



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA
EXPRESIÓN DE CITOQUERATINA 18 EN EL HÍGADO
EXPUESTO A ARSÉNICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACÁDEMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. OSCAR ZUÑIGA LEMUS

DIRECTOR DE TESIS: Dra. PATRICIA RAMIREZ NOGUERA

MÉXICO, D.F.

ENERO ,2008



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.

El alumno fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 189824

Este trabajo estuvo apoyado económicamente por el programa PAPIIT IN203405-2 y por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) en el programa de promoción 2006 con número de folio 0163.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Patricia Ramírez Noguera, Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dr. Carlos Gerardo García Tovar, porque sus comentarios mejoraron esta tesis.

A los miembros del jurado: Dra. Patricia Ramírez Noguera, Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo, Dra. Ma. de la Luz del Razo Jiménez, Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte. Por su tiempo y comentarios a este trabajo.

A la UNAM y FES-Cuautitlan por permitirme seguir con mis estudios y avanzar en mis conocimientos.

Dedicatorias

Dios

Gracias te doy por todo lo bueno y lo no tan bueno, por que me haces entender que no soy mas que una pequeñísima parte de un todo, por que dentro de todo el mal ser humano que soy, me haz mostrado que existen cosas buenas que merecen ser aplaudidas, por permitirme vivir hasta el día de hoy y conocer a toda la gente que he conocido, por permitirme conocer a Verónica aunque no se si lo merezco y gracias te doy por dejarme ver tu grandeza en este pedacito de luz que permitiste se atravesara en nuestro camino (Ameyalli). Por que no soy quien para merecerlo pero gracias te doy por estar en mí.

Ameyalli

Seguramente no he sido el mejor padre que un hijo puede tener, pues realmente no se como serlo eso no me lo enseñaron en la escuela, ni en la calle ni en ningún otro lado, sin embargo doy todo lo que tengo para hacerte feliz, toda vez que te ríes es una luz cegadora que alimenta mi alma entorpecida por el ego, toda vez que te ríes veo a dios sonriéndome y diciendo que el mundo no es tan malo pues por eso estas aquí, toda vez que te ríes no puedo dejar de ver todo el potencial que tienes por eso trato de no interferir en tu desarrollo pues quiero que explotes todo lo que veo en ti.

También se que como todo ciclo el tuyo debe continuar y que no dependerás de nosotros todo el tiempo por eso sólo te pido que trates de entender que soy más viejo que tú y en consecuencia soy más lento en aprender y entender las cosas, el tiempo es tan relativo pues parece que fuera ayer cuando aún estabas en el vientre de tu mamá y ahora han pasado varios meses y aún no se como ser papá, por lo cual recuerda que Te amo y si por algún motivo soy tan torpe de no darme cuenta que eres la estrella mas grande que el universo deposito en este planeta por favor no te enojas sólo recuerda que soy más lento para aprender.

Ante todo y por todo discúlpame si te he hecho algún mal. (Cuando sepas leer te lo mostrare).

Verónica

Tengo tantas cosas que agradecerte y tan pocas palabras que lo único posible por decirte es:

Gracias por permitirme seguir a tu lado, gracias por haberme encontrado, por ser como eres, por todo lo que me has enseñado, por que no soy tan inteligente y sabio como pensé, pero que tampoco soy tan torpe como me lo indicaron, se que no hay cosa mas difícil en este cerebro "mió" que reconocer los errores y aunque no siempre lo admito casi siempre reconozco que me equivoco; el problema es que no siempre te lo hago saber, debes saber que aunque no lo parezca todo lo que escribo es cierto; porque lo escribo desde lo más profundo de mi ser y en consecuencia nada hay mas cierto en este mundo que lo que estas leyendo, pues tan es así que lo mismo es de verdadero como de doloroso para mi alma y mi cuerpo que están en constante batalla que no deberían estarlo pero no se aún como detenerlo, aunque se que no soy tan rápido en hacer cambios que me pides también quiero que me entiendas trato de hacer lo mejor que puedo pero ROMA no se construyo en un día, el tiempo ha pasado y se que no tengo mucho tiempo más para realizar lo que me pides pues son cosas tan sencillas de entender pero tan difíciles de realizar para una pequeña mente indispuesta como la que tengo por lo que sólo te puedo decir que realmente TE AMO y que confíes no solo en mi sino también en ti por que eres más inteligente de lo que realmente crees y si yo lo veo es por que tu lo tienes.

Lo único que le pido a la vida es que me de la sabiduría para enseñarte cosas buenas, lo único que le pido al tiempo es que me permita caminar en compañía de las dos, lo único que le pido a Dios es que mi fe no se quiebre, lo único que "me pido" es no ser tan terco para reconocer los errores y lo único que les pido es su paciencia y amor pues es todo lo que tengo, LAS AMO como no tienen idea aunque no lo demuestre muy seguido.

No trato de detener ni cambiar nada de esto aunque si quisiera poder almacenar cada recuerdo vivido a su lado.

A mis y amigos:

Aunque casi no nos vemos aún se que el vinculo de amistad que formamos un día ni el tiempo ni la distancia han podido destruir, a todos y cada uno les agradezco por ser parte de mi vida y aprendizaje.

A mis Padres, hermanas, cuñados y sobrinos (sin excepción):

Por las aportaciones hechas a mi persona y por querer tanto a mi chiquita. Gracias a todos.

A la Dra. Patricia Ramírez Noguera y Al Dr. Roberto Díaz Torres

Por la confianza depositada en nosotros, por sus consejos y amistad. Gracias

A TODOS A LOS QUE HICIERON POSIBLE ESTA TESIS GRACIAS **TOTALES**.

El pasado es como el polvo si permitimos que se acumule, dentro de poco tiempo no sabremos que hay debajo. (OSHO).

ÍNDICE GENERAL

	PAGINA
CAPÍTULO I	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	3
CAPÍTULO II	
II. FUENTES DE EXPOSICIÓN A ARSÉNICO.....	4
II.1 Fuentes naturales.....	5
II.2 Fuentes antropogénicas.....	7
CAPÍTULO III	
III. METABOLISMO.....	9
III.1 Especies Reactivas de oxígeno y Arsénico.....	11
III.2 Absorción.....	12
III.3 Enzimas involucradas en la biotransformación del arsénico.....	13
III.4 Eliminación.....	16
CAPÍTULO IV	
IV. EFECTOS CELULARES Y TOXICIDAD DEL ARSÉNICO.....	16
IV.1 Estrés oxidativo.....	24
IV.1.1 Oxidación de proteínas.....	26
IV.1.2 Lipoperoxidación.....	26
IV.2 Señales de transducción y Arsénico.....	27
CAPÍTULO V	
V FILAMENTOS INTERMEDIOS.....	31
V.1.Citoqueratina 18 (CK 18).....	34
V.2.Citoqueratina 18 y enfermedad.....	35
CAPÍTULO VI	
VI DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
VI.1. Planteamiento del problema.....	38

VI.2.	Hipótesis.....	39
VI.3.	Objetivo general.....	39
VI.4.	Objetivos específicos.....	39

CAPÍTULO VII

VII	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
VII.1.	Cultivos Organotípicos.....	40
VII.2.	Viabilidad de los cultivos.....	41
VII.3.	Determinación de especies de arsénico inorgánico.....	41
VII.4.	Extracción de proteínas y análisis por electroforesis.....	41
VII.5.	Western Blott.....	42
VII.6.	RT-PCR.....	42
VII.7.	Cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.	43
VII.8.	Cuantificación de glutatión reducido.....	44
VII.9.	Determinación de la actividad enzimática de Glutatión-S- -transferasa.....	44
VII.10	Determinación de la actividad proteosomal.....	45
VII.11	Análisis estadístico.....	45

CAPÍTULO VIII

VIII	RESULTADOS.....	46
------	-----------------	----

CAPÍTULO IX

IX	DISCUSIÓN.....	73
----	----------------	----

CAPÍTULO X

X	CONCLUSIONES.....	78
---	-------------------	----

CAPÍTULO XI

XI	PERSPECTIVAS.....	81
----	-------------------	----

CAPÍTULO XII

XII	REFERENCIAS.....	82
-----	------------------	----

Figura 1. Metabolismo del arsénico.....	15
Figura. 2. Reacción de la guanina con el radical hidroxil. (Valko et al., 2006).	24
Figura. 3. Regulación de la expresión génica por parte de la exposición a arsénico inorgánico (Hamilton et al., 1998).....	28
Figura 4. Regulación de la transducción de señales por los ROS (Valko et al., 2006).....	31
Figura 5. Estructura general de las queratinas.....	34
Figura 6. Reacción del ácido tiobarbitúrico con malondialdehído.....	43
Figura 7. Reacción del glutatión con DTNB.....	44
Tabla 1. Genes que el arsénico afecta su expresión.....	21
Tabla 2. Cuantificación de potasio intracelular.....	47
Tabla 3. Biotransformación del arsénico. Concentración de especies arsenicales (ng/g de tejido) presentes en los cultivos organotípicos de hígado de ratón después de 3 horas de tratamiento.....	48
Tabla 4. Cuantificación de potasio intracelular.....	49
Tabla 5. Concentración de especies arsenicales (ng/g de tejido) presentes en los cultivos organotípicos de hígado de ratón después de 3 horas de exposición simultánea de As ₃ con BSO.....	49
Tabla 6. Cuantificación de potasio intracelular.....	62
Tabla 7. Concentración de especies arsenicales (ng/g de tejido) presentes en los cultivos organotípicos de hígado de raton después de 3 horas de exposición previa a As ₃ , y 2 horas con NAC.....	63

Tabla 8. Cuantificación de especies arsenicales (ng/g de tejido) presentes en los cultivos organotípicos de hígado de ratón después de 3 horas de exposición con As_i , y 2 horas con NAC 1 mM..... 64

Gráfica 1. Concentraciones de TBARS en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con arsenito de sodio en diferentes concentraciones y BSO..... 50

Gráfica 2. Efecto del arsenito sobre el glutatión reducido en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con diferentes concentraciones de arsenito y BSO..... 51

Gráfica 3. Correlación entre GSH y lipoperoxidación en cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsenito..... 52

Gráfica 4. Correlación entre GSH y lipoperoxidación en cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsenito y BSO..... 53

Gráfica 5. Efecto del arsenito de sodio sobre la actividad enzimática de la Glutatión-S-transferasa (GST) en cultivos organotípicos de hígado de ratón..... 54

Gráfica 6. Efecto del arsenito sobre la síntesis de y expresión de CK 18 en cultivos organotípicos de hígado de ratón. A) Análisis de la síntesis de CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada por medio de Western-Blott. B) Análisis de la expresión génica de CK 18..... 55

Gráfica 7. **A)** Correlación entre la síntesis CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con arsenito de sodio por tres horas. **B)** Correlación entre las concentraciones de mRNA para CK18 y la cantidad de arsenito intracelular y sus metabolitos, cuantificado en los cultivos organotípicos de hígado de ratón..... 57

Gráfica 8. Efecto del arsenito de sodio sobre la síntesis de CK 18 en cultivos organotípicos de hígado de ratón. A) Análisis de la síntesis de CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada por medio de Western-Blott. B) Análisis de la expresión génica de CK 18..... 59

Gráfica 9. **A)** Correlación entre la síntesis de CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada y **B)** Correlación entre las concentraciones de mRNA para la CK18 y la concentración de As total en cultivos organotípicos de hígado de ratón después de 3 horas de tratamiento con arsénico y BSO..... 61

Gráfica 10. Concentraciones de TBARS en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con arsenito de sodio y NAC en forma conjunta después de 5 horas de tratamiento con exposición previa al arsenito..... 65

Gráfica 11. Glutatión reducido en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con diferentes concentraciones de Arsénico y NAC 2.5 mM en forma conjunta..... 66

Gráfica 12. Correlación entre GSH y lipoperoxidación en cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsenito por tres horas y NAC dos horas más posterior a la exposición de arsenito 67

Gráfica 13. Efecto del arsenito de sodio sobre la síntesis de CK 18 en cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsenito de sodio y NAC. A) Análisis de la síntesis de CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada por medio de Western-Blott. B) Análisis de la expresión génica de CK 18..... 68

Gráfica 14. **A)** Correlación entre la síntesis de CK18 y la cantidad de CK 18 fosforilada y **B)** correlación entre la expresión del mRNA para CK18 y la cantidad de arsenito de sodio total intracelular en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con Asi y NAC en forma conjunta..... 70

Gráfica 15. Efecto de la exposición a arsenito de sodio sobre la actividad proteosomal en cultivos organotípicos de hígado de ratón..... 79

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN.

El As_i existe ubicuamente en nuestro ambiente y varias formas químicas circulan en el suelo, agua, aire y organismos vivos (Soto-Reyes et al., 2005), siendo las predominantes las formas As^{III} y As^V (Kazuo et al., 2004).

Hay millones de personas en riesgo en el mundo por beber agua que contiene cantidades que exceden los límites permisibles de As_i (Nordstrom D. K. 2002, Chakraborti et al., 2002). En varias áreas geográficas se ha relacionado la presencia de concentraciones altas de As_i en el agua de consumo humano con un riesgo elevado de cáncer (Walkes et al., 2002). En Asia, millones de personas están expuestas crónicamente a concentraciones elevadas de As_i en el agua de pozos taladrados hacia estratos geológicos ricos en arsénico. Esta exposición esta relacionada con enfermedades crónicas como enfermedades vasculares, arterosclerosis, síndrome de Raynaud's, hipertensión y enfermedad del pie negro (Kumagai et al., 2004), así mismo, la ingestión crónica de concentraciones elevadas de arsénico está asociada con un incremento en la incidencia de cáncer de piel, pulmón, vejiga e hígado (Basu eta., 2001; Buchet et al., 1985).

Una vez que el As_i es ingerido es transportado al hígado donde comienza su biotransformación, las formas pentavalentes son reducidas a trivalentes y entonces éstas son metiladas, resultando en la producción de arsenicales pentavalentes metilados (Hirano et al., 2004) así como de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Soto-Reyes et al., 2005).

Los efectos bioquímicos del arsénico y sus metabolitos son numerosos y en algunos casos nos permiten explicar sus efectos fisiológicos y en la salud de las personas afectadas. En este trabajo exploramos los efectos que ejerce el arsenito de sodio sobre la síntesis de proteínas del citoesqueleto como son las citoqueratinas en el hígado murino.

Resumen

Las citoqueratinas (CKs) participan en un amplio rango de importantes funciones celulares incluyendo mantención de integridad mecánica y respuesta a estrés jugando un papel esencial como “guardián” en el hígado que es expuesto a ambientes tóxicos.

La estructura y función anormal son efectos claramente relacionados con enfermedades hepáticas como: esteatohepatitis no alcohólica, hepatitis alcohólica y hepatocarcinoma celular. Las CK no sólo actúan como proteínas del citoesqueleto proporcionando estabilidad mecánica, sino además exhibe diversas funciones no esqueléticas. La expresión anormal del gen, mutaciones en las CKs y una organización estructural aberrante son efectos tóxicos que comúnmente causan enfermedades hepáticas la interferir con la reorganización normal de los filamentos y funciones relacionadas que comprometen al hepatocito. Las CK son filamentos intermedios tejido específico, en el hígado están expresadas principalmente las CK8 y CK18.

En el presente estudio investigamos la inducción del RNAm para CK18 al estar expuestos cortes de hígado a diferentes concentraciones de arsenito de sodio (AS), dado que este tipo de sistema *in vitro* es aceptado para el estudio del metabolismo de diversas drogas, los cultivos organotípicos fueron incubados con 0.01, 1 y 10 μM de AS en presencia y ausencia de Butionin Sulfoximina (BSO) 10 μM y otros cultivos de hígado se expusieron a N-acetil cisteína (NAC) 2.5mM.

Después del periodo de incubación se pudo observar un incremento en la síntesis y expresión tanto de la proteína como del RNAm para la CK 18. Nuestros resultados sugieren que la exposición temprana a AS modifica la síntesis y expresión del gen para CK18 comprometiendo la estructura y función de la proteína. La inducción de CK18 puede ser considerada como un indicador temprano de estrés oxidativo y daño por el arsenito.

Abstract

Cytoqueratin (CKs) participate in a wide range of important cellular functions including maintenance of cellular mechanical integrity and stress responses playing an essential “guardian” role in the liver that is unmasked by environmental toxicants.

Abnormal structure and function are effects clearly related to liver diseases as non-alcoholic steatohepatitis, alcoholic hepatitis and hepatocellular carcinoma. CK not only acts as skeletal protein providing mechanical stability, but also exhibits several non-skeletal functions. Their abnormal gene expression, CKs mutations and aberrant structural organization are toxic effects likely to cause liver disease by interfering with normal filament reorganization and related functions that compromise hepatocytes function upon multiple physiologic stimuli. CK are tissue specific intermediate filaments, CK8 and 18 are major CKs in the liver.

Here we investigated the induction of CK18 mRNA by different concentrations of Sodium Arsenite (SA) using liver slices culture, an accepted *in vitro* system for the examination of drug metabolism, the protein and CK18 mRNA was isolated in order to know their expression.

Organotypic cultures were incubated with 0.01, 1 and 10 μ M of SA in the absence and presence of Butionin Sulfoximine (BSO) 10 μ M and N-acetyl cysteine (NAC) 2.5mM. They modified oxidative status in the cultures and CK expression.

Increased CK18 synthesis and mRNA CK18 expression were observed after exposure period. Our results suggest that early SA exposure seems to modify synthesis and CK18 gene expression patterns in liver compromising their structure and function. The induction of CK 18 might be considered as an early indicator of oxidative stress and liver damage induced by arsenite.

CAPÍTULO II

FUENTES DE EXPOSICIÓN A ARSÉNICO.

Millones de personas en el mundo son afectadas por la exposición a As_i (Kazuo et al., 2004). La exposición a la forma más tóxica de As_i ocurre en escenarios ocupacionales o ambientales, o bien a través del uso medicinal de arsenicales (Kumagai et al., 2004). La principal fuente de exposición de As_i en muchas poblaciones es el agua de bebida, donde las formas predominantes de As_i son arsénico inorgánico III (As_i^{III}) y arsénico inorgánico V (As_i^V) (Walkes et al., 2002, Kazuo et al., 2004), siendo estas formas junto con los metabolitos formados las que causan efectos agudos y crónicos incluyendo cáncer humano (Kazuo et al., 2004). Además de las fuentes naturales de contaminación de As_i en el agua, el uso de herbicidas, insecticidas, rodenticidas, preservativos en los alimentos así como el de combustibles fósiles se encuentran también contaminando el ambiente (Gurusamy et al., 2004).

La exposición a humanos ocurre durante la producción y uso de estos herbicidas (155).

Concentraciones altas de As_i en agua de bebida se han encontrado en muchas regiones alrededor del mundo, incluyendo Taiwán, China, Chile, México, India, Bangladesh así como diversas áreas de EU y Europa que pueden conducir a una variedad de manifestaciones clínicas (NRC, 1999) (Walkes et al., 2002).

Debido a la contaminación por As_i en el agua de bebida, han aparecido en diversas áreas como India y Bangladesh, un incremento en la incidencia de “dermatosis arsenical” acompañada de hiperqueratosis, gangrena y cáncer de piel (Gurusamy et al., 2004). La exposición a este elemento esta relacionada con queratosis, carcinoma escamoso de piel y carcinoma celular basal.

II.1 FUENTES NATURALES

El arsénico es un elemento que está distribuido de manera ubicua a través de la corteza terrestre, suelo, sedimentos, aire, agua y en los organismos vivientes (Mandal et al., 2002)

En la corteza terrestre abarca entre el 0.00005% al 1%, y tiene una concentración promedio en rocas ígneas y sedimentarias de 2 mg/kg (Gulledge et al., 1973). En la mayor parte de las rocas su rango es de 0.5 a 2.5 mg/kg, aunque concentraciones altas fueron encontradas en sedimentos argiláceos de grano fino y fosforitos. El As_i está concentrado en algunos sedimentos marinos, los cuales pueden contener más de 3000 mg/kg. Este metaloide puede coprecipitar con hidróxidos de hierro y sulfatos en rocas sedimentarias. (Mandal et al., 2002).

El As_i se encuentra naturalmente en cerca de 200 formas minerales diferentes, de las cuales aproximadamente 60% son arsenatos, 20% sulfidos y sulfosales y el 20% restante incluye arsenidos, arsenitos, óxidos, silicatos y arsénico elemental, pero sólo algunos de éstos se encuentran de manera regular en cantidades significativas (Gulledge et al., 1973).

Las concentraciones de As_i en los suelos de varias ciudades se encuentran en un rango de 0.1 a 40 mg/kg (promedio de 6 mg/kg) (Bowen 1979), de 1 a 50 mg/kg (media de 6 mg/kg) y 5 mg/kg (Vinogradov 1959), pero varían considerablemente entre regiones geográficas.

El As_i está presente en mayor concentración en los suelos que en las rocas. Esto es debido principalmente a las actividades humanas y a las rocas que lo componen. Factores tales como el clima, los componentes orgánicos e inorgánicos de los suelos y el estado potencial redox también afectan el nivel de As_i en los suelos (Peterson et al., 1981).

El arsénico se encuentra principalmente como especie inorgánica pero también puede estar unida a materiales orgánicos en el suelo. Bajo condiciones

oxidantes, en ambientes aeróbicos, los arsenatos (As_i^{V}) son las especies estables y son fuertemente asimiladas en arcillas, óxidos/hidróxidos de hierro y manganeso, y materia orgánica. El As_i precipita como arsenato férrico en suelos ricos en hierro. En condiciones reductoras el arsenito (As_i^{III}) es el componente predominante. Los compuestos de As_i pueden ser metilados por microorganismos, produciendo bajo condiciones oxidantes, ácido monometilarsínico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) y óxido trimetilarsina (TMA₃O) (Reichert et al., 1921).

En condiciones anaeróbicas estas formas pueden ser reducidas a compuestos volátiles y fácilmente formar metilarsinas oxidadas. Las formas de As_i presentes en los suelos dependen del tipo y cantidades de componentes absorbidos del suelo, el pH y el potencial redox. Los arsenatos de hierro y aluminio (AlAsO_4 , FeAsO_4) son las fases dominantes en los suelos ácidos y son menos solubles que el arsenato de calcio (Ca_3AsO_4), el cual es la forma química principal en algunos suelos alcalinos y calcáreos (Fordyce et al., 1995). La fracción de arsenato adsorbido en los suelos está estrechamente relacionada al pH del suelo y al potencial redox. Esto también varía de acuerdo al tipo de suelo bajo las mismas condiciones de pH (Li 1982).

Las concentraciones generalmente encontradas en el agua natural son bajas. La mayor parte de las ciudades han reportado concentraciones de As_i en el agua de menos de $10 \mu\text{g/l}$, y en algunas ocasiones substancialmente menores (Geneva, 2001). La forma química principal en la cual el As_i se presenta por ser termodinámicamente estable es como ión arsenato. La proporción de $\text{As}_i^{\text{V}}\text{-As}_i^{\text{III}}$ basada en cálculos termodinámicos es $10^{26}:1$ para el agua de beber oxigenada a pH 8.1, en realidad, este es 0.1:1 a 10:1. Este alto contenido inesperado de As_i^{III} es causado, al menos en parte, por reducción biológica en el agua de mar (Jonson, 1972).

La concentración de As_i en agua proveniente de áreas de mineralización de sulfatos y minería es de $100\text{-}5,000 \mu\text{g/l}$ (Smedley et al., 1996). A potenciales redox altos o moderados el As_i puede ser estabilizado como una serie de oxianiones pentavalentes (arsenato), H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-} . Sin

embargo, en la mayor parte de las condiciones reductoras y menor potencial redox, las especies de As_i trivalente (H₃AsO₃) predominan. La presencia de As⁰ y As³⁻ es rara en ambientes acuáticos.

Compuestos de arsénico orgánico complejos tales como sales de tetrametilarsonium, arsenocolina, arsenobetaina, óxidos de dimetil (ribosil) arsinas y arsenolípidos son identificados en el ambiente marino. Sólo una fracción menor del arsénico total en los océanos permanece en solución en el agua de mar, debido a que la mayoría es asimilada en los materiales particulados suspendidos (Irgolic et al., 1995).

En el aire el As_i existe predominantemente absorbido en materia particulada, y está usualmente presente como una mezcla de arsenito y arsenato, con la existencia de especies orgánicas de insignificante importancia, excepto en áreas de aplicación de pesticidas de arsénico o actividad biótica (Davidson et al., 1985).

La exposición humana a As_i a través del aire es generalmente muy baja y normalmente son concentraciones en el rango de 0.4 a 30 ng/m³ (Geneva, 2001) La absorción de As_i inhalado es entre 30 y 85%, dependiendo de las porciones relativas de vapor y materia particulada. La agencia de protección al ambiente de EU estima que el público en general está expuesto en un rango de aproximadamente 40 - 90 ng por día por inhalación. (Pontius et al., 1994).

II.2 FUENTES ANTROPOGÉNICAS

Exceden en el ambiente a las fuentes naturales en una proporción de 3 a 1 (Woolson et al., 1983), debido a que el humano al utilizar los recursos naturales libera As_i al aire, agua y suelo, además de afectar las concentraciones de As_i de plantas y animales. (Piver, 1983).

Los principales productores de As_i han sido China, Rusia, Francia, México, Alemania, Perú, Namibia, Suecia y E.U.A., contando con casi el 90% de la producción mundial (Nelson, 1977). Durante los años 70's, cerca del 80% del

consumo de As_i fueron con propósitos agrícolas (U.S., 1973). El As_i fue principalmente usado para la preparación de insecticidas y pesticidas. En 1955, la producción mundial de arsénico fue de 37 000 toneladas. De esta cantidad, 10 800 toneladas fueron producidas en los Estados Unidos, sin embargo, su consumo doméstico se excedió de 18 000 toneladas, utilizándose principalmente como pesticida, en la forma de arsenato (Valle et al., 1960).

Los arsenicales inorgánicos, principalmente arsenito de sodio, fueron usados desde 1890 como herbicidas, particularmente como esterilizantes de suelo no selectivos (EPA, 1980).

El ácido de arsénico ha sido usado extensamente como un desecante de algodón durante muchos años, 2 500 toneladas de ácido arsénico (H_3AsO_4) fueron usados como desecantes de 1 222 000 acres de algodón en E.U.A. en 1964 (con una población de cerca de 495.000 hab.) (Fordyce et al., 1995).

El arsenato de cobre cromatado y el arsenato de cobre amoniacal en combinación son usados en el 99% de los conservadores arsenicales de madera (Perder, 1981).

Muchos compuestos de arsénico son usados para aditivos en alimentos, tales como H_3AsO_4 , ácido 3-nitro-4-hidroxi fenilarsónico, etc. Todos los ácidos fenilarsónicos fueron usados como aditivos de alimentos por la Ley de Aditivos de Alimentos de 1958 (Feed Additive Compendium, 1975).

Las virtudes medicinales del As_i han sido reconocidas por casi 2500 años. En Austria, los campesinos consumían una gran cantidad de As_i para suavizar y limpiar la piel, para engordar, para embellecer y darle lozanía a la figura y también para mejorar el aliento (Solman, 1957).

Preparaciones medicinales comunes, las cuales contenían As_i , incluyen la solución de Fowler (arsenito de potasio), la solución de Donovan (arsénico y yoduros de mercurio), tabletas asiáticas (trióxido de arsénico y pimienta negra), solución de Valagin (licor de cloruro de arsénico), cacodilato de sodio,

arfenamina (Salvarsan), neoarfenamina, hidrocloreto de oxofernasa (Marpharsen), artinol (Balarsen), acetarsona, triparsamida y carbasona. (Valle et al., 1960).

