujo K., Pereira de los Santos C., Ceballos G., Fabila-Castillo L. 2002. Actualización en la farmacología de *Spirulina* (Arthrospira), un alimento no convencional. *Arch. Latinoamer. Nutr.* **52**:232-240
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156.
- Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, **15**:532-537.

- Cui, X., Kobayashi Y., Hayakawa T., Hirano S. 2004. Arsenic speciation in bile and urine following oral intravenous exposure to inorganic and organic arsenics in rats. *Tox. Sci.* **82**:478-487
- Dalton, T.P., Chen Y., Schneider S.N., Nebert D.W., Shertzer H.G. 2004. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:1511-1526
- Dekundt, G. L., Leonard A., Arany J., DuBuisson G.J. and Delavignetta E. 1986. In vivo studies in male mice on the mutagenesis effects of inorganic arsenic. *Mutagenesis.* **1**:33-34
- DeLeve, L., and Kaplowitz N. 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* **52**:287-305
- Eblin, K.E., Bowen M.E., Cromery D.M., Bredfeldt T.G., Mash E.A., Lau S.S., Gandolfi A.J. 2006. Arsenite and monomethylarsenous acid generate oxidative stress response in human bladder cell culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **217**:7-14
- Fennel, J. S. and Stacy W.K. 1981. Electrocardiographic changes in acute arsenic poisoning. *Ir.J. Med. Sci.* **150**:338-339
- Gamble M.V., Liu X., Ahsan H., Pilsner J.R., Ilievski V., Slavkovich V., Parvez F., Chen Y., Levy D., Factor-Litvak P., Graziano J.H. 2006. Folate and arsenic metabolism: a double-blind, placebo-controlled folic acid-supplementation trial in Bangladesh. *Am. J. Nutr.* **84**:1093-1101
- Ghezzi, P. 2005a. Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochem Soc Trans.* **33**:1378-81
- Ghezzi, P. 2005b. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic. Res.* **39**:573-580
- Gilbert HF, 1984 Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol.* **107**:330-351
- Goldsmith, S. and From A.H. 1986 Arsenic-induced atypical ventricular tachycardia. *N. Engl. Med.* **303**:1096-1097
- Gonsebatt M.E., Vega L., Salazar A.M., Montero R., Guzman P., Blas J., Del Razo L.M., García-Vargas G., Albores A., Cebian M.E., Kelsh M. and Ostrosky Wegman P. 1997. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res.* **386**:2199-2228
- Gurr, J-R., Yih L.-H., Samikaannu T., Bau D.-T., Lin S.-Y. and Jan K.Y. 2003. Nitric oxide production by arsenite. *Mutat. Res.* **533**:173-182

- Hackett J.A., D.M., Feldser and C.W., Greider. 2001. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability, *Cell* **106**: 275–286
- Hall, A.F. 1946. Arsenical keratosis disappearing treated with vitamin A therapy. *Arch. Derm. Syph.* **53**:154
- Halliwell B., and Gutteridge M.C.1992 Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS*. **307**:108-112
- Hansen J., Zhang M., Dean H., Jones P. 2006. Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*. **40**:138-145
- Hayakawa T., Kobayashi Y., Cui X., Hirano S. 2005. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch. Toxicol.* **79**:183-191
- Hayashi, T., Ueno Y., Okamoto T. 1993. Oxireductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **268**:11380-11388
- Hei, T.K. and Filipic M., 2004. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:574-581
- Hirahashi, T., Matsumoto M., Hazeki K., Saeki Y., Ui M., Seya T. 2002. Activation of the human innate system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *International Immunopharmacology*. **2**:423-434
- Holmgren, A 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**:13963-13966
- Holmgren, A., Johansson C., Berndt C., Lönn M.E., Hundemann C., Lillig C.H. 2005. Thiol Redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions*. **33**:1375-1377
- Horton, N.D., Biswal S.S., Corrigan L.L., Bratta J., Kehrer J.P. 1999. Acrolein causes IκB-independent decreases in NF-κB activation in human lung adenocarcinoma (A549) cells through the formation of p50 adducts. *J. Biol. Chem.* **274**:9200-9206

