



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA EXPRESIÓN DE *AS3MT* EN DISTINTAS
REGIONES DEL CEREBRO DE RATÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARIANA MORALES CERVANTES

DRA. MARÍA EUGENIA
GONSEBATT BONAPARTE

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

<p>1. Datos del alumno:</p> <p>Morales Cervantes Mariana 56 55 97 84 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 402051354</p>	<p>5. Datos del sinodal 3:</p> <p>Dra. Julieta Rubio Lightbourn</p>
<p>2. Datos del tutor:</p> <p>Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte</p>	<p>6. Datos del sinodal 4:</p> <p>Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina</p>
<p>3. Datos del sinodal 1:</p> <p>Dra. Regina Dorinda Montero Montoya</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito:</p> <p>La expresión de <i>As3mt</i> en distintas regiones del cerebro del ratón 65 p. 2007</p>
<p>4. Datos del sinodal 2:</p> <p>Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez</p>	

La expresión de *As3mt* en distintas regiones del cerebro de ratón

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. CONTEXTO	3
B. TOXICOLOGÍA	3
C. TOXICIDAD	3
D. EL ARSÉNICO	4
1. Características químicas	4
2. Aspectos históricos	4
3. Toxicidad	4
4. Química ambiental y distribución	5
5. Toxicocinética y metabolismo	6
6. Arsénico-III-S-Adenosil-L-metionina-metiltransferasa(Arsenic(III)-Methyltransferase o <i>As3mt</i>)	9
7. Biometilación de As en el cerebro	13
8. S- Adenosil-L-metionina y balance de metilación	13
9. Efectos adversos de la exposición al arsénico inorgánico	15
a) Efectos agudos	15
b) Efectos crónicos	15
(1) Neurotoxicidad	16
(a) Efectos en el sistema nervioso periférico	16
(b) Efectos en el Sistema Nervioso Central y de comportamiento	16
(c) Estudios de neurocomportamiento en animales	19
(d) Efectos en los sistemas de neurotransmisión	21
(e) Mecanismos de acción	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
IV. HIPÓTESIS	28
V. MATERIAL Y MÉTODOS	29
A. Plan general de la metodología	29
B. Métodos	30
1. Tratamientos con arsenito de sodio	30

2. Sacrificio de los animales y disección de las regiones cerebrales _____	30
3. Extracción de RNA _____	30
4. Concentración y pureza de RNA _____	31
5. Verificación de la integridad del RNA _____	31
6. RT-PCR _____	32
7. Diseño de oligonucleótidos para <i>As3mt</i> _____	32
8. Estandarización de las condiciones de amplificado por PCR para <i>As3mt</i> _____	32
9. PCR _____	34
10. Determinación de los niveles de mRNA de <i>As3mt</i> _____	35
11. Análisis y cuantificación de los niveles de mRNA de <i>As3mt</i> _____	35
12. Determinación de As en las regiones cerebrales _____	35
13. Análisis estadístico _____	36
VI. RESULTADOS _____	37
VII. DISCUSIÓN _____	45
VIII. CONCLUSIONES _____	50
IX. PERSPECTIVAS _____	51
X. REFERENCIAS _____	52
XI. APÉNDICES _____	64
A. Materiales _____	64
B. Material biológico _____	65
C. Reactivos _____	65
D. Buffers _____	66
E. Soluciones _____	66

ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiacético
5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AdoMet, SAM	S-Adenosil-L-metionina
As	Arsénico
As(III)	Arsénico trivalente
As(V)	Arsénico pentavalente
As3mt o cyt19	Arsénico-3-S-Adenosil-L-metionina metiltransferasa
As ₄ S ₄	Disulfuro de arsénico
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Colina acetiltransferasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CH, CH ₂ , CH ₃	Grupos metilo
ChAT	Acetilcolintransferasa
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
Cu	Cobre
CYP 2A6,2E1, 3C9	Citocromo P450 2A6, 2E1, 3C9
D.O.	Densidades ópticas
DA	Dopamina
DAO	Diamina oxidasa
DAT	Transportador de dopamina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMA	Arsénico dimetilado
DMA(III)	Ácido dimetilarsonoso
DMA(V)	Ácido dimetilarsonico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DTT	Ditiotreitól

GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada
S GCS _L	Subunidad ligera de γ -glutamyl-cisteína-sintetasa
S GCS _P	Subunidad pesada de γ -glutamyl-cisteína-sintetasa
Glu	Glutamato
GR	Glutación reductasa
GRX	Glutarredoxina
GSH	Glutación
HMT	Histamina-N-metiltransferasa
HVA	Ácido homovalínico
I.G.	Intubación intragástrica
I.Q.	Coficiente de inteligencia
IAA	Imidazol de ácido acético
IARC	Internacional Agency for Research of Cancer
iAs	Arsénico inorgánico
MAO	Monoamino oxidasa
Mg ₂ Cl ₂	Cloruro de magnesio
MMA	Arsénico monometilado
MMA(III)	Ácido metilarsonoso
MMA(V)	Ácido metilarsónico
mRNA	RNA mensajero
MRP2	Proteína de resistencia a múltiples fármacos 2
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NE	Norepinefrina/noradrenalina
NET	Transportador de norepinefrina
NK cells	Células asesinas
NO	Óxido nítrico
Pb	Plomo
PNMT/PEMT	Feniletanolamina metiltransferasa
RNA	Ácido ribonucléico

ROS	Espécies reactivas de oxigeno
rRNA	RNA ribosomal
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TGI	Tracto gastrointestinal
t-MH	<i>tele</i> -metilhistamina
TR	Tioredoxin reductasa
tRNA	RNA de transferencia
Trx	Tioredoxina
UV	Ultravioleta
Zn	Zinc

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras:

- 1.- Metabolismo del arsénico en el hígado
- 2.- Alineamiento múltiple de secuencias de *cyt19*
- 3.- Esquema hipotético de la metilación oxidativa y la reducción del As catalizada por *As3mt*
- 4.- Estandarización de condiciones de amplificación por PCR (temperatura de alineamiento)
- 5.- Estandarización de condiciones de amplificación por PCR (concentración de $MgCl_2$)
- 6.- Curva de ciclos para amplificar *As3mt* por PCR
- 7.- RNA extraído de mesencéfalo e hipocampo de ratones CD-1
- 8.- Expresión de *As3mt* en controles
- 9.- Expresión de *As3mt* en corteza, hipocampo, estriado, mesencéfalo, protuberancia, bulbo, hipotálamo e hipófisis
- 10.- Expresión de *As3mt* en tálamo
- 11.- Expresión de *As3mt* en cerebelo
- 12.- Formación de metabolitos metilados de As por región cerebral (10mg/kg)

Tablas:

- 1.- Efectos en el comportamiento de humanos causados por exposición a As
- 2.- Efectos en el comportamiento de roedores por la exposición a compuestos arsenicales
- 3.- Efectos en sistemas neurotransmisores y sus metabolitos debido a la exposición de roedores a compuestos arsenicales

RESUMEN

Dentro del organismo el As se metaboliza en un proceso que genera compuestos orgánicos de As mediante reducción a As(III) y metilación oxidante. Se conoce que la toxicidad y los efectos adversos causados por el As correlacionan estrechamente con la capacidad de metabolizarlo, ya que este proceso genera estrés oxidante debido a la gran cantidad de radicales libres producidos. Una de las enzimas involucradas en este proceso es la *S-Adenosilmetionina Arsénico 3 Metiltransferasa* (*As3mt*). Se ha demostrado la capacidad del cerebro de ratón para formar metabolitos metilados. Sin embargo no hay estudios que exploren si todas las regiones del cerebro metabolizan estos compuestos. El objetivo de este trabajo es investigar la expresión de *As3mt* en diez regiones distintas del cerebro de ratones tratados con distintas dosis de arsenito de sodio.

Se usaron ratones CD-1 machos de 4 semanas de edad, a los que se les administraron distintas cantidades (0, 2,5mg/kg, 5 mg/kg y 10mg/kg) de arsenito de sodio por vía oral por nueve días. Después de sacrificarlos, se extrajeron las siguientes regiones del cerebro: Corteza, hipocampo, estriado, mesencéfalo, tálamo, hipotálamo, cerebelo, protuberancia, bulbo e hipófisis. Se extrajo el RNA y se realizó un análisis semi-cuantitativo de la expresión del mRNA de *As3mt* por RT-PCR. Los resultados muestran que todas las regiones expresan de forma constitutiva *As3mt*, que esta expresión tiene un patrón región-diferencial; casi todas las regiones expresan niveles similares de *As3mt*, sin embargo en el tálamo, se observó una disminución de la expresión en los animales tratados con 2.5mg/kg y un aumento en la de 10mg/kg. y en el cerebelo se presentó una disminución de la expresión en las dosis de 5 y 10 mg/kg. Por otro lado encontramos que no hay diferencias en la formación de metabolitos metilados de As en las distintas regiones, con excepción de bulbo, el hipotálamo y la hipófisis. Asimismo, esta formación de especies arsenicales no corresponde en términos generales con la expresión de *As3mt*.

I. INTRODUCCIÓN

El arsénico inorgánico (iAs) es un elemento ampliamente distribuido en la corteza terrestre, que se encuentra naturalmente en la mayoría de los ecosistemas en pequeñas cantidades. Los compuestos orgánicos arsenicales presentes en la naturaleza son producto de la actividad biológica. El iAs también es liberado al ambiente por la actividad humana debido a su amplio uso en actividades industriales.

La principal fuente de exposición al iAs es el agua potable y los alimentos cocinados con esa agua. En lugares como Argentina, Bangladesh, Brasil, Chile, Estados Unidos, India, México y Taiwán, se exceden varias veces los límites permitidos para agua (25 $\mu\text{g As/L}$. en México, 10 $\mu\text{g As/L}$. según WHO, 1993). La intoxicación con As por vía aérea y del suelo es mucho menor, pero puede aumentar significativamente en poblados cercanos a fuentes de emisión.

Se ha comprobado claramente que la exposición al iAs a través de la ingestión del agua, genera diversos efectos en la salud de las personas, entre los que se encuentran lesiones en la piel, alteraciones en el sistema cardiovascular, en el metabolismo del grupo hemo, distintos tipos de cáncer como el de riñón, vejiga, piel, hígado y pulmón, alteraciones en el sistema inmune y efectos en el sistema nervioso, tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) como en el sistema nervioso central (SNC).

La mayor parte de las investigaciones sobre la toxicidad de As se han enfocado al estudio del cáncer, sin embargo se han reportado alteraciones cognitivas, funcionales y fisiológicas en individuos expuestos al iAs. Debido a lo anterior, este trabajo estudia los efectos de la exposición al iAs en el SNC.

El cerebro es el órgano que procesa e integra toda la información proveniente del sistema nervioso periférico, del sistema hormonal y del inmune. El SNC regula las emociones, pensamientos, percepción, aprendizaje, recepción de estímulos externos,

memoria, control del movimiento, sistema neuroendócrino, sistema inmune y el sistema circulatorio.

El iAs es metabolizado en el organismo mediante un proceso de biometilación que lleva a cabo la arsénico-(III)-metiltransferasa (*As3mt*). Durante este proceso se generan compuestos metilados que son más reactivos y citotóxicos que el iAs. Por ello se ha relacionado la capacidad de metilar este metaloide con los efectos adversos producidos por la exposición al iAs.

Recientemente se demostró que el cerebro es capaz de metabolizar el iAs, a partir de este hecho surgió la idea de hacer este trabajo. Se sabe que la biometilación del iAs genera alteraciones fisiológicas por los metabolitos generados en los tejidos. Entonces resulta importante conocer si las distintas regiones cerebrales expresan de forma similar *As3mt*. Por lo que este trabajo pretende determinar si la expresión de *As3mt* es constitutiva en las regiones cerebrales estudiadas y si la exposición a As modula su expresión.

Los resultados de este trabajo contribuirán con información que permita comprender mejor la regulación de *As3mt* y las funciones que la enzima realiza en el cerebro, la forma en que el cerebro responde a la intoxicación con As, así como identificar las regiones cerebrales que pudieran presentar mayor susceptibilidad a los efectos deletéreos durante la exposición al iAs.

II. ANTECEDENTES

A. CONTEXTO

Los seres humanos vivimos rodeados del ambiente natural y del ambiente creado por el hombre. Inmersos en ellos interactuamos con infinidad de otros organismos, otros humanos, sustancias, etc. Entre todos esos agentes con los que interactuamos, aquellas sustancias extrañas, entendiendo extraño como no propio, que entran al organismo se denominan xenobióticos, como por ejemplo alimentos, medicamentos, contaminantes, toxinas, etc. Estos agentes pueden tener efectos benéficos y/o adversos para el organismo. En el caso de los metales y metaloides, algunos de ellos pueden ejercer efectos tóxicos, como es el caso del arsénico inorgánico (iAs).

B. TOXICOLOGÍA

La disciplina científica que estudia los efectos adversos generados por agentes físicos y químicos es la toxicología. Éste es un estudio descriptivo a nivel de la toxicología mecanística, en la que se estudian los mecanismos celulares, bioquímicos y moleculares por los cuales un agente químico ejerce sus efectos adversos en los organismos vivos (Klaasen y Watkins III, 2003).

C. TOXICIDAD

La toxicidad de un agente se describe por parámetros establecidos que intentan enumerar el conjunto de los efectos adversos provocados por los xenobióticos. La toxicidad generada por un compuesto químico depende de la naturaleza del agente al que se está expuesto, la dosis de exposición, la vía de exposición y la duración y frecuencia de la exposición. En este trabajo los animales estuvieron sujetos a exposición subaguda.

D. EL ARSÉNICO

1. Características químicas

El arsénico (As) es un elemento ampliamente distribuido en el planeta, está clasificado como metaloide ubicuo que tiene 33 de número atómico y pertenece a la familia V de la tabla periódica junto con el nitrógeno y el fósforo, con los que comparte sus propiedades. El As, en estado oxidado, puede ser trivalente +3 [As(III)] y pentavalente +5 [As(V)].

2. Aspectos históricos

Los compuestos del As se han usado desde hace muchos años como agentes medicinales y venenos. Hipócrates describió su uso medicinal desde el año 400 A.C., recomendando la aplicación de una pasta de rejalgar (As_4S_4) para el tratamiento de úlceras cutáneas. En la edad media, el As fue muy usado por sus propiedades tóxicas, especialmente el arsénico blanco (trióxido de arsénico) por su alta toxicidad. En los primeros años del siglo pasado los arsenicales orgánicos se utilizaron para combatir enfermedades como la tripanosomiasis y la sífilis; así como los arsenicales inorgánicos para el tratamiento de enfermedades cutáneas crónicas, anemia, leucemia y enfermedades pulmonares. A pesar de que se conocen la variedad de efectos adversos causados por el tratamiento con compuestos arsenicales, su uso como terapéutico sigue siendo aplicado para combatir ciertos tipos de leucemias y malignidades de origen hematopoiético.

3. Toxicidad

El iAs fue el primer metaloide clasificado como carcinógeno (IARC, 1980) y tiene toxicidad parecida a la del mercurio y a la del plomo. Es también un agente teratogénico y mutagénico (Albores, *et al.*, 1997).

4. Química ambiental y distribución

El iAs se encuentra en muchos minerales como los arsenuros de cobre, níquel y hierro o como sulfuro u óxido de arsénico. También puede ser liberado al ambiente por la actividad volcánica, la erosión de depósitos minerales y por diversas actividades humanas. Se encuentra naturalmente en la mayoría de los ecosistemas en pequeñas cantidades, los compuestos orgánicos arsenicales presentes en la naturaleza son producto de la actividad biológica, sin embargo también es liberado al ambiente por la actividad humana, como en las plantas termoeléctricas donde se usan combustibles fósiles, en la fundición y refinación de metales no ferrosos (Zn, Cu y Pb), así mismo el óxido de As(III) es el compuesto más comercial del As y es un producto de la fundición del cobre o hierro (Vahter, 1981). También se ha descrito su uso para la protección de maderas (método cobre-cromo-arsénico), la fabricación de semiconductores a base de arseniuro de galio e indio en la industria electrónica y se encuentra también biodisponible por el almacenamiento inadecuado de desechos industriales que contienen iAs (Albores *et al.*, 1997). Los compuestos arsenicales se usan también en la agricultura y la silvicultura como pesticidas, herbicidas y silvicidas; también en la industria del vidrio y de la cerámica y como aditivo en la alimentación del ganado (WHO, 1981). México es uno de los principales productores de iAs en el mundo, genera aproximadamente el 20% de la producción mundial.

La forma principal de transporte del As es por medio del agua. Las concentraciones en el agua normalmente son $<10 \mu\text{g/L}$ y en lugares contaminados con minerales arsenicales van de 200 a $1000 \mu\text{g/L}$. Además el agua puede contaminarse de forma natural por el rico contenido de As de las rocas del subsuelo, ejemplo de esto es la región norte de Chile y Argentina y en algunas zonas de la Comarca Lagunera (Noreste) y en Zimapan (Hidalgo) en México. En agua con oxígeno disuelto el As usualmente está en forma de sal, como arseniato (pentavalente), sin embargo en pozos muy profundos donde las condiciones son reductoras predomina como arsenito (trivalente).