Los compuestos de As₃ son famosos por ser potentes venenos y son preferidos como agentes suicidas y homicidas. La muerte de Napoleón Bonaparte se cree que fue por envenenamiento por As₃ (Marcelet, 1913).

CAPÍTULO III

METABOLISMO.

El proceso de biotransformación y metilación del As_i ocurre principalmente en el hígado y en mucha menor cantidad en otros órganos como el riñón y pulmón (Rossman G. T., 2003). Los arsenicales inorgánicos son absorbidos por intestino, metilados en el hígado y excretados a través de la orina (Hirano et al., 2004) siendo excretadas con mayor rapidez las especies metiladas pentavalentes que las inorgánicas (Marafante et al., 1987). El punto clave en el metabolismo del As_i es la reducción repetitiva de las formas pentavalentes de arsénico a formas trivalentes (Zhong et al., 2003), seguido de metilación oxidativa a arsénico orgánico pentavalente (Thomas et al., 2001), resultando en la producción de arsenicales pentavalentes metilados durante el metabolismo hepático (Hirano et al., 2004). Además, la reducción del arsénico (tanto *in vivo* como *in vitro*) está asociado con la formación de ROS (Qian et al., 2003) y la inducción en la alteración en los sistemas antioxidantes, aunque poco se conoce acerca de la relación entre el estrés oxidativo y la exposición crónica de As_i en humanos (Ramírez et al., 2000, Kumagai et al., 2004).

Los radicales libres pueden ser definidos como moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados. La presencia de electrones desapareados usualmente confiere un grado considerable de reactividad en los radicales libres. Estos radicales derivados de oxígeno representan la clase más importante de estas especies generadas en los sistemas vivientes (Albores et al., 1989).

Dado que las mitocondrias son los principales sitios de generación de radicales libres, también están altamente enriquecidas con antioxidantes incluyendo GSH y enzimas, tales como la superóxido dismutasa (SOD) y la GPx, las cuales están en ambos lados de sus membranas para minimizar el estrés oxidativo en los organelos (Bowen H., 1979). Desde hace tiempo se conoce que generan cantidades significativas de peróxido de hidrógeno, bajo condiciones fisiológicas, la producción de peróxido de hidrógeno se estima en cerca de 2%

del total de oxígeno captado por el organismo (Gulledge J. H, 1973). Los ROS pueden generarse tanto de substratos exógenos como endógenos. Las fuentes potenciales endógenas incluyen la mitocondria, el metabolismo del citocromo P450, el metabolismo de los peroxisomas y la activación de células inflamatorias (Mandal et al., 2002). En tanto dentro de los procesos exógenos se encuentran agentes ambientales incluyendo carcinógenos y no-genotóxicos que pueden inducir directamente ROS en las células.

Debido a que los ROS son oxidantes por naturaleza, influyen el estado redox y pueden, de acuerdo a su concentración, causar respuestas duales como: “proliferación celular” o “arresto del crecimiento y muerte celular”, el efecto de los ROS en la proliferación celular ocurre “principalmente a bajas concentraciones” de ROS (Valle et al., 1960, Chen et al., 1998). Las concentraciones bajas de radical superóxido y peróxido de hidrógeno estimulan la proliferación y aumentan la supervivencia en una gran variedad de tipos celulares, además de jugar un papel muy importante como mensajeros secundarios (Valle et al., 1960). Otro de los efectos que involucran a los ROS en papeles fisiológicos es en respuesta celular a anoxia, en defensa contra agentes infecciosos y en la función de un número de sistemas de señalización celular, aunque por otro lado las concentraciones bajas de ROS inducen una respuesta mitogénica. En contraste a concentraciones altas, los ROS pueden ser importantes mediadores de daño a estructuras celulares, incluyendo lípidos, y membranas, proteínas y ácidos nucleicos ya mencionados (Lui et al., 2001). Aunque el efecto dañino de los ROS es eliminado en su mayor parte por la acción de antioxidantes no-enzimáticos y de enzimas antioxidantes (Basu et al., 2001), éste se puede acumular durante el ciclo de vida y se ha propuesto que el daño relacionado con los radicales juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades dependientes de la edad tales como cáncer, arterosclerosis, artritis, desórdenes neurodegenerativos y otras condiciones (Buchet et al., 1985, Qian et al., 2003).

III.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ARSÉNICO.

La formación de peróxido de hidrógeno, anión superóxido, singulete de oxígeno y radical hidroxilo se generan en muchas células en respuesta a la estimulación por el As_i (Ramírez et al., 20001, Kitchin et al., 2003). Aunque de estos, se asume que el radical hidroxil es la especie reactiva que directamente ataca al DNA (108). Aunque el arsenito no reacciona directamente con el DNA, las células tratadas con este metal revelan un daño oxidativo (Nordenson et al., 1991, Huang et al., 1994, Lee et al., 1995, Fan et al., 1996, Hei et al., 1998, Kessel et al., 2004).

El daño oxidativo al DNA y el entrecruzamiento DNA-proteínas son de las lesiones más frecuentes al DNA encontradas en líneas celulares expuestas con As_i (Bau et al., 2002).

Se ha propuesto que la formación de ROS por exposición a As_i se debe principalmente a varias razones entre ellas: a) el sitio de ubiquitinación de la cadena respiratoria, b) una disminución en el potencial membranar mitocondrial celular, c) alteración en la concentración de glutatión reducido (GSH), d) activación de NADH oxidasa y e) la oxidación de arsenito a arsenato (Qian et al., 2003).

Además, del daño que puede producir la exposición a As_i por generación de ROS, como las ya mencionadas, también puede producir óxido nítrico. Se ha reportado que los agentes que reducen las concentraciones de ROS pueden disminuir la citotoxicidad y la potencial mutagenicidad del metaloide. Por otro lado, los productos asociados con este daño incluyen 8-hidroxi-2´deoxiguanosina, formamidopiridina y 8-oxoguanosina entre otros (Filippova et al., 2003).

La producción de peróxido de hidrógeno por el arsenito parece estar involucrada en la inducción de apoptosis en células NB4 (Hayakawa et al., 2005), en células de ovario de hámster chino (Vasken et al., 2003) y en células HeCat y CHO-K1 (Marcelet H, 1913).

El As_i , además tiene un efecto directo en la respiración celular de la mitocondria, este efecto ocurre cuando el As_i se une al ácido lipóico en la mitocondria e inhibe la piruvato deshidrogenasa, como resultado se produce una mayor cantidad de peróxido de hidrógeno, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, disminución de la respiración celular y un incremento en la generación de ROS lo que conduce a hepatotoxicidad y porfirinuria. Estos síntomas de toxicidad por exposición a As_i se han visto más comúnmente con exposición aguda pero también pueden ocurrir en exposición crónica a dosis bajas (Patrick., 2003).

III.2 ABSORCIÓN

Aunque el mecanismo de transporte del arsenito a las células no está bien establecido se ha propuesto que transportadores de iones orgánicos podrían estar involucrados (Rossman G. 2003). A concentraciones equimolares, la acumulación de arsenito en muchos tipos celulares es más rápida comparada con el arsenato (Lemrman et al., 1983, Vega et al., 2001), lo que ha sugerido que el arsenito es neutralizado a pH fisiológico y transportado por acuagliceporinas (Rosen., 2002, Hirano et al., 2004, Kumagai et al., 2004) las cuales transportan agua, glicerol y urea (Rosen., 2002, Lui et al., 2002) por lo que puede ser fácilmente absorbido, en tanto, el arsenato entra a las células vía los mecanismos de transporte de fosfatos, interfiriendo con el metabolismo celular al remplazar el fosfato inorgánico en las reacciones enzimáticas, incluyendo la fosforilación oxidativa en la mitocondria (Huang et al., 1996, Waalkes et al 2002). Este mecanismo de entrada permite que el arsenito pase a través de la membrana más rápido que el arsenato, el cual está cargado negativamente (Rossman., 2003).

Aunque la metilación de arsénico ha sido considerada un proceso de desintoxicación, debido a que la toxicidad de MMA^V y DMA^V es mucho más baja que la del As_i (Tanaka-Kagawa et al., 2001, Zhong et al., 2003, Hirano et al., 2004), el MMA^{III} es más citotóxico y genotóxico que el arsenito y arsenato (Marafante et al., 1987, Tanaka-Kagawa et al., 2001, Zhong et al 2003, Kitchin et al., 2003) y el DMA^{III} es más tóxico que las especies inorgánicas (Hirano et

al., 2004). De tal manera la metilación ha sido revisada más como un proceso de bioactivación que un proceso de biotransformación (Rosenfeld et al., 1990). Con base a reportes previos se conoce que el arsenito es más tóxico que el arsenato y las especies orgánicas metiladas pentavalentes menos tóxicas que las inorgánicas tanto *in vivo* como *in vitro* por el orden de 10^{-3} a 10^{-4} . Por lo que el orden de toxicidad de los compuestos de arsénico es como sigue:

$\text{DMA}^{\text{III}}, \text{MMA}^{\text{III}} > \text{Asi}^{\text{III}} > \text{Asi}^{\text{V}} > \text{DMA}^{\text{V}}, \text{MMA}^{\text{V}} > \text{TMAO}$ (Sakurai et al., 2002, Hirano et al., 2004).

De tal forma la elucidación de la ruta metabólica del arsénico ha cambiado nuestro entendimiento del significado de la metilación (Thomas et al., 2004).

III.3 ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL ARSÉNICO

La metilación del As_i es un punto de debate e interés en el campo toxicológico debido a que la habilidad de metilar y eliminar el arsénico es influenciada por la nutrición, género, estilo de vida y el polimorfismo genético individual. Esto parece ser una variación significativa individual en la habilidad para metabolizar al As_i (Patrick., 2003).

Recientemente se ha reportado que la enzima responsable de la metilación tanto para Asi^{III} como para MMA^{III} es la arsenicometiltransferasa (As3MT) anteriormente identificada como *cyt19* (Zhong et al., 2003, Hirano et al., 2004). La reducción de arsénico pentavalente parece también estar bajo la responsabilidad de la As3MT , en presencia de reductores endógenos como el GSH, ácido lipoico y el sistema tioredoxina (Waters et al.,).

La glutatión-S-transferasa (GSTs) constituye una familia de enzimas multifuncionales que utiliza GSH en reacciones que contribuyen a la biotransformación de xenobióticos (Tanaka-Kagawa et al., 2003), desintoxicación de ROS (Schuliga et al., 2002) y disposición de un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos, se expresa en un amplio rango

de tejidos del humano incluyendo hígado, macrófagos, células de la glia y células endocrinas. Se ha encontrado que esta enzima cataliza la reducción de MMA^{V} , el cual es la especie limitante en la reacción de biotransformación del arsénico inorgánico (Tanaka-Kagawa et al., 2003).

Anteriormente se especuló que la glutatión-S-transferasa Omega 1-1 (GSTO 1-1) reduce el MMA^{V} a ácido monometilarsenoso (MMA^{III}) (Zakharyan et al., 2001), utilizando GSH como reductor. Aunque hay evidencia que sugiere que la oxidación de arsénico trivalente, MMA^{III} y DMA^{III} , a sus respectivas formas menos tóxicas +5, es causada por la generación de peróxido de hidrógeno formado por el metabolismo de la Xantina oxidasa (Vasken et al., 2003) (Fig. 1).

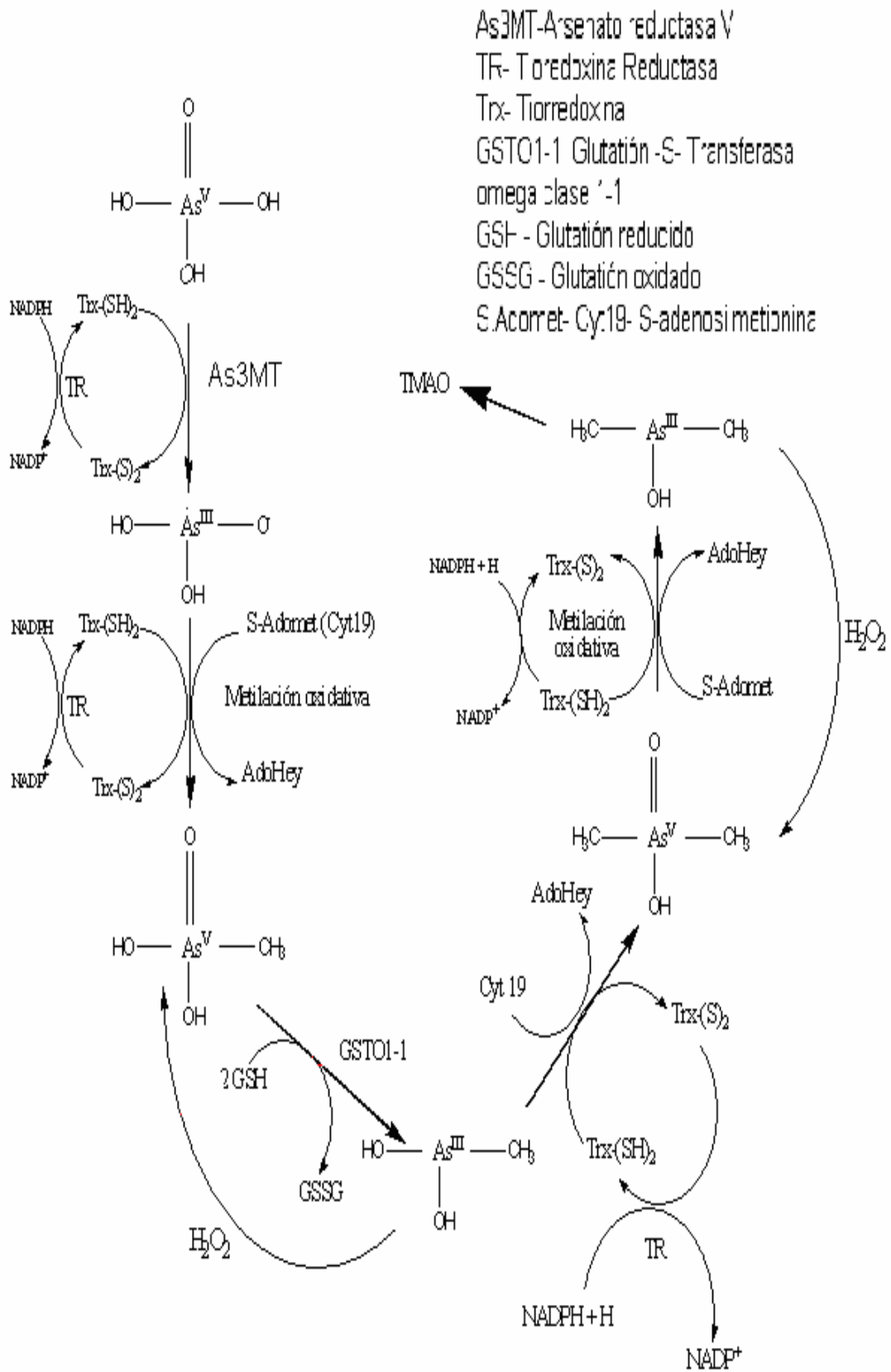


Figura 1. Metabolismo del arsénico

III.4 ELIMINACIÓN

En cuanto a la eliminación de estos compuestos se ha reportado que humanos expuestos a As_i excretan vía orina 10-30% de As_i , 10-20% MMA^{III+V} y 60-80% de DMA^{III+V}, sin embargo, algunas poblaciones difieren con estos datos (Vahter et al., 2001).

El metabolito mayoritario en orina en áreas donde la exposición ambiental de As_i es alta es el ácido dimetilarsínico (DMA^V), siendo los metabolitos arsenicales orgánicos los que se han detectado con mayor facilidad en muestras de orina proveniente de gente expuesta a concentraciones altas del metaloide, en tanto que las especies trivalentes ha sido difícil detectarlas (Hirano et al., 2004). En estudios realizados en roedores y humanos ingiriendo DMA^V, se ha visto que mucho de este compuesto es excretado rápidamente y sin cambio, pero aproximadamente 5% es convertido a óxido de trimetilarsénico (TMAO) (Buchet et al., 1981, Marafante et al., 1987).

CAPÍTULO IV

EFFECTOS CELULARES Y TOXICIDAD DEL ARSÉNICO.

La exposición crónica As_3^{III} causa un amplio rango de efectos tóxicos por lo que este metaloide ha sido considerado como un carcinógeno en humanos por la Internacional Agency for Research on Cancer en 1987 (Thomas et al 2004), por otro lado hay reportes en Japón y Taiwán que indican que el As_3^I actúa como co-carcinógeno, ya que en poblaciones expuestas al As_3 en el agua de bebida, se ha observado un incremento en cáncer de pulmón en fumadores comparado con no fumadores sugiriendo un sinergismo (Chiou et al 1995, Tsuda et al., 1995). Aunque este metaloide ha sido reportado como un co-carcinógeno humano, paradójicamente se sigue usando en el tratamiento de leucemia promielocítica aguda. Por otro lado, estudios en animales han mostrado que el As_3 funciona como un co-mutágeno y es un promotor de tumor (Zhang et al., 2003).

Una exposición crónica de As_3 está asociada con el riesgo de cáncer de pulmón en humanos, además de carcinoma hepatocelular, angiosarcoma, cirrosis y esclerosis hepatoportal (Patrick., 2003). Así mismo, se ha reportado que la exposición crónica a las especies inorgánicas de este metaloide está asociada con cambios crónicos en el hígado. Así como desarrollo de ascitis en dosis terapéuticas por periodos prolongados (Bang, 1974).

En estudios epidemiológicos se ha mostrado una fuerte asociación entre la exposición ocupacional crónica al As_3 y diversos efectos adversos para la salud, incluyendo enfermedades cardiovasculares, defectos neurológicos y cáncer de pulmón, piel, vejiga, hígado y riñón, anemia, neuropatía periférica, así como irritación de mucosas (Patrick, 2003, Zhang et al., 2003, Wen et al., 2004) incluyendo cavidad oral, faringe, intestino delgado e intestino grueso (Enterline et al., 1995).

Las cuatro principales áreas de investigación en el efecto celular tóxico de la exposición a As_3 son: 1) inducción de mutaciones y aberraciones cromosómicas, 2) alteración en las señales de transducción, control del ciclo

celular, diferenciación y apoptosis, 3) daño directo ocasionado por el estrés oxidativo y 4) alteraciones en la expresión génica. Ninguno de estos mecanismos es exclusivo y se ha observado que el estrés oxidativo influye sobre todos de manera directa o indirecta (Patrick, 2003).

Estudios recientes indican que la exposición a este elemento induce la proliferación celular asociado a un incremento en la proteína p53 y un incremento transitorio de p21 (Hernandez-Zavala et al., 2005). Aunque el proceso involucrado en la carcinogénesis con As_i permanece como un enigma, una variedad de mecanismos, tanto genotóxicos y no genotóxicos, se han propuesto para explicar la carcinogenicidad del As_i a nivel celular y molecular (18).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que los arsenicales causan anomalías cromosómicas, incluyendo elevación de la frecuencia de micronúcleos, intercambio y rompimiento de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y amplificación génica. Se ha reportado que induce oxirradicales, daño al DNA y cromosomas, inhibe la reparación del DNA y modula la metilación del DNA en células de mamíferos (Gurr et al., 1993, Filippova et al., 2003, Zhang et al., 2003).

El daño al DNA típicamente conduce a respuestas celulares diseñadas para detener la replicación del DNA dañado, esto induce la expresión de p53. Esta inducción sido propuesta como indicador de daño (Filippova et al., 2003, Kitchin., 2001). Datos reportados demuestran que el tratamiento con As_i trivalente (Wen et al., 2004) así como el DMA^{III} y el MMA^{III} causan rompimiento de las cadenas sencillas de DNA (Perker., 1981, Wen et al., 2004, Soto-Reyes et al., 2005) y amplificación génica, por lo cual es aceptado como agente clastogénico (Wen et al., 2004). Por otro lado, hay reportes que indican que la administración de DMA^V causa rompimiento de cadenas sencillas en pulmón de ratón, pero no en hígado o en riñón (Arnold et al., 1999, Yamanaka et al., 1991).

Los principales determinantes del modo de acción de los arsenicales son el estado de valencia (estado trivalente es casi siempre más potente que el estado pentavalente), el grado de metilación, su carga a pH fisiológico, la atracción electrostática y repulsión a sitios activos en macromoléculas importantes (DNA, RNA y proteínas). Factores farmacocinéticos tales como absorción, distribución, metabolismo, unión a proteínas y excreción son importantes para todas las formas químicas de arsénico a las cuales los humanos y animales están expuestos (Zhong et al., 2003).

Un probable mecanismo de toxicidad del As_i es oxidando proteínas e inhibiendo enzimas que contienen grupos sulfhídrico. Esta última actividad describe los efectos de las especies arsenicales trivalentes las cuales son más potentes en la inhibición enzimática y generando ROS (Schuliga et al., 2002, Gurusamy et al., 2004, Hirano et al., 2004), mientras que las formas pentavalentes podrían remplazar el fosfato de las moléculas de alta energía (arsenólisis). Aunque hay reportes que indican que el As_i inicia su toxicidad al inducir un daño oxidativo (Schuliga et al., 2002, Gurusamy et al., 2004) y un subsecuente incremento en las concentraciones de GSH (Schuliga et al., 2002), esto no está del todo claro, pues estudios diferentes indican que el tratamiento con arsenito de sodio disminuye significativamente las concentraciones de glutatión (GSH), la actividad de la SOD (ó, la actividad de glutatión peroxidasa (GPx), así como de la catalasa (Gurusamy et al., 2004).

La tolerancia al As_i ha estado relacionada con diversos cambios metabólicos, los cuales incluyen síntesis de diferentes proteínas de choque térmico (Lee et al., 1989), metilación de As_i (Aposhian., 1997), hiperinducibilidad del gen de metalotioneína (Zhao et al., 1997) y disminución en la acumulación de arsénico intracelular al incrementar la excreción de este metal (Wang et al., 1993, Zaman et al., 1995, Romach et al., 2000, Lui et al., 2001), siendo esta última probablemente uno de los más importantes eventos en la adquisición de tolerancia (Wang et al., 1993, Romach et al., 2000, Lui et al., 2001).

Aunque el mecanismo celular exacto de carcinogénesis del As_i no está del todo claro, pues como se mencionó anteriormente se cree que puede actuar como

co-carcinogénico y promotor de tumor más que iniciador del mismo (Patrick, 2003). Hay resultados que indican que el As_i induce carcinogénesis *in vivo* por inducción de un amplio espectro de cambios en la transducción de señales, incluyendo las alteraciones en la diferenciación celular, proliferación y apoptosis (Qian et al., 2003), asociando a estos cambios celulares la generación de estrés oxidativo (Zhong et al., 2003, Yamanaka et al., 2004).

Todos los tumores contienen alteraciones genéticas, incluyendo cambios sutiles en las secuencias de DNA, amplificación génica, pérdida total de cromosomas, ganancia, translocación y aneuploidia. La transformación celular maligna inducida por la exposición a As_i ha mostrado una asociación con hipometilación de DNA, incremento en la secreción de metaloproteinasa-9 y retraso en la mutagenesis, dado que la exposición a As_i induce cambios genéticos y epigenéticos durante el desarrollo del cáncer y la forma en que los favorece permanece sin elucidarse (Wen et al., 2004).

Diversos estudios han mostrado que a dosis bajas la exposición a As_i estimula la proliferación de células de mamíferos. Mientras que exposiciones prolongadas a concentraciones bajas causan un incremento en la transformación neoplásica de células murinas JB6 Cl41, una transformación blastoide de linfocitos humanos y transformación maligna de la línea celular TRL 1215 (epitelio de hígado) y de RWPE-1 (epitelio de próstata humano). Así mismo, se ha observado que en periodos de exposición de 2 años a 50 ppm en el agua, el As_i actuó como un carcinógeno, causando transición a células de carcinoma (Wei et al., 1991), así como un incremento en la tolerancia a exposiciones crónicas y la expresión aberrante de genes involucrados en la regulación de una variedad de funciones celulares, incluyendo la transducción de señales, la respuesta a estrés, apoptosis y proliferación celular (Tabla 1).

Estos estudios sugieren que una exposición crónica a dosis bajas del metal produce cambios celulares que promueven la transformación celular inducida o el desarrollo de tumor (Wen et al., 2004).

Tabla 1. Genes que el arsénico afecta su expresión

SOBRE EXPRESION DE GENES INDUCIDOS POR LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO INORGANICO	
<u>Genes de estrés y genes relacionados con daño al DNA</u>	<u>Efectores y moduladores de las señales de transducción</u>
Superóxido dismutasa 1 (Cu,ZN SOD)	Cinasa1 regulada por señal extracelular (ERK1)
Glutación- S-transferasa-p (GST-p)	Proteína cinasa 5 activada por mitogenos (MAPKK5)
Glutación- S-transferasa microsomal (MGST1)	Proteína cinasa C tipo d (PKC-d)
Proteína de resistencia a multifármacos (MDR1) y MDR2	Ral A, proteína de unión a GTP
Proteína asociada a resistencia de multifármacos (MRP)	Transducción b3, proteína de unión a GTP,
Proteína de choque térmico 70-kDa (hsp-70) y hsp-90	Proteína G RK4 ras
Proteína inducible al daño al DNA y arresto de crecimiento (GADD45)	Proteína relacionada a ras-m
Proteína de estrés del retículo endoplásmico (ERP72)	Annexina 1
Proteína relacionada con glucosa 78-kDa (GRP78)	<u>Proteínas relacionadas con Apoptosis</u>
DNA mismatch repair protein MSH2	Caspasa-1 y 3
Glutación peroxidasa-1	BAX-a y bcl -x
Early response growth protein-1	Activador de apoptosis harakiri (HRK)
ICAM-1, CD14 LPS receptor, IL-6 receptor, NF-kB p65 y p105	<u>Citocinas y Componentes relacionados con citocinas</u>
	Receptor de Interleucina-1, 6 y 7
	Sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS)
	Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)
	Factor (GM-CSF)

<u>Receptores de hormonas y factores de crecimiento</u>	<u>Otras categorías.</u>
<p>Factor de crecimiento epidermal</p> <p>VEGE receptor-1</p> <p>Proteína de unión 1a IGF (IGFBP-1)</p> <p>Hormona Nuclear ROR-alpha</p> <p>Factor de crecimiento similar a insulina ligado a la proteína 6 (IGFBP6)</p> <p>Factor 10 de crecimiento de fibroblastos (PGF 10)</p> <p>Fibrinogeno</p> <p>Factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGF-D)</p> <p>Endotelina-1 (ET-1)</p> <p>Receptor de Prostaglandinas E2</p>	<p>Citoqueratina-18 Tipo 1</p> <p>XPAC</p> <p>RXR proteína de interacción RIP15</p> <p>Hemo proteína</p> <p>Protooncogene Tie-2</p>
<u>Reguladores del ciclo celular</u>	
<p>Ciclinas D1, D2 y D3.</p> <p>Inhibidor cinasa dependiente de ciclina 1</p>	

INHIBICIÓN DE LA EXPRESION DE GENES INDUCIDA POR ARSÉNICO.