- Hossain K, Akband A.A., Kato M., Du J., Takeda K., Wu J., Takeuchi K., Liu W., Susuki H., Nakashima I. 2000. Arsenite induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane raft-linked signaling for activation of c-Jun amino-terminal kinase. *J. Immunol.* **165**:4290-4297
- Huang, C.S., Anderson M.E., Mesiter A.. 1993. Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* **268**:20578-20583
- Hughes, M.F. 2006. Biomarkers of exposure: A case study with inorganic arsenic. *Environmental Health Perspectives.* **114**: 17901796
- Ichijo, H., Nishida E., Irie K., Dijke P., Saitoh M., Moriguchi T., Takagi M., Matsumoto K., Miyazono K. Gotoh Y. 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* **275**:90-94
- International Agency for Research on Cancer. 1987. Arsenic and arsenic compounds. *IARC Monogr. Eval. Carcinog Risks Hum.* **23**:100-103
- Jaime, L., Mendiola J.A., Herrero M., Soler-Rivas C., Santoyo S., Señorans F.J., Cifuentes A., Ibáñez E. 2005. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *J. Sep. Sci.*, **28**:2111-2119
- Johnson, P., Shubert E., 1986. Availability of iron to rats from *Spirulina*, a blue-green algae. *Nutr. Res.* **6**:85-94
- Kala, S.V., Neely M.W., Kala G., Prater C.I., Atwood D.W., Rice J.S., Lieberman M.W. 2000. The MRP2/cMOAT Transporter and Arsenic-Glutathione Complex Formation Are Required for Biliary Excretion of Arsenic. *J. Biol. Chem.* **275**:33404-33408
- Kala S.V., Kala G., Prater C.I., Sartorelli A.C., Lieberman M.W. 2004. Formation and urinary excretion of arsenic triglutathione and methylarsenic diglutathione. *Chem. Res. Toxicol.* **17**:243-249
- Kato T., Takemoto K. 1984. Effects of spirulina on hypercholesterolemia and fatty liver in rats. *Saitama Med. College, Japan. Japan Nutr Foods Assoc. Jour.* **37**:321
- Kessel M., Liu S.X., Xu A., Santella R., Hei T.K. 2002. Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem.* **234**:301-308

- Kuriyama H., Shimomura I., Kishida K., Kondo H., Furuyama N., Nishizawa H., Maeda N., Matsuda M., Nagaretani H., Kihara S., Nakamura T., Tochino Y., Funahashi T., Matsuzawa Y. 2002. Coordinated Regulation of Fat-Specific and Liver-Specific Glycerol Channels, Aquaporin Adipose and Aquaporin 9. *Diabetes*. **51**:2915-2921
- Klaassen, C.D.1996. Heavy metals and heavy-metal antagonist In: Gilman A.G., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, pp. 1592-1614
- Hu, Y., Jin X., Snow E.T. 2002. Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF-kappa B DNA binding activity and related gene expression. *Toxicol. Lett.* **133**:33-45
- Lander JJ, Stanley R.J., Sumner H.W., *et al.* 1975. Angiosarcoma of the liver associated with Fowler's solution (potassium arsenite). *Gastroenterology*. **68**:1582-1586
- Lee T.C., Ho I.C. 1994. Expression of heme oxygenase in arsenic-resistant human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res*. **54**:1660-1664
- Lee T.C., Ho I.C., Lu W.-J., Huang J. 2006. Enhanced expression of multidrug resistance-associated protein 2 and reduced expression of aquaglyceroporin 3 in an arsenic-resistant human cell line. *Journal of Biological Chemistry*. **281**:18401-18407
- Li L., Hamilton R.F., Holian A. 1999. Effect of acrolein on human alveolar macrophage NF-κB activity. *Am. J. Physiol.* **277**:550-557
- Lin S., Shi Q., Brent F., Styblo M., Beck M., Herbin-Davis M., Hall L., Simeonsson J., Thomas D. 2002. A novel S-adenosyl-L-methionine: Arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol, *J. Biol. Chem.* **277**:10795-10803
- Liu, J. Chen H., Miller D.S., Saavedra J.E., Keefer L.K., Jonson D.R., Klaassen C.D., Waalkes M.P. 2001. Overexpression of glutathione s-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Molecular Pharmacology*. **60**:302-309