Las principales fuentes de exposición al iAs son el agua potable y los alimentos elaborados con esa agua. Esto genera problemas severos de salud como el hidroarsenicismo y el cáncer, que se han observado en distintos sitios en el mundo como en Argentina (100-3810 $\mu\text{g/l}$), Bangladesh (>1000 $\mu\text{g/l}$), Chile, China (0.05-850 $\mu\text{g/l}$), Estados Unidos, India (5-23000 $\mu\text{g/l}$), México (8-624 $\mu\text{g/l}$), Taiwán. En estos lugares se exceden varias veces los límites permitidos en agua para consumo humano (25 $\mu\text{g As/l}$ en México, 10 $\mu\text{g As/l}$ según WHO, 1993). La exposición a iAs por vía aérea o vía dérmica es mucho menor, pero puede aumentar significativamente en poblados cercanos a fuentes de emisión (Albores *et al.*, 1997).

5. Toxicocinética y metabolismo

La exposición humana al iAs ocurre por exposición laboral, ambiental y por accidentes. Las principales vías por las que el iAs entra al organismo es por la vía respiratoria y por el tracto gastrointestinal (TGI). La absorción por vía dérmica es baja y alcanza solamente el 2%. La absorción de compuestos arsenicales por el TGI en los humanos y en la mayoría de las especies animales es alta (95%) cuando se administran en solución acuosa.

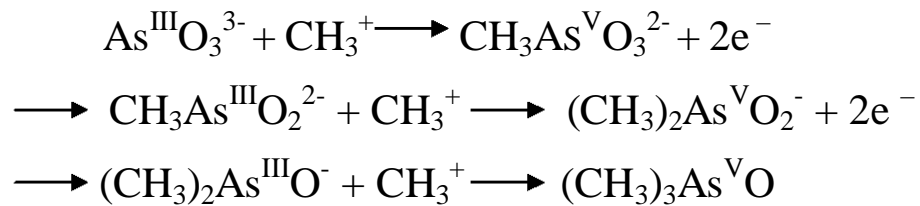
Los arsenicales tienden a acumularse principalmente en el hígado, riñón, pulmón, vejiga, corazón y bazo, mientras que se encuentran pequeñas cantidades en el tejido muscular y neural (Klaassen, 1996). El iAs en su forma trivalente tiene la capacidad de interactuar con los grupos sulfhidrilo de las proteínas; ejemplo de esto es la queratina, por lo que el iAs se deposita en pelo y uñas. Las enzimas y receptores son especialmente afectados si el grupo sulfhidrilo se encuentra en su sitio activo. (Albores *et al.*, 1997). El iAs(V) puede substituir al grupo fosfato en las reacciones que son catalizadas enzimáticamente, afectando procesos como la producción de ATP y la síntesis de DNA; sin embargo es difícil medir el daño pues el As(V) se reduce a As(III) en el organismo.

El hígado es el órgano con la mayor capacidad de metabolizar el iAs, sin embargo varios tejidos han mostrado mayor o menor medida capacidad para metabolizarlo, entre

ellos el cerebro (Rodríguez *et.al.*, 2006). En este mecanismo se propone que ocurren dos procesos:

- Reducción de As(V) a As (III)
- Metilación oxidativa del As(III) para formar compuestos metilados a partir de un donador de metilos como la S-adenosil-L-metionina (AdoMet o SAM)

Challenger (1945) resume la conversión de iAs a especies metiladas en un esquema en donde considera los dos procesos antes mencionados:



La propuesta más aceptada sugiere que primero hay una reducción de As(V) a As(III) (Lerman y Clarkson, 1983; Vahter y Envía, 1983; Vahter y Marafante, 1983); seguida de la primera metilación que genera un ácido monometil-arsónico (MMA), se postula que luego vuelve a ocurrir una reducción de MMA(V) a MMA(III) previa a una segunda metilación produciendo ácido dimetil-arsónico (DMA). Se propone que la S-adenosilmetionina (SAM) es el donador de grupos metilo (Vahter y Marafante, 1984; Buchet y Lauwerys, 1985) y el glutatión (GSH) es el principal agente reductor y transportador de As (Scout *et al.*, 1994). En el esquema siguiente se muestra el metabolismo del arsénico en el hígado, la formación de intermediarios y productos metilados y la excreción de estos compuestos por el organismo (Tchounwou, 2003) (**Fig.1**):

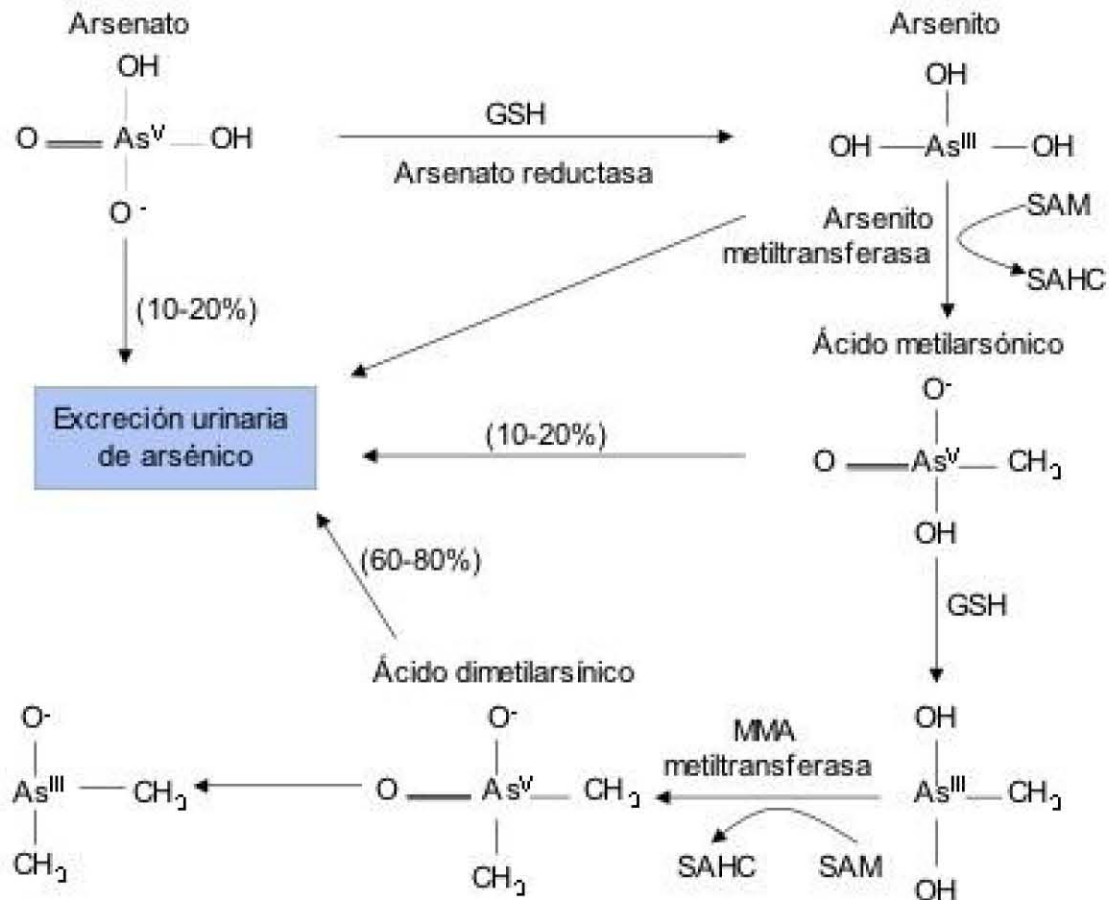


Fig.1 Metabolismo del iAs en el hígado; SAM (*S*-Adenosilmetionina); SAHC (*S*-Adenosilhomocisteína); GSH (glutatión reducido).

La mayoría de las especies animales, en comparación con el hombre, excretan MMA en bajas cantidades (<4%); en la rata, la retención y la distribución de As difieren de las observadas en otras especies, ya que la mayoría del DMA se une a los eritrocitos (Albores *et al.*, 1997).

Existen varios factores que intervienen en la capacidad de metilación del iAs, algunos de ellos son la dosis y el tiempo de exposición, el contenido de metionina y de proteínas en la dieta, y la actividad de la enzima metilante (As3mt).

La metilación del iAs fue inicialmente considerada como un proceso metabólico de desintoxicación, ya que se detectó que el ácido metilarsónico (MMA^V) y el ácido dimetilarsónico (DMA^V) tienen toxicidad aguda más baja que el arsenito (Yamauchi y

Fowler, 1994) y que los compuestos metilados pentavalentes arsenicales son eliminados más rápidamente por el organismo en comparación con el iAs (Gebel, 2002; Vahter, 2002). Sin embargo estudios posteriores mostraron que la biometilación de iAs inorgánico genera intermediarios y productos como el ácido metilarsonoso (MMA^{III}) y el ácido dimetilarsonoso (DMA^{III}) que tienen una mayor citotoxicidad que el arsenito (Petrick *et al.*, 2000, Styblo *et al.*, 2000). Además se ha demostrado que los compuestos metilados trivalentes exceden la genotoxicidad de los arsenicales inorgánicos (Ahmad *et al.*, 2002; Mass *et al.*, 2001; Nesnow *et al.*, 2002; Yamakana *et al.*, 1997), son capaces de inhibir diversas enzimas antioxidantes con mayor potencia que el iAs (Lin *et al.*, 1999, 2001; Petrick *et al.*, 2001; Styblo, *et al.*, 1997) y alteran las vías de señalización asociadas al estrés oxidante (Drobna *et al.*, 2003; Styblo *et al.*, 2002). Por lo anterior, se puede decir que la biometilación del iAs es un proceso de activación (Hughes, 2002).

6. Arsénico-III-S-Adenosil-L-metionina-metiltransferasa(Arsenic(III)-Methyltransferase o As3mt)

Zakharyan *et.al.* (1995, 1998), Lin *et. al.* (2002) y Thomas *et.al.* (2004) purificaron una enzima (de hígado conejo (**cyt19**) y de rata respectivamente (**As3mt**)) dependiente de AdoMet con capacidad para metilar tanto iAs como ácido metilarsonoso, generando productos monometilados y dimetilados. De acuerdo a la sugerencia de la Organización del Genoma Humano, esta enzima se ha denominado As3mt. Se observó que la producción de compuestos monometilados precede a la de compuestos dimetilados, en donde sólo se metilan los compuestos trivalentes. Por lo que se postula que hay cambios en el estado de oxidación del As durante su metabolismo y que la reducción de As(V) a As(III) es un prerrequisito para su metilación (Aposhian *et al.*, 2000, Del Razo *et al.*, 2001a; Le *et al.*, 2000; Sampayo-Reyes *et al.*, 2000). La actividad de As3mt es estimulada por tides endógenos como GSH, DTT y Trx. Esta proteína requiere de la presencia de agentes reductores como tiorredoxin reductasa (TR) y NADPH para llevar a cabo su actividad. La tiorredoxina podría ser necesaria para reducir los puentes disulfuro entre cualquiera de los 13 residuos de cisteína y el mantenimiento de este balance entre cisteínas reducidas y oxidadas puede ser importante para su función,

por otro lado esta molécula podría estar sirviendo como fuente de equivalentes reductores que son usados para reducir el As de su forma pentavalente a su forma trivalente (Thomas *et al.*, 2004). Sin embargo esta reacción también puede estar acoplada a un sistema reductor como el GSH-GR-Grx-NADPH (Mukhopadhyay *et al.*, 2000).

El alineamiento de las secuencias de mRNA de *cyt19* humana y de ratón con *As3mt* de rata, resultó que existe una relación muy cercana entre las proteínas, por lo que se plantea que *cyt19* humana es una *As3mt*. Estas proteínas tienen alrededor de 370 residuos de aa, asimismo comparten varios dominios comúnmente encontrados en metiltransferasas que no metilan ácidos nucleicos, todas tienen 12 residuos de cisteína en común y una cisteína en el extremo carboxil-terminal.

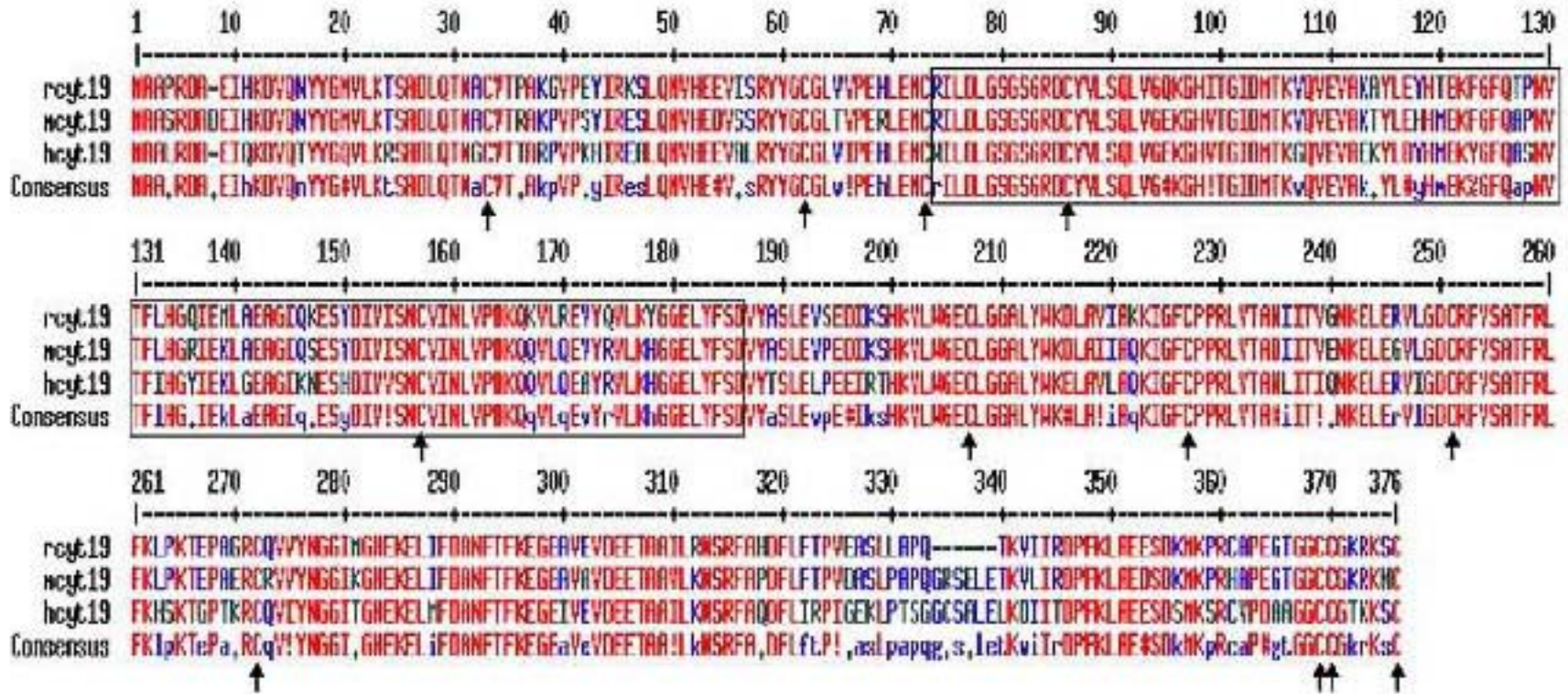
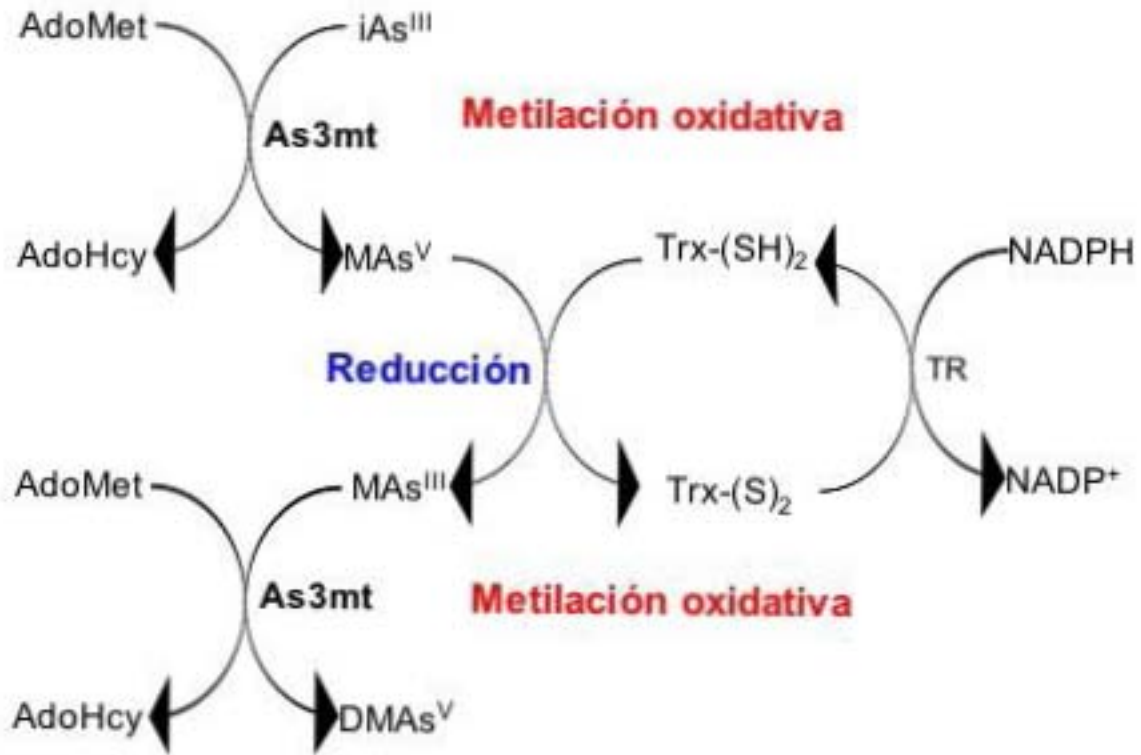


Fig.2 Alineamiento de secuencias múltiples basado en los números de acceso para cyt19_rata NP_543166 (aislada por Thomas *et.al.* (2004)); ratón AAH13468 y humano AK057833. La región enmarcada es un dominio común de UbiE metiltransferasa. Las posiciones de cisteínas conservadas se identifican por las flechas.