Genes relacionados al daño de DNA y estrés

IL-4
NADPH P450 reductasa

Moduladores y efectores de las señales de Transducción

c-jun N-terminal kinase (JNK1)
Proteína cinasa activada por mitogeno p38 (MAPK p38)
Subunidad reguladora de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3K)
Calmodulina

Proteínas relacionadas a Apoptosis

bcl-2
CD 30L receptor
Antígeno de Fas ligando (Fasl)
CD 25 protein
Nur 77 early response protein
Presenilin 2
Clusterin
Caspasa-1 (ICE)
Caspasa-2 y 11
Proteína RAD

Citocinas y Componentes relacionados con citocinas

Granulocyte-macrophage colony-stimulated
Receptor de Interleucina 2, 10 y 15
Receptor- a del Factor de necrosis tumoral (TNFR1)

Receptores de hormonas y factores de crecimiento

Receptor de la hormona folículo estimulante
Proteína de unión a Andrógeno
Receptor de la hormona de crecimiento
Receptor de estrógeno
Factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I) y IGF-II
Proteína de unión a Heparina

Reguladores del ciclo celular

NINGUNO

Otras categorías

MmRad52

IV.2 ESTRÉS OXIDATIVO

El término estrés oxidativo se refiere a una situación en la cual las células son expuestas a un desequilibrio en las concentraciones de oxígeno molecular o sus formas reducidas tales como anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\bullet OH$), singulete de oxígeno (1O_2) y radical peroxilo ($LOO\bullet$), así como el óxido nítrico ($NO\bullet$) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), las cuales son referidas como especies reactivas de nitrógeno (178). El H_2O_2 principalmente emerge de una desproporción intra y extracelular de superóxido por la superóxido dismutasa. El radical hidroxilo se puede derivar del superóxido a través de la reacción de Haber-Weiss, sugiriendo que la generación de superóxido es probablemente la fuente primaria de otras ROS (Kumagai et al., 2004). Es conocido que los ROS reaccionan con todos los componentes del DNA, dañando a las purinas y pirimidinas, además del enlace desoxirribosa (Reichert et al., 1921, Peterson et al., 1981, Fordyce et al., 1995, Ramírez et al., 2000), además, las lesiones al DNA están asociadas con 8-hidroxi-2´deoxiguanosina (8-OHdG) como el mayor aducto ocasionado a esta macromolécula (Fig. 2), entre otras lesiones asociadas a los ROS se encuentran la lipoperoxidación, la modificación proteica, o bien la alteración en las defensas anti-oxidantes. (Qian et al., 2003). La modificación permanente del material genético resultado de este daño oxidativo representa el primer paso involucrado en la mutagénesis y carcinogénesis. Como dato, más de 100 productos han sido identificados que oxidan el DNA (Reichert et al., 1921, Fordyce et al., 1995).

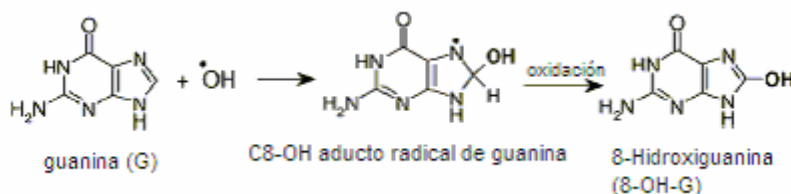


Figura. 2. Reacción de la guanina con el radical hidroxil. (Valko et al., 2006).

Hay dos mecanismos principales por los cuales los metales tóxicos pueden dañar a las células. Primero, pueden unirse directamente a las moléculas e inducir cambios conformacionales o cambios fisiológicos en el lugar de unión al

metal, alterando la función celular normal. Segundo, pueden actuar como centros catalíticos de reacciones redox que producen ROS capaces de dañar una gran variedad de macromoléculas (Qian et al., 2003).

La inducción de estrés oxidativo y daño se ha observado seguida a la exposición de varios xenobióticos. Estos involucran compuestos clorados, metales, iones, radiación y barbitúricos (45).

En la biología de los radicales libres se ha adoptado el término “biomarcador” para describir aquellos daños causados en el ataque por ROS. Este es el término estándar para cualquier lista de cambios en los sistemas biológicos relacionados a una exposición a estas especies. Los biomarcadores de estrés oxidativo pueden ser clasificados en diversos grupos: ROS propiamente, daño oxidativo de los productos iniciales o finales de los radicales libres y enzimas antioxidantes. Esta clasificación está basada en el hecho de que es usualmente difícil detectarlos directamente, pues son altamente reactivos y tienen un tiempo de vida media corta. Además, el incremento en la formación de ROS no necesariamente causa un daño oxidativo a macromoléculas celulares, puesto que pueden ser desintoxicados por los sistemas de defensa antioxidantes. En este sentido, los análisis de productos de degradación de macromoléculas dañadas tales como lípidos, proteínas y DNA, sirven para reflejar si un daño oxidativo ha ocurrido (Gustafsson et al., 2005).

El monitoreo del ambiente y la evaluación del riesgo a la exposición de agentes xenobióticos, se realiza utilizando sistemas de pruebas biológicas, los marcadores de respuesta biológica y de enfermedad no pueden identificar el tóxico que produjo el daño, pero sí indican al investigador qué el daño ha ocurrido. En ellos se intenta establecer la existencia, naturaleza o grado del daño tóxico provocado por un agente y da pautas acerca del mecanismo de acción a través de indicadores o biomarcadores (Ramírez et al., 2000).

IV.2.1 OXIDACION DE PROTEÍNAS

La oxidación de proteínas por los ROS está asociada con la formación de muchos tipos de entrecruzamientos inter e intra proteínas, incluyendo los siguientes: 1) por adición del grupo amino de la lisina al grupo carbonilo de una proteína oxidada; 2) por interacción de dos radicales carbono obtenidos por la abstracción dirigida por el radical hidroxilo del hidrógeno de la cadena del polipéptido; 3) por la oxidación de los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína para formar entrecruzamientos -S-S- y 4) la oxidación de residuos de tirosina para formar -tyr-tyr- (Hei et al., 1998).

Los residuos de proteínas cisteína y metionina son particularmente susceptibles a la oxidación por ROS (Davidson et al., 1985).

El As_3 es altamente reactivo con grupos sulfhidrilo resultando en modificaciones de varias proteínas y enzimas (Filippova et al., 2003). La inducción de metalotioneína (MT) se ha observado en células y ratones después del tratamiento con arsenito, la sobreexpresión de esta proteína da algo de protección contra la toxicidad contra la exposición al arsenito (Albores et al., 1992, Lui et al., 2000, Romach et al., 2002). Otra proteína inducible por daño al DNA es la GADD153 que es sobreexpresada como resultado de exposición a arsenito y puede ser suprimida por el antioxidante N- acetilcisteína (NAC) (138). La expresión de HO-1 y citoqueratina 18 (CK18) han sido sugeridas como biomarcadores de exposición a As_3 (Menzel et al., 1998, Ramírez et al., 2000), lo mismo que un indicador de estrés oxidativo (Stocker et al., 1987, Applegate et al., 1991, Ryter et al., 2002).

IV.2.2 LIPOPEROXIDACIÓN.

Es conocido que los metales inducen la generación de ROS resultando en el ataque no sólo del DNA en el núcleo, sino también de otros componentes celulares involucrando residuos de fosfolípidos de los ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son extremadamente sensibles a la oxidación (Li.,

1982, Geneva., 2001). Bajo condiciones de estrés, los lípidos de la membrana son oxidados a varios aldehídos (Uchida., 2000). Estos aldehídos están involucrados en eventos patofisiológicos asociados con estrés oxidativo en células y tejidos (Tsuchiya et al., 2005) y han sido clasificados en tres familias: **a)** 2-alquenos, **b)** 4-hidroxi-2-alquenesales tales como 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) los cuales son los aldehídos predominantes generados durante la peroxidación y **c)** cetoaldehídos. HNE tiene una gran estabilidad y reactividad (Esterbauer et al., 1991) y son en gran parte responsable de muchos tipos de daño celular asociado con el estrés oxidativo y se genera al reaccionar los ROS con ácidos grasos poliinsaturados 6n. El HNE se une covalentemente a residuos de cisteína, lisina o histidina (Uchida., 2003). Estos aductos han sido detectados en diversas enfermedades, por ejemplo, en el cerebro de pacientes con Alzheimer (Lauderback et al., 2001, Markesbery et al., 1998) y en lipoproteínas de baja densidad en lesiones de arterosclerosis (Rosenfeld et al., 1990).

IV.3 SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN Y ARSÉNICO.

Las células se comunican entre sí y responden a estímulos extracelulares a través de mecanismos biológicos llamados de señalización celular o transducción de señales (Woolson et al., 1983, Pontius et al., 1994). La transducción de señales es un proceso que permite a la información ser transmitida desde fuera de la célula a varios elementos dentro. Las señales de transducción se disparan por señalización extracelular tales como hormonas, factores de crecimiento, citocinas y neurotransmisores (Piver et al., 1983). Las señales mandadas a la maquinaria de transcripción son responsables de la expresión de ciertos genes, normalmente transmitidos al núcleo por una clase de proteínas llamadas factores de transcripción. Por unión específica a secuencias de DNA, estos factores regulan la actividad de la RNA polimerasa II. Estos procesos de transducción de señales pueden involucrar varias actividades biológicas, tales como contracción muscular, expresión génica, crecimiento celular y transmisión nerviosa (Nelson., 1977), entre otras.

Diferentes lesiones al DNA pueden iniciar rutas de señalización comunes que colectivamente son referidas como respuestas de daño al DNA (Rouse et al., 2002). Como ejemplo, una regulación inadecuada en la fosforilación de tirosina, puede consecutivamente elevar la fosforilación de esta, lo que está directamente relacionado con señalización celular aberrante y crecimiento celular descontrolado tanto en cultivo como en el desarrollo del cáncer (Qian et al., 2003).

La alteración crónica de las rutas de transducción debido a los cambios en los concentraciones redox puede jugar un papel importante en la oncogénesis inducida por la exposición al As_i (Figura 3) (Schiliga et al., 2002) y en efectos celulares relacionados, como la modificación en función, expresión y estructura de proteínas.

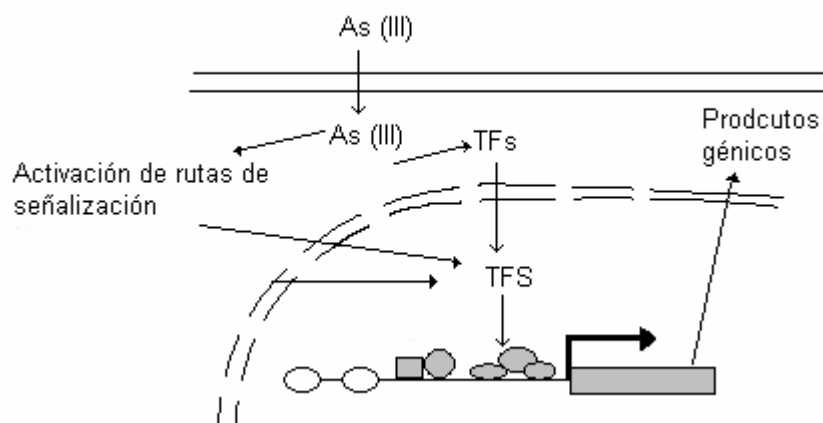


Figura. 3. Regulación de la expresión génica por parte de la exposición a arsénico inorgánico (Hamilton et al., 1998)

Se ha postulado desde hace tiempo que los genes inducibles son afectados fuertemente por daño al DNA por agentes químicos. La exposición al As_i induce la fosforilación e incrementa la expresión de hsp27, además incrementa la expresión de hsp70 y hsp90 a través de factores de choque térmico, induce HO-1, MDR1 y reduce la expresión génica de quinona, por otro lado induce tanto transcripcional como porstranscripcionalmente la expresión de MT (Hamilton et al., 1998).

En estudios previos se encontró que la exposición de las células al As_i incrementó de manera dosis dependiente la fosforilación celular total. Un mecanismo opuesto es que el As_i puede interactuar directamente con el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) para inducir un cambio conformacional o su dimerización, resultando en su activación. La activación del EGFR en respuesta a la estimulación por As_i recluta a Shc y fosforila su residuo de tirosina, el cual resulta en el aumento de las interacciones entre Shc y Grb2. Las señales son entonces dirigidas a proteínas de señalización río abajo. Ha quedado demostrado que la fosforilación de EGFR fue responsable directo de la activación de MAPK (Qian et al., 2003).

Aunque se ha observado que el As_i induce arresto del ciclo celular, se sabe que en la línea celular HT1197 de cáncer de vejiga induce daño al DNA y activa los puntos de control del ciclo celular, sin embargo el mecanismo aún no está claro, se ha demostrado que en periodos cortos la proteína p21 disminuye su concentración, sugiriendo una degradación (Xie et al., 2002, Hernández-Zavala et al., 2005) a través de la ruta de ubiquitina y que los bajos concentraciones de p21 no son capaces de inhibir la actividad del complejo ciclina E-CDK2, como consecuencia Rb puede ser fosforilada permitiendo la transcripción de los genes regulados por el factor de transcripción E2F y la progresión del ciclo celular hacia la fase S, causando una desregulación del ciclo y promoviendo el desarrollo del cáncer (Hernández-Zavala et al., 2005)).

Por otro lado, en células de fibroblastos humanos normales W138, se observó que a dosis bajas ($0.1\mu M$) de arsenito hay un modesto incremento de la p53. Los efectos tóxicos sólo se pudieron observar en concentraciones de $50\mu M$, al incrementar las concentraciones de p53 después de una exposición de 18h (Vogt et al., 2001). El mecanismo por el cual el arsenito causa amplificación génica puede estar relacionado con la alteración de la actividad de p53. La regulación de la actividad de p53 es compleja e involucra modificaciones covalentes tales como fosforilaciones, oxidación de cisteínas, acetilación o interacción proteína-proteína. La actividad de p53 es inhibida en levaduras nulas a tioredoxina reductasa y este efecto fue atribuido a la presencia de tioredoxina oxidada (Merwin et al., 2002).

Existe evidencia que indica que el As_i puede activar tres clases de MAPKs en una gran variedad de líneas celulares en una manera dependiente de tiempo. El As_i puede activar MAPKs en concentraciones de un rango de 0.1 a 500 μM. La activación individual de MAPKs por el As_i involucra diferentes rutas de señalización. La activación de ERKs y p38 parece estar mediada por la ruta de Ras/Raf/Mek, mientras en la activación de JNKs se ha propuesto que está involucrada la Rac, Rho y MEKK3-4. Estudios han demostrado que el tratamiento con As_i inhibe la actividad de JNK e incrementa la actividad de p38 y ERK en células transformadas. La apoptosis inducida por JNK revela que la expresión de Bcl-x_L y Bcl-2 (dos proteínas antiapoptóticas) se incrementa mientras la expresión de Bax (proteína pro-apoptótica) disminuye, lo que indica que la exposición con As_i conduce a la inhibición de la apoptosis en células transformadas (Qian et al., 2003).

NF-κB es un factor de transcripción que regula una variedad de procesos celulares, incluyendo la interacción célula-célula, comunicación intracelular, reclutamiento o trasmigración celular, amplificación de señales patogénicas primarias e iniciación o aceleración de carcinogénesis. NF-κB es capaz de translocarse al núcleo para activar la transcripción. La activación de NF-κB inducida por As_i es tiempo y dosis dependiente, concentraciones bajas y no citotóxicas de arsénico (1-10 μM) usualmente activan NF-κB (Barchowsky et al., 1999), mientras concentraciones mayores a 10 μM inhiben este factor de transcripción. Se ha encontrado que la generación de ROS esta involucrada en la activación de NF-κB inducida por As_i en células endoteliales (Qian et al., 2003).

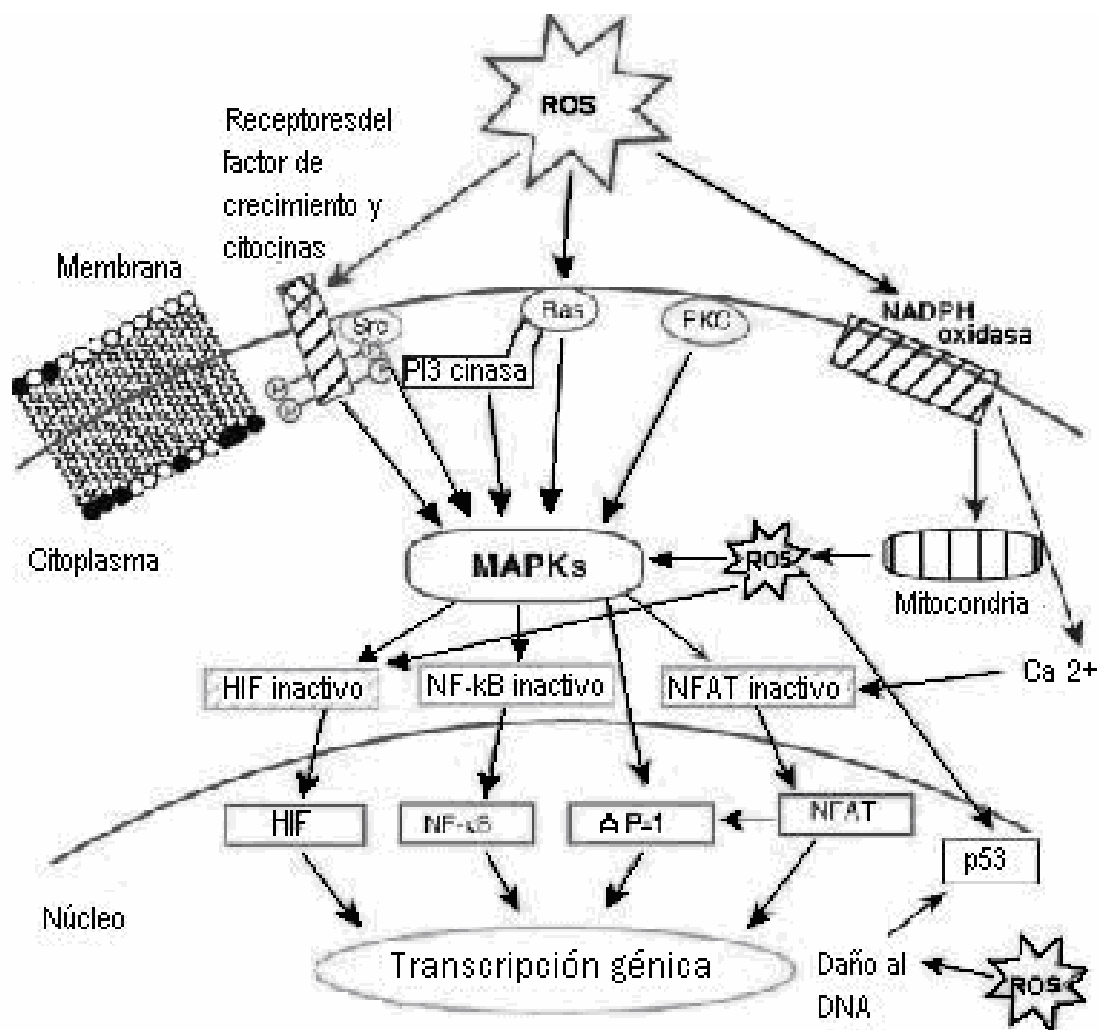


Figura 4. Regulación de la transducción de señales por los ROS (Valko et al., 2006)

CAPÍTULO V

FILAMENTOS INTERMEDIOS.

En un inicio muchos biólogos moleculares consideraron al citoplasma de las células como una bolsa biológica en donde importantes moléculas flotan e interactúan unas con otras. Una cuidadosa inspección de esta bolsa bajo el microscopio reveló una asombrosa red de proteínas fibrosas a lo largo del citoplasma (Paramio et al., 2002). El término citoesqueleto fue acuñado para describir proteínas como peldaños insolubles en detergentes (Porter et al., 2003).

El citoesqueleto consiste de diversas mayas de filamentos que se extienden de la membrana plasmática a la envoltura nuclear, e incluso en el interior del núcleo, juega un papel importante en el anclaje de las células con sus vecinas y a la matriz extracelular vía uniones celulares especializadas (Columbe et al., 2001, Ramaekers et al., 2004). Es la fracción mayoritaria del total de la proteína celular, aproximadamente 80%. Está involucrado en la maquinaria que regula la dinámica y estructura de las células vivas incluyendo mantenimiento de la forma, movimiento, replicación, apoptosis, diferenciación y señalización celular (Ramaekers et al., 2004).

El citoesqueleto está compuesto por tres proteínas mayoritarias que forman filamentos estructurales que corren a través de la célula: microfilamentos (filamentos de actina), microtúbulos y filamentos intermedios. Los microtúbulos y microfilamentos están formados por proteínas globulares altamente conservadas en tanto los filamentos intermedios están contruidos por proteínas filamentosas con un dominio central α -hélice (Paramio et al 2002, Ramaekers et al., 2004, Ku et al., 1999).

El núcleo también contiene estructuras de soporte, tales como la lámina nuclear, la cual contiene una subfamilia de proteínas: los filamentos intermedios. Estructuras similares a andamios deben existir debajo de la membrana plasmática de tipos celulares específicos, relacionados con

funciones como: motilidad celular; proliferación celular; control y mantenimiento de la morfología celular y estabilidad del tejido; comunicación y transducción de señales internas (Ramaekers et al., 2004) y respuestas a estrés y transporte vesicular, entre otras (Ku et al., 1999, Pollard., 2003).

Los filamentos intermedios se dividen en 5 grupos mayoritarios, los grupos más grandes de estas proteínas son las queratinas tipo I (K9-K20) y II (K1-K8). Las queratinas se encuentran asociadas no covalentemente en heteropolímeros (4, 29), dada la naturaleza heteropolimérica obligada de las queratinas todas las células epiteliales expresan por lo menos una tipo I y otra tipo II en una estequiometría 1:1 (Ku et al., 1999, Toivola et al., 2002, Omary et al., 2002, Zhong et al., 2003).

Las funciones de las queratinas se pueden dividir en dos categorías: mecánicas y no mecánicas. El papel de las queratinas hepáticas y no hepáticas proporcionando integridad mecánica celular ha sido bien establecido, la naturaleza mecánica del estrés que el hepatocito puede experimentar esta relacionado con cambios hemodinámicos que ocurren en asociación con daño hepático (Omary et al., 2002). La mayor función de las queratinas es actuar como un peldaño elástico adaptable concediendo a las células epiteliales la habilidad para soportar tanto un estrés mecánico como uno no mecánico (Coulombe et al., 2002).

Evidencia reciente sugiere que las queratinas protegen a las células de daño no mecánico por diversos mecanismos que pueden incluir: regulación de las cascadas de señalización, regulación en la disposición de proteínas así como de proteínas blanco de diversos compartimentos subcelulares (Omary et al., 2002, Kim et al., 2005).

Los filamentos intermedios están asociados con un amplio rango de enfermedades humanas que reflejan su diversidad y distribución, los desórdenes incluyen enfermedades en la piel, cardiomiopatías, distrofia corneal, leucoqueratosis oral, enfermedades laminares, enfermedades del hígado y un subgrupo de esterosclerosis amiotrópica lateral (Omary et al.,

2002) así como problemas cardiovasculares, neurodegeneración, cáncer, cirrosis hepática y fibrosis pulmonar (Ramaekers et al., 2004). Así mismo, se han asociado las mutaciones de queratinas con desórdenes en la fragilidad de la piel constituyendo uno de los ejemplos más fuertes de desórdenes del citoesqueleto (Malean et al., 1995).

Las queratinas tienen una estructura molecular básica común para todos los filamentos intermedios (Fig. 5). Un dominio de vara central con cerca de 310 aminoácidos, la cual es responsable de la dimerización y la polimerización ordenada. Este dominio existe en cuatro segmentos helicoidales interrumpidos por tres no helicoidales (L1, L2, L3) y una aparentemente hélice de polaridad reversa, la secuencia stutter usualmente indicada como S. El dominio vara es flanqueado por la cabeza globular más variable (amino terminal) y la cola (carboxilo terminal) Dos regiones cortas al inicio y al final de los dominios vara, el límite de la hélice, muestra un remarcado grado de conservación evolutiva. El dominio vara tiene secuencias altamente conservadas con cada una de las isoformas de los filamentos intermedios y estas, junto con las secuencias cabeza y cola y la posición de los intrones, proporcionan la base para la clasificación en tipos I a VI.

Se piensa que las CK8 y 18 son el par más viejo en términos de evolución, ya que son las primeras queratinas embrionarias en expresarse en el oocito y la preimplantación blastocística.

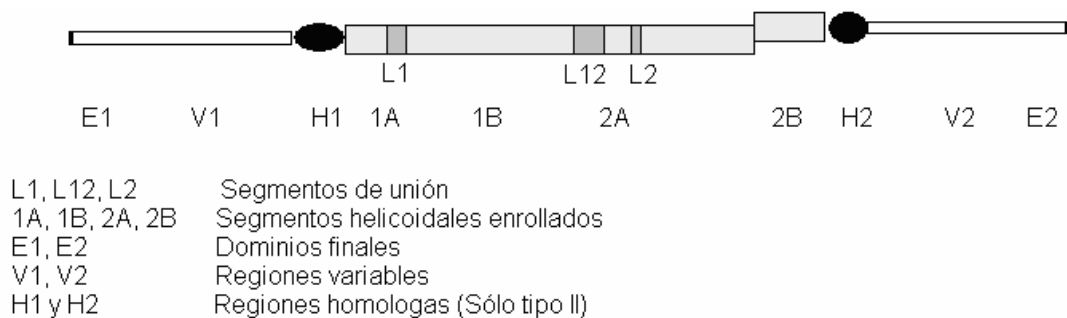


Figura 5. Estructura general de las queratinas.

V.1 CITOQUERATINA18 (CK 18)

El epitelio simple encontrado en el hígado, intestino y páncreas expresan combinaciones únicas de CK7, CK8, CK18, CK19 y CK20 (Toivola et al., 2002).

Los hepatocitos, normalmente expresan sólo las queratinas 8 (tipo II) y la 18 (tipo I) (Zatloukal et al., 2004, Ku et al., 1999, Fausther et al., 2004). CK8/CK18 están distribuidas como una red de filamentos citoplásmicos o como una cinta justo debajo de los microfilamentos rodeando la membrana plasmática (Omary et al., 2002).

Actualmente se ha empezado el estudio de las queratinas del citoesqueleto en enfermedades hepáticas y se ha observado que los filamentos intermedios son blancos de muchas enfermedades, entre ellas esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica, toxicosis por cobre y colestasis. El estudio con ratones knock-out de queratinas ha proporcionado una visión del papel que estas proteínas juegan en los hepatocitos: proporcionan estabilidad mecánica y son un elemento clave en la estructura celular y constituyen un blanco al estrés tóxico (Ramaekers et al., 2004).

V.2 CITOQUERATINA 18 Y ENFERMEDAD

Las mutaciones en CK8/CK18 están asociadas con enfermedades severas de la piel, orales, esofágicas, oculares y enfermedades hepáticas que reflejan la expresión tejida específica de las queratinas involucradas (Fuchs et al., 1992, Steinert et al., 1993, Ku et al., 1999, Ku et al., 2001, Omary et al., 2002, Ku et al., 2003, McLean et al., 1995, Kim et al., 2005). Muchas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la presencia de agregados de proteínas unidos a filamentos intermedios y estructuras similares, conocidas como cuerpos de Mallory (MBs) (Shinichiro et al., 2005) formados por queratina 8 y 18 en individuos con esteatohepatitis no alcohólica o neoplasia hepatocelular maligna y no maligna (Nakamichi et al., 2002). Así mismo, mutaciones en estas mismas queratinas se han encontrado en pacientes con cirrosis cryptogénicas (Ku et al., 2003), cirrosis alcohólica, pancreatitis crónica y recientemente se han encontrado mutaciones en la CK8 en pacientes con colitis (Ramaekers et al., 2004).