- Liu, L., Trimarchi J.R., Navarro P., Blasco M.A., Keefe D.L. 2003. Oxidative stress contributes to arsenic induced telomere attrition chromosomal instability and apoptosis. *J. Biol. Hem.* **278**:31998-32004
- Liu Z., Shen J., Carbrey. J.M., Mukhopadhyay R., Agre P., Rosen B.P. 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:6053-6058
- Liu Z., Carbrey J.M., Agre P., Rosen B.P. 2004. Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins. *Biochem Biophys Res Commun.* **316**:1178-1185
- Liu Z., Styblo M., Rosen B.P. 2006. Methylarsonous acid transport by aquaglyceroporins. *Environmental Health Perspectives.* **114**:527-531
- Lu S.C. 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB.* **13**:1169-1183
- Lu S.C., 2000. Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell. Regul.* **36**:95-116
- Mahata J., Basu A., Ghoshal S., Sarkar J.N., Roy A.K., Poddar G., Nandy A.K., Banerjee A., Ray K., Natarajan A.T., Nilsson R., Giri A.k. 2003. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India, *Mutation Research.* **534**:133–143
- Mandal B.K., Suzuki K.T. 2002. Arsenic around the world: a review. *Talanta.* **58**:201-235
- Mani, U.V.; Iyer U.M, Nayak U.S. 2002. Hypocholesterolemic effect of spirulina in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome. *J. Medicinal Food.* **5**:91-96
- Meister, A. 1988a. Glutathione Metabolism and its selective modifications. *The Journal of Biological Chemistry.* **263**:17205-17208
- Meister, A. 1988b. Glutathione. In *The liver: Biology and Pathology.* Aria, I.M., W.B. Jacoby, H. Popper, D. Schachter, and D.A. Shafritz, Eds. Raven Pres New D. Schachter, and D.A. Shafritz, Eds. *Raven Pres New York.* 401-417.
- Miranda M.S., Cintra R.G., Barros S.B.M., Mancini F.J. 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima.* *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**:1075-1079

- Misbahuddin M, Islam AZ., Khandker S., Ifthaker-Al-Mahmud, Islam N., Anjumanara. 2006. Efficacy of spirulina extract plus zinc in patients of chronic arsenic poisoning: a randomized placebo-controlled study. *Clin Toxicol (Phila)*. **44**:135-141
- Mukhopadhyay R., Rosen B.P., 2002. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ Health. Perspect* **110**:745-748
- Nguyen, T., Sharratt P.J., Pickett C.B. 2003. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**:233-260
- Nioi, P., Hayes J.D. 2004. Contribution of NAD(P):quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix–loop–helix transcription factors. *Mutat. Res.* **555**:149-171
- Niwa T. 2007. Protein glutathionylation and oxidative stress. *J. Chromatogr. B.* doi:10.1016/j.jchromb.2006.12.029
- Nishiyama A., Masutani H., Nakamura H., Nishinaka Y., Yodoi J. 2001. Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins. *IUBMB Life* **52**:29-33
- Nkabyo Y. S., Ziegler T.R., Gu L.H., Watson W.H., Jones D.P. 2002. Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colonic epithelial (Caco-2) cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**:1352–1359
- Norma Oficial Mexicana 127 NOM-127-SSA1-2002, Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamiento que debe someterse el agua para su potabilización.
- Onishi H. 1969. Arsenic, in: Handbook of Geochemistry. Wedepohl, K.H. (ed.). Springer-Verag, New York. Vol II-2, Chapter 33.
- Pal S., Chatterjee A. K. 2005. Prospective protective role of melatonin against arsenic-induced metabolic toxicity in wistar rats. *Toxicol.* **208**:25-33
- Peraza MA., Ayala-Fierro F., Barbaer D.S., Casarez A., Rael L.T. 1998. Effects of Micronutrients on metal toxicity. *Environmental Health Perspectivs.* **106**: 203-215