Se propone que este proceso de biometilación de arsénico funcione de manera que $As3mt$ catalice dos reacciones distintas e interdependientes (Thomas *et al.*, 2004). Éstas son la metilación oxidativa de los compuestos trivalentes que necesita de $AdoMet$ como donador de grupos metilo y la reducción de compuestos pentavalentes en la que se requiere una reacción acoplada a Trx - TR - $NADPH$ para disponer de equivalentes reductores:

Fig.2 Esquema hipotético de la relación entre la metilación oxidativa y la reducción de As catalizada por $cyt19$. Este esquema muestra pasos secuenciales en los que el arsénico trivalente es primero metilado oxidativamente por la adición de un grupo metilo proveniente de $AdoMet$ y luego es reducido a un estado trivalente en una reacción que requiere de equivalentes reductores de una proteína activa reductora, tiorredoxina (Trx). Trx es en respuesta reducida como sustrato de una reacción dependiente de $NADPH$ catalizada por la tiorredoxin reductasa (TR).

7. Biometilación de As en el cerebro:

Utilizando un modelo experimental murino, se observó una acumulación dosis-dependiente de metabolitos metilados, especialmente el DMA en cerebro de ratón (Rodríguez *et al.*, 2005), sugiriendo que el cerebro posee y expresa la enzima As3mt. La presencia del iAs en cerebro y su metilación pueden generar estrés oxidativo en este órgano, de manera similar a lo observado en el sistema nervioso periférico en ratas tratadas con arsenito de sodio (García Chávez *et. al.* 2007). Otros trabajos también han reportado que el tejido cerebral es capaz de expresar el gen *As3mt* (Waters *et al.*, 2003), de la misma forma Lin *et al.*, (2002) detectó mRNA de *As3mt* en cerebro de rata y comprobó la presencia de proteína As3mt en cerebro de rata, sin embargo no se logró detectar la metilación de iAs por As3mt, ya que no se detectó ni MMA ni DMA en el cerebro de las ratas (Kobayashi *et al.*, 2006).

8. S-Adenosil-L-metionina y balance de metilación:

El donador universal de grupos metilo en las células es AdoMet (Kresge *et.al.*, 2005). Es el segundo sustrato más usado en el organismo después del ATP. Las reacciones que más consumen AdoMet son (en orden decreciente de consumo de AdoMet):

- a) Síntesis de fosfatidilcolina, que se lleva a cabo por la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT o PEMT) y requiere de 3 moléculas de SAM para sintetizar 1 de fosfatidilcolina.
- b) Síntesis de creatina, generada por la guanidinacetato metiltransferasa.
- c) Síntesis de poliaminas.
- d) Otras reacciones de metilación, entre las que están la metilación del DNA, neurotransmisores, As, aminoácidos, RNA, proteínas, etc (Stead *et.al.*, 2006).

La escasez de folatos en la dieta, el abuso de alcohol, la intoxicación por metales o factores hereditarios, pueden ocasionar la depleción de AdoMet y causar alteraciones y enfermedad (Loenen *et.al.*, 2006).

En el cerebro, el proceso de metilación que consume mayor cantidad de AdoMet es la formación de fosfatidilcolina (PNMT), un componente importante de la membrana; otros procesos esenciales son los siguientes: i) la formación de colina para la acetilcolina (PNMT), ii) la formación de adrenalina (PNMT), iii) la degradación de catecolaminas (COMT), iv) la inactivación de la histamina (HNMT). La deficiencia en estas metilaciones provoca alteraciones fisiológicas como:

- 1) Modificación de la composición y función de la membrana y poner en peligro la viabilidad neuronal (Blusztajn *et.al.*, 1987)
- 2) Disminución de las cantidades de adrenalina en las neuronas del bulbo
- 3) Disminución de las cantidades de acetilcolina en el SNC
- 4) Disminución de la metilación de catecolaminas y estrógenos catecol, lo que aumentaría las cantidades de estas moléculas circulando. Ejemplos de esto son:
 - a. La norepinefrina y la adrenalina estimulan el sistema cardiovascular, y la sobreestimulación de este sistema se relaciona fuertemente con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.
 - b. Las catecolaminas son moléculas reactivas. Los niveles elevados de estas moléculas en los tejidos aumenta la formación de moléculas químicas intermediarias reactivas y posteriormente la producción de ROS (Zhu, 2002).
- 5) Aumento en los niveles de histamina, alterando las funciones del hipotálamo, la ingesta de agua y comida y la actividad general del cerebro, ya que es un regulador de estos procesos.

9. Efectos adversos de la exposición al arsénico inorgánico

La toxicidad del As es compleja porque depende de numerosos factores, como la vía de exposición, el tiempo de exposición, la valencia del As, la forma química del compuesto (orgánico o inorgánico), etc. A continuación se describen brevemente aspectos importantes de la toxicidad a nivel de distintos órganos y tejidos, con especial énfasis en el sistema nervioso.

a) Efectos agudos

La exposición aguda a iAs genera usualmente alteraciones gastrointestinales, cardiovasculares, nerviosas, renales y hepáticas. Puede haber cambios en la piel, como hiperpigmentaciones y la aparición de líneas blanquecinas en las uñas (Albores *et al.*, 1997).

b) Efectos crónicos

Los efectos adversos que se presentan con la exposición crónica a iAs dependen de la vía de exposición. Se presentan en distintos tejidos como la piel, el sistema cardiovascular, las vías respiratorias, el riñón, el hígado, el sistema inmune y el sistema nervioso. En la piel se han encontrado hiperqueratosis papular, hiperchromías, hipochromías y lesiones ulceradas (Albores *et al.*, 1997). En el sistema cardiovascular causa efectos vasculares periféricos que se caracterizan por cianosis y pérdida progresiva de la circulación a las extremidades y en algunos casos termina en gangrena seca o enfermedad del pie negro (Albores *et al.*, 1997). En el sistema inmune se ha detectado que hay disminución en el número total de células T, B y macrófagos, disminución de la función de linfocitos T citotóxicos y células natural killer (NK), una respuesta disminuida (Gonsebatt *et al.*, 1994) y alteración en la producción de diferentes interleucinas (Soto-Peña *et al.*, 2006). El iAs es un agente teratogénico, mutagénico y carcinogénico. El iAs está clasificado por la IARC (1987) como carcinógeno en el grupo 1 (con suficientes evidencias en humanos). Las personas expuestas por vía aérea

presentan mayor incidencia de cáncer de pulmón; la exposición oral a iAs aumenta el riesgo de presentar cáncer de piel, aunque también se presentan tumores en vejiga, riñón, hígado y pulmón.

(1) Neurotoxicidad

(a) Efectos en el sistema nervioso periférico

Los primeros reportes de neuropatías causadas por iAs fueron casos de neuropatías generadas después de inhalación o ingestión de iAs. Varios autores han reportado neuropatía simétrica periférica con mayor afectación en los nervios sensoriales y en neuronas con axones largos. En estos pacientes se ha observado axonopatía y desmielinización de neuronas (Gherardi *et al.*, 1990; Goebel *et al.*, 1990), fragmentación de la mielina y desintegración de los cilindros axiales (Chhuttani *et al.*, 1967; Goebel *et al.*, 1990; Heymann *et al.*, 1956). Los síntomas incluyen entumecimiento y parestesia de las extremidades distales (Chhuttani y Chopra, 1979; Triebig y Büttner, 1983) donde las piernas son más afectadas que los brazos (Klassen, 1996). Estas neuropatías se presentaron después de exposición ocupacional a altas dosis, sin embargo las poblaciones que están expuestas de forma cónica a bajas dosis normalmente no desarrollan neuropatías periféricas.

(b) Efectos en el Sistema Nervioso Central y de comportamiento

Algunos autores han reportado la presencia de encefalopatía, alteraciones en las funciones neurológicas superiores como aprendizaje, inteligencia verbal (IQ), memoria a corto plazo y concentración posterior a la exposición ocupacional al iAs. La severidad de los síntomas dependen de la cantidad de tiempo y la dosis al que hayan estado expuestas las personas y normalmente los síntomas desaparecen después de que la exposición termina (Bolla-Wilson y Bleecker, 1987; Frank, 1976; Hall, 2002; Morton y Caron,

1989). Contrariamente un estudio transversal en una población expuesta y otra no expuesta muestra que los déficits de comportamiento neuronal después de la exposición crónica a iAs pueden ser duraderos (Gerr *et al.*, 2000 a, b). La siguiente tabla muestra los estudios que se han realizado en humanos para determinar los efectos en el comportamiento causados por exposición a iAs (Rodríguez *et al.*, 2003):

Tabla 1 Efectos en el comportamiento de humanos causados por exposición a As

Abreviación: **NR**, No reportado; Datos presentados como la media \pm S.E..

Efectos en el sistema nervioso central	Población estudiada	Ruta	Concentraciones de As en agua, suelo, aire y polvo	Concentraciones del biomarcador	Duración de la exposición	Referencia
Alteraciones auditivas	Niños	Exposición ambiental	NR	7.8-25.3 $\mu\text{g/L}$ de orina, 0,295-3.79 $\mu\text{g/g}$ de pelo	NR	Bencko y Symon, 1977
Daños en la memoria	Un hombre adulto	Oral	NR	NR	Aguda (intento suicida)	Danan <i>et.al.</i> , 1984
Alteraciones en el potencial visual evocado y neuropatía periférica	Un hombre adulto	Oral	NR	28000 $\mu\text{g/L}$ orina	Aguda (intento suicida)	Fincher y Körker, 1987
Alteraciones en el aprendizaje verbal y la memoria	Un hombre adulto	Inhalación	NR	41 $\mu\text{g/L}$ orina, 5.1 $\mu\text{g/g}$ cabello	2 meses (exposición ocupacional)	Bolla-Wilson y Bleecker, 1987
Amnesia, confusión y sensaciones visuales	Dos hombres adultos	Ingestión de agua de pozo	9000-10900 $\mu\text{g/L}$ de agua	488 y 2260 $\mu\text{g/L}$ orina respectivamente	2-3 meses aprox.	Franzblau y Lilis, 1989
Alteraciones en el aprendizaje verbal, memoria y concentración	Dos hombres adultos	Inhalación	NR	115 y 300 $\mu\text{g/L}$ orina	12 meses, 14 meses (exposición ocupacional)	Morton y Caron, 1989
Fuerza de puño, tecleo de los dedos, coordinación mano-ojo alterados y temblor	Adultos	Exposición ambiental	45.8 \pm 134.00 mg/g de polvo casero, 46.6 \pm 164.1 mg/g de suelo	NR	14.1 \pm 1.32 (años)	Gerr <i>et.al.</i> , 2000
IQ verbal disminuido	Niños	Exposición ambiental	14.2 $\mu\text{g/L}$ agua, 502.4 $\mu\text{g/g}$ suelo, 857 $\mu\text{g/g}$ de polvo, 0.48 $\mu\text{g/m}^3$ aire	62.9 \pm 0.03 $\mu\text{g/L}$ en orina	Toda la vida	Calderon <i>et.al.</i> , 2001, Díaz-Barriga <i>et.al.</i> , 1993
Alteraciones en el patrón de memoria y cambios en la atención	Adolescentes (grupo de dosis alta)	Ingesta de agua	131.19 \pm 343.70 $\mu\text{g/L}$ agua	NR	8.10 \pm 6.07 (años)	Tsai <i>et.al.</i> , en prensa
	Adolescentes (grupo de dosis baja)		184.99 \pm 225.99 $\mu\text{g/L}$ agua		11.28 \pm 2.58 (años)	

(c) Estudios de neurocomportamiento en animales

La mayoría de los estudios de neurocomportamiento en animales han usado como modelo a los roedores, en estos estudios se ha reportado que las ratas mostraron disminución en la actividad locomotora (Rodríguez *et al.*, 2001), otros estudios contrariamente, encuentran que los animales presentaron mayor actividad de respuesta (Rodríguez *et al.*, 2002). Sin embargo los efectos más consistentes después de la administración de iAs a ratas es una disminución en la actividad locomotora que se presenta durante la exposición. Igualmente se ha encontrado que los animales expuestos mostraron retardo en adquisición y realización de una tarea a ejecutar (Nagaraja y Desiraju, 1994), asimismo tuvieron más errores durante la realización de una prueba de tareas de alternancia demoradas (T-maze) (Rodríguez *et al.*, 2001). En el caso de los ratones, éstos presentaron mayor (bajas dosis) y menor (alta dosis) actividad locomotora (Itoh *et al.*, 1990). La siguiente tabla muestra estudios sobre los efectos de comportamiento causados por exposición a iAs en roedores, es importante señalar que las dosis de iAs utilizadas no produjeron ni reducción en el peso ni signos de intoxicación sistémica (Rodríguez *et al.*, 2003):

Tabla 2 Efectos en el comportamiento de roedores por la exposición a compuestos arsenicales

Efectos en el comportamiento	Dosis y ruta de administración	Duración de la exposición	Compuesto arsenical	Roedor	Referencias
Actividad locomotora disminuida	1.5, 3.0, 6.0 y 12 mg/kg por I.G.	12 semanas	Trióxido de arsénico	Rata	Pryor <i>et.al.</i> ,1983
Actividad locomotora aumentada	3 mg/kg por I.G.	2 semanas	Trióxido de arsénico	Ratón	Itoh <i>et.al.</i> , 1990
Actividad locomotora disminuida	10 mg/kg por I.G.				
Eliminación y retardo en la adquisición del aprendizaje operante	5 mg/kg por I.G.	2 y 3 meses	Arsenato de sodio	Rata	Nagaraja y Desiraju, 1994
Actividad locomotora disminuida	10 mg/kg por I.G.	4 semanas	Arsenito de sodio	Rata	Rodríguez <i>et.al.</i> , 2001, 2002
Actividad locomotora disminuida	20 mg/kg por I.G.	2 semanas			
Aumento en el número de errores en una prueba de alternación retardada probada en un T-Maze	10 mg/kg por I.G.	4 semanas			
Aumento en el número de errores en una prueba de alternación retardada probada en un T-Maze	36.70 mg/L en agua de bebida	4 meses (comenzando el DG15 o el DPN1)			
Actividad locomotora disminuida	0.03, 0.3, 3.0 y 5.0 mg/L en agua de bebida	20 días	Arsenito de sodio	Rata	Chattopadhyay <i>et. al.</i> , 2002 a, b.

Abreviaciones: I.G., Intubación Intragástrica; DG15, día gestacional 15; DPN1, día postnatal 1.

(d) Efectos en los sistemas de neurotransmisión

Los estudios a este nivel muestran alteraciones que pueden reflejar deficiencias de comportamiento observados en humanos y en animales. Se han encontrado alteraciones en los sistemas colinérgicos (Valkonen *et al.*, 1983; Kannan *et al.*, 2001; Nagaraja y Desiraju, 1994; Tripathi *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1982). Estos efectos del iAs se atribuyen a su capacidad para reaccionar con los grupos sulfhidrilo involucrados en la recaptura de alta afinidad de colina y con el grupo disulfuro de la AchE (Trevor *et al.*, 1978). Otros sistemas reportados con alteraciones son el GABAérgico (Nagaraja y Desiraju, 1993) y los sistemas monoaminérgicos (Tripathi *et al.*, 1997; Kannan *et al.*, 2001; Nagaraja y Desiraju, 1993; Delgado *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 1990; Mejía *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2001). Sin embargo los estudios en estos últimos sistemas no son consistentes debido a la variación en los protocolos de exposición, por lo que no se tiene una idea clara del papel del iAs en estos sistemas. La siguiente tabla muestra con mayor detalle los estudios que se han hecho para ver los efectos del iAs en los sistemas de neurotransmisión (Rodríguez *et al.*, 2003):

Tabla 3 Efectos en sistemas neurotransmisores y sus metabolitos debido a la exposición de roedores a compuestos arsenicales

Sistema Neurotransmisor	Región cerebral	Efecto	Duración de la exposición	Compuesto arsenical	Dosis y ruta de administración	Roedores	Referencias
Colinérgico	Médula espinal (fracción axonal)	- actividad AChE	11 días	Arsenito de sodio	0.1 g/L en agua de bebida	Rata	Valkonen <i>et. al.</i> ,1983
Monoaminérgico	Corteza cerebral Hipocampo Hipotálamo Estriado	+ NE, DOPAC, 5-HT y 5-HIAA + 5-HT y 5-HIAA + DOPAC, NE, 5-HT, 5-HIAA - DOPAC Y HVA + 5-HT Y 5-HIAA	2 semanas	Trióxido de arsénico	3 y 10 mg/kg del peso corporal por I.G.	Ratón	Itoh <i>et. al.</i> ,1990
Monoaminérgico, GABAérgico, Glutamaérgico	Cerebelo Hipotálamo Tallo cerebral Estriado Núcleo Accumbens Corteza motora Hipocampo Estriado Hipocampo Cerebelo Hipotálamo Tallo cerebral Núcleo Accumbens Corteza motora	- NE, DA, 5-HT y actividad GAD - DA, 5-HT, GABA y actividad GAD + NE, DA y Glu, - actividad GAD + 5-HT - DA + DA - DA - DA y 5-HT + NE, - 5-HT, - Glu, - actividad GAD - DA Y 5-HT - 5-HT y - actividad GAD - GABA + Glu, - actividad GAD + Glu	2 meses (desarrollo) 3 meses (adulto)	Arsenito de sodio	5 mg/kg del peso corporal por I.G.	Rata	Nagaraja y Desiraju 1993
Colinérgico	Cerebelo Tallo cerebral Hipocampo	- actividad AChE	2 y 3 meses	Arsenito de sodio	5 mg/kg del peso corporal por I.G.	Rata	Nagaraja y Desiraju 1994