Los cuerpos de Mallory son agregomas, compuestos de CKs y otras proteínas (ubiquitina, hsp70), las cuales se forman en enfermedades hepáticas debido a la alteración de la ruta de degradación ubiquitina-proteosoma (Riley et al., 2003). Los agregomas se forman cuando la capacidad del proteosoma es rebasada por la producción de proteínas mal plegadas (Johnston et al., 1998, Kopito, 2000, Harada et al., 2003, Bardag-Gorce et al., 2004). Aunque si bien, las hsp70 fueron las primeras en ser detectadas en tejido hepático de pacientes con hepatitis alcohólica (Omar et al., 1990) existen otras alteraciones con las cuales están asociadas. Esto constituye una evidencia que defectos en CK8 y CK18 pueden predisponer al hígado humano a desórdenes que llevan a enfermedades como pancreatitis crónica y colitis, entre otros ya señalados. Es importante hacer notar que hasta ahora no se han relacionado enfermedades asociadas con otras queratinas encontradas en el hígado como CK7, CK19 o CK20 (Owens et al., 2004).

Los fenotipos de ratones nulos para CK8 o CK18 muestran que las mutaciones en estas queratinas causan patologías humanas, involucradas con el hígado o intestino. Ratones carentes de CK8 desarrollan hiperplasia de colon con inflamación y prolapso anorectal. La evidencia de los modelos de ratón soporta un papel mecánico en el plegamiento de CK8 y CK18. Primero, los hepatocitos de ratones carentes de CK8 son mecánicamente más frágiles que los normales. Segundo, la expresión de CK18 en la epidermis puede parcialmente enmascarar el ampollado de ratones CK14^{-/-} como EBS. Esto debido a la habilidad de formar pareja entre CK5+CK18 formando de esta manera filamentos funcionales (Owens et al., 2004).

El uso de ratones transgénicos ha mostrado la importancia de las queratinas en la protección del hígado por daño mecánico o no mecánico y directamente la búsqueda de enfermedades relacionadas con esta proteína, lo que ha revelado una sobre expresión de genes mutados para CK. En el caso específico en la relación de CK8/18 la sobre expresión del gen mutado para CK18 generó hepatocitos frágiles en ratones, alteraciones en los filamentos citoplásmicos de queratina, hepatitis crónica y una marcada susceptibilidad a daño hepático,

comparado con la expresión de CK18 silvestre. En el caso de mutaciones de CK8 las manifestaciones presentaron un 94% de embriofetalidad con hemorragias severas. Mutaciones en CK8 y CK18 heterocigotas se reportaron en 6 de 55 pacientes con cirrosis criptogénica (Omary et al., 2002).

En experimentos con ratones se ha mostrado que la alteración de los filamentos de queratina o su ausencia predispone al hígado a un daño por perfusión además de establecer que las queratinas son esenciales en la protección de los hepatocitos contra estrés mecánico. La estabilidad mecánica proporcionada por las queratinas es probablemente relacionada a su interacción con desmosomas y hemidesmosomas. La importancia de la ayuda de las queratinas en relación con estrés no mecánico ha sido comprobada en numerosos modelos de daño hepático.

El mecanismo de crioprotección que proporcionan las queratinas hepáticas permanece sin estar bien elucidado sin embargo se piensa que el sitio específico de fosforilación puede ser una contribución importante para este efecto. En ratones transgénicos que sobreexpresaron una CK18 fosforilada mutante fueron significativamente más susceptibles a griseofulvina comparando con la sobreexpresión de una CK18 silvestre. Además una hiperfosforilación de queratinas es una asociación común en todas las formas de daño que han sido probadas en cultivos celulares, modelos animales y humanos (Omary et al., 2002). La fosforilación es importante en la regulación de las queratinas y otros filamentos intermedios debido a que esta ocurre en el dominio N-terminal (cabeza) o C-terminal (cola) de las proteínas, los cuales son más heterogéneos para impartir las funciones tejido-específicas (Omary et al., 1998, Pant et al., 2000, Nagata et al., 2001, Ku et al., 2002).

La función en la protección contra estrés mecánico por parte de las CKs esta relacionada a su abundancia como una de las mayores familias de proteínas del citoesqueleto (Ku et al., 1999). Se ha propuesto que están involucradas en la regulación en la transmisión de los estímulos apoptóticos cuando se encuentran presentes (Ramírez et al., 2000, Zhong et al., 2003). En experimentos realizados con ratones knock out para CK8/18, se observó que

éstos fueron más susceptibles a daño mediado por Fas comparados con su control. Los mecanismos de resistencia a apoptosis mediados por queratinas pueden estar relacionados con la densidad del receptor de superficie Fas, pues existe una diferencia en la densidad de este receptor en células mutadas con respecto de las normales, sugiriendo que puede haber una posible interacción de CK8/18 con el receptor del factor de necrosis tumoral tipo II, además de modular la interacción con otras proteínas como la hsp70 y las proteínas 14-3-3 (Omary et al., 2002).

El aumento en la expresión en los patrones de fosforilación de queratinas en respuesta a daño hepático o vesicular se ha reportado en diversos modelos, además se sugiere que estas proteínas pueden comportarse como proteínas de estrés, de manera similar a las proteínas de choque térmico, ya que el aumento en esta proteína ha sido reportado previamente (Zhong et al., 2003).

El tratamiento con griseofulvina induce cambios en la expresión de hsp70 y fosforilación de CK8 en serinas 79, 436 y en la fosforilación de CK8 en la serina 33 (Fausther et al., 2004).

CAPÍTULO VI

DISEÑO EXPERIMENTAL

VI.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las CKs constituyen una familia de proteínas de filamentos intermedios del citoesqueleto muy importante en la sensibilidad hepática a agentes tóxicos. La estructura y función anormales en estas proteínas son un efecto claro relacionado a enfermedades como carcinoma hepatocelular, cirrosis alcohólica y no alcohólica y esteatohepatitis entre otras.

En estudios previos reportamos la capacidad del arsenito de sodio de alterar considerablemente la síntesis, función y organización de filamentos de CK18 en las células hepáticas humanas, lo que podría comprometer fenómenos de diferenciación, especialización, proliferación y división celular en el tejido hepático (Ramírez et al., 2000).

Considerando estos resultados y el hecho de que diversos estudios muestran la capacidad tóxica del As_i como contaminante ambiental y carcinógeno humano, además que los mecanismos de acción asociados con la inducción por As_i de fenómenos celulares no se conocen del todo. Nuestro interés, por entender de qué manera el As_i compromete la función de los filamentos intermedios en el hígado con objeto de inferir fenómenos celulares en el órgano es grande.

Por lo que en este trabajo de investigación nos propusimos estudiar la capacidad del arsenito de sodio para alterar la síntesis y expresión de la proteína CK18 en cultivos organotípicos de hígado de ratones machos de la cepa BALB/c y determinar si el estrés oxidativo generado durante la exposición y biotransformación del agente en los cultivos organotípicos modifica la síntesis y expresión de la CK 18.

VI.2 HIPÓTESIS

El estrés oxidativo es capaz de modificar la expresión y síntesis de la CK 18 en cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a As_i trivalente.

VI.3 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del estrés oxidativo generado por la exposición y el metabolismo del As_i sobre la expresión de la CK18 en cultivos organotípicos de hígado de ratón.

VI.4 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ∞ Estudiar la influencia de la inhibición del glutatión (GSH), inducida por butionin-sulfoximida (BSO) sobre la expresión y síntesis de CK18 en cultivos organotípicos de hígado de ratón de la cepa BALB/c expuestos a arsenito de sodio.
- ∞ Analizar la influencia de N-acetil-cisteína (NAC) sobre la expresión y síntesis de la CK18 en cultivos organotípicos de hígado de ratones de la cepa BALB/c expuestos a arsenito de sodio.
- ∞ Determinar la relación entre el estrés oxidativo (al cuantificar el daño generado por ROS mediante la técnica de TBARS) y el GSH sobre la expresión de la CK18.
- ∞ Conocer el perfil de biotransformación del As_i III mediante espectroscopia de absorción atómica en los cultivos de cortes de hígado de ratón expuestos arsenito de sodio.

CAPÍTULO VII

MATERIALES Y MÉTODOS.

VII.1 CULTIVOS ORGANOTÍPICOS

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de 5-6 semanas de edad, peso entre 22-25 g, obtenidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se sacrificaron por dislocación cervical y los cortes se realizaron manualmente con un grosor no mayor a 1 mm², los cuales fueron aclimatados por 2 horas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% sin antibióticos, a 37⁰C, en atmósfera de 5% de CO₂.

Los cultivos fueron expuestos a 0.01 μM, 1 μM y 10 μM de arsenito de sodio por tres horas, simultáneamente se expusieron cultivos con arsenito de sodio utilizando las mismas concentraciones y BSO a concentración final de 10 μM.

De forma similar se utilizaron cultivos con exposición previa a arsenito de sodio por 3 horas para posteriormente agregar NAC a concentración final de 2.5 mM por dos horas más.

Al final de los tratamientos, los tejidos se homogenizaron en PBS 1X pH 7.4 conteniendo Azida de sodio 15 mM, PMSF 1 mM, Triton X-100 a 0.1%, EDTA 5 mM.

VII.2 VIABILIDAD DE LOS CULTIVOS.

La viabilidad en los tejidos se verificó después del periodo de incubación establecido, determinando la cantidad de K⁺ intracelular por medio de absorción atómica con flama (Perkin Elmer 3100). Los cultivos se recolectaron y homogenizaron en PBS, se adicionó un volumen equivalente de ácido perclórico 2.5% agitando la mezcla gentilmente, se dejó incubar 5 min a temperatura ambiente, para finalmente centrifugar a 12,000 rpm por 10 min a 4⁰C. La cantidad de K⁺ se cuantificó en el sobrenadante usando una flama de

atomización de aire-acetileno a una longitud de 766.5 nm el resultado se reportó en μmol de K^+ por gramo de tejido.

VII.3 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DEL ARSENICO INORGÁNICO.

Para evaluar la biotransformación sufrida por el Arsenito en los cultivos organotípicos de hígado, se midió las concentraciones de especies arsenicales (As_i y sus metabolitos: MMA, DMA) presentes, mediante espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros, después de una separación por cromatografía en columna (Wang et al., 1994).

VII.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS

Los cultivos de hígado se homogenizaron en PBS 1X (pH 7.4) conteniendo azida de sodio 15mM, PMSF 1mM, Triton X-100 a 0.1%, EDTA 5mM y UREA 8.5M (Eichner et al., 1990, Zhong et al., 2003) seguido de centrifugación a 12,000 rpm, a 4°C por 10 minutos. El contenido de proteína del sobrenadante se cuantificó utilizando la metodología descrita en el Kit comercial Protein Assay de la compañía Bio-Rad (Biuret) La caracterización del perfil de proteínas se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) al 12%, a temperatura ambiente y voltaje constante de 80V por 1.30 h.

VII.5 WESTERN BLOTT

Las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa 0.45μ a 350 mA, 80 volts, 60min. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 3% en PBS 1X por 24 horas. Para la detección de la CK 18 se utilizó un anticuerpo de la compañía SIGMA-ALDRICH, seguido de un anticuerpo secundario de la misma compañía anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa, revelándose con diaminobenzídina al 1%. Para la detección de la CK18 fosforilada se usó un anticuerpo contra serina 78

de CK –fosforilada de la compañía Santa Cruz, seguido de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de la misma compañía revelándose de la misma manera. El análisis de imágenes se realizó utilizando el Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

VII.6 RT-PCR

Las concentraciones de RNAm se cuantificaron por RT-PCR. El RNA total fue aislado utilizando el método de TRIZOL (Invitrogen), la concentración de RNA se determinó por absorbancia a 260 y 280 nm. Se verificó la integridad usando geles de agarosa a 1% y buffer desnaturizante con formaldehído a concentración de 2.2 M, las muestras se retrotranscribieron con RT-MLV retrotranscriptasa (Invitrogen) y el cDNA se amplificó usando los siguientes primers:

SENTIDO (5´ A 3´)

CK18 GACGCTGAGACCACT

ANTISENTIDO (5´ A 3´)

TCCATCTGTGCCTTGTAT (203)

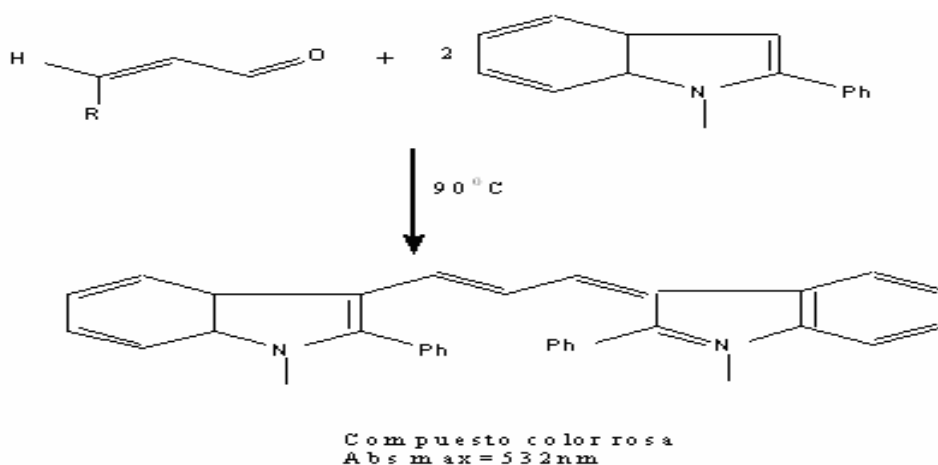
La amplificación se llevó a cabo usando los siguientes parámetros: 5 min a 95⁰C, seguido por 50 ciclos de 50 seg a 95⁰C, 50 seg a 60⁰C y 50 seg a 72⁰C, usando como control interno primers de actina en un termociclador Corbett Research, (Massachusetts, MA), los productos del PCR se visualizaron utilizando bromuro de etidio y un transilumionador. El análisis de imágenes se realizó utilizando el Kodak Gel Logic 100 Imaging System

7.7 CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO.

Las células vivas están constantemente expuestas a ROS, algunas de las cuales son capaces de iniciar la lipoperoxidación al extraer un protón alílico de un ácido graso poliinsaturado. Este proceso, por múltiples etapas conduce a la formación de hidroperóxidos. La prueba de ácido tiobarbitúrico (TBA) es rápida y fácil para medir la lipoperoxidación en la cual el malondialdehído (MDA) es

derivatizado (Lykkesfeldt., 2001). En esta reacción, el MDA o substratos como MDA reaccionan con el TBA generando un producto reactivo (TBAR) de color rosado con un máximo de absorción a 532 nm.

Los cultivos se homogenizaron en PBS 1X pH 7.2, conteniendo azida de sodio 15 mM, PMSF 1 mM, Tritón X-100 0.1%, EDTA 5 mM. A 500µl del homogenado se les agregó un volumen equivalente de ácido perclórico 2.5% pH 1.0, dejándose 10 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugarse a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se hizo reaccionar con 0.67% de TBA a 90°C por 30 min (Figura 6) (Coban et al., 2004) El contenido de MDA de las muestras se cuantificó usando una curva estándar generada con concentraciones conocidas del lipoperóxido. Las concentraciones se ajustaron por gramo de tejido.



Malondialdehído (MDA): R = OH
4-hidroxiálquenal: R = hidroxiálquil

Figura 6. Reacción del ácido tiobarbitúrico con malondialdehído

VII.8 CUANTIFICACIÓN DE GLUTATIÓN.

El contenido de GSH intracelular total de los tratamientos realizados se determinó usando el siguiente protocolo; los cultivos fueron recolectados y homogenizados en PBS conteniendo inhibidores de proteasas, inmediatamente después se adicionó ácido perclórico 2.5% en relación 1:1 (vol/vol) agitándose durante 10 seg, dejando reaccionar 3 min a temperatura ambiente; posteriormente se sometió a centrifugación por 10 min, 12,000 rpm, 4°C. Posteriormente, 50 µl del sobrenadante se pusieron en contacto con 950 µl de

amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.5) conteniendo 0.2 mM de NADPH, 0.52 mM DTNB [ácido 5´5´-dithio-bis(2-nitrobenzoico)] y 0.15 mM de EDTA. Después de la incubación a 37⁰C por 25 min, las muestras fueron leídas en espectrofotómetro a 405 nm. La concentración de GSH de las muestras se determinó usando un grafico estándar generada con concentraciones conocidas de GSH (Clarke et al., 1996, Anderson et al., 1999, Schuliga et al., 2002, Schoen et al., 2004). Las concentraciones se ajustaron por gramo de tejido.

El grupo sulfhidrilo de GSH reacciona con el DTNB y genera un producto coloreado amarillo 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB) (Figura 7).

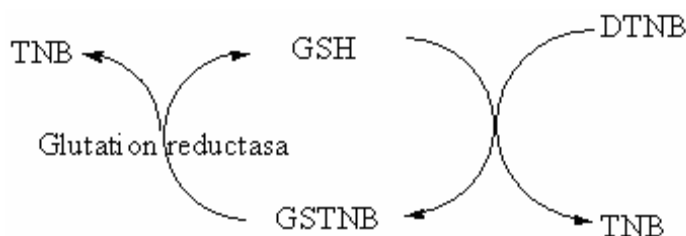


Figura 7. Reacción del glutatión con DTNB

VII.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST).

Para el ensayo de actividad de GST, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, se inició con la adición de 50 µg de proteína del homogenado, llevándose a un volumen de 1.0 ml con amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 6.9) conteniendo 1 mM de EDTA, 1 mM de GSH reducido y 1 mM de CDNB (1-cloro, 2,4-dinitrobenzeno). La formación del conjugado GSH-CDNB se monitoreó espectrofotométricamente a 340nm por 10 min, tomando lectura cada 60 seg (Clarke et al., 1996, Bramblia et al., 2002, Schuliga et al., 2002, Lee et al., 2005, Kojima et al., 2006).

VII.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOSOMAL.

La actividad proteosomal en el hígado se evaluó utilizando el sustrato del proteosoma LLVY-AMC (BostonBiochem), el cual es específicamente degradado por las subunidades con actividad semejante a la quimiotripsina en el proteosoma. Los cultivos organotípicos de hígado se homogenizaron en 250 μ l de amortiguador (50 mM Tris pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 0.5 mM, NP40 0.5%) (IGEPAL, SIGMA ALDRICH). Cada reacción contenía 50 μ g de proteína de los homogenados y 10 μ M del sustrato LLVY-AMC, incubándose 30 minutos a 37°C. La fluorescencia se determinó utilizando filtros de excitación de λ 360/460 λ de emisión.

VII.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron en promedios \pm error estándar (ES). La significancia estadística se determinó al evaluar la diferencia entre dos grupos empleando la prueba T-Student; mientras que las comparaciones entre varios grupos se estimó mediante la prueba de ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas cuando el calculó $P < 0.05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el software STATGRAPHICS Plus 4.0

CAPÍTULO VIII

RESULTADOS

Las CKs constituyen una familia de proteínas del citoesqueleto que se expresan típicamente en las células epiteliales. Una estructura y función anormales son efectos claramente relacionados a enfermedades hepáticas como esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis y carcinoma hepatocelular. Previamente observamos que el arsenito de sodio induce la síntesis de la CK 18 y promueve una alteración de los filamentos de CK18 en una línea celular hepática humana. Tanto la expresión anormal y la alteración en la organización estructural son eventos tóxicos que comúnmente causan enfermedades hepáticas al interferir con la función normal del hepatocito. Para investigar si la alteración en el patrón de expresión de la CK18 se encuentra asociado con daño al hígado por el arsenito, investigamos las concentraciones de la proteína y el RNAm para la CK18 en cultivos organotípicos de hígado tratados con las concentraciones bajas de arsenito. Los cultivos fueron incubados con 0.01, 1 y 10 μM de arsenito de sodio en presencia y ausencia de NAC así como de BSO. La viabilidad celular y el metabolismo del As_i fueron determinados. Un incremento en la expresión de la CK18 se observó después de una exposición con As_i . La adición de NAC revertió los efectos oxidativos de la exposición con arsenito, disminuyendo de manera significativa la producción de TBAR, la sobreexpresión y síntesis del RNAm y la proteína para la CK18. Las concentraciones de As_i y sus metabolitos correlacionaron con un incremento en los concentraciones del RNAm.

En el presente trabajo estudiamos el efecto que tiene el estrés oxidativo generado por la exposición a As_i y su modificación en presencia del antioxidante NAC y BSO sobre la expresión y síntesis de la CK 18.

Los resultados arrojados en la presente investigación demuestran que la exposición a As_i es capaz de modificar tanto la expresión como la síntesis de la CK18 y que el estrés oxidativo generado durante su exposición y biotransformación es un factor celular importante que modula la síntesis y expresión de esta proteína en el hígado expuesto a arsenito de sodio.

Los resultados obtenidos muestran que las células en el cultivo organotípico expuesto a arsenito de sodio permanece viables durante el lapso de exposición y

son capaces de biotransformar *in vitro* al As_i (Tablas 1 y 2). Por otro lado, al evaluar el daño oxidativo generado por el metabolismo del As_i en los cultivos organotípicos mediante la cuantificación de productos como lipoperoxidación y GSH observamos una variación en ambos parámetros de forma correspondiente entre ellos.

Los resultados obtenidos indican que la cantidad de lipoperóxidos generados en los tejidos por la exposición al arsenito se incrementó, de igual forma para el caso de exposición conjunta con BSO en donde se observó un incremento en este parámetro con respecto al control en todos los tratamientos. Además obtuvimos un efecto contrario en las células tratadas con NAC, esta modificación del estado redox del sistema repercutió en la síntesis y la expresión de la CK18 dependiendo del tratamiento al cual fue sometido el hepatocito.

La capacidad de biotransformación del arsénico no se vio afectada con ningún tratamiento. Las concentraciones intracelulares de potasio fueron superiores a 100 $\mu\text{M K}^+$ /g de tejido (Tabla 2) y se puede apreciar que el hepatocito pudo metabolizar al arsenito de sodio hasta su metabolito DMA.

Tabla 2. Cuantificación de potasio intracelular

As (μM)	Concentración de K^+ /g de tejido	error estándar
0	315.4075	56.44
0.01	651.41	0.5091
1	601.75	81.16
10	504.73	37.80

Tabla 3. Biotransformación del arsénico. Concentración de especies arsenicales (ng/g de tejido) presentes en los cultivos organotípicos de hígado de ratón después de 3 horas de tratamiento.

As (μM)	As I	MMA	DMA	As Total
----------------------	------	-----	-----	----------

0	.22 ± 0.6	1	1	.22 ± 0.6
0.01	1.4 ± 0.67	1	1	1.4 ± 0.67
1.0	81.81 ± 17.5	2.73 ± 1.6	0.02 ± 5.2	14.5 ± 10.7
10.0	052.4 ± 54.4	8.06 ± 23.4	76.2 ± 56.7	272.72 ± 35.6

De acuerdo a los resultados anteriores podemos decir que no se afectan la viabilidad ni la capacidad de biotransformación en el hígado expuesto a arsenito de sodio, ya que las concentraciones intracelulares de potasio no disminuye de 100µM K⁺/g de tejido (Tabla 2) y se puede apreciar que el hepatocito pudo metabolizar al arsenito de sodio hasta DMA (Tabla 3).

Para evaluar si la capacidad de biotransformación en el hepatocito no se afectaba por el arsénico, fue necesario cuantificar las especies metiladas después de 3 horas de exposición al metaloide, se observó que los cultivos no se altera la capacidad de biotransformación pues no sólo ingresaron el arsénico sino además fueron capaces de metabolizarlo quedando demostrado al cuantificar sus especies metiladas.

La biotransformación del metaloide presentó una tendencia dependiente de la dosis de exposición hacia la formación de especies mono y dimetiladas.

La exposición conjunta *in vitro* del hígado a arsenito de sodio y BSO no modificó la viabilidad celular pero si la formación de los metabolitos metilados (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Cuantificación de potasio intracelular

As (µM) SO 10(µM)	mol de K ⁺ /g de tejido	error estándar
0	315.41	56.44

0.01	389.46	29.14
1	378.85	13.97
10	517.17	52.26
BSO	528.85	73.68

Tabla 5. Concentración de especies arsenicales (ng/g de tejido) presentes en los cultivos organotípicos de hígado de ratón después de 3 horas de exposición simultánea de As_i con BSO.

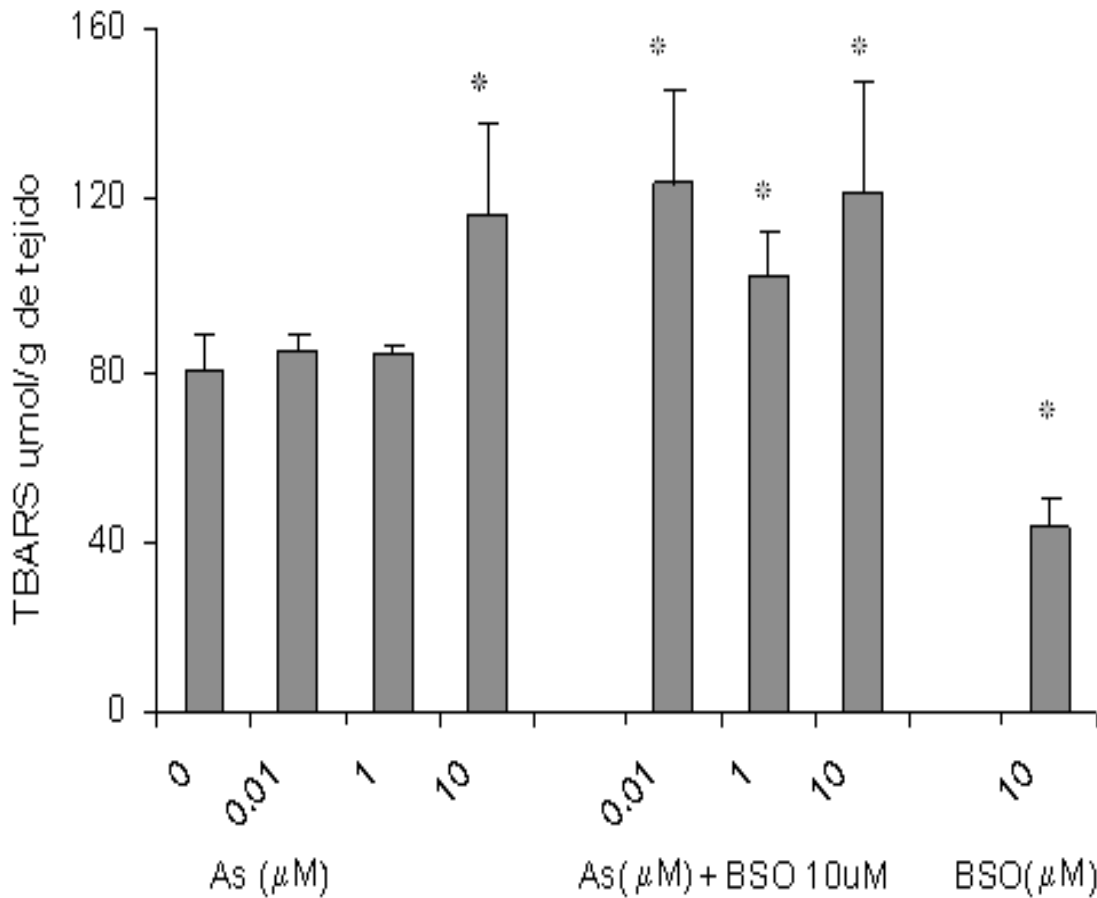
Arsenito (μM) + BSO 10μM	As I	MMA	DMA	As Total
0	7.22 ± 0.6	<1	<1	7.22 ± 0.6
0.01	17.6 ± 1.35	<1	<1	17.6 ± 2.58
1.0	144.35 ± 4.01	8.29 ± .99	<1	153.6 ± 3.83
10.0	1004.83 ± 8.4	58.46 ± 7.1	48.2 ± 1.2	1111.49 ± 35.6
BSO	5.6 ± 0.7	<1	<1	5.6 ± 0.7

En la tabla 5 podemos observar una disminución en la cantidad de especies metiladas cuantificadas, además; la generación de metabolitos metilados en presencia de BSO disminuyeron aunque sin presentar un cambio significativo.