- Pershagen, G., Braman R. S., Vahter M. 1981 en: Environmental Health Criteria 18: Arsenic. *World Health Organ.* Geneva. 76-146
- Peto R., Doll R., Buckley J.D., Sporn M.B. 1981. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?. *Nature*, **290**:201-208
- Pi, J., Qu W., Reece J.M., Kumagai Y., Waalkes M.P. 2003. Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. *Experimental Cell Research* **290**:234–245
- Powis G., Montfort W.R. 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**:261-295
- Premkumar K., Pachiappan A., Abraham S.K., Santhiya S.T., Gopinath P.M., Ramesh A. 2001. Effect of *Spirulina fusiformis* on cyclophosphamide and mitomycin-C induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Fitoterapia.* **72**:906-911
- Premkumar K., Abraham S.K., Santhiya S.T., Ramesh A. 2004. Protective effect of *Spirulina fusiformis* on chemically-induced genotoxicity in mice. *Fitoterapia.* **75**:24-31
- Qian Y., Castranova V., Shi X. 2003. New perspectives in arsenic induced cell signal transduction. *J. Inorg. Biochem.* **96**:271-278
- Ratnaike R.N., 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J.* **79**:391-396
- Ramírez P., Del Razo L.M., Gutiérrez-Ruiz M.C., Gonsébat M.E. 2000. Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis.* **21**:701-706
- Ramírez L., Olvera R. 2006. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia.* **31**:657-663
- Reddy M.C., Subhashini J., Mahipal S.V., Bhat V.B., Srinivas Reddy P., Kiranmai G., Madyastha K.M., Reddanna P. 2003. C-phycoyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **304**:385-392

- Regelson W, Kim U., Ospina J., *et al.* 1968. Hemangioendothelial sarcoma of liver from chronic arsenic intoxication by Fowler's solution. *Cancer*. **21**:514-522
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**:1-61
- Rodríguez V.M, Del Razo L.M., Limón-Pacheco J.H., Giordano M., Sánchez-Peña L.C., Uribe-Querol E., Gutiérrez-Ospina G., Gonsébat M.E. 2005. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Tox. Scien.* **84**:157-166
- Rosenberg, H., Gerdes R.G., Chegwidden K. 1977. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **131**:505-511
- Ruiz, L.E., Madrigal-Bujaidar E., Salazar M., Chamorro G. 2003. Anticlastogenic effect of *Spirulina maxima* extract on the micronuclei induced by maleic hydrazide in *Trasdescantia*. *Life Sciences*. **72**:1345-1351
- Saha, K.C. 1995. Chronic arsenical dermatoses from tube-well water in West Bengal during 1983 to 1987. *Indian J. Dermatol.* **40**:1-12
- Saha J.C., Dikshit A.K., Bandyopadhyay M., Saha K.C. 1999. A review of arsenic poisoning and its effects on human health. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **29**:281-313
- Saitoh, M., Nishitoh H., Fujii M., Takeda K., Tobiume K., Sawada Y., Kawabata M., Miyazono K., Ichijo H. 1998. Mammalian thioredoxin is direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**:2596-2606
- Salazar M, Chamorro G., Steele C.E. 1996. Effect of *Spirulina maxima* consumption on reproduction and peri- and postnatal development in rats. *Food and Chemical Toxicology*. **34**:353-359
- Salazar M., Martínez E., Madrigal E., Ruiz L.E., Chamorro G. 1998. Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. *Journal of Ethnopharmacology*. **62**:235-241
- Sánchez M., Bernal Castillo J., Rozo C., Rodríguez I. 2003. *Spirulina (Arthrospira)*: an edible microorganism. A review. www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum/vol8n1/J_bernal.htm

- Sanders O.I., Rensing C., Kuroda M., Mitra B., Rosen B.P. 1977. Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179**:3365–3367
- Schafer F.Q., Buettner G.R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* **30**:1191-1212
- Shan L., Del Razo L.M., Styblo M., Wang C., Cullen W.R., Thomas D.J.: 2001. Arsenicals inhibit thioredoxin reductase in cultured rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* **14**:305-311
- Shinkai Y., Sumi D., Fukami I., Ishii T., Kumagai Y. 2006. Sulforaphane, an activator of Nrf2, suppresses cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *FEBS Letters.* **580**:1771-1774
- Smedley P.L., Edmunds W.M., Pelig-Ba K.B. en: Appleton J.D., Fuge R., McCall G.J.H. (Eds.), Environmental Geochemistry and Health, vol. 113, *Geological Society Special Publication, London, 1996*, p 153
- Song J.J., Rhee J.G., Suntharalingam M., Walsh S.A., Spitz D.R., Lee Y.J. 2002. Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress: glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* **277**:46566-46575
- Song J.J., Lee Y.J. 2003. Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochem. J.* **373**, 845-853
- Starke DW, Chock P.B., Mieyal J.J. 2003. Glutathione-thiyl radical scavenging and transferase properties of human glutaredoxin (thioltransferase). Potential role in redox signal transduction. *J Biol Chem.* **278**:14607-14613
- Stefanková P., Kollárová M., Barák I. 2005. Thioredoxin – structural and functional complexity. *Gen Physiol Biophys.* **24**:3-11
- Subhashini J., Mahipal S.V., Reddy M.C., Mallikarjuna M., Reddy, Rachamalla A., Reddanna P. 2004. Molecular mechanisms in c-phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukaemia cell line-k562. *Biochemical Pharmacology.* **68**:453-462
- Tapio S., Grosche B. 2006. Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutation Research.* **612**:215-246