Tabla 3 (continuación)

Sistema Neurotransmisor	Región cerebral	Efecto	Duración de la exposición	Compuesto arsenical	Dosis y ruta de administración	Roedores	Referencias
Monoaminérgico	Cerebro completo	- DA, NE	4 meses	Arsenito de sodio	100 mg/L en agua de bebida.	Rata	Tripathy <i>et. al.</i> ,1997
Colinérgico		+ MAO					
Monoaminérgico	Estriado	- AchE					
		+ DA y 5-HIAA	2 semanas	Arsenito de sodio	11 y 13.8 mg/kg del peso corporal por I.G..	Ratón	Mejia <i>et. al.</i> ,1997
	Corteza cerebral	+ DOPAC					
	Hipotálamo	+ DOPAC, - NE					
Monoaminérgico	Estriado	- Liberación de DA, DOPAC y HVA	2 semanas	Arsenito de sodio	25 mg/kg del peso corporal en comida	Rata	Rodriguez <i>et. al.</i> ,1998
Monoaminérgico	Médula y protuberancia	+ 5-HT	2 meses y 1 semana	Arsenito de sodio	20, 40, 60 80 y 100 mg/L en agua de bebida	Ratón	Delgado <i>et. al.</i> ,2000
	Hipotálamo	- DA					
	Corteza cerebral	- DOPAC					
Monoaminérgico	Mesencéfalo	+ DA, + 5-HIAA, - DA/HVA	2 y 3 semanas	Arsenito de sodio	10, 20 mg/kg del peso corporal por I.G.	Rata	Rodríguez <i>et. al.</i> ,1990
	Corteza cerebral	+ DA					
Monoaminérgico	Cerebro completo	- DA y actividad AchE	16 semanas	Arsenito de sodio	25 mg/L en agua de bebida	Rata	Kannan <i>et. al.</i> ,2001
						Cobayos	
Colinérgico		+ DA, + NE, + 5-HT, - actividad MAO					

Abreviaciones: AchE, acetilcolinesterasa; DA, dopamina; DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; GABA, ácido γ -aminobutírico; GAD, descarboxilasa de ácido glutámico; Glu, glutamato; HVA, ácido homovanílico; MAO, monoamino oxidasa; NE, norepinefrina; 5-HIAA, ácido 5-hidroindolacético; 5-HT, serotonina; I.G., intubación intragástrica.

(e) Mecanismos de acción

Hasta ahora no se conoce el mecanismo por el cual el iAs y sus metabolitos entran al cerebro, parece acumularse en el plexo coroideo probablemente para impedir la entrada del As al mismo (Zheng *et al.*, 1991). Se sabe que los arsenicales trivalentes pueden entrar a las células por las acuagliceroporinas y puede salir como conjugados con GSH por las MRP2, sin embargo aún no se ha aislado una bomba de As en las células de mamíferos, pero es posible que exista un sistema como éste, ya que células expuestas de forma crónica a As desarrollan las estrategias para aumentar la salida y reducir el almacenamiento de As (Romach *et al.*, 2000).

El arsenato puede mimetizar al fosfato y compite con él en la formación de ATP lo que desacopla la fosforilación por la generación de éster de arsenato que se hidroliza espontáneamente (Hughes, 2002). Incluso en algunas reacciones el arsenato puede mimetizar al fosfato piridoxal e inhibir las reacciones dependientes de él como es el caso de la conversión de DOPA a DA, y la de 5-hidroxitriptofano a serotonina (Alves y de Meis, 1987).

El arsenito puede interactuar directamente con los grupos sulfhídrido de las proteínas alterando su función o inhibiéndola. Ejemplo de esto es la inhibición que produce en la glutatión reductasa (GR) y la disminución de los niveles intracelulares de glutatión (GSH), lo que altera el balance óxido-reducción que hay en las células y disminuye la protección existente contra el daño oxidante generado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Thomas *et al.*, 2001; Flora, 1999). El As aumenta los niveles de superóxido a través de la NADPH oxidasa (Chen *et al.*, 1998; Lynn *et al.*, 2000; Kumagai y Sumi, 2007) y la NO sintasa (Kumagai y Sumi, 2007). Además de estas vías, el As genera estrés oxidante mediante la oxidación de lípidos, proteínas, DNA y por el consumo y depleción de GSH.

Además, la biometilación de arsenito inorgánico genera intermediarios y productos como el ácido metilarsonoso (As^{III}) y el ácido dimetilarsinoso (As^{III}) que tienen

una mayor citotoxicidad que el arsenito (Petrick *et al.*, 2000, Styblo *et al.*, 2000). Los compuestos metilados exceden la genotoxicidad de los arsenicales inorgánicos (Ahmad et al, 2002; Mass et al., 2001; Nesnow *et al.*,2002; Yamakana *et al.*, 1997), también son inhibidores de enzimas antioxidantes más potentes que el iAs (Lin *et al.*, 1999, 2001; Petrick *et al.*, 2001; Styblo, et al., 1997) y alteran las vías de señalización (Drobna *et al.*, 2003; Styblo *et al.*, 2002). En particular las células del sistema nervioso central son más susceptibles al estrés oxidante porque tienen un consumo elevado de oxígeno y un sistema de protección relativamente deficiente comparado con otros tejidos como el hígado y el riñón.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha comprobado que el iAs es un contaminante natural y antropogénico del agua, que genera diversos efectos en la salud de las personas, entre los que se encuentran lesiones en la piel, alteraciones en el sistema cardiovascular, en el metabolismo del grupo hemo, distintos tipos de cáncer, alteraciones en el sistema inmune y efectos en el sistema nervioso, tanto en el SNP como en el SNC.

Este trabajo se enfoca en los efectos del iAs en el SNC, en donde se ha reportado que ocasiona diversas alteraciones cognitivas, fisiológicas y funcionales. Algunos de estos efectos descritos en el ser humano y otros en modelos experimentales son:

- a) Disminución en el aprendizaje y concentración
- b) Menor memoria a corto plazo
- c) Desorientación
- d) Paranoia
- e) Percepción e integración visual disminuida
- f) Disminución en la inteligencia verbal
- g) Alteraciones en la actividad locomotora
- h) Alteraciones en los sistemas colinérgicos, GABAérgicos, monoaminérgicos

El cerebro es el órgano encargado de integrar y procesar toda la información proveniente del sistema nervioso periférico, del sistema hormonal y del inmune. El SNC regula las emociones, pensamientos, percepción, aprendizaje, recepción de estímulos externos, memoria, control del movimiento, sistema neuroendócrino, sistema inmune y el sistema circulatorio.

Se sabe que el iAs es metabolizado en el organismo. Este proceso consiste en reducir el As^{V} a As^{III} , previo a su metilación oxidativa, ambos eventos se pueden repetir varias veces hasta formar compuestos trimetilados, este metabolismo lo realiza la As3mt (Arsénico-3-metiltransferasa). En un principio se pensó que este proceso de biometilación era un mecanismo de desintoxicación, sin embargo se ha demostrado que

las especies formadas durante la biometilación son compuestos más reactivos y citotóxicos que el iAs, por lo que ahora se cataloga como un proceso de bioactivación. Por ello, se ha relacionado la capacidad de metilar este metaloide con los efectos adversos producidos por la exposición al iAs.

Recientemente se demostró la presencia de especies metiladas de As en el cerebro de ratones, así como la generación de estos metabolitos en rebanadas de cerebro *in vitro*, lo que habla de la presencia de actividad de la *As3mt* en el cerebro murino (Rodríguez *et al.*, 2005).

Resulta importante investigar la expresión de *As3mt* y el efecto del As en la expresión de las distintas regiones cerebrales, así como conocer si la cantidad de mRNA se ve reflejada en los metabolitos metilados. Lo anterior es necesario para comprender mejor las consecuencias fisiológicas que la bioactivación de arsenito puede tener para cada región cerebral en particular. Este trabajo pretende determinar si *As3mt* se expresa de forma constitutiva en 10 diferentes regiones del cerebro de ratón, si el iAs modula esta expresión y si la cantidad de mRNA corresponde con la formación de metabolitos metilados.

Los datos resultantes de esta investigación brindarán información para comprender mejor el papel que esta proteína desempeña en el cerebro y la forma en que ésta es regulada, iniciar el camino para entender la forma en la que el cerebro responde a esta intoxicación y poder identificar cuáles son las zonas más susceptibles al daño para comenzar a entender los efectos patológicos perceptibles que presenta la población expuesta.

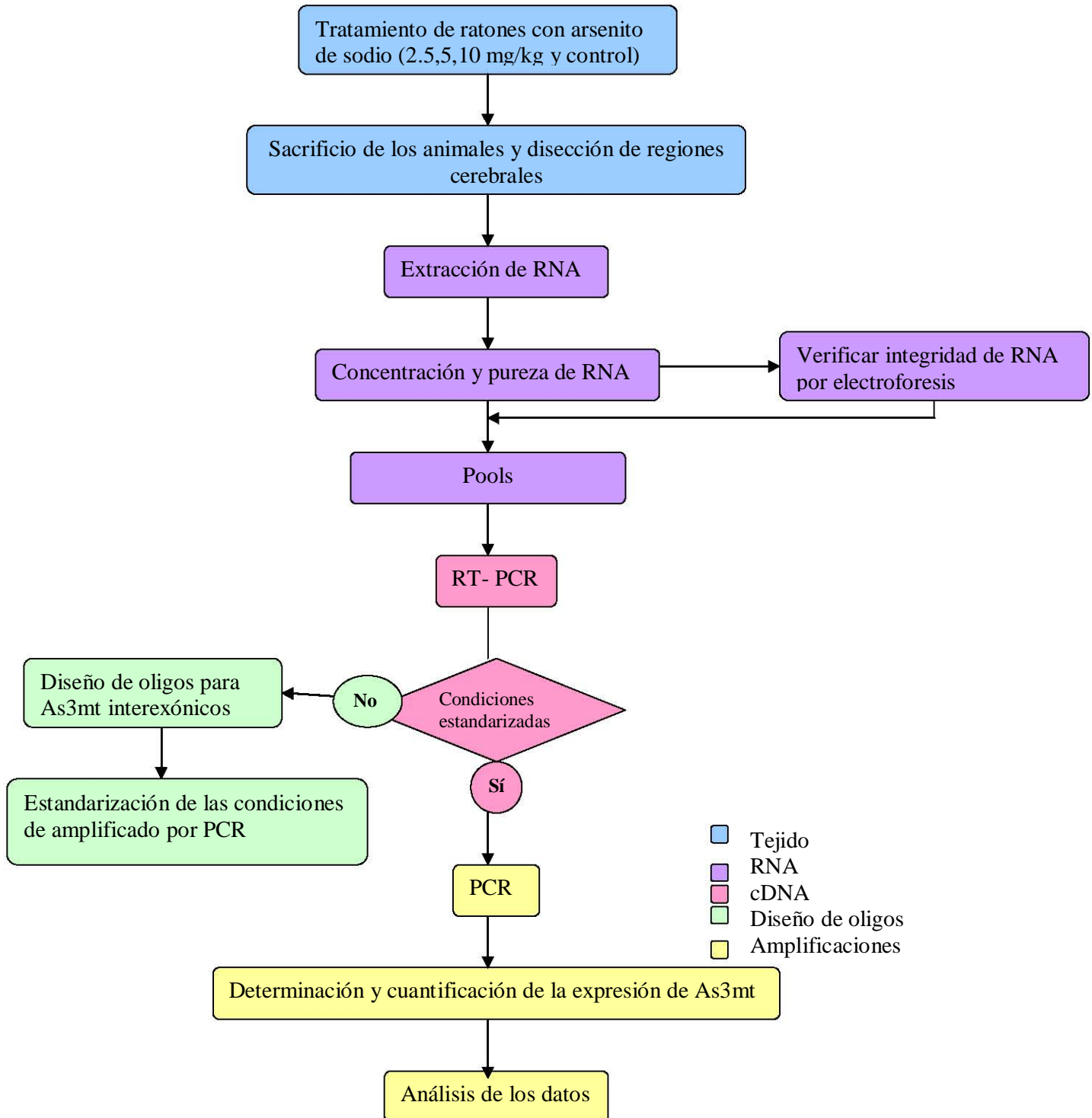
IV. HIPÓTESIS

La expresión transcripcional de *As3mt* es diferencial en las distintas regiones cerebrales y es modulada por el arsénico.

Esta transcripción diferencial en las distintas regiones del cerebro se verá reflejada en la formación de metabolitos metilados.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Plan general de la metodología



B. Métodos

1. Tratamientos con arsenito de sodio:

Se utilizaron ratones de la cepa CD1, machos de 4 semanas de edad que fueron alimentados *ad libitum*, con periodos de luz/oscuridad de 12 horas c/uno. Se establecieron tres dosis de tratamiento (2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg) y el grupo control recibió agua destilada. La administración de arsenito de sodio se hizo por vía oral diariamente durante 9 días a la misma hora (Rodríguez *et al.*, 2005). Los ratones fueron pesados antes de la administración de la dosis correspondiente. Las soluciones de arsenito de sodio se prepararon todos los días con agua desionizada para evitar cambios en el estado de reducción del arsenito de sodio. Cada grupo-dosis estaba formado por 5 ratones.

2. Sacrificio de los animales y disección de las regiones cerebrales:

Se sacrificaron los ratones por dislocación cerebral y se disecaron las siguientes regiones cerebrales: Corteza, hipocampo, estriado, mesencéfalo, tálamo, cerebelo, protuberancia, bulbo, hipotálamo e hipófisis.

Las muestras fueron almacenadas inmediatamente después de la disección, en nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA.

3. Extracción de RNA:

Se sacaron las muestras del nitrógeno líquido y todavía congeladas se pusieron inmediatamente en Trizol para evitar la degradación del RNA. La extracción del RNA se realizó de acuerdo con el protocolo de Trizol Reagent proveniente de Invitrogen® (Chomczynski *et al.*, 1987; Chomczynski, 1993). Se realizaron algunas modificaciones para optimizar los rendimientos. La extracción se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, los materiales fueron esterilizados y las soluciones se prepararon con agua DEPC (dietilpirocarbonato).

4. Concentración y pureza de RNA:

Se tomaron 3 µl del RNA resuspendido en agua libre de RNasas y se colocaron en 1 ml de agua Milli Q en una cubeta de cuarzo UV para calcular la concentración y pureza del RNA por absorbancia a 260nm y a 280 nm en el espectro de luz UV, empleando un espectrofotómetro controlado por un microprocesador (modelo Ultrospec 2000 de Pharmacia Biotech®). La concentración de RNA se midió a 260 nm., ya que se sabe que una solución de RNA con una densidad óptica de 1.0 (1.0 Unidad de Absorbancia) tiene una concentración de 40 µg/ml, en una cubeta de paso de luz de 10 mm. Por lo anterior, para calcular la concentración de RNA se usa la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (A_{260} * 40\mu\text{g}/\text{ml}) / \# \text{ de } \mu\text{l} \text{ agregados de RNA}$$

El índice de pureza se estimó dividiendo la lectura de absorbancia en el espectro a 260 nm entre la lectura de absorbancia a 280 nm. Considerando que un cociente de 2.0 equivale a 100% de pureza en el RNA.

5. Verificación de la integridad del RNA:

Con el fin de verificar la integridad del RNA extraído (observando las bandas 18S y 28S de RNA ribosomal), se realizó un gel de agarosa al 1% por electroforesis horizontal con 2 µl de muestra en cada carril. Los RNAs se observaron por fluorescencia de bromuro de etidio a 254 nm de luz UV (**Fig.7**).

Para tener una muestra representativa de todos los animales tratados en cada grupo se tomó la misma cantidad de RNA de cada animal por dosis (3 µg de RNA de cada individuo) y se juntaron para hacer el RT-PCR. Asimismo se hicieron determinaciones individuales para probar la cantidad de mRNA en las distintas regiones. La variabilidad fue similar, por lo que se optó por reunir alícuotas de RNA de los individuos y realizar de esta manera las estimaciones conjuntas.

6. RT-PCR:

Se realizó el RT-PCR (Retro Transcriptase–Polymerase Chain Reaction) con oligonucleótidos Oligo(dT) para convertir los mRNA a cDNA. La enzima que se utilizó es la Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT de Invitrogen®) y el protocolo se realizó de acuerdo con el método del proveedor.

7. Diseño de oligonucleótidos para *As3mt*:

Se diseñaron oligonucleótidos interexónicos para amplificar *As3mt* mediante PCR con el programa Oligo. La amplificación obtenida de mRNA es de 257 pb, en contraste con la del DNA genómico de 685 pb. El resultado fue el siguiente:

- Forward:

5' **GGT ATT ATG GCT GTG GTC TGA** 3'

21 nucleótidos $T_m = 62^\circ\text{C}$ $\Delta G = -37,2 \text{ kcal/mol}$

- Reverse:

5' **AGC CTC TGC CAA CTT CTC GA** 3'

20 nucleótidos $T_m = 62^\circ\text{C}$ $\Delta G = -39,3 \text{ kcal/mol}$

8. Estandarización de las condiciones de amplificado por PCR para *As3mt*:

Este procedimiento fue necesario para determinar las condiciones específicas en las cuales el cDNA correspondiente al mRNA de *As3mt* amplifica óptimamente. Todas estas pruebas se llevaron a cabo con DNA genómico. La temperatura de alineamiento más adecuada fue 62°C , la concentración de sales óptima fue la concentración media (**M**) y posteriormente mediante la realización de una gráfica se determinó el número de ciclos, el resultado fue 30 ciclos.