En las concentraciones de 1 y 10 μM se observó que en el tejido la presencia de metabolitos arsenicales disminuyó tanto en concentración como en la proporción relativa de MMA, encontrando sólo DMA para el caso del tratamiento con 10 μM de As_i y BSO.

Lo que sugiere que las concentraciones de GSH son importantes en el mantenimiento del estado redox en la célula y que esto a su vez modifica el patrón de biotransformación hepática *in vitro* del arsenito de sodio (Gráfica 2). Reforzando esta observación, los resultados muestran que *per se* el arsenito de sodio modifica considerablemente la concentración intracelular de GSH.

El daño oxidativo a causa del incremento en la generación de ROS durante la biotransformación del arsenito de sodio en los cultivos organotípicos viables, se corroboró mediante la cuantificación de lipoperóxidos ó especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).



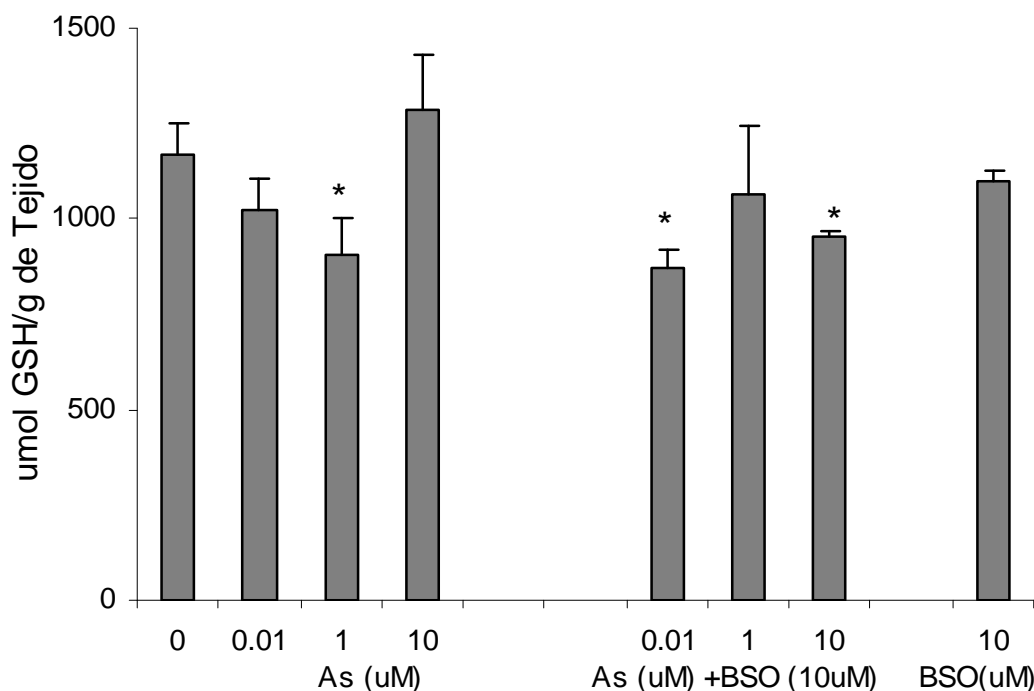
Gráfica 1. Concentraciones de TBARS en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con arsenito de sodio en diferentes concentraciones y BSO en forma conjunta. Las barras representan el promedio de cultivos por triplicado. * Denota diferencias significativas con respecto al control.

Al cuantificar la cantidad de lipoperóxidos generados durante la exposición de As_i por 3 horas en los cultivos, se observó un incremento significativo en la concentración más alta utilizada de arsenito de sodio (Gráfica 1).

Por otro lado; al cuantificar la cantidad de TBARS en los cultivos tratados con BSO en todos los casos se observa un incremento significativo en la concentración de TBARS confirmando que la modificación del sistema redox incrementa el daño a las membranas en el hígado (Gráfica 1).

Se cuantificó la cantidad de GSH, teniendo en cuenta que este péptido esta involucrado en la eliminación de ROS generados durante el metabolismo normal

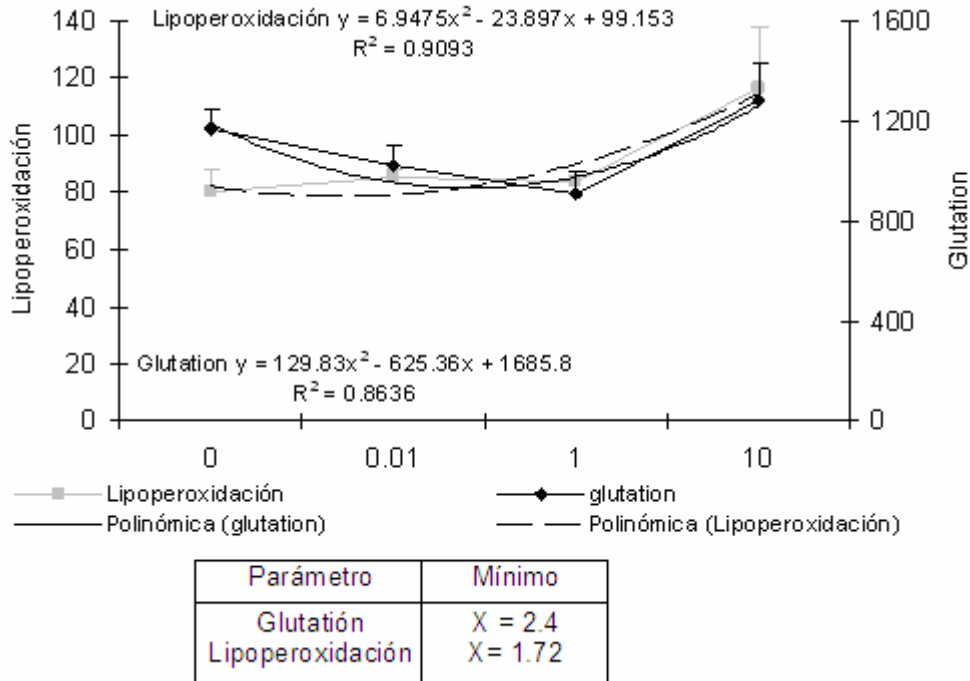
celular, así como en la desintoxicación de agentes químicos, además de estar implicado en el equilibrio redox intracelular, entre algunas de sus funciones.



Gráfica 2. Efecto del arsenito sobre el glutatión reducido en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con diferentes concentraciones de arsenito y BSO en forma conjunta. Las barras representan el promedio de cultivos por triplicado. * Denota diferencias significativas con respecto al control.

Los resultados indican que el arsenito fue capaz de modificar la concentración de GSH intracelular de los hepatocitos dependiendo de la dosis utilizada. Además obtuvimos una modificación en la concentración del tripéptido al utilizar el BSO.

Después de cuantificar la cantidad de TBARS y la concentración de GSH hepático que existía en los cultivos, fue necesario demostrar que estos parámetros presentaban una correlación, pues como ya se hizo mención dentro de algunas de las funciones del GSH se encuentra la eliminación ROS (generados por el metabolismo normal celular y en nuestro caso además por los agentes tóxicos involucrados en los tratamientos), los cuales son causantes de lipoperoxidación, entre otros daños a las membranas celulares.



Gráfica 3. Correlación entre GSH y lipoperoxidación en cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsenito. Análisis matemático de las líneas de tendencia (Curvas polinómicas de segundo orden).

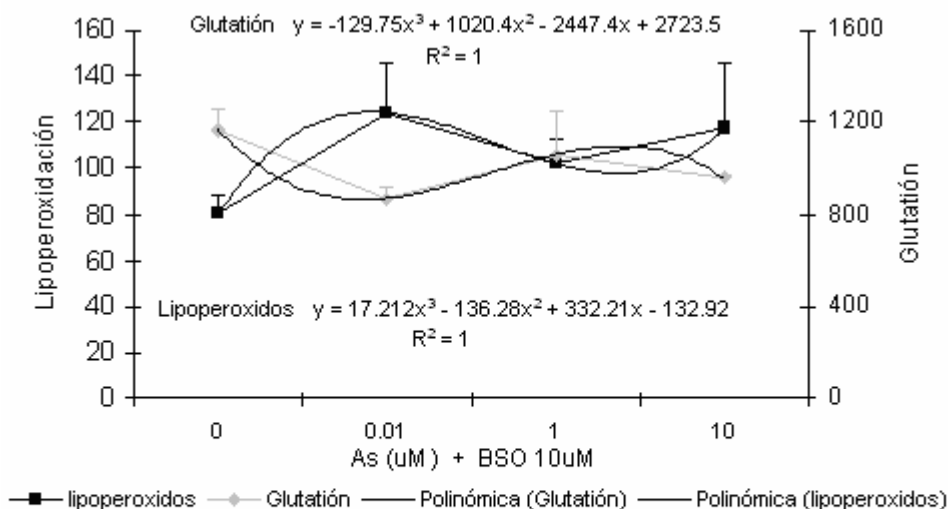
Al calcular los puntos de inflexión de las variables evaluadas, éstas nos indican la relación del cambio en que los hepatocitos responden a las respuestas celulares óxido-reductoras como mecanismos de protección durante la exposición al arsenito (Gráfica 3).

Al realizar el análisis de correlación entre el GSH y la cantidad de TBARS, observamos una correlación positiva (R^2 se aproxima a 1.0) mostrándonos que existe una variación directa entre la cantidad de TBARS y el GSH dosis dependiente.

Cabe mencionar que el análisis muestra una mayor cantidad de lipoperóxidos en el tejido y un incremento en la cantidad del tripéptido antioxidante (GSH) lo que nos sugiere síntesis *de novo*.

Cuando correlacionamos la cantidad de lipoperóxidos intracelulares y la cantidad de GSH hepático en los cultivos expuestos a BSO (Gráfica 4) observamos que existe una variación indirecta entre la cantidad de TBARS y el GSH. Es decir, el incremento en la cantidad de ROS, en los hepatocitos expuestos a arsenito y BSO

no permite restituir significativamente las concentraciones de GSH en las concentraciones evaluadas.

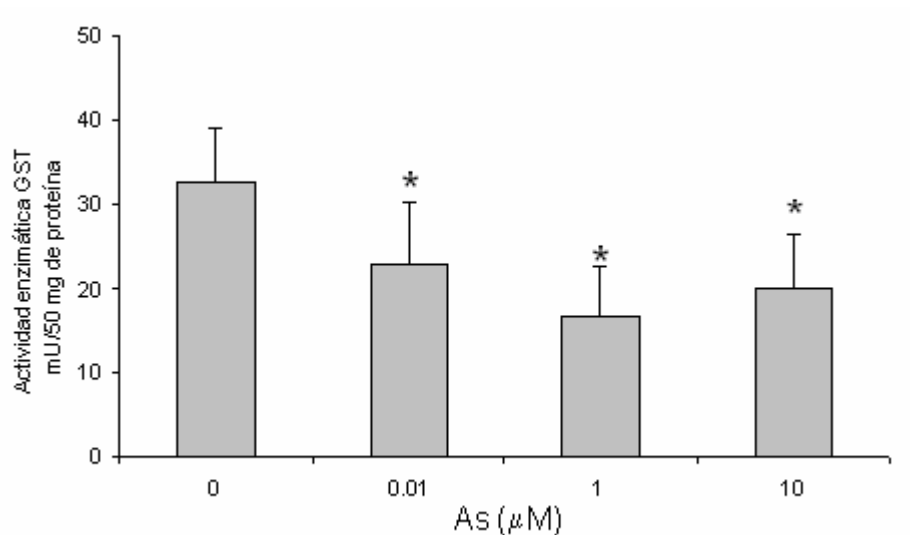


Parámetro	Mínimo	Máximo
Glutación	$X_2 = 1.8569$	$X_1 = 3.3859$
Lipoperoxidación	$X_1 = 3.368$	$X_2 = 1.90$

Gráfica 4. Correlación entre GSH y lipoperoxidación en cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsenito y BSO en forma conjunta. Análisis matemático de las líneas de tendencia (Curvas polinómicas de tercer orden).

El análisis polinómico muestra que el comportamiento de estas dos variables no muestra una tendencia similar sino opuesta (Gráfica 4), puesto que en la menor concentración de GSH celular se observa la mayor cantidad de lipoperoxidos.

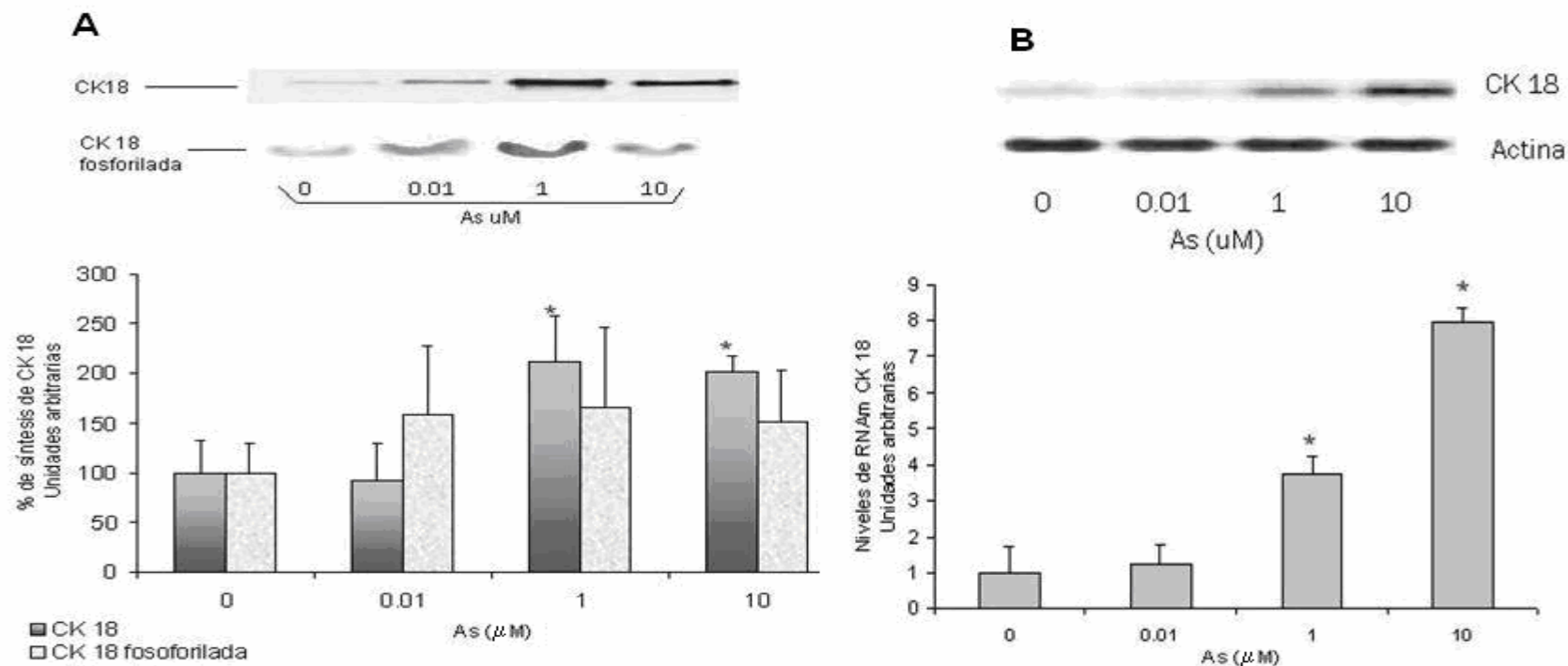
Una vez que evaluamos de manera parcial el estado óxico-reducción en los cultivos organotípicos de hígado expuestos a arsenito de sodio mediante la cuantificación de las concentraciones de GSH y TBARS, en presencia de BSO y NAC, consideramos importante evaluar la actividad enzimática de la GST, proteína importante en los mecanismos de desintoxicación celular y de biotransformación del arsénico.



Gráfica 5. Efecto del arsenito de sodio sobre la actividad enzimática de la Glutación-S-transferasa (GST) en cultivos organotípicos de hígado de ratón. Las barras representan el promedio de cultivos por triplicado. * Denota diferencias significativas con respecto al control.

Nuestros resultados muestran que la exposición al As_i inhibió significativamente la actividad de la GST en las concentraciones de 0.01 a $10\mu\text{M}$ (gráfica 5), posiblemente por disminuir las concentraciones intracelulares de GSH (Gráfica 2). Nuestros resultados corroboran reportes previos (Thomas et al., 2001).

Una vez evaluados los parámetros anteriores y después de comprobar que el arsenito de sodio modifica significativamente el estado óxido-reducción en los cultivos organotípicos de hígado de ratones BALB/c, nos preguntamos si estos efectos celulares podrían modular la síntesis y expresión de CK18.

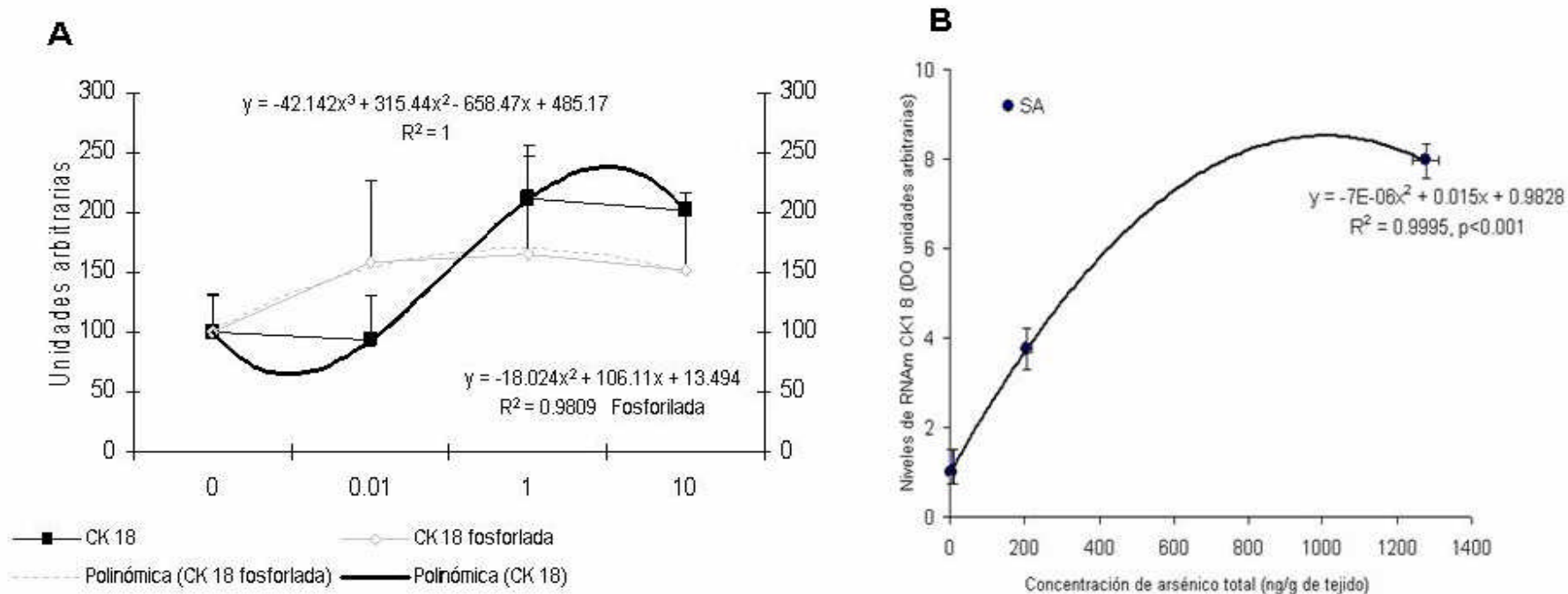


Gráfica 6. Efecto del arsenito sobre la síntesis de y expresión de CK 18 en cultivos organotípicos de hígado de ratón. Las barras denotan el análisis densitométrico realizado a dos cultivos distintos por triplicado. * Denota diferencia significativa con respecto al control. A) Análisis de la síntesis de CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada por medio de Western-Blott. B) Análisis de la expresión génica de CK 18.

Los resultados muestran un incremento en la síntesis de la CK 18 en el hígado expuesto a As_i , teniendo la mayor síntesis proteica en la concentración intermedia de los cultivos tratados, aunque no pudimos apreciar un incremento significativo con respecto al control en la cantidad de CK 18 fosforilada, si se observa una tendencia a incrementarse en todos los tratamientos con As_i , y al considerar los análisis previos (gráficos 1, 2 y 5) en conjunto nos sugieren una correlación significativa importante entre ellos ya que es posible apreciar una variación en la cantidad de estrés oxidativo generado en los tratamientos, lo que repercutió en la síntesis y en la cantidad de CK 18 y CK 18 fosforilada, respectivamente (Gráfica 6A). En estudios previos se ha reportado que la fosforilación de esta proteína se presenta en el hígado como consecuencia de modificaciones postranscripcionales asociadas a diversos fenómenos celulares entre los que destacan el estrés mecánico y el estrés oxidativo inducido por sustancias hepatotóxicas tomando como antecedente estos hallazgos; nuestros resultados muestran que a consecuencia del estrés oxidativo generado en el hepatocito se incremento tanto la fosforilación como la síntesis de la CK18.

Una vez que conocimos que la síntesis estaba modificada por arsenito, esto abrió la puerta para suponer que el incremento de la proteína pudiera ser por un incremento en la expresión del gen, por lo que estudiamos como estaban los niveles de mRNA CK18 en los hepatocitos. Obtuvimos un incremento de manera dosis dependiente, siendo significativo a partir de $1 \mu M$ (Gráfica 6B). Lo que nos indicó que el incremento en la síntesis de la proteína obtenido por Wester-Blott estaba relacionado de manera directa por un incremento en la transcripción del gen.

Con base en los resultados previos que indicaban que la síntesis de CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada estaban aumentadas en los tratamientos con arsenito, además de observar que existía una modificación en la expresión del gen, era interesante evaluar si los datos obtenidos seguían un patrón en común, por lo que se estudió si existía alguna relación matemática.

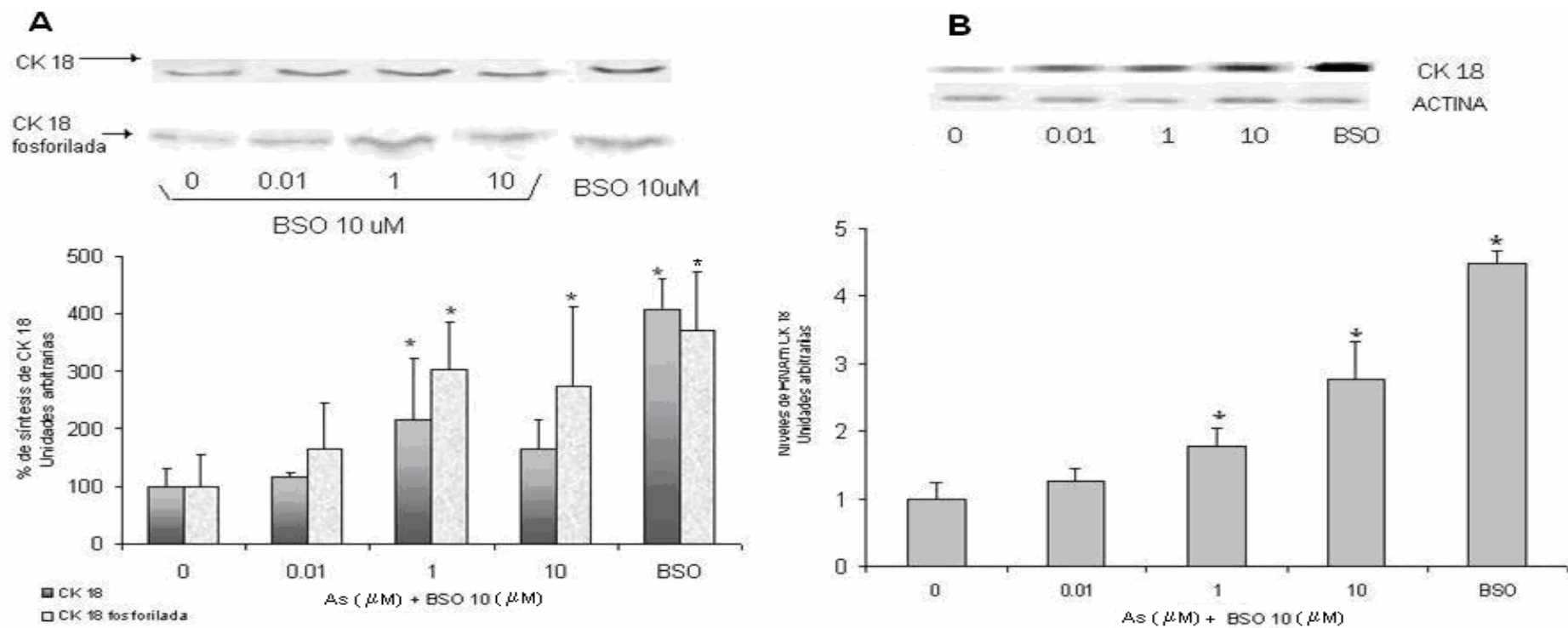


Gráfica 7. **A)** Correlación entre la síntesis CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada en cultivos organotípicos de ratón tratados con arsenito de sodio por tres horas. **B)** Correlación entre las concentraciones de mRNA para CK18 y la cantidad de arsenito intracelular y sus metabolitos, cuantificado en el hígado.

Aunque los gráficos no presentan líneas de tendencia similares, se observa que el incremento en la CK18 así como el aumento en la cantidad de la CK 18 fosforilada comienzan desde la concentración más baja de arsenito, lo cual es indicativo de una respuesta celular a estrés por parte del hepatocito y concuerda con los datos anteriores (Gráficas 1 y 2) obtenidos que nos indican un incremento de estrés oxidativo en estas células.

Con los resultados anteriores nos cuestionamos si las concentraciones en la expresión del mRNA para la CK 18 tendría alguna correlación directa con la cantidad de arsenito de sodio intracelular total cuantificada en los hepatocitos, se observa que la correlación que presentan estos factores sigue una curva de segundo orden, que a pesar de que la correlación no es lineal si sigue un patrón en cuanto a respuesta en la expresión del gen, teniendo una activación en la expresión del gen conforme se aumenta la dosis de arsenito y posteriormente una disminución en la cantidad posiblemente por el aumento en el resto de los sistemas antioxidantes.

Con la finalidad de conocer si la modificación del equilibrio óxido-reductor en las células modificaba la síntesis de CK18 y la expresión del gen para la CK18 se realizaron cultivos expuestos a arsenito de sodio y BSO.