- Thiaprasi M. 1984. Chronic cutaneous arsenism treated with aromatic retinoid *J. Med. Assoc. Thailand.* **67**:93-100
- Thomas D.J., Styblo M., Lin S. 2001. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **176**:127-144
- Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* **57**:145-155
- Trotter E.W., Grant C.M. 2003. Nonreciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *EMBO Reports* **4**:184-188
- Tseng W.P. 1977. Effect of dose-response relationships of skin cancer and Blackfoot disease with arsenic. *Environ. Health Perspect.* **19**:109-119
- Tsukaguchi H., Shayakul C., Berger U.V., Mackenzie B., Devidas S., Guggino W.B., van Hoek A.N., Hediger M.A. 1998. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J. Biol. Chem.* **273**:24737-24743.
- Tsukaguchi H., Weremowicz S., Morton C.C., Hediger M.A. 1999. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am. J. Physiol.* **277**:F685–F696.
- Vadiraja B.B., Madyastha K.M. 2000. C-PC: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* **275**:20-5.
- Vega L., Gonsebatt M.E., Ostrosky-Wegman P. 1995. Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes *in vitro*: an individual susceptibility effect detected, *Mutation Research.* **334**:365–373.
- Verkman A.S. 2005. More than just water channel: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci.* **116**:3225-3232.
- Vernhet, L., Seite M.P., Allain N., Guillouzo A., Fardel O. 2001. Arsenic induces expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene in primary rat and human hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**:234-239.

- Vonshak A., Tomaselli L. 2000. *Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology*. In *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht Holland. 505-522 pp
- Waalkes M.P., Ward J.M., Diwan B.A. 2004. Induction of tumors of the liver, lung, ovary and adrenal in adult mice after brief maternal gestational exposure to inorganic arsenic: promotional effects of postnatal phorbol ester exposure on hepatic and pulmonary, but not dermal cancers, *Carcinogenesis*. **25**:133-141
- Waters B.S., Devesa V., Del Razo L.M., Styblo M., Thomas D.J. 2004. Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat Cyt19, an arsenic methyltransferase. *Chem. Res. Toxicol.* **17**:404-409
- Watson W.H., Jones D.P. 2003. Oxidation of nuclear thioredoxin during oxidative stress. *FEBS Lett.* **544**:144-147
- Watson W.H., Yang X., Choi Y.E., Jones D.P., Kehrer J.P. 2004. Thioredoxin and its role in Toxicology. Review. *Tox. Scien.* **78**:3-14
- Westhoff D.D., Samaha R.J., Barnes A. 1975 Arsenic intoxication as a cause of megaloblastic anemia. *Blood.* **45**:241-246
- Wild A.C., Mulcahy R.T. 2000. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radic. Res.* **32**:281-301
- Winship K.A. 1984. Toxicity of inorganic arsenic salts. *Adv. Drug. React. Acute Poisoning Rev.* **3**:129-160
- World Health Organization, 1998. Guidelines for Drinking-water Quality. *WHO*, Geneva.
- Wysocki R., Chery C.C., Wawrzycka D., Van Hullen M., Cornelis R., Thevelein J.M., Tamas M.J. 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **40**:1391-1401
- Xue C., Hu Y., Saito H., Zhang Z., Li Z., Cai Y., Ou C., Lin H., Imbs A.B. 2002. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chem.* **77**:9-13

Zaldivar R. 1974. Arsenic contamination of drinking water and foodstuffs causing endemic chronic arsenic poisoning. *Beitr. Pathol.* **151**:384-400