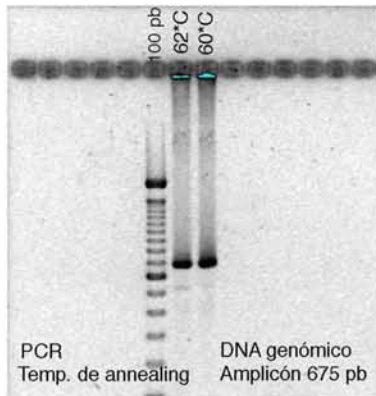


Fig. 4

La imagen muestra las temperaturas de alineamiento probadas para estandarizar las condiciones de amplificación óptimas de *As3mt* por PCR. Se muestran 60 y 62° C. La temperatura adecuada fue 62°C porque la amplificación fue más específica a esta temperatura.



Fig. 5

Esta imagen muestra las distintas salinidades probadas para la amplificación de *As3mt* por PCR. La mayor amplificación ocurrió usando buffer de salinidad media (M).

Curva de ciclos para amplificar *As3mt* por PCR

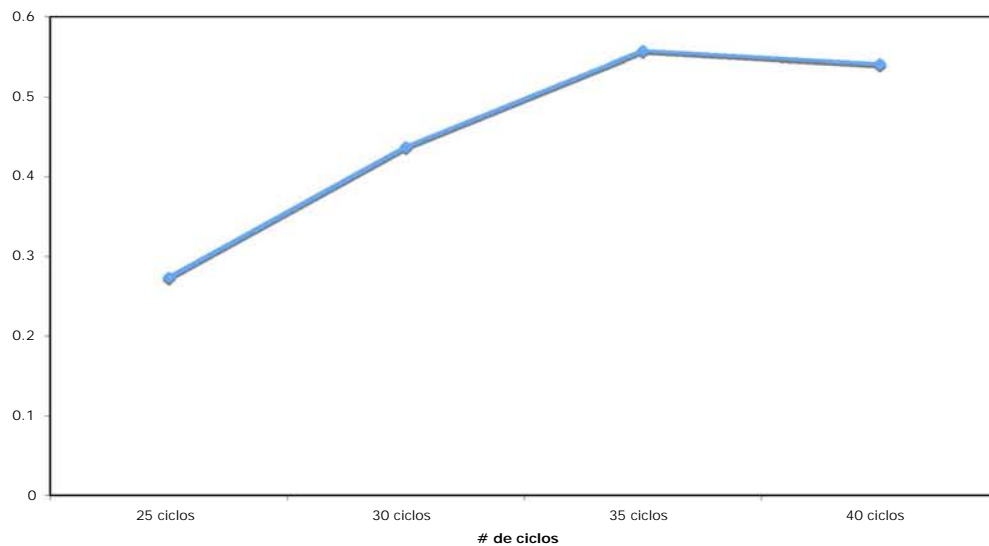


Fig. 6 Curva de ciclos para amplificar *As3mt* por PCR

9. PCR:

Una vez establecidas las condiciones óptimas de amplificación de *As3mt*, se realizó la amplificación de los cDNA de *As3mt* y de *GAPDH* (como control interno) para determinar su nivel de expresión.

Los oligos de *GAPDH* fueron:

- Forward:

5' TGA AGG TCG GTG TGA TCG GAT T 3'

22 nucleótidos $T_m = 60^\circ\text{C}$

- Reverse:

5' CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC C 3'

19 nucleótidos $T_m = 60^\circ\text{C}$

La enzima que se utilizó fue Platinum Taq DNA Polymerase de Invitrogen® en un termociclador (modelo RapidCycler de Idaho Technology®). Los experimentos se hicieron por triplicado, es decir se hizo la amplificación de *As3mt* y *GAPDH* con cada uno de los pools tres veces.

10. Determinación de los niveles de mRNA de *As3mt*:

Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% (w/v) por electroforesis horizontal por 35-40 minutos a 100V. Las amplificaciones se localizaron por fluorescencia de bromuro de etidio a 254 nm de luz UV. Se tomaron fotografías de las amplificaciones con el fotodocumentador Kodak Gel Logic 200 Imaging System, para posteriormente hacer el análisis densitométrico.

11. Análisis y cuantificación de los niveles de mRNA de *As3mt*:

Para analizar las imágenes se usó el programa Image J versión 1.36b (National Institutes of Health). Se midieron las intensidades netas (en píxeles) de cada una de las amplificaciones. En algunos casos fue necesario utilizar la siguiente fórmula:

$$\text{D.O. no calibradas} = \log_{10} (255/x \text{ (pixeles)})$$

Donde x es el valor obtenido en pixeles de la intensidad de la banda, que corresponde al amplicón obtenido de cada PCR; D.O. son las densidades ópticas de dicha banda.

Para la hoja de datos se utilizó el programa Excel (Microsoft), la expresión relativa de los mRNA de *As3mt* se obtuvo mediante el cociente de la amplificación con respecto a su control interno (*GAPDH*).

12. Determinación de As en las regiones cerebrales

La determinación de iAs y sus metabolitos en las fracciones se realizó en el laboratorio de la Dra. Luz María Del Razo en el CINVESTAV utilizando espectroscopia de absorción atómica acoplado a un generador de hidruros previo a la separación de los arsenicales (Rodríguez *et al* 2003).

13. Análisis estadístico:

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Sigma Instat, se hizo una ANOVA de una vía con el método Holm-Sydak para comparar las columnas contra el control y todas las columnas entre ellas. Los datos se analizaron por región y por dosis.

VI. RESULTADOS

El objetivo de esta investigación fue determinar la expresión del mRNA de *As3mt* en distintas regiones del cerebro de ratones tratados con distintas dosis de arsenito de sodio y conocer si esta expresión corresponde con la formación de metabolitos metilados. En adelante se presentan los resultados de forma gráfica y detallada.

Por medio del método de Trizol® se logró extraer RNA total del tejido íntegro y con poca contaminación de DNA, como se muestra en la **Fig.7**.

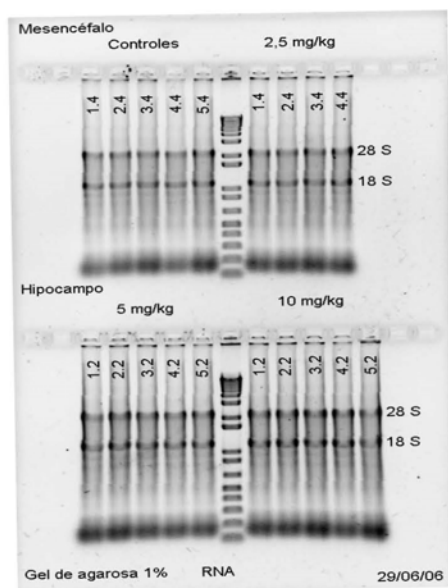


Fig. 7 Se muestra el RNA obtenido del mesencéfalo y el hipocampo en dos dosis distintas. En la figura se pueden apreciar con claridad las bandas correspondientes a las fracciones ribosomales 28S y 18S, lo que comprueba la integridad del RNA celular de estas muestras.

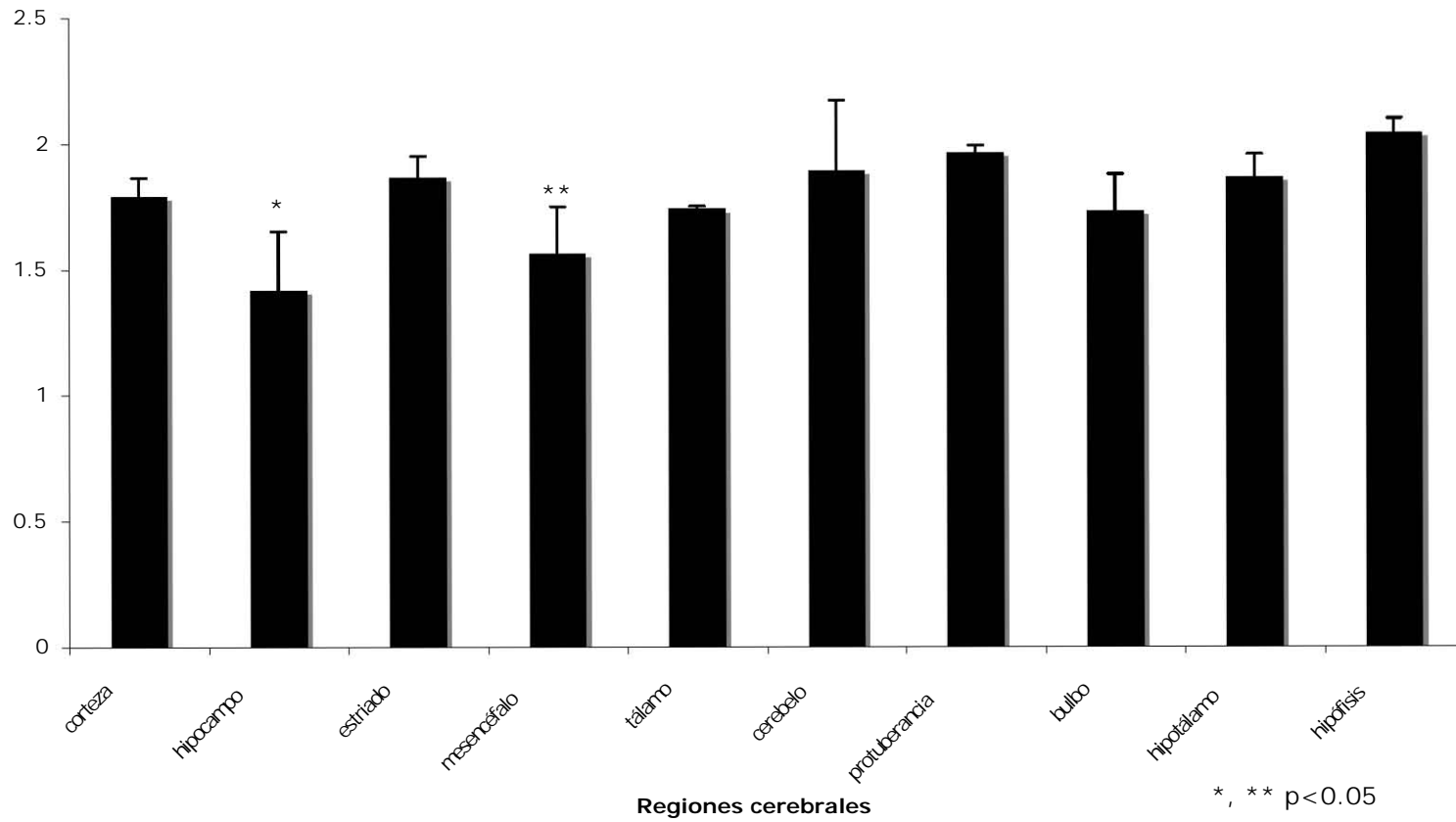
Nuestros resultados muestran que en el cerebro existe expresión diferencial del mRNA de *As3mt* que es región-específica. En términos generales (con excepción del tálamo y el cerebelo) este patrón de expresión en las distintas regiones cerebrales se mantiene a pesar de los tratamientos, lo que sugiere que el arsenito de sodio parece no modular la expresión diferencial del mRNA de *As3mt* en esas regiones.

Cuando se comparó la expresión del mensajero de RNA de *As3mt* en las distintas regiones cerebrales entre sí, en algunos casos encontramos una expresión diferencial región-dependiente. En el caso de los controles, se encontraron diferencias

significativas en los niveles de mensajero de RNA de *As3mt*. El hipocampo tiene significativamente menores niveles de mRNA que la hipófisis, el cerebelo, el estriado, el hipotálamo y la protuberancia ($P < 0.05$); asimismo el mesencéfalo tiene una menor expresión que la hipófisis ($P < 0.05$) (**Fig.8**). Estos experimentos muestran que la expresión región-específica intracerebral es diferencial. Las regiones que mostraron mayor expresión fueron la hipófisis, la protuberancia y el hipotálamo, asimismo las regiones de menor expresión fueron el hipocampo y el mesencéfalo.

En la **Fig.9** se muestran los resultados de los niveles de mRNA en corteza ($p=0.16$), hipocampo ($p=0.72$), estriado ($p=0.75$), mesencéfalo ($p=0.12$), protuberancia ($p=0.59$), bulbo ($p=0.44$), hipotálamo ($p=0.82$) e hipófisis ($p=0.93$) en donde no encontramos diferencias significativas entre animales expuestos y no expuestos, a pesar de que parece observarse una disminución en los niveles de mRNA por los tratamientos con arsenito de sodio.

Expresión de *As3mt* en controles



Región	Corteza	Hipocampo	Estriado	Mesencéfalo	Tálamo	Cerebelo	Protuberancia	Bulbo	Hipotálamo	Hipófisis
Hipocampo			*			*	*		*	*
Mesencéfalo										*

Fig.8 La figura muestra la expresión de *As3mt* de las distintas regiones cerebrales en controles de ratones machos CD-1. Se realizó una ANOVA por el método Holm-Sydk, con una $p < 0.05$. Los valores representan la media \pm S.D. de tres repeticiones.

Regiones cerebrales sin modulación del mRNA de

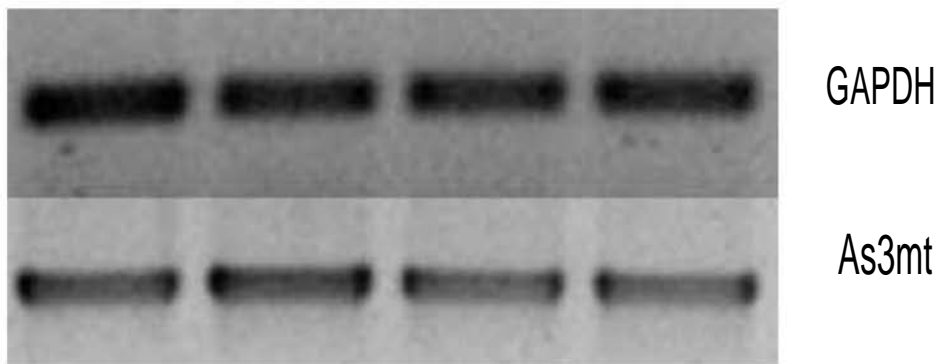
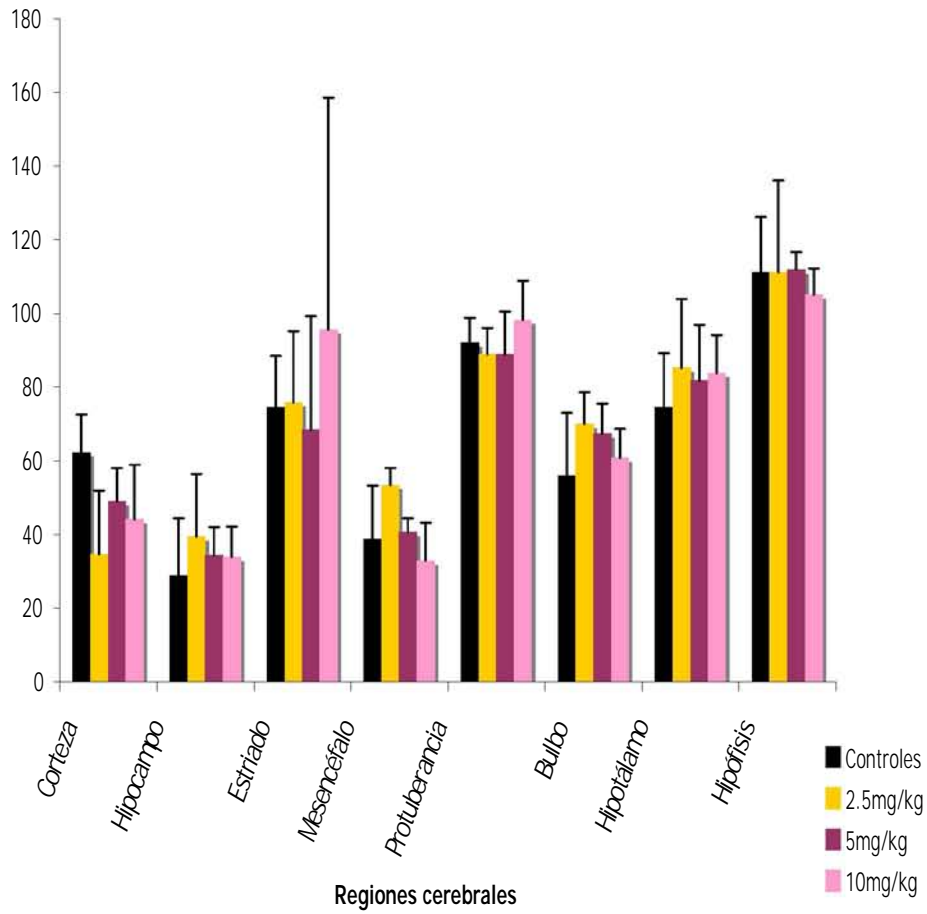


Fig.9 La figura muestra la expresión de *As3mt* en corteza, hipocampo, estriado, mesencéfalo, protuberancia, bulbo, hipotálamo e hipófisis de ratones machos CD-1. De acuerdo con una ANOVA de una vía que se realizó, en las dosis de 2.5mg/kg, 5mg/kg y 10mg/kg de arsenito de sodio (administrado vía oral por 9 días) no se observan diferencias significativas en la expresión de *As3mt* con respecto al control. Los valores representan la media \pm S.D. de tres repeticiones.