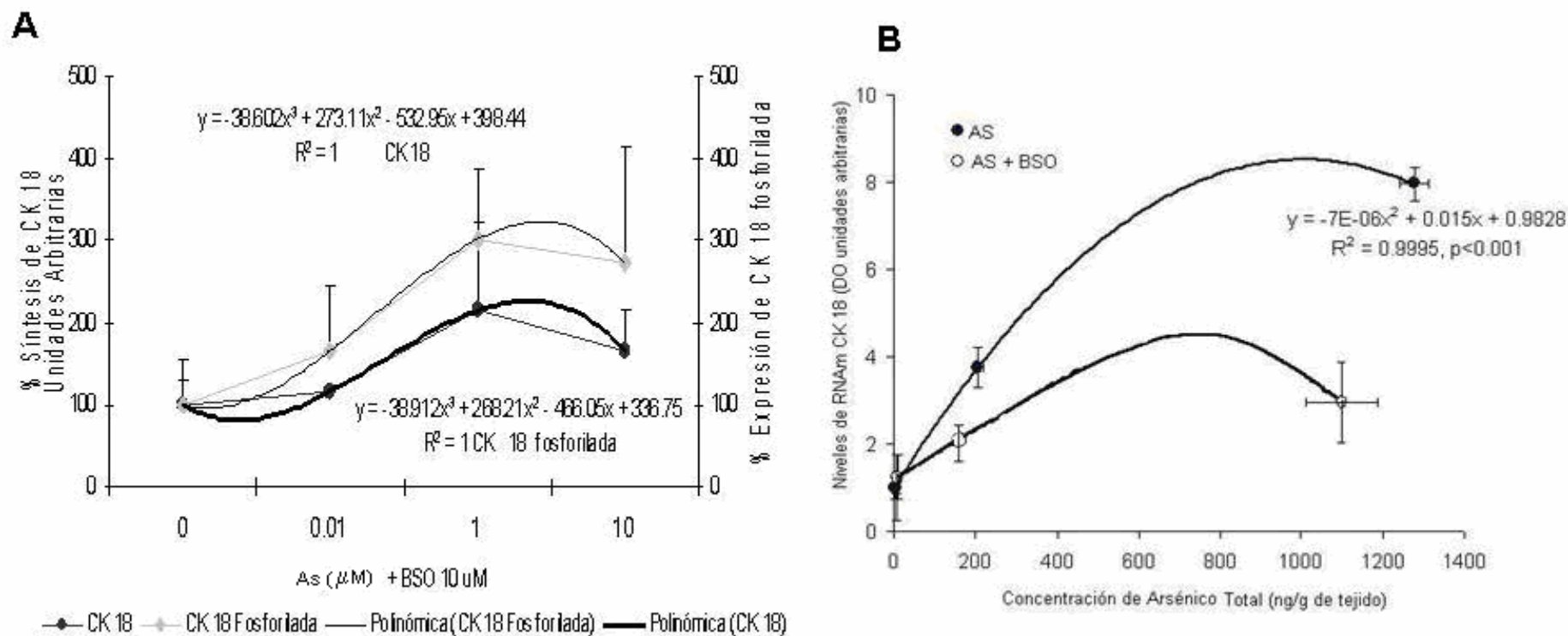


Gráfica 8. Efecto del arsenito de sodio sobre la síntesis de CK 18 en cultivos organotípicos de hígado de ratón. Las barras representan el promedio de dos cultivos por triplicado. * Denota diferencias significativas con respecto al control. A) Análisis de la síntesis de CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada por medio de Western-Blott. B) Análisis de la expresión génica de CK 18.

Al realizar el análisis de síntesis de CK 18 en los cultivos tratados con BSO y arsenito en forma conjunta, obtuvimos un incremento considerable en la síntesis de esta proteína en las concentraciones más altas utilizadas, siendo significativa en la concentración de 1 μM , así como en los tratamientos con BSO sólo. Además, los datos indican una modificación en la cantidad de la CK 18 fosforilada en todos los tratamientos expuestos a arsenito de sodio y BSO en forma conjunta siendo significativo a partir de la concentración de 1 μM , lo que es indicativo que el incremento en la proteína tiene que ver con una modificación en el equilibrio redox intracelular del hepatocito (Gráfica 8 A).

Con base a los resultados anteriores, se llevó a cabo el análisis en la expresión del gen. Al realizar el análisis de la expresión génica para la CK18 en los tratamientos con BSO observamos un incremento de manera dosis dependiente en todos los tratamientos (Gráfica 8 B), que al relacionarlo con nuestros datos anteriores observamos que el aumento en la cantidad de estrés oxidativo da como resultado una respuesta celular dirigida a la activación del gen para esta proteína.

Una vez conocidos los patrones de síntesis de la CK 18 y dado que nuestros datos mostraban una correlación entre la expresión del gen para CK 18 y la cantidad de As_i, y sus metabolitos a nivel intracelular (Gráfica 7B), nos interesaba conocer si esta misma correlación se presentaba al tratar a los hepatocitos con el arsenito y el BSO en forma conjunta.



Gráfica 9. **A)** Correlación entre la síntesis de CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada y **B)** Correlación entre los concentraciones de mRNA para la CK18 y la concentración de As total en cultivos organotípicos de hígado de ratón después de 3 horas de tratamiento con arsénico y BSO en forma conjunta, el análisis matemático de la línea de tendencia nos muestra una curva polinómicas de segundo orden.

Los resultados arrojados nos muestran que en ambos casos los gráficos siguen un comportamiento de tercer orden, tanto la expresión de CK 18 como la cantidad de CK 18 fosforilada tienen la misma tendencia (Gráfico 9A). Lo que nos estaría indicando fenómenos celulares distintos que el hepatocito está llevando a cabo para la adaptación al estrés en el medio, para el caso de la CK18 es indicativo de un posible aumento en la síntesis de la proteína y en el caso de la CK 18 fosforilada un aumento en la fosforilación del a.a. (detectado por el anticuerpo) por proteína cinasas lo que desencadenaría la activación de diversas rutas de señalización. Con estos resultados y los anteriores obtenidos demostramos cómo un cambio en la variación del sistema redox afecta la síntesis de la CK 18 drásticamente.

Además, se puede observar que la correlación que presentan los tratamientos con arsenito y BSO siguen curvas de segundo orden (Gráfica 9B), como lo es el caso de los cultivos tratados con arsenito únicamente (Gráfica 7B), sin embargo esta tendencia se ve modificada con los tratamientos con BSO ya que se puede apreciar una ligera disminución en la concentración de la sumatoria del As_i , y sus metabolitos, con una disminución en la expresión del mRNA para la CK18.

Para todos los tratamientos fue necesario evaluar de inicio si existía una modificación en la viabilidad y la capacidad de biotransformación del arsenito de los cultivos. Por lo cual al iniciar la segunda parte de nuestro trabajo, la cual consistió en conocer el efecto que tenía el utilizar el antioxidante NAC en los hepatocitos tratados con arsenito de sodio, fue necesario empezar con la evaluación de estos parámetros.

Tabla 6. Cuantificación de potasio intracelular

As (μ M)	mol de K^+ /g de tejido	error estándar
0	315.41	56.44
0.01	506.04	97.41
1	361.42	33.31
10	431.29	81.69
NAC	617.88	51.42

Para todos los tratamientos se obtuvieron valores superiores a 100 μmol de K^+ /g de tejido, indicando que los cultivos tienen una buena viabilidad.

El patrón de biotransformación del arsénico a sus metabolitos monometilados y dimetilados se modificó considerablemente en presencia de NAC observando que el metabolito predominante obtenido fue dependiente de la dosis utilizada del metaloide.

Tabla 7. Concentración de especies arsenicales (ng/g de tejido) presentes en los cultivos organotípicos de hígado de ratón después de 3 horas de exposición previa a As_i , y 2 horas con NAC.

As (μM) + NAC 2.5mM	As I	MMA	DMA	As Total
0	7.22 ± 0.6	>1	>1	7.22 ± 0.6
0.01	8.25 ± 0.786	>1	>1	8.25 ± 0.7
1	13.99 ± 1.7	>1	>1	13.99 ± 1
10	80.023 ± 85	5.24 ± 8	4.54 ± 5	77.61 ± 93

Después de realizar la especiación de los arsenicales hepáticos, pudimos apreciar que con el NAC la biotransformación del arsenito se modifica de manera evidente, ya que sólo obtuvimos especies metiladas en la concentración más alta de As_i , por otro lado se observa que la concentración intracelular de los arsenicales es menor con respecto a la exposición única de As_i , (Tabla 4).

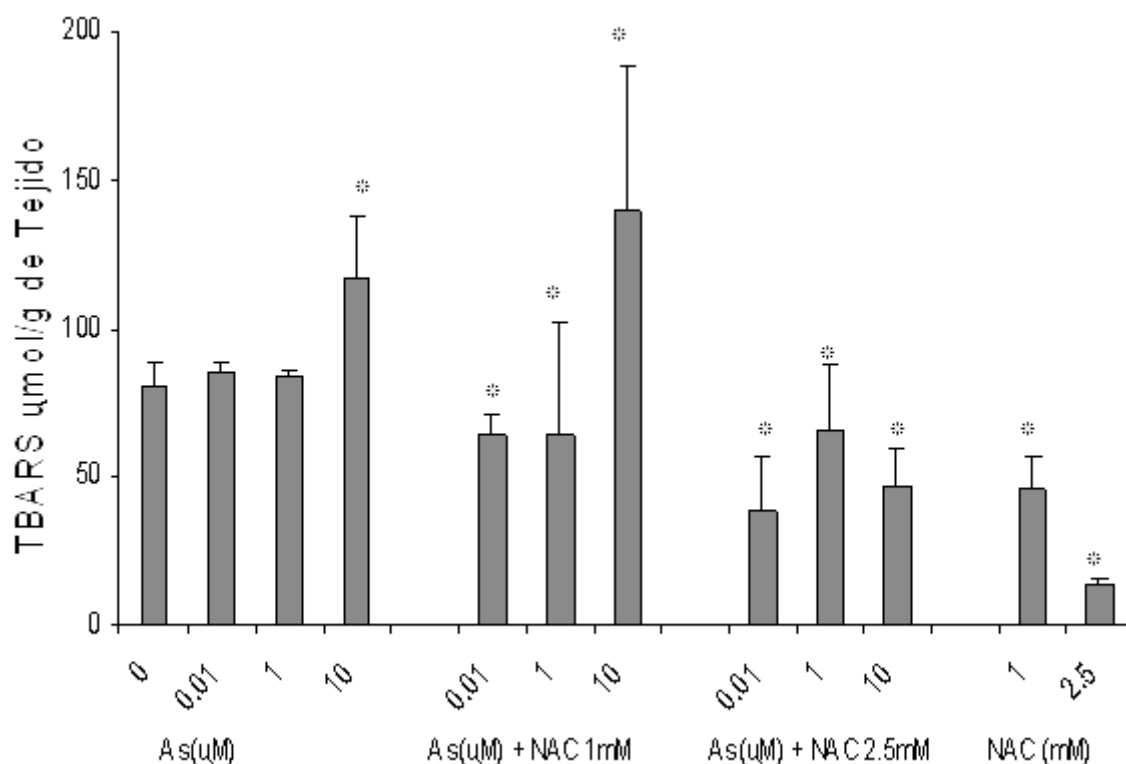
Teniendo en cuenta los resultados anteriores nos preguntamos cual sería la concentración necesaria del antioxidante para que, por una parte demostrar que el proceso de biotransformación se puede seguir llevando a cabo sin que el NAC afecte la actividad metabólica intracelular, por lo cual se realizó un cultivo manejando la concentración de 1 mM de NAC.

Tabla 8. Cuantificación de especies arsenicales (ng/g de tejido) presentes en los cultivos organotípicos de hígado de ratón después de 3 horas de exposición con As_i , y 2 horas con NAC 1 mM.

As (μM) NAC 1 mM	As I	MMA	DMA	As Total
0	7.22 ± 0.6	>1	>1	7.22 ± 0.6
0.01	16.275 ± 0	>1	>1	16.275 ± 0
1	59.29 ± 6	2.39 ± 4	>1	81.76 ± 2
10	64.65 ± 30	6.26 ± 4	9.3 ± 2	87.22 ± 30

Los datos de la tabla 8 nos indican que la concentración en la cual se pueden encontrar especies monometiladas manejado concentraciones pequeñas de arsénico, es de 1 mM de NAC, quedando demostrado que el proceso de biotransformación del arsenito no se es afectado por el NAC en esta concentración.

Uno de los objetivos del trabajo fue evaluar si la exposición a As_i conjuntamente con NAC produjo estrés oxidativo, por lo que también se cuantificó la concentración de TBARS generadas en los cultivos tratados con el antioxidante.



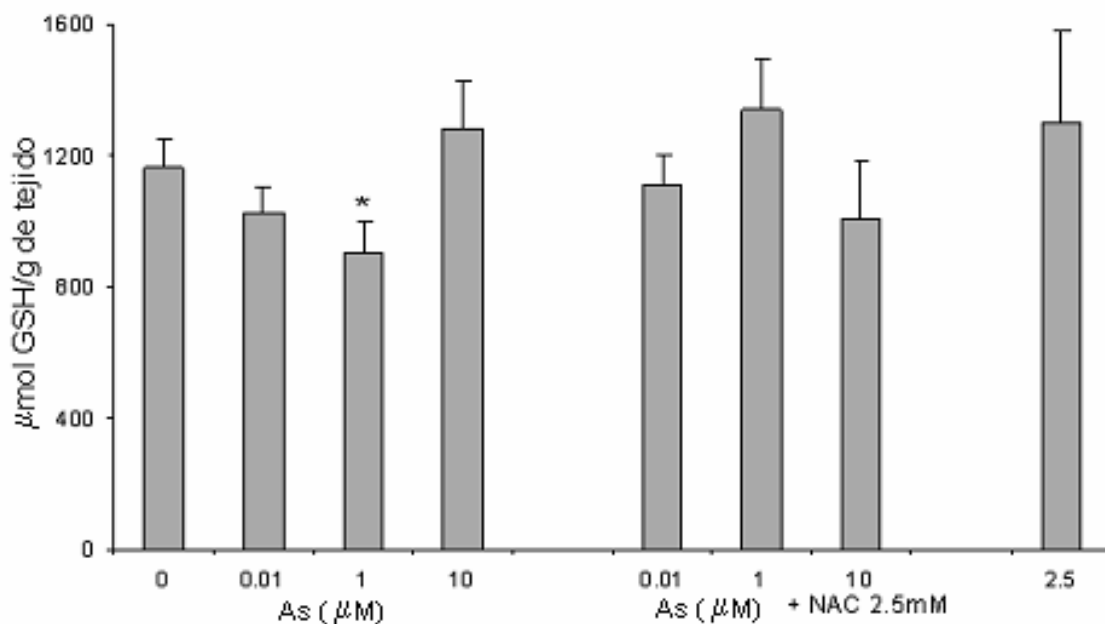
Gráfica 10. Concentraciones de TBARS en cultivos orgaotípicos de hígado de ratón tratados con arsenito de sodio y NAC en forma conjunta después de 5 horas de tratamiento con exposición previa al arsenito. Las barras representan el promedio de cultivos por triplicado.

* Denota diferencias significativas con respecto al control.

En la Gráfica 10, se puede apreciar que debido a la naturaleza antioxidante del NAC la cantidad de TBARS disminuyó de manera significativa en todos los tratamientos con NAC, lo que nos sugirió una disminución en el estrés oxidativo intracelular. Además nos mostró que la concentración en donde obtendríamos el mayor efecto en la modificación de lipoperóxidos fue con 2.5 mM de NAC por lo que se decidió seguir nuestro trabajo únicamente con esta concentración de antioxidante.

Después de demostrar que el tratamiento con NAC disminuyó las concentraciones de TBARS en los hepatocitos era importante estudiar que efecto tenía este antioxidante sobre las concentraciones de GSH, demostrando de esta manera que

el estrés oxidativo generado en los cultivos disminuía teniendo en cuenta los datos arrojados en la cuantificación de lipoperóxidos.

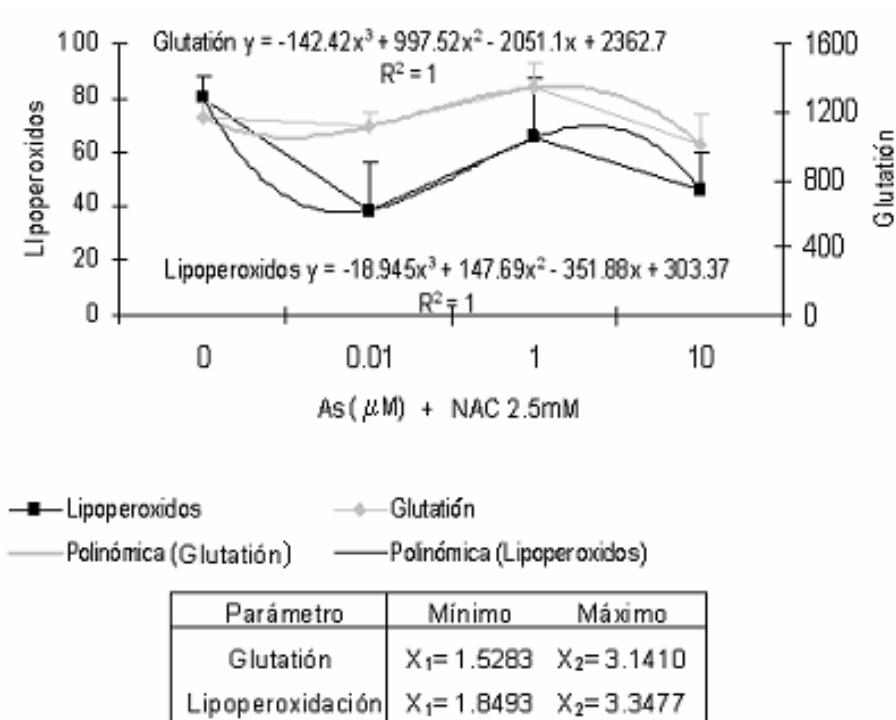


Gráfica 11. Glutati3n reducido en cultivos organot3picos de h3gado de rat3n tratados con diferentes concentraciones de Ars3nico y NAC 2.5 mM en forma conjunta. Las barras representan el promedio de cultivos por triplicado.

* Denota diferencias significativas con respecto al control.

Los datos de la Gr3fica 11 muestran que en todos los tratamientos con Arsenito y NAC la concentraci3n de GSH no presenta diferencias significativas con respecto al control.

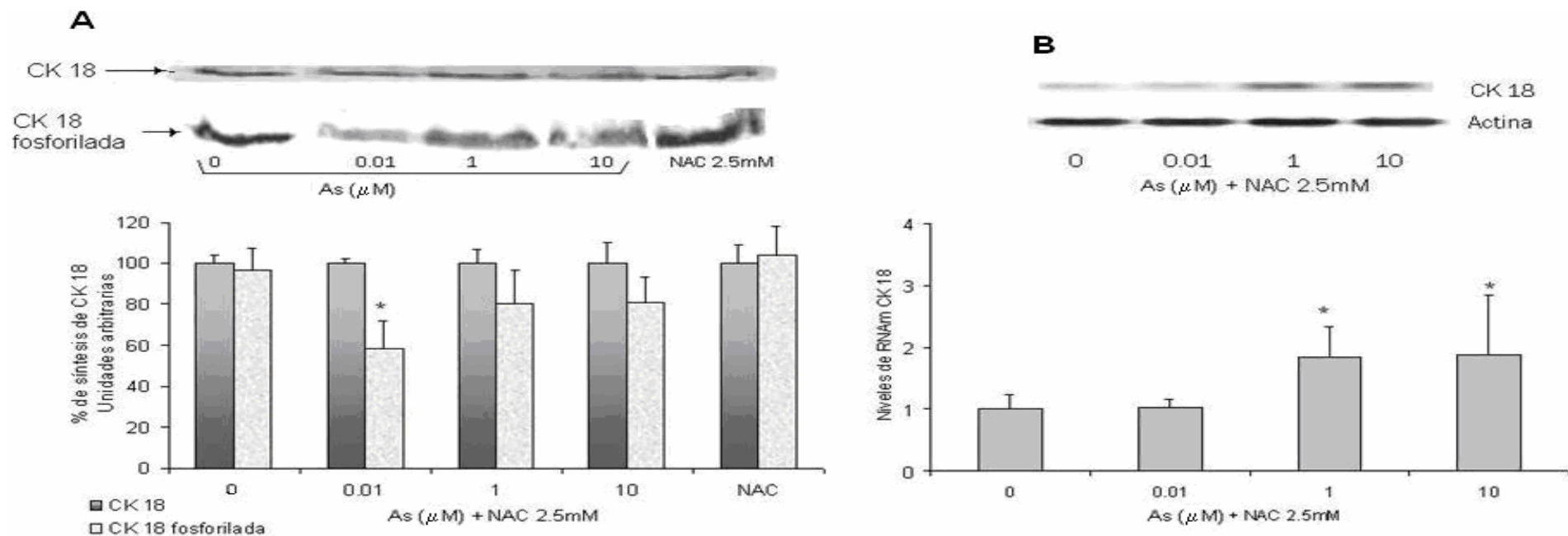
Para demostrar la relación entre la generación de TBARS en presencia de arsenito y NAC se calculó la correlación entre GSH y TBARS.



Gráfica 12. Correlación entre GSH y lipoperoxidación en cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsenito por tres horas y NAC dos horas más posterior a la exposición de arsenito (en forma conjunta). Análisis matemático de las líneas de tendencia.

Al correlacionar dos valores relacionados entre sí como lo es el GSH y la cantidad de TBARS, los resultados nos muestran patrones similares de respuesta celular (Gráfica 12), estos datos nos indican que cuando existe una mayor cantidad de lipoperóxidos también existe un incremento en la cantidad de GSH, ya sea por un aumento en la síntesis de esta molécula, por la habilidad del NAC de ser un posible precursor del péptido o bien por la respuesta de diferentes sistemas antioxidantes que responde a esta modificación en la cantidad de lipoperóxidos, además al calcular los puntos de inflexión estos son muy cercanos como se muestra en el recuadro de la Gráfica 12, indicando que las concentraciones teóricas en las cuales los hepatocitos montan estos cambios en la respuesta celular son muy similares, dejando en claro la correlación de estos parámetros.

Después de conocer que el NAC modificaba los diferentes factores evaluados como lo es el GSH y la cantidad de lipoperóxidos y que estos parámetros presentaban una correlación entre sí, se evaluó como estaba la síntesis de la CK 18 por medio de Western-Blott obteniendo los siguientes resultados.



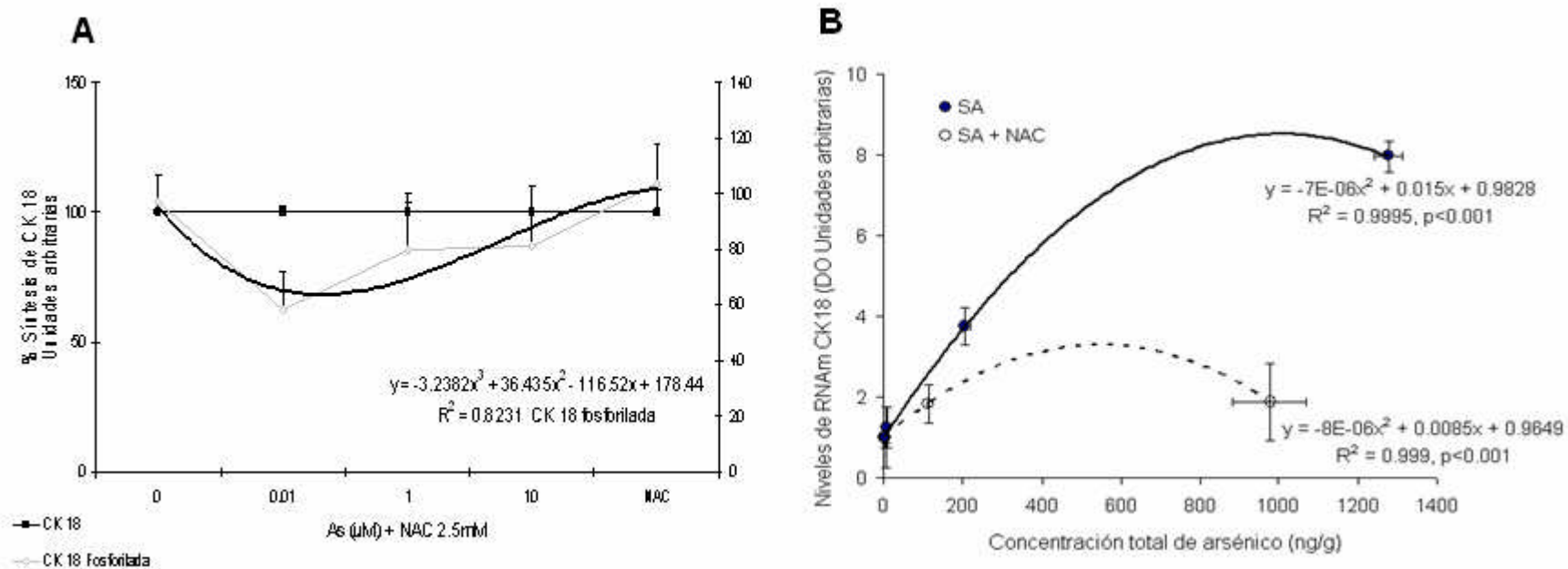
Gráfica 13. Efecto del arsenito de sodio sobre la síntesis de CK 18 en cultivos organotípicos de hígado de ratón expuestos a arsenito de sodio y NAC. Las barras representan el promedio de dos cultivos por triplicado. * Denota diferencias significativas con respecto al control. A) Análisis de la síntesis de CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada por medio de Western-Blott. B) Análisis de la expresión génica de CK 18.

Los datos de la Gráfica 13 nos muestran que el antioxidante disminuyó la cantidad de lipoperóxidos, modificó la cantidad de GSH y además cambió el patrón de metilación de As_i , todo esto repercutiendo en la síntesis de la CK 18 como lo muestran los resultados del Wester-Blott (Gráfica 13A). Estos datos indican que al tratar a los hepatocitos con NAC se alteró la síntesis de la proteína con respecto a los datos obtenidos con arsenito de sodio únicamente (Gráfica 6)

De manera similar podemos observar que el NAC afectó la cantidad de la CK 18 fosforilada, obteniendo una disminución en la cantidad de CK 18 fosforilada en todos los cultivos tratados con arsenito, siendo significativa únicamente en el tratamiento de 1 μ M de As_i . Dado que se ha reportado que la fosforilación de las CKs es un fenómeno de respuesta a estrés (Fausther et al., 2004), estos datos nos sugieren en forma conjunta con las Gráficas 10, 11 y 13 que efectivamente el NAC es capaz de reducir los efectos tóxicos del arsenito de sodio.

Aunque el aumento en la expresión de la CK 18 en los hepatocitos tratados con NAC no disminuyó totalmente, que es lo que se pudiera esperar, ya que al observar la Gráfica 13 B los concentraciones de la proteína no están alterados con el antioxidante, entonces las concentraciones en la expresión tampoco debieran estar modificados, si se observa una disminución con respecto a los tratamientos expuestos a arsenito solo (Gráfica 10), lo que nos demuestra que el NAC, al disminuir el estrés oxidativo en los hepatocitos, está modulando la transcripción del gen de la CK 18, quedando demostrado con las Gráficas 6, 8 y 13, en donde observamos que al variar el sistema redox intracelular los hepatocitos montan una respuesta celular que nuestros datos indican es dirigida hacia la expresión del gen de la CK 18.

Finalmente con los resultados anteriores era interesante analizar si la correlación entre la expresión de CK18 y la cantidad de arsenito de sodio total en los hepatocitos expuestos a NAC se modificaba con respecto al análisis obtenido con el metaloide exclusivamente (Grafica 10).



Gráfica 14. **A)** Correlación entre la síntesis de CK18 y la cantidad de CK 18 fosforilada y **B)** correlación entre la expresión del mRNA para CK18 y la cantidad de arsenito de sodio total intracelular en cultivos organotípicos de hígado de ratón tratados con Asi y NAC en forma conjunta. El análisis matemático de las líneas de tendencia nos muestra curvas polinómicas de segundo orden.