En el caso del tálamo observamos una variación en los niveles del mRNA de *As3mt* que parece modulada por el arsenito de sodio administrado. La expresión se inhibió a la dosis de 2.5mg/kg (43.920 ± 3.596 , $p < 0.002$) y al contrario en la dosis de 10mg/kg (67.885 ± 8.468 , $p < 0.002$) se presentó un aumento en la expresión del mRNA de *As3mt* con respecto al control (55.275 ± 1.486).

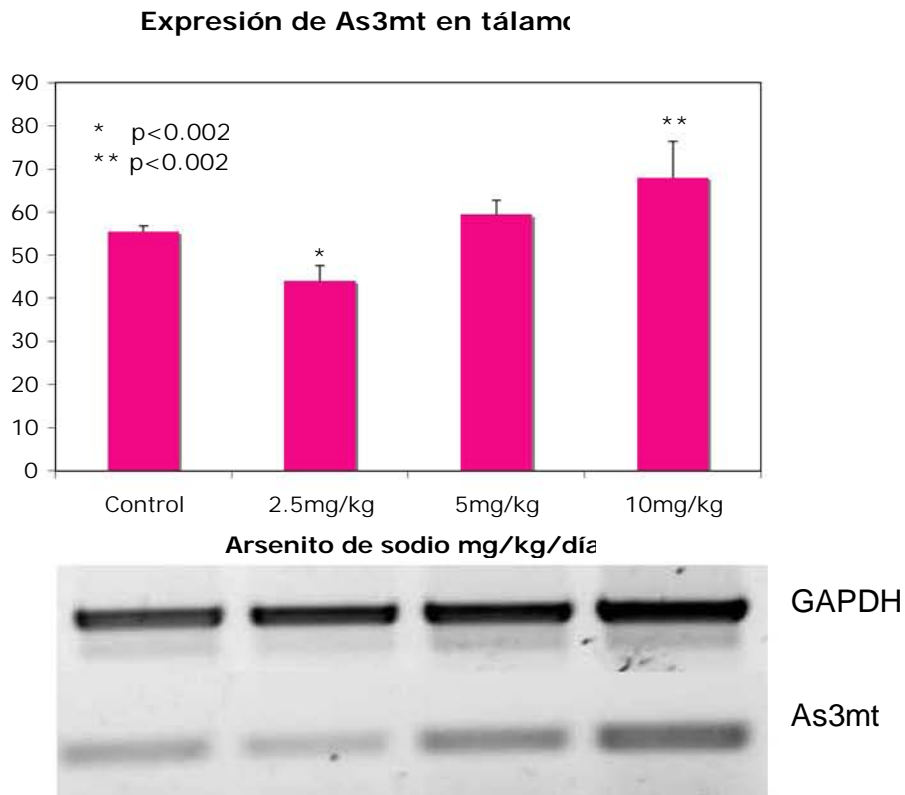


Fig.10 En esta figura se puede observar la expresión de *As3mt* en el tálamo. Para este experimento se usaron ratones machos CD-1 que fueron tratados con arsenito de sodio por vía oral durante 9 días. Para el análisis estadístico se hizo una ANOVA de una vía con el método Holm-Sydak y se encontró que hay diferencias significativas en las dosis de 2.5mg/kg ($P=0.002$) y de 10mg/kg ($P=0.002$) con respecto al control. Los valores representan la media \pm S.D. de tres repeticiones.

En el caso del cerebelo el arsenito de sodio moduló también la expresión del mRNA de *As3mt*. La expresión de *As3mt* disminuyó drásticamente, fue cuatro veces menor, a la dosis de 5mg/kg (22.181 ± 15.357 , $p < 0.002$) con respecto al control (88.727 ± 13.422). De igual forma en la dosis de 10mg/kg (28.054 ± 3.584 , $p < 0.002$) la expresión de *As3mt* se inhibió por acción del arsenito de sodio; en este caso, la expresión fue alrededor de 3 veces menor que el control negativo.

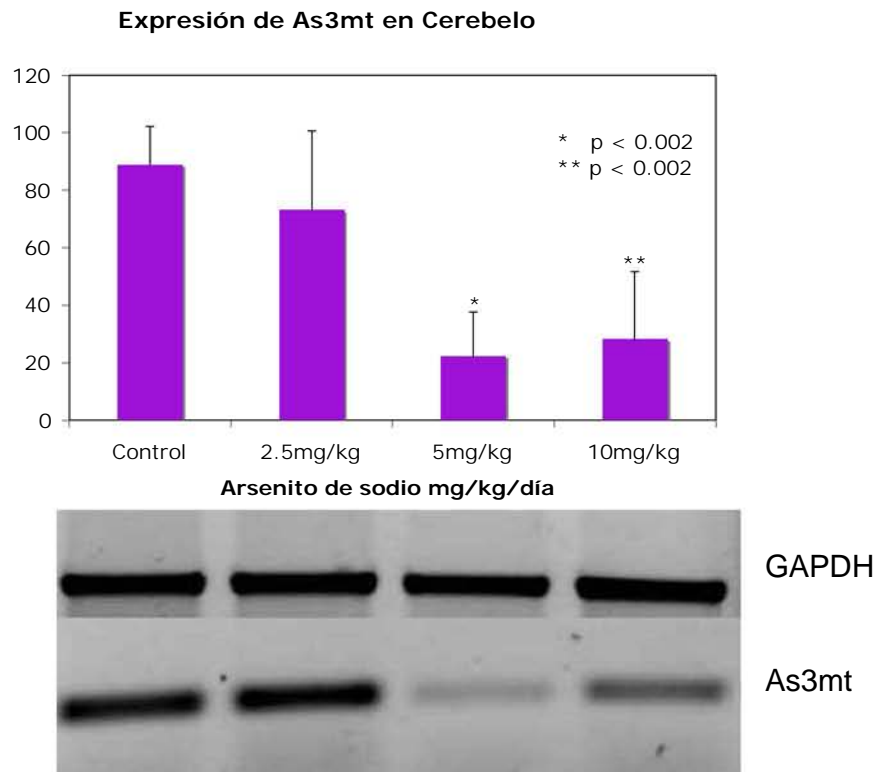


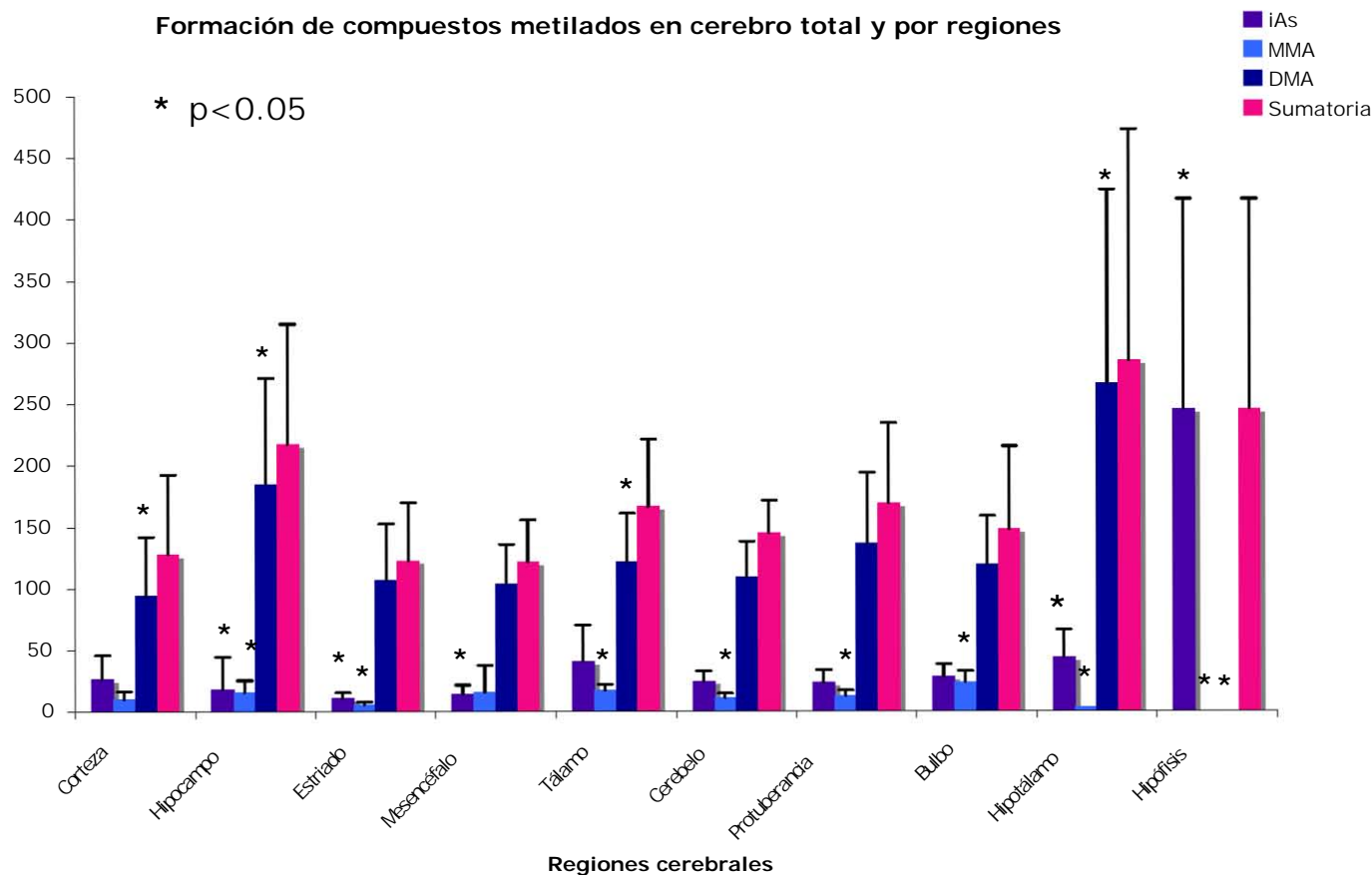
Fig.11 La figura muestra la expresión del mRNA de *As3mt* en cerebelo de ratones machos CD-1 tratados con distintas dosis de arsenito de sodio (2.5mg/kg, 5mg/kg y 10 mg/kg) y el control negativo. Se realizó una ANOVA de una vía con el método Holm-Sydak. Se encontró que la expresión de *As3mt* en las dosis de 5mg/kg ($P < 0.002$) y de 10mg/kg ($P < 0.002$) es significativamente menor que el control. Los valores representan la media \pm S.D. de tres repeticiones.

Resumiendo, en 8 de las regiones (corteza hipocampo, estriado, mesencéfalo, protuberancia, bulbo, hipotálamo e hipófisis) los resultados muestran que el arsenito de sodio no modula la cantidad de mRNA de *As3mt*, ya que no hubo cambios significativos entre los controles y los tratados (2.5mg/kg, 5mg/kg y 10 mg/kg). Al contrario de estos resultados, se encontró que en el tálamo se inhibe la expresión en la dosis de 2.5mg/kg, se normaliza en la dosis de 5 mg/kg y se induce en la dosis de 10mg/kg. Asimismo en el cerebelo se observa una inhibición importante en la dosis de 5mg/kg que se conserva en la dosis de 10mg/kg.

En la **Fig.12** mostramos la acumulación de especies arsenicales en las distintas regiones cerebrales de los ratones que recibieron 10 mg/kg de arsenito de sodio. Un análisis de varianza no paramétrico demostró diferencias significativas en la acumulación de iAs en la hipófisis y el hipotálamo.

Estos datos sugieren que todas las regiones tienen capacidad similar para metilar el As, excepto la hipófisis, el hipotálamo y el bulbo. La hipófisis y el hipotálamo acumularon significativamente ($P < 0.05$) más iAs que el hipocampo, el estriado y el mesencéfalo. Al comparar la formación de especies monometiladas (MMA) se encontraron diferencias significativas entre la hipófisis y el hipocampo, el tálamo, el cerebelo, la protuberancia y el bulbo ($P < 0.05$), asimismo el hipotálamo presentó diferencias significativas con respecto al hipocampo, el tálamo y el bulbo ($P < 0.05$). Esta región a su vez fue significativamente diferente del estriado ($P < 0.05$). En lo que respecta a los compuestos dimetilados (DMA), de nuevo, el análisis demostró diferencias significativas entre la hipófisis y las siguientes regiones: hipocampo, tálamo, protuberancia, bulbo e hipotálamo ($P < 0.05$) y el hipotálamo presentó diferencias significativas con el estriado ($P < 0.05$).

Formación de compuestos metilados en cerebro total y por regiones



Región	Corteza	Hipocampo	Estriado	Mesencéfalo	Tálamo	Cerebelo	Protuberancia	Bulbo	Hipotálamo	Hipófisis
Bulbo			MMA							
Hipotálamo	DMA	iAs MMA	iAs	iAs	MMA			MMA		
Hipófisis		iAs MMA DMA	iAs	iAs	MMA DMA	MMA	MMA DMA	MMA DMA	MMA DMA	DMA

Fig 23. La gráfica muestra la formación de metabolitos metilados de As en las distintas regiones del cerebro de ratón, así como en el cerebro total de animales tratados con 10 mg/kg de arsenito de sodio por 9 días por vía. oral. Los valores expresan la media \pm D.E. de 6 mediciones.

VII. DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que si bien el homogenado de cerebro total nos puede servir para estimar en promedio la capacidad metabólica del cerebro murino (Rodríguez *et al.*, 2005), no todas las regiones transcriben el gen de la *As3mt* de igual manera y hay regiones en los animales tratados donde se observan cambios significativos en los niveles de mRNA.

Existen estudios de expresión regional diferencial como el de Kang *et.al.* (1999), en donde encontraron que la subunidad GCS_P se expresa ampliamente en las distintas capas de la neocorteza cerebral, sin embargo la GCS_L (regulatoria) no tiene el mismo patrón de expresión en esta zona, ya que su expresión se limita a sólo una capa de esta región. Esto corresponde con las observaciones en donde las variaciones en la distribución del mRNA corresponden con las diferencias en los niveles de GSH en varias regiones. Implicando que la presencia del mensajero se refleja en la función de la enzima y en la producción de novo de GSH. Asimismo Lorang *et.al.* (1994) encontró que el transportador de dopamina (DAT) y el de norepinefrina (NET) poseen un patrón de expresión regional específico. El mRNA de DAT sólo se detectó en regiones cerebrales que contiene células dopaminérgicas; de la misma forma, la expresión de NET se limitó a las regiones del tallo cerebral que se conoce contienen cuerpos celulares norepinérgicos, sin embargo células epinérgicas de la misma región no expresaron NET. Esto puede sugerir que la expresión de DAT y NET podrían estar relacionadas con los mecanismos celulares que especifican el neurotransmisor. Los estudios anteriores relacionan la expresión diferencial regional con la función de las proteínas a nivel celular. En nuestro caso, aún no se conoce cual es la función endógena de *As3mt* en el organismo, sin embargo en este estudio encontramos que todas las regiones cerebrales estudiadas tienen expresión constitutiva de *As3mt*. Esto podría sugerir entonces, que por lo menos en el cerebro de ratones adultos (4 semanas) esta proteína desempeña una función importante en cada una de las regiones estudiadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la expresión basal de

As3mt resultó región-específica y este patrón se mantuvo a pesar de los tratamientos con arsenito de sodio, con excepción del tálamo y el cerebelo. Encontramos que las regiones con menor expresión de *As3mt* son el hipocampo y el mesencéfalo, por lo que se esperaba encontrar, en el caso de que la cantidad de mRNA correlacionara con la actividad de proteína, menor formación de metabolitos metilados. Por el contrario, las regiones con mayor expresión de *As3mt* fueron la protuberancia, el hipotálamo y la hipófisis, suponiendo que la cantidad de mRNA correspondería con la actividad de proteína *As3mt*, entonces se esperaba que estas regiones fueran las más susceptibles de daño por ser las que mostrarían mayor formación de metabolitos metilados.

Al hacer el estudio por regiones, observamos, en la región talámica una reducción en los niveles de mRNA en los animales que recibieron una dosis de 2.5 mg/kg y un aumento en los que recibieron 10 mg/kg. Creemos que este comportamiento merece ser investigado con más detalle determinando los niveles de la proteína y su actividad y correlacionarlo con los niveles de especies metiladas en la región para determinar si estos cambios en la expresión de *As3mt* podrían reflejar alguna alteración fisiológica. Por otra parte, el cerebelo mostró claramente una disminución significativa de los niveles de mRNA en las dosis de 5 y 10 mg/kg, por lo que teóricamente esta región debería mostrar una menor acumulación de especies metiladas; sin embargo esto no se observa cuando se analizaron las especies arsenicales por región en los animales tratados con 10 mg/kg (**Fig. 12**). Una explicación a este resultado puede ser que la exposición a iAs podría estar inhibiendo la transcripción pero no la actividad de la enzima.

La formación de metabolitos metilados observada en las distintas regiones del cerebro de ratones tratados con 10 mg/kg no mostró diferencias significativas entre ellas en 7 de las diez regiones estudiadas; la hipófisis, el hipotálamo y el bulbo sí presentaron diferencias significativas con respecto de otras regiones. Esto sugiere, en el caso de las regiones que no presentan diferencias en la formación de metabolitos, que a pesar de que se encontró una expresión de *As3mt* región-específica, este patrón no se ve reflejado en la capacidad metabólica de las distintas regiones.

El hipotálamo presentó una menor cantidad de metabolitos monometilados, sin embargo encontramos que en esta región se encuentra distribuida una cantidad elevada de metabolitos dimetilados (**Fig.12**), asimismo observamos niveles elevados de mRNA de *As3mt* (**Fig.11**). Es posible que la formación elevada de metabolitos dimetilados sea debido a que esta región presenta actividad metabólica importante ya que participa en funciones homeostáticas, hormonales y reproductoras.

La hipófisis presenta un comportamiento interesante. Esta región se encuentra fuera de la barrera hematoencefálica y es una región metabólicamente muy activa. Su ubicación anatómica le confiere menor protección contra la entrada de iAs, por lo que era de esperar que presentara mayor acumulación de iAs, lo cual se encontró en los resultados obtenidos de la medición de especies de As ya que presenta niveles elevados de iAs en comparación con otras regiones cerebrales (hipocampo, estriado y mesencéfalo, ($p < 0.05$)) que se encuentran protegidas por la barrera hematoencefálica. La hipófisis es la región que mostró los niveles más altos de mRNA de *As3mt*, sin embargo, contrario a lo esperado, ésta fue la única región donde no hubo formación de compuestos metilados, solamente acumulación de iAs (**Fig.12**). Esto sugiere que la cantidad de mRNA de *As3mt* en esta región no concuerda con la actividad de proteína *As3mt*. Lo que puede estar indicando que en esta región particular existe alguna regulación para que no se transcriba la proteína, no se encuentre en estado activo o toda su actividad la acapare un sustrato más afin. Otra posibilidad es que ya que esta región es secretora, pues elimine más eficientemente las especies arsenicales de tal forma que no haya sido posible detectarlos. Estos resultados merecen ser estudiados con mayor detalle para comprender mejor la regulación post-transcripcional y post-transduccional de estas proteínas, que permitan comprender la ausencia de metilación en esta región.

En el tálamo, donde en la dosis de 10mg/kg se observa una inducción en la expresión de *As3mt*, sin embargo ésta no se ve reflejada en la formación de metabolitos metilados a la dosis de 10mg/kg. La corteza y el bulbo tienen niveles de mRNA de *As3mt* similares a los del tálamo en los controles, pero no se encontraron cambios significativos en estos niveles de mRNA a pesar de los tratamientos. En el tálamo observamos una

inducción en los niveles del mensajero en la dosis de 10mg/kg y si la expresión corresponde con la actividad de la proteína, entonces se esperaría encontrar mayor formación de metabolitos en esta región con respecto a la corteza y al bulbo, sin embargo esto no sucede ya que no hay diferencias significativas en la formación de metabolitos metilados entre estas regiones.

Finalmente, en el caso del cerebelo en la dosis de 10 mg/kg, la expresión se ve disminuida por el arsenito de sodio, disminuye aproximadamente 3 veces en comparación con la expresión basal. Comparativamente, la expresión basal de *As3mt* en el cerebelo es similar a la del estriado, sin embargo el As no modula la expresión de *As3mt* en esta última región. Si tomamos esta expresión basal como parámetro y se asume que la cantidad de mRNA corresponde con la actividad de la proteína *As3mt*, entonces se esperaría que la formación de metabolitos metilados a esta dosis en el cerebelo fuera aproximadamente 3 veces menor que la producción de estas especies en el estriado. Sin embargo, no sucedió de esta manera ya que la formación de estas especies de As en esta dosis en el cerebelo fue similar a la producida en el estriado (**Fig.12**), lo que supone que la cantidad de mRNA no corresponde con la actividad de la proteína. Lo anterior indica que aparentemente esta disminución en los niveles de mRNA no tiene efectos en la capacidad metabólica del As de esta región, por lo que no se asume que esta disminución tenga un efecto protector. El daño a nivel de esta región podría verse reflejado en alteraciones en la locomoción de los individuos como se ha registrado en la literatura (Pryor *et.al.*,1983; Itoh *et.al.*, 1990; Rodríguez *et.al.* 2001, 2002; Chattopadhyay *et. al.*, 2002). Cabe mencionar que los estudios encontrados fueron en su mayoría regímenes de exposición subcrónica y nuestro estudio fue de exposición subaguda, igual que el estudio de Itoh *et.al.* (1990) y pudiera haber algunas diferencias en las alteraciones presentadas debido al régimen de exposición.

Estos datos se semejan con los encontrados por Rodríguez-Antona *et.al.* (2001) en donde la cantidad de mRNA de CYP 2A6, 2C9 y 2E1 no correlaciona con la actividad de la proteína. Debido probablemente a una regulación a nivel pretranscripcional, pretraduccional, traduccional y/o posttraduccional. Estos mecanismos combinados de

regulación podrían estar explicando la falta de correlación entre la expresión de mRNA y la actividad de estos citocromos. Aparentemente en nuestro estudio no sólo existe regulación pretranscripcional, sino que podría existir un mecanismo combinado de regulación que actúe a nivel pretraduccional, traduccional y/o posttraduccional, lo que explicaría la no correspondencia de la cantidad de mRNA de *As3mt* con la formación de metabolitos metilados de As. Por otro lado Wood *et.al.* (2006) encontraron que *As3mt* presenta polimorfismos en los humanos que alteran la actividad de la proteína, es posible que existan también polimorfismos en los ratones que alteren la actividad de la proteína. Esto también pudo contribuir a la falta de correlación entre los niveles de mRNA y la formación de metabolitos metilados, ya que se estudiaron los tejidos de todos los ratones en cada tratamiento y no a los animales individuales.

Los datos mencionados indican aparentemente que la capacidad de biometilación de las distintas regiones cerebrales es similar (con excepción de la hipófisis, el hipotálamo y el bulbo) a pesar de que el patrón de expresión de *As3mt* sea diferencial. Lo que implica que posiblemente esas regiones tengan una susceptibilidad similar a los efectos generados por el As debido a la acumulación de metabolitos metilados. Sería entonces muy interesante determinar si existen polimorfismos que afectan la actividad *As3mt*, su frecuencia en la población y el impacto de éstos en la actividad de la proteína; así como investigar a los mecanismos de regulación de *As3mt*. Por otra parte sería interesante conocer si la mayor acumulación de compuestos dimetilados en el hipotálamo se ven reflejados en efectos a nivel fisiológicos en esta región. Por otro lado es importante reiterar la necesidad de cuantificar los niveles de la enzima para correlacionarlos con los datos obtenidos de esta investigación y así conocer mejor la regulación de este gen y proteína *As3mt*.

VIII. CONCLUSIONES

Sin duda, la investigación en este tema acerca de los mecanismos de acción del As para generar efectos adversos y daño en el SN, especialmente en el SNC, tiene un largo camino por recorrer. Sin embargo, los hallazgos de este trabajo resultan valiosos por su contribución para comenzar dicho camino, ya que se comprobó que la expresión de *As3mt* es constitutiva, que tiene un patrón de expresión cerebral región-específica, que en términos generales no es modulada por el arsenito de sodio (con excepción del tálamo y el cerebelo), que en la mayoría de las regiones cerebrales estudiadas (excepto la hipófisis, el hipotálamo y el bulbo) tienen capacidad similar para biometilar el As por lo que presentan aparentemente la misma susceptibilidad de daño generado por esta exposición y que probablemente la regulación de *As3mt* se lleva a cabo a nivel pretraduccional, traduccional y/o postraduccional en esas regiones. Paralelamente, casi todas las regiones cerebrales biometilan el As, lo que implica que sus células están en contacto con las especies tóxicas y se enfrentan al consumo de GSH y de AdoMet. El estrés oxidante en sistema nervioso genera daño mitocondrial y membranar, aumenta la excitotoxicidad glutamatergica y provoca la muerte celular por apoptosis o necrosis (Bains y Shaw, 1997). El desequilibrio en el balance de metilación podría generar alteraciones en la composición y función de la membrana, poniendo en peligro la viabilidad neuronal (Blusztajn *et.al.*, 1987) y alteraciones en el metabolismo de ciertos neurotransmisores como las catecolaminas, la acetilcolina y la histamina.

Estos resultados ofrecen un buen comienzo para conocer más acerca de la expresión diferencial regional de *As3mt* y de la modulación de este gen, para conocer cuál podría ser el sustrato endógeno de la enzima e investigar más acerca de la proteína y posteriormente asociar la formación de metabolitos metilados con los efectos adversos provocados por los mismos en este órgano.

IX. PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio aportan conocimiento valioso en la comprensión de los mecanismos de acción del As en el SNC y en el estudio de As3mt, así mismo abrieron un camino de investigación muy interesante que ayudará a elucidar las preguntas que surgieron de este trabajo. Para responder estas preguntas sería importante:

- Determinar la cantidad de proteína As3mt en las distintas regiones cerebrales para correlacionarlo con los niveles de mRNA y la formación de metabolitos metilados.
- Confirmar la expresión de As3mt en las regiones estudiadas y relacionarla con el daño generado por la presencia de metabolitos metilados (a nivel histológico y/o fisiológico).
- Caracterizar completamente el gen As3mt para conocer si existen factores de transcripción y mecanismos de regulación que puedan modular su transcripción.
- Realizar un análisis bio-informático, generando modelos moleculares que permitan aproximarse al posible sustrato y función endógena de esta proteína.
- Determinar el nivel de expresión, actividad proteica y cuantificación de productos generados por otras metiltransferasas del SNC (COMT, PNMT, HNMT, DNMT) para conocer los efectos de la biometilación de As en el balance de metilación celular, especialmente en estas reacciones importantes en el SNC, ya que están implicadas en procesos como el metabolismo de neurotransmisores y procesos como la formación de la memoria a través de la metilación del DNA.

X. REFERENCIAS:

- **Ahmad, S., Kitchin, K.T., Cullen, W.R.**, 2002, Plasmid DNA damage caused by methylated arsenicals, ascorbic acid and human liver ferritin, *Toxicol. Lett* 133, 47-57.
- **Alberts Bruce**, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 4th Edition, 2002, EUA, pp. G: 22, 431-435.
- **Albores, A., Vega, B., Del Razo, L.M., Cebrían, M. en Albert**, *Introducción a la toxicología ambiental*, Hemes impresores, 1997, 247-261.
- **Alves E.W., de Meis L.**, 1987, Effects of arsenate on the Ca²⁺ ATPase of sarcoplasmic reticulum, *Eur. J. Biochem.* 166, 647-651.
- **Aposhian H.V., Gurzau E.S., Le X.C., Gurzau U., Healy S.M., Lu X., Ma M., Yip L., Zakharyan R.A., Maiorino R.M., Dart R.C., Tirces M.G., González-Ramírez D., Morgan D.L., Avram D., Aposhian M.M.**, 2000, Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic, *Chem. Res. Toxicol.* 13, 693-697.
- **Bains J., Shaw C.**, 1997, Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death, *Brain Res. Rev.* 25, 335-358.
- **Bencko, V.**, 1987, Arsenic, en: *Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational occurrence and exposure*, Fishbein, L., Furst, A. And Mehlman, M.A. eds. Princeton Scientific Publishing Co., Princeton, New Jersey, pp 1-30.
- **Bencko V., Symon K.**, 1977, Test of environmental exposure to arsenic and hearing changes in exposed children, *Environ. Health Perspect.* 19, 95-101.
- **Bernstam L., Nriagu J.**, 2000, Molecular aspects of arsenic stress, *J.Toxicol. Environ. Health B: Crit. Rev.* 3, 293-322.
- **Blom S., Lagerkvist B., Linderholm H.**, 1985, Arsenic exposure to smelter workers. Clinical and neurophysiological studies. *Scand. J. Work Environ. Health* 11, 265-269.

- **Blusztajn JK., Liskovitch M., Richardson I.,** 1987, Synthesis of acetylcholine from choline derived from phosphatidylcholine in a human neuronal cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 5474-5477.
- **Bolla-Wilson K., Bleecker M.L.,** 1987, Neurophysiological impairment following inorganic arsenic exposure, *J. Occup. Med.* 29, 500-503.
- **Borgoño J.M., Vicent P., Venturino H., Infante A.,** 1977, Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: epidemiological and clinical study before and after the installation of a treatment plant, *Environ. Health Perspect.* 19, 103-105.
- **Buchet J.P., Laurewys R.,** 1985, Study of inorganic arsenic methylation by rat in vitro: relevant for the interpretation of observations in man, *Arch. Toxicol.* 57, 125-129.
- **Bunge M.,** 2002, La investigación científica, Siglo XXI, México, p. 8-10.
- **Calderon J., Navarro M.E., Jiménez-Capdeville M.E., Santos Diaz M.A., Goleen A., Rodríguez-Leyva I., Borja-Aburto V., Diaz Barriga F.,** 2001, Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children, *Environ. Res.* 85, 69-76.
- **Cebrián, M.E.,** 1983, Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico, *Hum. Toxicol.*, 2, 121-133.
- **Challenger, F.,** 1945, Biological methylation, *Chem. Rev.* 36, 315-362.
- **Chattopadhyay S., Bhaumik S., Nag Chaudhury A., Das Gupta S.,** 2002a, Arsenic induced changes in growth development and apoptosis in neonatal and adult brain cells in vivo and in tissue culture, *Toxicol. Lett.* 128, 73-84.
- **Chattopadhyay S., Bhaumik S., Purkayastha M., Basu S., Chaudhury A., Das Gupta S.,** 2002b, Apoptosis and necrosis in developing brain cells due to arsenic toxicity and protection with antioxidants, *Toxicol.Lett.* 136, 65.
- **Chen Y.C., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K.,** 1998, Involvement of reactive oxygen species and caspase-3 activation in arsenite-induced apoptosis, *J. Cell Physiol.* 177, 324-333.
- **Chhuttani P.N., Charla, L.S., Sharma, T.D.,** 1967, Arsenical neuropathy. *Neurology* 17., 269-274.

- **Chhuttani, P.N., Chopra J.S.**, 1979, Arsenic poisoning, In: Vinken, P.J., Bruyn, G.W. (Eds.), Handbook of Clinical Neurology, North Holland, New York, pp.199-216.
- **Chomczynski P. y Sacchi N.**, 1987, "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction", Anal. Biochem. 162, 156.
- **Danan M., Dally S., Conso F.**, 1984, Arsenic induced encephalopathy, Neurology 34(11), 1524.
- **Del Razo L.M. Quintanilla-Vega B., Brambila-Colombres E., Calderon-Aranda E.S., Manno M., Albores A.**, 2001, Stress proteins induced by arsenic, Toxicol., Appl. Pharmacol. 177, 132-148.
- **Del Razo L.M., García-Vargas G.G., Vargas H., Albores A., Gonsebatt M.E., Montero R., Ostrosky-Wegman P., Kelsh M., Cebrián M.E.**, 1997, Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism, A pilot study, Arch. Toxicol. 71, 211-217.
- **Del Razo L.M., Styblo M., Cullen W.R., Thomas D.**, 2001a, Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices, Toxicol. Appl. Pharmacol. 174, 282-293.
- **Delgado J.M., Dufour L., Grimaldo J.I., Carrizales L., Rodríguez V.M., Jiménez-Capdeville M.E.**, 2000, Effects of arsenite on central monoamines and plasmatic levels of adrenocorticotropic hormone (ACTH) in mice, Toxicol. Lett. 117, 61-67.
- **Díaz-Barriga F., Santos M.A., Mejía J.J., Batres L., Yáñez L., Carrizales L., Vera E., del Razo L.M., Cebrián M.E.**, 1993, Arsenic and cadmium exposure in children living near a smelter complex in San Luis Potosí, México, Environ. Res. 62, 242-250.
- **Dieterich H.**, 1996, Nueva guía para la investigación científica, Avelar editores e impresores, México, p. 222-224.
- **Dringen R.**, 2000, Metabolism and functions of glutathione in brain, Prog. Neurobiol. 62, 649-671.

- **Drobna Z., Jaspers I., Thomas D.J., Styblo M.,** 2003, Differential activation of AP-1 in human bladder epithelial cells by inorganic and methylated arsenicals, *FASEB J.* 17, 67-69.
- **Fincher R.M., Koerker R.M.,** 1987, Long-term survival in acute arsenic encephalopathy. Follow-up using newer measures of electrophysiologic parameters, *Am. J. Med.* 82(3), 549-552.
- **Flora S.J.,** 1999, Arsenic induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of *N*-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 865-869.
- **Fontecave M., Atta M., Mulliez E.,** 2004, *S*-adenosylmethionine, nothing goes to waste, *Trends Biochem. Sci.* 29(5), 243-249.
- **Frank G.,** 1976, Neurological and Psychiatric disorders following acute arsenic poisoning, *J. Neurol.* 213, 59-70.
- **Franzblau A., Lilis R.,** 1989, Acute arsenic intoxication from environmental arsenic exposure, *Arch. Environ. Health* 44, 385-390.
- **García-Chávez E., Segura B., Merchant H., Jiménez I., Del Razo L.M.,** 2007, Functional and morphological effects of repeated sodium arsenite exposure on rat peripheral sensory nerves, *J. Neurol Sci.*, 258(1-2), 104-110.
- **Gebel, T.W.,** 2002, Arsenic methylation is a process of detoxification through accelerated excretion, *Int. J. Environ. Health* 205, 505-508.
- **Gerr F., Letz R., Green R.C.,** 2000 a, Relationships between quantitative measures and neurologist's clinical rating of tremor and standing steadiness in two epidemiological studies, *NeuroToxicology* 21, 753-760.
- **Gerr F., Letz R., Ryan P.B., Green R.C.,** 2000 b, Neurological effects of environmental exposure to arsenic in dust and soil among humans, *NeuroToxicology* 21, 475-487.
- **Gherardi, R.K., Chariot, P., Vanderstigel, M., Malapert, D., Verroust, J., Astier, A., Brun-Buisson, C., Schaeffer, A.,** 1990, Organic arsenic-induced Guillain-Barre-like syndrome due to melarsoprol: a clinical, electrophysiological and pathological study, *Muscle Nerve* 13, 637-645.