Se puede apreciar que la correlación entre la síntesis y la cantidad de la CK 18 no es directa como lo muestra la Gráfica 14A, nos indica una disminución en el estrés oxidativo generado en los hepatocitos y lo cual se demostró por la cuantificación en los Western-Blott de la CK18. En la Gráfica 14B se muestra que el NAC disminuyó la concentración intracelular de arsenicales, pero además modificó la curva de correlación entre los parámetros estudiados, si bien el grafico sigue el mismo orden se observa que el NAC afecta la tendencia dejándola más lineal lo que nos estaría indicando una posible disminución del estrés generado por el arsenito permitiendo a los hepatocitos regresar a los concentraciones basales del gen de CK 18.

Nuestra hipótesis postulaba la relación del daño oxidativo inducido por la exposición al arsenito de sodio y modificaciones en la síntesis y expresión de CK18 (Gráfica 6). El aumento de TBARS (parámetro indicativo del daño oxidativo) inducido por los efectos tóxicos del arsenito y las correlaciones correspondientes entre TBARS y GSH después de una exposición del hepatocito al As_i presencia o ausencia de BSO y NAC; así como las determinaciones de la actividad de GST muestran que los concentraciones de expresión y síntesis de la CK18 son modulados por el estado óxido-reducción en el tejido (Gráficas 7,10 – 13).

Consistente con nuestra hipótesis de trabajo, observamos que la incubación de hígado con diferentes concentraciones de arsenito de sodio incrementa significativamente los concentraciones de mRNA para CK18. Esta inducción correlaciona con los concentraciones intracelulares de arsénico total (Gráfica 7A). Los resultados mostraron que el antioxidante NAC inhibe significativamente la inducción de mRNA para CK18 y su síntesis, sin modular la expresión basal del mRNA y la proteína correspondiente (Gráfica 13).

La presencia de As_i y sus metabolitos se modifica claramente por adición de NAC. La regresión lineal cuadrática muestra un efecto dosis dependiente en los cultivos expuestos a NAC y los concentraciones de mRNA para CK18 (Gráfica 14B).

Observamos que la cantidad de arsénico total se redujo ligeramente en las exposiciones con NAC (Tablas 6 y 7) reduciendo la formación de especies metiladas de manera similar a lo observado por Santra et al., 2007.

CAPÍTULO IX

DISCUSIÓN

En este trabajo estudiamos la síntesis y expresión de CK 18 y su asociación con el estrés oxidativo generado por exposición de cultivos organotípicos a arsenito de sodio, por lo que investigamos como los concentraciones de esta proteína y la expresión del mRNA en cultivos organotípicos tratados con bajas concentraciones de arsenito de sodio, se modificaban bajo diferentes condiciones oxido-reductoras inducidas por NAC y BSO.

Las CKs forman parte de la red de los filamentos intermedios realizando una variedad de funciones celulares importantes incluyendo división celular, motilidad, mantenimiento de la integridad mecánica, respuesta a estrés y transporte, entre otras funciones celulares, además de jugar un papel esencial como guardianes hepáticos después de la exposición a agentes ambientales (Omary et al., 2002).

La función y estructura anormal de estos filamentos intermedios es de nuestro interés en el grupo de trabajo. Existen evidencias que muestran que modificaciones en la estructura, síntesis y expresión de la CK18 en el hígado, pone en riesgo la funcionalidad del órgano por alteraciones en el estado óxido-reducción.

En estudios previos reportamos el daño celular inducido por arsenito de sodio reflejado en la modificación, síntesis y estructura de la proteína en hepatocitos fetales humanos (Ramírez et al., 2000).

El cultivo organotípico viable y con capacidad biotransformante para el arsenito de sodio en el hígado (Tablas 2 y 3) nos permitió conocer la modulación por estrés oxidativo del gen de CK18 después de la exposición a este metaloide (Gráfica 6).

Los resultados mostraron que la síntesis y expresión de la CK18 pueden ser considerados como indicadores de daño temprano asociado a la toxicidad del arsénico en el hígado ya que estos efectos celulares se incrementan cuando el

hepatocito sufre exposiciones tempranas al metaloide (Gráficas 6 A y B). Modificaciones en las condiciones óxido-reductoras en el medio de cultivo mediante la exposición de los cortes a NAC favorecieron la inhibición significativa del incremento en la síntesis (hasta 2 veces) y expresión de la CK18 (Gráficas 13 A y B). La capacidad antioxidante de NAC nos sugiere una relación importante entre el estado óxido-reductor en el medio y la modulación de la transcripción del gen codificante para CK 18. Existen evidencias que muestran que NAC inactiva eficazmente a los radicales libres celulares protegiendo a la célula contra el daño oxidativo (Da Flora et al., 2001, Gustafsson et al., 2005).

Un efecto protector fue observado al cuantificar la concentración de lipoperóxidos así como modificaciones en la concentración de GSH se observaron al utilizar NAC. En estudios previos ha quedado de manifiesto este hecho (Da Flora et al., 2001, Morley et al., 2003), lo que concuerda con nuestros resultados (Gráfica 10), es importante señalar que en el caso de los cultivos tratados con NAC sin arsenito, las concentraciones de lipoperoxidación disminuyeron aún más que nuestros controles, esto probablemente debido a que el antioxidante regula la expresión de genes relacionados con otros sistemas antioxidantes como ya ha sido reportado previamente (Gustafsson et al., 2005). Además el efecto protector del NAC en la síntesis y expresión de la CK 18 fue claro ya que las concentraciones de estos parámetros prácticamente quedaron iguales a los de nuestro control confirmándonos que el estrés oxidativo generado por el arsénico puede modular la expresión del gen en los hepatocitos (gráfico 13 y 14).

Por otro lado, se ha reportado que el NAC disminuye la presencia intracelular de arsenicales al incrementar su eliminación del hepatocito (84, 85, 86, 87), siendo esta capacidad probablemente uno de los eventos más importantes en la adquisición de tolerancia al metal (Wang et al., 1993, Romach et al., 2000, Lui et al., 2001). La presencia de NAC en los cultivos organotípicos disminuyó la concentración intracelular del As_i y sus metabolitos (Tabla 6), lo que sugiere la posibilidad de que por la elevada afinidad que presentan los arsenicales trivalentes a residuos sulfhidrilo, parte de las especies arsenicales

intracelulares se hayan unido a NAC evitando así su contacto directo con las células hepáticas.

Se ha considerado al tiol NAC como un poderoso agente antioxidante quimioprotector en el tratamiento contra el cáncer, actuando a través de una variedad de mecanismos, incluyendo sus propiedades nucleofílicas y propiedades antioxidantes. El papel modulador del estado óxido-reducción celular por NAC se ha demostrado *in vitro* cuando fibroblastos de piel crecían en medio suplementado con 5 mM de NAC, incrementándose la síntesis de GSH intracelular (Emonet et al., 1997).

El cultivo organotípico de hígado de ratón fue capaz de biotransformar el arsenito de sodio a especies metiladas sin poner en riesgo la integridad celular hepática, sería interesante conocer si la expresión de CK18 guarda alguna relación específica con las especies pentavalentes o trivalentes del metaloide.

Las evidencias nos muestran que durante la biotransformación del arsénico la generación de ROS creadas por la reducción de formas pentavalentes de arsénico y la metilación oxidativa de sus formas trivalentes causan daño celular (Yamanaka et al., 1991, Kitchin et al., 2001).

Nuestro trabajo mostró que la reducción en la concentración intracelular de estas especies reduce la posibilidad de incrementar la síntesis y expresión de CK18 asociada con la exposición a arsenito (Gráfica 10 y Tabla 7). Eventos relacionados se han observado en células de vejiga de rata ya que la presencia de NAC inhibió significativamente la citotoxicidad de los metabolitos del As_i (MMA, DMA y TMAO), (Ding et al., 2005, Kojima et al., 2006).

Los resultados obtenidos demuestran que la exposición al arsenito de sodio favorece la modificación transcripcional de la CK 18 además, la modificación del estado redox por exposición a NAC y BSO (Gráficas 1, 2, 10 y 11) modula esta respuesta (Gráficas 6, 8, 9, 13 y 14).

Los efectos óxido-reductores en el hígado también modificaron la síntesis de CK 18 fosforilada. Su síntesis durante la exposición al arsenito puede estar encaminada a desencadenar respuestas para proteger al hepatocito contra la toxicidad del arsénico como ha sido reportado en estudios anteriores con diversos agentes tóxicos (Porter et al., 2003). Existen reportes que asocian este tipo de modificaciones postranscripcionales, con una hiperfosforilación de queratinas con el estrés oxidativo inducido en cultivos celulares, modelos animales y humanos (4). Nuestros resultados muestran que el As_i fue capaz de incrementar no sólo la síntesis y expresión de CK 18 sino también la cantidad de CK 18 fosforilada (Gráfica 6 A y B). Consideramos que estos resultados son importantes ya que evidencias previas muestran que la fosforilación de los filamentos intermedios favorece su reorganización mediante despolimerización y polimerización, mecanismos celulares indispensables en la dinámica de los filamentos en el citoesqueleto, lo que favorece la reorganización celular durante el estrés celular inducido por agentes tóxicos y durante la mitosis (Toivola et al., 2002, Fausther et al., 2004). No queda duda que la CK18 es una proteína blanco celular importante en la toxicidad aguda inducida por el As_i .

Entre los diversos mecanismos probables de toxicidad del As_i se encuentra la oxidación de pequeñas moléculas con grupos sulfhidrilos como el GSH (Bramblia et al., 2002, Kojima et al., 2006), oxidación de proteínas e inhibición de enzimas que contienen grupos sulfhidrilo indicando la alta reactividad del metaloide para inhibir diversas enzimas importantes en los procesos de detoxificación de agentes químicos, dentro de las que se encuentra la GST (Hei et al., 1998, Filippova et al., 2003). El GSH es un antioxidante no enzimático endógeno que juega un importante papel en la protección de las células contra el estrés oxidativo, desintoxicación de compuestos químicos y peróxidos (Anderson et al., 1997, Schoen et al., 2004), además de funcionar como sustrato para la GST y la GPx. Se ha reportado que una disminución en la concentración intracelular del tripéptido (Gurusamy et al., 2004) incrementó el efecto tóxico y clastogénico del arsenito (Oya-Otha et al., 1996), así como algunos de los efectos oxidativos causados por la falta de este tiol (Scout et al., 1993). Nuestros resultados muestran una modificación en la concentración del GSH intracelular hepático al ser expuesto al As_i y que esta modificación puede

ser atribuida en parte a las propiedades antioxidantes del GSH o bien, a la estrecha relación en el metabolismo del As_i , específicamente la metilación de MMA a DMA (Anderson, 1998). Reportes previos indican que el arsenito de sodio es capaz de inhibir la actividad de diversas enzimas antioxidantes (afectando el equilibrio redox) entre ellas: la SOD, la catalasa (6) así como la GPx. (Rodríguez et al., 2005), nuestros resultados muestran que una inhibición significativa en la actividad enzimática de la GST ocurre a partir de $0.01 \mu\text{M}$ y hasta $10 \mu\text{M}$ de arsenito de sodio después de 3 horas de exposición y que esta inhibición puede ser atribuida a la ya mencionada reactividad del arsenito con los grupos sulfhidrilo de la enzima o bien a que esta enzima, así como sus isoenzimas, son altamente activas contra los aldehídos reactivos productos de la peroxidación. Los resultados arrojados en el presente trabajo nos muestran el efecto citoprotector del GSH sobre el hígado expuesto *in vitro* a arsenito, ya que el tratamiento con arsenito de sodio afectó tanto la concentración de GSH como de TBARS teniendo una correlación directa como lo muestra la Gráfica 3 en donde se observa una variación directa entre la cantidad de GSH y la cantidad de lipoperóxidos. En presencia de BSO y As_i se observó un incremento significativo en la acumulación intracelular de lipoperóxidos en todos los tratamientos comparados con el control, además se modificó la cantidad intracelular de GSH. La capacidad biotransformante se modificó considerablemente (Tablas 3, 5 y 6) y las especies metiladas disminuyeron considerablemente.

En estudios previos, el compuesto ha sido utilizado con la finalidad de inhibir selectivamente la síntesis del GSH así como para sensibilizar a células tumorales (Anderson et al., 1999), en estudios en embriones de ratones inhibiendo la síntesis de GSH con BSO hasta 20 mM causaron alteraciones genéticas irreversibles al perder fragmentos de DNA de hasta 70 kd (Morley et al., 2003). Nuestros resultados en conjunto nos indican un incremento en el estrés oxidativo generado en el hepatocito lo que repercutió tanto en la síntesis y expresión de la CK 18 así como en la cantidad de la CK 18 fosforilada (Gráficas 12 y 13, respectivamente), teniendo un aumento en todos los casos y sugiriendo que el aumento en la CK18 es una respuesta celular encaminada a mitigar la modificación del estado redox en los cultivos, pero además los

resultados nos indican que el aumento en la síntesis de la CK 18 es debido a una regulación transcripcional, ya que como se muestra en la Gráfica 15, el aumento en síntesis de la proteína está dado por el aumento en la expresión del gen y aparentemente esta modificación génica está sujeta a cambios en el estado redox del sistema.

Cabe mencionar que aunque en los hepatocitos tratados exclusivamente con BSO no se observó el mismo patrón en cuanto a la acumulación de lipoperóxidos y la modificación en el GSH, esto podría deberse a que los demás sistemas antioxidantes que el hepatocito tiene están modulando estos efectos, sin embargo, si se aprecia un aumento en la síntesis y expresión de la CK 18 lo que nos estaría sugiriendo que esta proteína está implicada en respuesta a la modificación del estado redox, por muy pequeños que estos sean.

El análisis matemático nos mostró que todas las correlaciones de GSH lipoperóxidos siguen una tendencia no lineal pero si polinómica, lo que sugiere la presencia de fenómenos celulares diversos en respuesta al estrés generado en cada tratamiento, además al derivar las ecuaciones y obtener los máximos y mínimos, los puntos de inflexión son muy parecidos, lo que nos muestra las concentraciones teóricas en las cuales los cultivos empiezan a articular estas respuestas celulares dentro de las que podrían incluirse respuestas de adaptación, supervivencia o muerte, entre otras. Por otro lado las curvas de correlación entre la síntesis de CK 18 y la cantidad de CK 18 fosforilada nos indican que un incremento en la cantidad de estrés oxidativo en el sistema desencadena el incremento en la síntesis de la proteína y un aumento en la fosforilación de la misma, como un mecanismo de defensa contra la toxicidad ejercida por el metaloide. Finalmente al analizar la expresión del gen para esta proteína, claramente se tiene una correlación entre la modificación del sistema redox en la célula y el aumento en la transcripción génica lo que nos lleva a sugerir que variaciones ligeras en el ambiente óxido-reductor de la célula desencadena la transcripción del gen para la CK 18 y con ello la traducción y síntesis de la proteína en respuesta a los efectos tóxicos del As_i.

CAPÍTULO XI

CONCLUSIONES

En base a los resultados del trabajo podemos concluir lo siguiente:

- La exposición a arsenito de sodio modifica la expresión y síntesis de la CK 18 en el hígado de ratones machos de la cepa BALB/c.
- El estrés oxidativo inducido por la exposición a el arsenito de sodio está asociado con la modulación en los concentraciones de CK y estos eventos celulares están asociados con el metabolismo óxido-reductor del metaloide.
- La modificación en el estado redox intracelular de los hepatocitos desencadena respuestas celulares encaminadas a modular la expresión y síntesis de la CK 18.
- Se puede considerar a la Ck 18 como un marcador de efecto temprano a exposiciones cortas de arsenito de sodio.
- Los resultados de este trabajo nos permitieron proponer un modelo acerca de los fenómenos celulares relacionados con la síntesis y expresión de la CK18 en el hígado y algunas vías de señalización que pueden modular estos efectos (Figura 8).

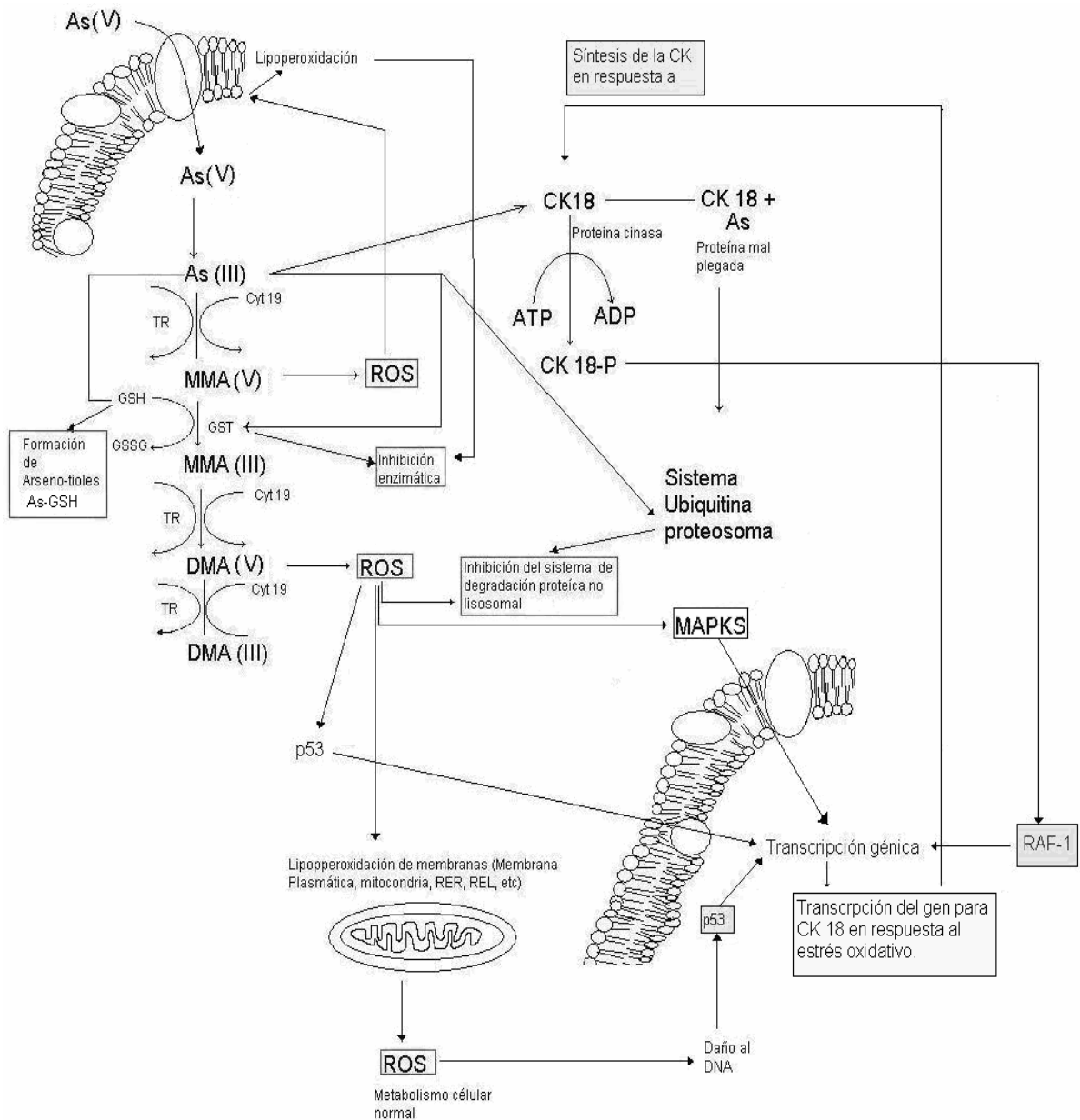
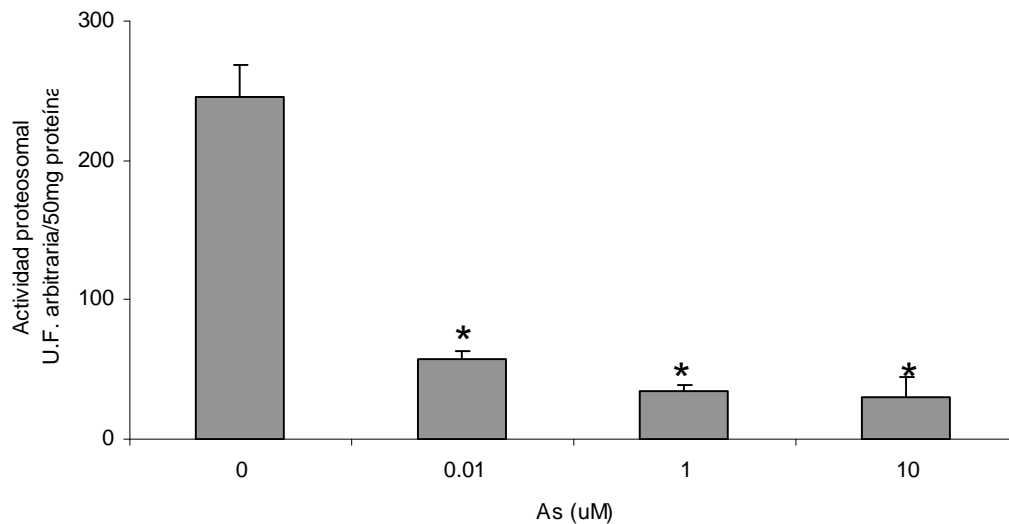


Figura 8. Posible forma en que la exposición a arsenito de sodio induce daño al hepatocito. ¿El incremento en la expresión del gen que codifica para la síntesis de CK18 puede estar asociado a fenómenos celulares de recambio proteico? Por el momento, resultados preliminares (Gráfica 15) nos muestran que la modulación ejercida al gen de CK18 o genes reguladores por el estrés oxidativo inducido en el hígado por la exposición *in vitro* de arsenito de sodio, pudiera también estar relacionado con fenómenos postranscripcionales como el procesamiento proteolítico no lisosomal dependiente de ubiquitina en el proteosoma. Los resultados mostraron que en los cultivos expuestos a arsenito la actividad proteosomal similar a quimiotripsina se encontraba inhibida considerablemente hasta en un 85% respecto al control negativo. Estos

hallazgos sugieren fuertemente que el incremento en la síntesis y expresión de CK 18 inducida por la exposición a arsenito de sodio, no sólo se regula a nivel transcripcional sino que pueden estar involucrados fenómenos postranscripcionales como el recambio proteico no lisosomal dependiente de ubiquitina mismo que se altera en presencia del metaloide reflejándose en la síntesis de la proteína.



Gráfica 15. Efecto de la exposición a arsenito de sodio sobre la actividad proteosomal en cultivos organotípicos de hígado de ratón. Las barras representan el promedio de un cultivo por triplicado.

*Denota diferencias significativas con respecto al control.

CAPÍTULO XI

PERSPECTIVAS

Considerando los hallazgos obtenidos acerca de la capacidad de generación de estrés oxidativo por la exposición a arsénito sobre el gen de la *CK 18* así como la escasa información acerca de su significado biológico y de las consecuencias de su formación, es importante continuar con el estudio de los mecanismos involucrados en esta activación.

Considerando que las CKs son proteínas tejido específico y que en este caso particular la expresión y síntesis de CK18 así como su estructura se alteran en presencia de la exposición a arsénito, sería interesante conocer si este efecto es específico para arsénito o sus metabolitos. Incluso podría estudiarse esta proteína como indicador de daño para otros agentes tóxicos.

El hecho de que la exposición a arsénito induzca la expresión de CK18 es relevante ya que las CK son proteínas involucradas en los procesos de diferenciación celular, integridad y organización, entre otros, y la alteración en organización y cantidad repercuten en una adecuada organización del citoesqueleto que es una estructura importante en la proliferación.

Dilucidar que otros mecanismos pudieran estar involucrados en la sobre expresión de otras CKs resulta importante ya que uno de los signos característicos observados en exposiciones crónicas al metaloide es la hiperqueratosis palmoplantar, la fibrosis colestásica, fibrosis en el tracto portal y angiosarcoma entre otras enfermedades, en donde las CKs pueden estar desempeñando un papel importante.

Investigaciones recientes sugieren que la transformación celular inducida por la exposición al arsénito puede resultar de la alteración de diferentes vías. Gran atención ha tenido el involucrar al arsénito en la modulación de la proteína cinasa activada por mitogeno (MAPK) y factores de crecimiento. Las rutas de señalización de MAPK son un punto clave en las rutas de transducción de señales intracelulares involucrando la fosforilación de proteína cinasas,

culminando en la activación y modulación de factores de transcripción requeridos para la expresión génica, el control de la proliferación celular, la diferenciación, transformación celular, apoptosis y cáncer, así como eventos celulares que pudieran estar involucrados directamente con la activación y represión del gen de la *CK 18*, por lo cual es necesario continuar con el estudio en la expresión y regulación del gen para la proteína, por lo que sería interesante conocer si existe alguna relación con las modificaciones en la síntesis, estructura, expresión y recambio de esta proteína en hígado expuesto a arsenito

ABREVIATURAS

As _i	Arsénico inorgánico
As ^{III}	Arsenito de Sodio
As ^V	Arsenato de sodio
MMA ^{III}	Ácido monometilarsenoso
MMA ^V	Ácido monometilarsínico
DMA ^{III}	Ácido dimetilarsenoso
DMA ^V	Ácido dimetilarsínico
TMA ₃ O	Óxido trimetilarsina
CK 18	Citoqueratina 18
CK 8	Citoqueraina 8
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
AlAsO ₄	Arsenato de aluminio
FeAsO ₄	Arsenato de hierro
Ca ₃ AsO ₄	Arsenato de calcio
EPA	Agencia de protección al ambiente
H ₃ AsO ₄	Ácido arsénico
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
SOD	Superóxido dismutasa
Gpx	Glutación peroxidasa
DNA	Ácido desoxiribonucleico
NADH oxidasa	Oxidasa de Nicotina Adenina dinucleótido reducido
GSTO-1-1	Glutación-S-transferasa Omega 1
As ₃ mt	Arsénico metiltransferasa
RNA	Ácido ribonucleico
GST-p	Glutación S-transferasa-p
HSP 70	Proteína de Choque térmico 70
HSP 90	Proteína de Choque térmico 90
ERP72	Proteína de estrés del retículo endoplásmico
GRP78	Proteína relacionada con glucosa 78-kDa
ERK1	Cinasa-1 regulada por señal extracelular
MAPKK5	Proteína cinasa 5 activada por mitógenos

PKC-d	Proteína cinasa C tipo d
iNOS	Sintetasa inducible del óxido nítrico
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
GM-CSF	Factor estimulador de crecimiento de granulocitos
IGFBP-1	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a Insulina 1
IGFBP6	Factor de crecimiento similar a insulina ligado a la proteína 6
PGF 10	Factor 10 de crecimiento de fibroblastos
VEGF-D	Factor de crecimiento endotelial vascular D
ET-1	Endotelina-1
JNK	Cinasa Terminal-NH ₂ c-jun
JNK1	Cinase terminal-NH ₂ c-jun 1
Fasl	Antígeno de Fas ligando
MAPK p38	Proteína cinasa activada por mitogeno p38
PI-3K	Subunidad reguladora de fosfatidilinositol-3-cinasa
ICE	Caspasa-1
O ₂ ^{•-}	anión superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
•OH	Radical hidroxilo
¹ O ₂	Singulete de oxígeno
LOO•	Radical peroxilo
NO•	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
8-OHdG	8-hidroxi-2´deoxiguanosina
NAC	N- acetilcisteina
HO-1	Hemoxigenasa 1
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HHE	4-hydroxi-2-hexenal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógeno
NF- κ B	Factor nuclear κ B
BSO	Butionin-sulfoximida

TBARS	Especies Reactivas al ácido tiobarbitúrico
SFB	Suero fetal bovino
PMSF	Fenilmetanosulfonil fluorido
EDTA	Ácido etilen Diamino tetraacético
PBS	Buffer de fosfatos
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-Dodecil Sulfato de sodio.
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en cadena de la Polimerasa
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
TBA	Ácido tiobarbitúrico
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotina Adenina dinucleótido reducido
DTNB	Ácido 5'5'-dithio-bis (2-nitrobenzoico)
TNB	5-tiol-2-nitrobenzoico
GST	Glutación-S-transferasa
ATP	Adenosin-5'- trifosfato
ADP	Adenosin-5'-difosfato

CAPÍTULO XII

REFERENCIAS

Anderson M. E. (1997). Glutathione and glutathione delivery compounds, *Advances in pharmacology* **38**: 65-78.