- **Goebel, H.H., Schimdt, P.F., Bohl, J., Tettenborn, B., Kramer, G., Gutmann, L.,** 1990, Polyneuropathy due to acute arsenic intoxication biopsy studies, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49, 137-149.
- **Gonsebatt M.E., Vega L., Montero R., García-Vargas G., Del Razo L.M., Albores A., Cebrián M.E., Ostrosky-Wegman P.,** 1994, Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water, *Mutat. Res.* 313 (2-3), 293-299.
- **Gonsebatt M.E., L. Vega, A.M. Salazar, R. Montero, P. Guzmán, J. Blas, L.M. Del Razo, G. García-Vargas, A. Albores, M.E. Cebian, M. Kelsh and P. Ostrosky Wegman.** 1997. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res.* **386**:2199-2228
- **Hall A. H.,** 2002, Chronic arsenic poisoning, *Toxicol. Lett.* 128, 69-72.
- **Heymann, A., Pfeiffer, J.B., WillR.W., Haywood M., Taylor H.M.,** 1956, Peripheral neuropathy caused by arsenical intoxication: A study of 41 cases with observations in the effects of BAL (2, 3-dimercapto-propanol), *N. Engl. J. Med.* 254, 401-409.
- **Hughes, M.F.,** 2002, Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicology Letters*, 133, 1-16.
- **IARC,** 1987, IARC Monographs on the evaluation on carcinogenic risks to humans overall evaluations of carcinogenicity, Vol. 23 Suppl.7, 32-43.
- **Itoh T., Zhang Y.F., Murai S., Saito H., Nagahama H., Miyate H., Saito Y., Abe E.,** 1990, The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice, *Toxicol. Lett.* 54, 345-353.
- **Kang Y., Viswanath V., Jha N., Qiao X., Mo J.Q., Andersen J.K.,** 1999, Brain γ -Glutamyl Cysteine Synthetase (GCS) mRNA expression patterns correlate with regional specific enzyme activities and glutathione levels, *J. Neurosci. Res.* 58, 436-441.
- **Kannan G.M., Tripathi N., Dube S.N., Gupta M., Flora S.J.,** 2001, Toxic effects of arsenic (III) on some hematopoietic and central nervous system variables in rats and guinea pigs, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 39, 675-682.

- **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.
- **Klaassen C.D., Watkins III J.B.**, 2003, *Essentials of toxicology*, McGraw Hill, EUA, 7-8,19.
- **Kobayashi H., Yuyama A., Tokonabe Y., Matsusaka N.**, 1982, Reversible effects of monothiol (D-penicillamine) and dithiol (dimercaptosuccinic acid) chelating compounds on methylmercury-inhibited choline acetyltransferase activity and high affinity choline uptake, *Jpn. J. Pharmacol.* 32, 655-663.
- **Kobayashi Y., Hayakawa T., Hirano S.**, 2006, Expression and activity of arsenic methyltransferase Cyt19 in rat tissues, *Environ. Toxicol. and Phar.* doi: 10.1016/j.etap.2006.07.010
- **Kresge N., Tabor H., Simoni RD., Hill RL**, 2005, An escape from Italy; the discovery of S-adenosylmethionine and the biosynthesis of creatine by Giulio L. Cantoni, *J. Biol. Chem.* 280, 38.
- **Kumagai Y. and Sumi D.**, 2007, Arsenic: Signal Transduction, transcription factor and biotransformation involved in cellular response and toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 243-262.
- **Le X.C., Lu X., Ma M., Cullen W.R., Aposhian H.V., Zheng B.**, 2000, Speciation of key arsenic metabolic intermediates in human urine, *Anal. Chem.* 72, 5172-5177.
- **Lerman, S. Y Clarkson, T.W.**, 1983, The metabolism of arsenite and arsenate by rat, *Fund. Appl. Toxicol.*, 3, 309-314.
- **Lin S., Cullen W.R., Thomas D.J.**, 1999, Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase, *Chem. Res. Toxicol.* 12, 924-930.
- **Lin S., 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.

- **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.
- **Loenen WAM.,** 2006, *S*-Adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything?, *Biochem. Soc. Trans.* 34, part 2.
- **Lorang D., Amara S.G., Simerly R.B.,** 1994, Cell type specific expression of catecholamine transporters in the rat brain, *J. of Neurosci.* 14(8), 4903-4914.
- **Lynn S., Gurr J.R., Lai H.T., Jan K.Y.,** 2000, NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.* 86, 514-519.
- **Mailman R., Lawler CP., Martin P.,** Biochemical toxicology of the central nervous system. In: **Hodgson E. and Levi PE,** editors. Introduction to biochemical toxicology, Connecticut, USA, Appleton & Lange, 1994, 431-457.
- **Mass M.J., Tennant A., Roop B.C., Cullen W.R., Styblo M., Thomas D.J., Kligerman A.D.,** 2001, Methylated trivalent arsenic species may be the proximate or ultimate genotoxic forms of arsenic, *Chem. Res. Toxicol.* 14, 355-361.
- **Miller, C. and Sweatt, D.,** 2007, Covalent modification of DNA regulates memory formation, *Neuron* 53, 857-869.
- **Morton W.E., Caron G.A.,** 1989, Encephalopathy: an uncommon manifestation of workplace arsenic poisoning?, *Am. J. Ind. Med.* 15, 1-5.
- **Mukhopadhyay R., Shi J., Rosen B.P.,** 2000, Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase, *J. Biol. Chem.* 275, 21149-21157.
- **Nagaraja T.N., Desiraju T.,** 1993, Regional alterations in the levels of brain biogenic amines glutamate, GABA, and GAD activity due to chronic consumption of inorganic arsenic in developing and adult rat, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 100-107.
- **Nagaraja T.N., Desiraju T.,** 1994, Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake, *Hum. Exp. Toxicol.* 13, 353-356.

- **Nesnow S., Roop B.C., Lambert G., Kadiiska M., Mason R.P., Cullem W.R., Mass M.J.,** 2002, DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species, *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1627-1634.
- **Petrick J.S., Ayala-Fierro F., Cullen W.R., Carter D.E., Aposhian H.V.,** 2000, Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163, 203-207.
- **Petrick J.S., Jagadish B., Mash E.A., Aposhian H.V.,** 2001, Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD(50) in hamster and *in vitro* inhibition of pyruvate dehydrogenase, *Chem. Res. Toxicol.* 14, 651-656.
- **Pryor G.T., Uyeno E.T., Tilson H.A., Mitchell C.L.,** 1983, Assessment of chemicals using a battery of neurobehavioral tests: a comparative study, *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 5, 91-117.
- **Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, Lamantia AS, Macnamara J.,** *Invitación a la neurociencia*, Ed. Panamericana, 2001, Argentina, p. 480, 603.
- **Rodríguez-Antona C., Donato M.T., Pareja E., Gómez-Lechón M.J., Castell J.V.,** 2001, Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity, *Arch. Biochem. And Biophys.*, 393-2, 308-315.
- **Rodríguez V.M., Carrizales L., Jiménez-Capdeville M.E., Dufour L., Giordano M.,** 2001, The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat, *Brain Res. Bull.* 55, 301-308.
- **Rodríguez V.M., Carrizales L., Mendoza M.S., Fajardo O.R., Giordano M.,** 2002, Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat, *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 743-750.
- **Rodríguez V.M., Dufour L., Carrizales L. Diaz-Barriga F., Jiménez-Capdeville M.E.,** 1998, Effects of oral exposure to mining waste in vivo dopamine release from rat striatum, *Environ. Health Perspect.* 106, 487-491.
- **Rodríguez V.M., Jiménez-Capdeville M.E., Giordano M.,** 2003, The effects of arsenic on the nervous system, *Toxicol. Lett.* 145, 1-18.
- **Rodríguez VM., Del Razo LM., Limón Pacheco JH., Giordano M., Sánchez Peña LC, Uribe-Querol E., Gutiérrez-Ospina G., Gonsebatt ME.,** 2005,

- Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in CD1 mice brain and liver, *Toxicol. Sci.* 84, 157-166.
- **Romach E.H., Zhao C.Q., Del Razo L.M., Cebrián M.E., Waalkes M.P.,** 2000, Studies on the mechanisms of arsenic-induced self-tolerance development in liver epithelial cells through continuous low-level arsenite exposure, *Toxicol. Sci.* 54, 500-508.
 - **Sampayo-Reyes A., Zakharyan R.A., Healy S.M., Aposhian H.V.,** 2000, Monomethylarsonic acid reductase and monomethylarsonous acid in hamster tissue, *Chem. Res. Toxicol.* 13, 1181-1186.
 - **Sastre, M.S.R. de, Varillas, A., Kirschbaum, P. Boemo, A. Rodríguez, H., Salim, B. de, Chalabe, G. de y Franco, J.,** 1992, Chronic endemic hydroarsenicism. Arsenic in the environment and its incidence on health. *Internacional Semianr Proceedings, A.M. Sancha Ed.,* pp. 123-130.
 - **Scout, N. Hatleid, K.M., MacKenzie, N.E. y Carter, D.,** 1994, Reactions of Arsenic (III) and Arsenic (V) species with glutathione, *Chem. Res. Toxicol.,* 6, 102-106.
 - **Siegel G, Albers W, Brady S, Price D.,** *Basic Neurochemistry,* Academic Press, 2006, Canada, p. 303-306.
 - **Soto-Peña G.A., Luna A.L., Acosta-Saavedra L., Conde P., López Carrillo L., Cebrián M.E., Bastida M., Calderón-Aranda E.S., Vega L.,** 2006, Assessment of lymphocyte subpopulations cytokine secretion on children exposed to arsenic, *FASEB J.* 20(6), 779-781.
 - **Stead, L.M., Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., Dennis, E.V., Jacobs, R.L.,** 2006, Is it time to reevaluate the methyl balance in humans?, *American Journal of Clinical Nutrition,* 83, 5-10.
 - **Styblo M., Drobna Z., Jaspers I., Lin S., Thomas D.J.,** 2002, The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic, A research update, *Environ. Health Perspect.* 110, (Suppl. 5), 767-771.
 - **Styblo M., Serves S.V., Cullen W.R., Thomas D.J.,** 1997, Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols, *Chem. Res. Toxicol.* 10, 27-33.

- **Stybło, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., Lecluyse, E.L., Hamilton, G.A., Wang, C., Cullen, W.R., Thomas, D.J.,** 2000, Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in human cells, *Arch. Toxicol.* 74, 289-299.
- **Takahashi K., Yamauchi H., Mashiko M., Yamamura Y.,** 1990, The effect of S-adenosylmethionine on methylation of inorganic arsenic, *Nipón Eiseigaku Zasshi* 45, 613-618.
- **Tchounwou, P., Patlolla A., Centeno J.,** 2003, Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure- a critical review, *Toxicologic Pathology*, 31:575-588.
- **Thomas D., Stybło M., Lin S.,** 2001, The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176, 127-144.
- **Thomas D., Waters S., Stybło M.,** 2004, Elucidating the pathway for arsenic methylation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 319-326.
- **Trevor A.J., Gordon M.A., Parker K.K., Chan S.L.,** 1978, Acetylcholinesterases, *Life Sci.* 23, 1209-1220.
- **Triebig, G., Büttner, J.,** 1983, Neurotoxic occupational substances, I. Metals and their compounds. A literature review of the years 1970 to 1982. *Central Bakteriolog. Microbiol. Hyg.* 177, 11-36.
- **Tripathi N., Kannan G.M., Pant B.P., Jaiswal D.K., Malhotra P.R., Flora S.J.,** 1997, Arsenic – induced changes in certain neurotransmitters levels and their recoveries following chelation in rat whole brain, *Toxicology Letters* 92, 201-208.
- **Tsai S.Y., Chou H.Y., The H.W., Chen C.M., Chen C.J.,** 2003, The effects of chronic exposure on the neurobehavioral development in adolescence, *NeuroToxicology* 24, 747-753.
- **Vahter, M.,** 1981, Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats, *Environ. Res.*, 190, 225-228.
- **Vahter, M. y Marafante E.,** 1983, Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite and arsenate in mice and rabbits, *Chem. Biol. Interact.*, 47(1), 29-44.

- **Vahter, M., Marafante, E.**, 1984, The effect of methyltransferase inhibition on the metabolism of (74As) arsenite in mice and rabbits, *Chem. Biol. Interact.*, 50, 49-57
- **Vahter, M.**, 2002, Mechanisms of arsenic biotransformation, *Toxicology* 181-182, 211-217.
- **Valkonen S., Savolainen H., Jarvisaio J.**, 1983, Arsenic distribution and neurochemical effects in peroral sodium arsenite exposure of rats, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 303-308.
- **WHO**, 1981, Arsenic. Environmental health criteria 18, World health organization, Geneva.
- **Wood T.C., Salavagionne O.E., Mukherjee B., Wang L., Klumpp A.F., Thomas B.A., Eckloff B. W., Schaid D.J., Wieben E.D., Weinshilboum R.M.**, 2006, Human Arsenic Methyltransferase (As3mt) pahrmacogenetics: gene resequecing and functional genomic studies. *J.Biol Chem.* 18, 7364-7373.
- **Yamanaka K., Hayashi H., Tachikawa M., Kato K., Hasegawa A., Oku N., Okada S.**, 1997, Metabolic methylation is a posible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics, *Mutat. Res.* 394, 95-101.
- **Yamauchi, H., Fowler, B.A.**, 1994, Toxicity and metabolism of inorganic and methylated arsenicals, In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Arsenic in the Environment, Part II: Human Health and Ecosystem Effects*, Wley, New York, pp. 35-43.
- **Zakharyan R.A., Wu Y., Bogdan G.M., Aposhian H.V.**, 1995, Enzymatic methylation of arsenic compounds: assay, partial purification and porperties of arsenite methyltransferase from rabbit liver, *Chem. Res. Toxicol.* 8, 1029-1038.
- **Zakharyan R.A., Wildfang E., Aposhian H.V.**, 1998, Enzymatic methylation of arsenic compounds VI. Characterization of hmaster liver arsenite and methylarsonic acid methyltranferase activities in vitro, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152(2), 366-375.
- **Zakharyan R.A., Ayala-Fierro F., Cullen W.R., Carter D.M., Aposhian H.V.**, 1999, Enzymatic methylation of arsenic compunds: VII. Monomethylarsonous acid (MMA (III)) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit and human hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158, 9-15.

- **Zheng W., Perry D.F., Nelson D.L., Aposhian H.V.,** 1991, Choroid plexus protects cerebrospinal fluid against toxic metals, *FASEB J.* 5, 2188-2193.
- **Zhu BT.,** 2002, Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation of endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis, *Curr. Drug Metabol.* 3, 321-349

XI. APÉNDICES

A. Materiales:

Equipo y material:

Analizador de imágenes

Balanza analítica

Baño María

Bisturí

Cámara de electroforesis horizontal

Campana de flujo laminar

Criotubos

Cubeta de cuarzo para luz UV

Espectrofotómetro

Fuente de poder

Gradilla

Guantes

Homogenizadores

Incubadora

Material de disección

Material de vidrio de uso rutinario en el laboratorio

Mechero

Microcentrífuga refrigerada

Micropipetas

Microtubos

Pipetas

Potenciómetro

Tapabocas

Tanque de nitrógeno líquido

Termociclador

Transiluminador

B. Material biológico:

dNTPs 2 mM (mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados)

dNTPs 10 mM (mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados)

M-MLV RT (Moloney Murine Leucemia Virus Retro Transcriptasa)

Oligo dT

Oligonucleótidos sintetizados (primers- forward/reverse para As3mt y GAPDH)

Platinum Taq DNA Polymerase

Ratones CD1 machos de 4 semanas de edad

C. Reactivos:

Ácido acético

Ácido bórico

Agarosa

Agua Milli Q estéril

Arsenito de sodio

Azul de bromofenol

Bromuro de etidio (BrEt)

Cloroformo

DEPC

EDTA

Hielo

Hielo Seco

Isopropanol

Tris Base

Trizol

D. Buffers:

Buffer **TBE** 1x (pH 8,3): Tris Base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, agua Milli Q.

Buffer **TAE** 1x (pH 8,3): Tris Base 40 mM, ácido acético, EDTA 0,5 M agua Milli Q.

Buffers para PCR:

(Tris 500 mM pH 8.3, BSA 5.2 mg/ml, Ficoll 5%, Cresol Red 5mM y

L (Low 10x) MgCl₂ 10 mM)

M (Médium 10x) MgCl₂ 20 mM)

H (High 10x) MgCl₂ 30 mM)

10x DNase I Reaction Buffer: Tris HCl 200 mM (pH 8,4), MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM.

M-MLV RT 5x Reaction Buffer: Tris HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM.

E. Soluciones:

Mezcla de aplicación para RNA: 0.75 ml de formamida desionizada, 0.15 ml de 10x MOPS, 0.24 de formaldehído, 0.1 ml de agua desionizada libre de RNasas, 0.1 ml de glicerol, 0.08 ml 10% (w/v) de azul de bromofenol.