Albores A., Cebrian M.E., Bach P.H., Connelly J.C., Hinton R. H. y Bridges J.W. (1989). Sodium arsenite induced alterations in bilirubin excretion and heme metabolism. *Journal Biochemistry Toxicology*. **4**:73-78.

Albores A., Koropatnick J., Cherian M.G., Zelazowski A.J. (1992). Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production in vivo, *Chemico-Biological Interactions*. **85**: 127–140.

Anderson C., Tsai M. J., Meek E. W., Lui M., Tang Y., Forman J. and Reynolds P. (1999), Depletion of Glutathione by Buthionine Sulfoximine Is cytotoxic for Human Neuroblastoma Cell lines via apoptosis, *Experimental Cell Research* **246**: 183-192.

Anderson M. E., (1998). Glutathione: An overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*. **111-112**: 1-14.

Aposhian, H. V. (1997). Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annual Review Toxicology* **37**: 397-419.

Applegate L.A., Janscher P. and Tyrell M. (1991). Induction of heme oxygenase: a general response to oxidative stress in cultured mammalian cells, *Cancer Research*. **51**: 974–978.

Arnold L.L., Cano M., John M.St., Eldan M., van Gemert M., Cohen S.M. (1999). Effects of dietary dimethylarsinic acid on the urine and urothelium of rats, *Carcinogenesis*. **10**: 2171–2179.

Bang, F. L. (1974). De hydrope ex ingesto arsenico observation. *Soc. Med. Havn. Collect.* **1**: 307.

Barchowsky A., Roussel R. R., Kñei L. R., James P. E ., Ganju N, Smith K. R., and Dudek E. J. (1999). Low levels of arsenic trioxide stimulate proliferative signals in primary vascular cells without activating stress effector pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **159**: 65-75.

Bardag-Gorce F., Riley N.E., Nan L., Montgomery R.O., Li J., French B.A., Lue Y.H. and French S.W. (2004). The proteasome inhibitor, PS-341, causes cytokeratin aggresome formation, *Experimental Molecular Pathology*. **76**: 9 –16.

Bardag-Gorce F., Vu J., Nan L., Riley N., Li J. and French S. (2004). Proteasome inhibition induces cytokeratin accumulation in vivo, *Experimental and Molecular Pathology* **76**: 83-89.

Basu A., Mahata J., Gupta S. and Giri A.K. (2001). Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutation Research*. **488**: 171-194.

Bau D.-T., Wang T.-S., Chung C.-H., Wang A.S.S. and Jan K.-Y. (2002). Oxidative DNA adducts and DNA–protein cross-links are the major DNA lesions induced by arsenite, *Environmental Health Perspectives*. **110**: 753–756.

Bowen H. (1979). *Elemental Chemistry of the elements*, Academic Press, London and New York, 60.

Brambila E. M., Achanzar W. E, Wei Q., Webber M. M., and Waalkes M. P. (2002). Chronic Arsenic-Exposed Human Prostate Epithelial Cells Exhibit Stable arsenic Tolerance: Mechanistic implications of altered cellular glutathione and Glutathione S-transferase, *Toxicology and Applied Pharmacology* **183**: 99-107.

Buchet J. and Lauwerys R. (1985). Study of inorganic arsenic methylation by rat liver in vitro. Relevance for the interpretation of observations in man. *Archives of Toxicology* **57**:125-129.

Buchet J.P., Lauwerys R., Roels H. (1981). Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single dose of sodium arsenite, monomethylarsonate or dimethylarsinate in man, *Int. Archives Occupational Environment and Health* **48**: 71–79.

Chakraborti D., Mohammed M. R., Paul K., Chowdhury U. K., Sengupta M.K., Lodh D., Chanda C. R., Saha K.C., Mukherjee S.C. (2002). Arsenic calamity in the Indian subcontinent: what lessons have been learned? *Talanta* **58**: 3-22.

Chen Y., Lin-Shiau, S. and Lin J. (1998). Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis *Journal Cell Physiology*. **177**: 324–333.

Chiou H. Y., Hsueh Y. M., Liaw K. F., Horng S. F., Chiang M. H., Pu Y. S., Lin J. S. N., Huang C. H., Chen C. J. (1995), Incidence of internal cancer ingested inorganic arsenic: a seven year follow-up study in Taiwan, *Cancer Research*. **55**: 1296-1300.

Clarke J., Fortes M., Giovanni A., and Brewster D. (1996). Modification enzymatic glutathione assay for the microtiter plate and the determination of glutathione in rat primary cortical cells. *Toxicology Methods*. **6**: 223-230.

Coban K. and Inanc F. (2004). Low-Volume Tumescant liposuction does not change plasma malondialdehyde levels: A preliminary study. *Aesthetic Plastic Surgery*, **28** (5): 321-323

Coulombe A P. and Omary B. (2002). Hard and soft principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filament. *Current Opinion Cell Biology*, **14**: 110-122.

Coulombe P. A., Ma L., Yamada S. and Wawersk M. (2001) Intermediate filaments at a glance, *Journal of Cell Science*. **114**: 4345-4347.

Davidson, C.I.; Goold W.D.; Mathison, T.P.; Wiersma, K.W.; Reilly, M.T. (1985). *Environmental Science and Technology*. **19**: 27.

De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F., and Balansky R. M. (2001), Mechanism of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-point, *Carcinogenesis*. **22**: 999-1013.

Del Razo L. M, Quintanilla-Vega B., Brambila-Colombres E., Calderón-Aranda E.S., Manno M., and Albores A. (2001), Stress proteins Induced by Arsenic, *Toxicology and Applied Pharmacology* **177**, 132-148.

Del Razo, L. M., Styblo, M., Cullen, W. R., and Thomas, D. J. (2001). Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices. *Toxicology and Applied Pharmacology* **174**: 283–293.

Ding W., Hudson L. G. and Liu K. J. (2005). Inorganic arsenic compounds cause orhan damage to DNA and protein by inducing ROS and RNS generation in human keratinocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **279**: 105-112.

Eichner R. and Kahn M. (1990). Differential extraction of keratin Subunits and filaments from Normal Human Epidermis, *The Journal of Cell Biology*. **110**: 1149-1158.

Emonet N., Leccia M. T., Favier A., Beani J. C. and Richard M. J. (1997). Thiols and selenium: protective effect o for human skin fibroblast exponed to UVA radiation, *Journal of photochemistry and photobiology Biology*. **40**: 84-90.

Enterline P. E., Day R., and Marsh G. M., (1995). Cancer related to exposure to arsenic at a copper smelter. *Occupation Environmental Medical*. **52**: 28-32.

Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991), Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine*. **11** 81–128.

Fan S.-R., Ho I.-C., Yeoh F.L.-F., Lin C.-J., Lee T.-C. (1996). Squalene inhibits sodium arsenite-induced sister chromatid exchanges and micronuclei in Chinese hamster ovary-K1 cells, *Mutation Research*. **368**: 165–169.

Fausther M., Villeneuve L. and Cadrin M. (2004), Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice, *Comparative Hepatology* **3**: 1-15.

Filippova M. and Duerksen-Hughes J. P. (2003), Inorganic and Dimethylated Arsenic species induce cellular p53. *Chemical Research Toxicology* **16**: 423-431

Fordyce F.M.; Williams, T.M.; Pajitpapapon, A.; Charoenchaisei, P. British (1995). Geol. Survey, Keyworth,

Fuchs E. and Weber K. (1994): Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annual Review Biochemistry*. **63**:345-382.

Fuchs, E. & Coulombe, P. A (1992). Of mice and men: genetic skin diseases of keratin. *Cell* **69**: 899–902.

Guha M. N. (2005). Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on liver, *Toxicology and Applied Pharmacology* **206**: 169-175.

Gulledge, J.H.; O'Connor, (1973) *J. AWWA* 548.

Gurr J. R., Y Lin. C., Ho I. C., Jan K. J., Lee T. C. (1993), Induction of chromatid breakers and tetraploidy in Chinese hamster ovary cells by treatment with sodium arsenite during the G2 phase, *Mutant Research*. **319**: 165-196.

Gurusamy M. K. and Swaran J.S. F. (2004). Chronic arsenic poisoning in the rat: treatment with combined administration of succimers and an antioxidant. *Ecotoxicology and Environmental safety* **58**: 37-43.

Gustafsson C. A., Kupersmidt I., Edlundh-Rose E., Greco G., Serafino A., Krasnowska K. E., Lundeberg T., Bracci-Laudiero L., Romano C-M., Parasassi T. and Lundeberg J. (2005). Global gene expression analysis in time series following N-acetyl L-cysteine induced epithelial differentiation of human normal and cancer cells *in vitro*. *BMC Cancer*. **5**: 75 1-19

Guyton K.Z., Xu Q.B., Holbrook N.J. (1996). Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by orhan stress: role of AP-1 element, *The Biochemical journal*. **314**: 547–554.

Habib G., Shi Z-Z., Lieberman M. (2007). Glutathione protects cells against arsenite-induced toxicity, *Free Radical Biology* **42**: 191-201

Hamilton W. J., Kaltreider C. R., Bajenova V.O., Ilnat A. M., McCaffrey J., Turpie W. B., Rowell E. E., Oh J., Nemeth M. J., Pesce C. A. and Lariviere J. R. (1998). Molecular Basis for Effects of Carcinogenic Heavy Metals on Inducible. Gene Expression Environmental Health Perspectives. **106**, Supplement 4: 1005-1015

Harada M., Kumemura H., Omary M.B., Kawaguchi T., Maeyama N., Hanada S., Taniguchi E., Koga H., Suganuma T., Ueno T. and Sata M. (2003) Proteasome inhibition induces inclusion bodies associated with intermediate filaments and fragmentation of the Golgi apparatus, *Experimental cell research*. **288**: 60–69.

Hayakawa T., Kobayashi Y., Cui X. and Hirano S. (2005), A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19, *Inorganic compounds* **79**: 183-191.

Hei T., Liu S. and Waldren C. (1998). Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* . **95**: 8103–8107.

Hernández-Zavala A., Córdova E., Del Razo L.M., Cebrián M. E. and Garrido E. (2005), Effects of arsenite on cell cycle progression in human bladder cancer cell line, *Toxicology* **207**: 49-57.

Hirano S., Kobayashi Y., Cui X., Kanno S., Hayakawa T. and Shraim A. (2004). The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: important roles of thiol compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* **198**: 458-467.

Huang H., Huang C.F., Wu D.R., Jinn C.M., Jan K.Y. (1993). Glutathione as a cellular defense against arsenite toxicity in cultured Chinese hamster ovary cells, *Toxicology*. **79**: 195–204.

Huang R.N. and Lee T. C. (1996), Cellular uptake of trivalent arsenite and pentavalent arsenate in KB cells cultured in phosphate-free medium, *Toxicology Applied Pharmacology*. **136**: 243-249.

Irgolic, K.J.; Greschonig, H.; Howard, A.G., Arsenic in :A. Townshend (Ed.), *The Encyclopedia of Analytical Science*, Academic Press, (1995) 168-184.

Irvine A. D. and McLean W. H. I. (1999). Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation. *The British journal of dermatology*. **140**: 815–828.

Johnston J.A., Ward C.L. and Kopito R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins, *The Journal of Cell Biology*, **143**: 1883– 1898.

Kazuo T. Suzuki, K. Mandal, Katagiri A., Sakuma Y., Kawakami A., Ogra Y., Yamaguchi K., Sei Y., Takayama H., and Aimi N., (2004), Dimethylthioarsenicals as Arsenic metabolites and their chemical preparations, *Chemical Research in Toxicology* **17**, 914-921.

Kessel M., Liu S.X., Xu A., Santella R., Hei T.K. (2004). Arsenic induces orhan DNA damage in mammalian cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*. **234**: 301–308.

Kim Y. H., Park E. J., Han S. T., Park J. W., Taeg K. K. (2005), Arsenic trioxide induces Hsp70 expression via reactive oxygen species and JNK pathway in MDA231 cells, *Life Sciences* **77**: 2783–2793

Kitchin K. (2001). Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model system and methylated arsenic metabolites. *Toxicology Applied Pharmacology* **172**: 249-261.

Kitchin K. and Ahmad S. (2003), Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis, *Toxicology Letters* **137**: 3-13

Kojima C., Qu W., Waalkes M. P., Himeno S., and Sakurai T. (2006), Chronic exposure to methylated arsenicals stimulates arsenic excretion pathways and induce Arsenic Tolerance in Rat liver Cells, *Toxicological Science*. **91**: 70-81.

Kopito R.R., (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation, *Trends in cell Biology* **10**: 524–530.

Ku N. O., Darling J. M., Krams M. S., Esquivel C. O., Keeffe E., Sibley K R., Lee M. Y., Wright L. T. and Omary M. B. (2003). Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies, *Medical Science* 100, **10**: 6063-6068.

Ku N. O., Gish R., Wright T. L., Omary M. B. (2001). Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease. *The New England journal of medicine*, **344**:1580-1587.

Ku N. O., Michie S., Resurreccion Z., Broome R. L. and Omary M. B. (2002). Keratin binding to 14-3-3 protein modulates keratin filaments and hepatocytes mitotic progression, *Cell Biology*. **99**: 4373-7378.

Ku N. O., Wright T. L., Terrault N. A., Gish R. and Omary M. B. (1997). Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis. *The Journal of clinical investigation*, **99**:19-23.

Ku N. O., Zhou X., Toivola D. M. and Omary M. B. (1999). The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease, *The American journal of physiology*. **277**: G1108-G1137.

Ku N.O., Michie S., Oshima R.G. and Omary M.B. (1995). Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice

expressing a keratin 18 conserved arginine mutant, *The Journal of cell biology*. **131**: 1303–1314.

Ku N.O., Michie S., Resurreccion E.Z., Broome R.L., Omary M.B. (2002). Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**: 4373– 4378.

Ku N.O., Zhou X., Toivola D.M. and Omary M.B. (1999). The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease, *The American journal of physiology*. **277**: G1108–G1137.

Kumagai Y and Pi J. (2004). Molecular basis for arsenic-induced alteration in nitric oxide production and oxidative stress: implication of endothelial dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology* **198**: 450-457.

Lauderback C.M., Hackett J.M., Huang F.F., Keller J.N., Szweda L.I., Markesbery W.R., ButterWeld D.A. (2001). *Journal of neurochemistry*. **78**: 413–416.

Lee T. C., Ko, J. L. and Jan, K. Y. (1989). Differential cytotoxicity of sodium arsenite in human fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Toxicology* **56**: 289-299.

Lee T. C., Wei M. L., Chang W. J., Ho I. C., Lo J. F., Jan K. Y., and Huang H. (2005). Elevation of glutathione levels and glutathione S-transferase activity in arsenic-resistant Chinese Hamster ovary cells. *In vitro cell Dev. Biology* **25**: 442-448.

Lee T.-C., Ho I.-C. (1995). Modulation of cellular antioxidant defense activities by sodium arsenite in human fibroblasts, *Archives of Toxicology*. **69**: 498–504.

Lemrman S. A., Clarkson T. W., Gerson R. J. (1983), Arsenic uptake and metabolism by liver cells is dependent on arsenic oxidation state, *Chemico-Biological Interactions*, **45**: 401-406.

Li X.G. Ma S. D., Xie R. M., Miao A. R., Shen Y. Q., Chen G. J., Zhao G.S. Qui P. L., Zhiang F. E., Bai Y. R., Ming Z. and Ding B. X. (1982), The effects of Picrasma quassinoides on cardiovascular system, Yao Xue Xue Bao, **17** (5): 327-30.

Liao J. and Omary M.B. (1996). 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor, J. Cell Biol. **133**: 345– 357.

Liu J., Liu Y., Goyer R.A., Achanzar W., Waalkes M.P. (2000). Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals, Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology **55**: 460–470.

Liu L., Trimarchi J., Navarro P., Blasco M. and Keefe D. (2003). Oxidative Stress Contributes to Arsenic-induced Telomere Attrition, Chromosome Instability, and Apoptosis, The journal of Biological Chemistry, 378, **34**: 31998-32004.

Liu S., Athar M., Lippai I., Waldren C. and Hei, T. (2001). Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**, 1643–1648

Lu S. C., (2000). Regulation of glutathione synthesis, Current topics in cellular regulation. **36**: 95-116.

Lui Z, Shen J., Carbrey J.M., Mukhopadhyay R., Agre P., Rosen B. P. (2002), Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 y AQP9, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America . **99**: 6053-6058.

Lui, J., Chen, H., Miller, D. S., Saaverdra, J. E., Keefer, L- K-. Johnson, D. R., Klaasen, C. D., and Waalkes M. P., (2001). Overexpression of glutathione S-transferase π and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. Molecular pharmacology. **60**: 302-309.

Lykkesfeldt J., (2001). Determination of Malondialdehyde as Dithiobarbituric acid Adduct in Biological Samples by HPLC with Fluorescence Detection: comparison with UV spectrophotometry. *Clinical Chemistry* 47, **9**:1725-1727.

Mandal B. and Suzuki K. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta* **58**: 201-235.

Marafante E., Vahter M., Norin H., Envall J., Sandstrom M., Christakopoulos A., Ryhage R. (1987), Biotransformation of dimethylarsinic acid in mouse, hamster and man, *Journal of applied toxicology*. **7**: 111-117.

Marcelet, H., (1973). *Bull. Sci. Pharmacol.* 20 p. 271.

Markesbery W.R., Lovell M.A. (1998), Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease, *Neurobiology Aging* **19**: 33–36.

McLean, W. H. I. and Lane, E. B (1995). Intermediate filaments in disease. *Current opinion in cell biology*. **7**: 118–125.

Menzel D.B., Rasmussen R.E., Lee E., Meacher D.M., Said B., Hamadeh H., Vargas M., Greene H., Roth R.N. (1998). Human lymphocyte heme oxygenase 1 as a response biomarker to inorganic arsenic, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **250**: 653–656.

Merwin J.R., Mustacich D.J., Muller E.G.D., Pearson G.D. and Merrill G.F. (2002). Reporter gene transactivation by human p53 is inhibited in thioredoxin reductase null yeast by a mechanism associated with thioredoxin oxidation and independent of changes in the redox state of glutathione, *Carcinogenesis* **23**: 1609–1615.

Mizoi M., Takabayashi F., Nakano M., An T., Sagesaka Y., Kato K., Okada S. and Yamanaka K. (2005). The role of trivalent dimethylated arsenic in dimethylarsinic acid-promoted skin and lung tumorigenesis in mice: Tumor-promoting action through the induction of oxidative stress, *Toxicology Letters*. **158**: 87-94.

Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B. and Krepler R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumor and cultured cells, *Cell* **31**: 11 – 24.

Morikawa T., Wanibuchi H., Morimura K., Ogawa M. and Fukushima S. (2001). Promotion of skin carcinogenesis by Dimethylarsinic acid in Keratin (K6)/ODC Transgenic Mice, *Japanese journal of cancer research*. **91**: 579-581.

Morley N., Curnow A., Salter L., Campbell S., Gould D., (2003). N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **72**: 55-60.

Nagata K., Izawa I. and Inagaki M. (2001) A decade of site- and phosphorylation state-specific antibodies: recent advances in studies of spatiotemporal protein phosphorylation *Genes Cells* **6**: 653–664.

Nakamichi I., Hatakeyama S. and Nakayama K. (2002), Formation of Mallory Body-like inclusions and cell death induced by deregulated expression of keratin 18, *Molecular Biology of the cell* **13**: 3441-3451.

National Research Council, Arsenic in Drinking Water, National Academy Press, Washington, DC, 2000.

Nelly G. S. (1998), Clinical applications of N-acetylcysteine, *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. **3**: 114-127.

Nelson, K.W. (1977) Industrial contributions of arsenic to the environment, *Environmental health perspectives*. **19**: 31-34.

Németi B. and Gregus Z. (2004). Glutathione-Dependent Reduction of Arsenate in Human Erythrocytes a process Independent of Purine Nucleoside Phosphorylase, *Toxicological Science*. **82**: 419-428.

Németi B., Csanaky I. and Gregus Z. (2006). Effect of an Inactivator of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, a fortuitous Arsenate Reductase, on Disposition of Arsenate in Rats, *Toxicological Science* **90**. **1**: 49-60

Nesnow S., Roop B. C., Lambert G., Kadiiska M., Mason R. P., Cullen W. R., and Mass M. J. (2002) DNA damage Induced by Methylated trivalent Arsenicals Is mediated by Reactive Oxygen Species, *Chemical research in toxicology*, **15**: 1627-1634

Noda Y., Suzuki T., Kohara A., Hasegawa A., Yotsuyanagi T., Hayashi M., Sofuni T., Yamanaka K., Okada S., (2003). In vivo genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in MutaTM Mouse, *Mutation Research* **513**: 205-212

Nordenson I., Beckman L. (1991). Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals? *Human heredity*. **41**: 71–73.

Nordstrom D. K. (2002). World occurrences of arsenic in ground water. *Science* **296**: 2143-2146.

Omar R., Papolla M. and Saran B. (1990). Immunocytochemical detection of the 70-kD heat shock protein in alcoholic liver disease. *Archives of pathology and laboratory medicine*. **114**: 589-592.

Omary M. B., Ku N. O. and Toivola, D. M. (2002). Keratins: guardians of the liver *Hepatology* **35**: 251–257.

Omary M. B., Ku, N. O., Liao J. and Price D. (1998) Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro Subcell. *The Biochemical journal*. **31**: 105–140.

Omary M. B., Nam-On Ku, and Toivola M. D. (2002). Keratins: Guardians of the liver, *Hepatology*, **35**,2: 251-257

Orhan H., Gurer-Orhan H., Vriese E., Vermeulen N.P.E. and Meerman J.H.N. (2006). Application of lipid peroxidation and protein oxidation biomarkers for oxidative damage in mammalian cells. A comparison with two fluorescent probes. *Toxicology in Vitro*. **20**: 1005–1013.

Owens D. and Lane E.B. (2004). Keratin mutations and intestinal pathology, *Journal of pathology* **204**: 377-385.

Owens D. W., Wilsom N. J., Hill A. H., Rugg E.L., Porter R. M., Hutcheson A. M., Quinlan R.A., Hell D.van, Parkes M., Jewell D.P., Campbell S. S., Ghosh S., Satsangi J. and Lane E. B. (2003). Human Keratin 8 mutations that disturb filament assembly observed in inflammatory bowel disease patients, *Journal of Cell Science* **117**: 1989-1999

Oya-Ohta Y., Kaise T., Ochi T. (1996). Induction of chromosomal aberrations in cultured human fibroblasts by inorganic and organic arsenic compounds and the different roles of glutathione in such induction, *Mutation Research*. **357**: 123–129.

Pant H. C., Veeranna and Grant P. (2000) Regulation of axonal neurofilament phosphorylation *Current topics in cellular regulation*. **36**: 133–150.

Paramio J., and L. Jorcano J., (2002). Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signaling? , *Bioassays* 24.9, **24**:836-844

Patrick L., ND, (2003), Toxic Metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and Cadmium Toxicity. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. No. 2, **8** 106-128

Perker C.L.; (1981). USEPA Contract No. 68-01-5965, The Mitre Corporation p. 1.

Peters, R.A. (1955). Biochemistry of some toxic agents. I. Present state of knowledge of biochemical lesions induced by trivalent arsenical poisoning. *Bull. John Hopkins Hospital* 97 1-20.

Peterson P., Benson M., Zaive R., (1981). Metalloids, in: M.W. Leep (Ed), *Arsenic and effect of heavy metal pollution on plants*, vol.1, Appl. Sci. Publ. London, p. 299.

Vouk V.B.: Piver, W.T., (1983). Metallic elements in fossil fuel combustion products: amounts and form of emissions and evaluation of carcinogenicity and mutagenicity *Environmental health perspectives*, 47:201-25.

Pollard T.D.(2003), The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda, *Nature* **422**: 741– 745.

Porter R. and Lane E. B., (2003). Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function, *TRENDS in genetics*, Vol 19. **5**: 278-285.

Pourahmad J., Rabiei M., Jokar F. and O'Brien P. (2005). A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for chromate and arsenite, *Toxicology* **206**: 449–460.

Qian Y., Castranova V., Shi X. (2003). New perspectives in arsenic-induced cell signal transduction. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **96**:271-278

Ramaekers C. S.and Bosman F. T. (2004). The cytoskeleton and disease. *Journal of Pathology*. **204**:351-354.

Ramírez P., Del Razo L. M., Gutierrez-Ruiz M. C. and Gonshebbatt M. E. (2000). Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis* **21**, 4: 701-706.

Reichert, F.; Trelles R.A. (1921). *Anales de la Asociación Química Argentina*. **9** 89.

Reline R. and Schiestl R. H. (2006), Glutathione depletion by buthionene sulfoximine induces DNA deletions in mice, *Carcinogenesis* 27. **2**: 240-244.

Riley N. E., Li J., McPhaul L. W., Bardag-Gorce F, Lue Y. H., and French S. W (2003), Heat shock protein are present in Mallory bodies (cytoqueratin aggresomes) in human liver biopsy specimens, *Experimental and Molecular Pathology* **74**: 168—172.

Rodríguez V. M., Del Razo L. M., Limón-Pacheco J. H., Giordano M., Sanchez-Peña L. C., Uribe-Querol E., Gutierrez-Ospina G. and Gonsbatt M. E. (2005), Glutathione Reductase Inhibition and Methylated Arsenic Distribution in Cd1 Mice Brain and Liver, *Toxicological Science*, **84**: 157-166.

Romach E. H., Zhao, C. Q., Del Razo, L. M., Cebrian M. E., and Waalkes, M. P., (2000). Studies on the mechanisms of arsenic-induced self tolerance developed in liver epithelial cells through continuous low-level arsenite exposure. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **54** : 500-508.

Romach E.H., Zhao C.Q., Del Razo L.M., Cebrian M.E., Waalkes M.P. (2002). Studies on the mechanisms of arsenic-induced self tolerance developed in liver epithelial cells through continuous low-level arsenite exposure, *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. **54**: 500–508.

Rosen B.P., (2002). Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*. **529**: 86–92.

Rosenfeld M.E., Palinski W., Yla-Herttuala S., Butler S., Witztum J.L. (1990). *Arteriosclerosis*, **10**: 336–349.

Rossmann G. T. (2003), Mechanism of arsenic carcinogenesis: an approach, *Mutation Research*. **533**: 37-65.

Rouse J., Jackson S.P. (2002) Interfaces between the detection, signaling and repair of DNA damage, *Science*. **297**: 547–551.

Russell D., Andrews D., James J. and Lane E. B. (2004). Mechanical stress induces profound remodeling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes, *Journal of Cell Science* **117**. **22**: 5233-5243

Ryter S.W. and Choi A.M. (2002). Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress, *Antioxidants & redox signaling*. **4**: 625–632.

Sakurai T., Qu W., Sakurai M. H. and Waalkes M.I P. (2002), A major human arsenic metabolite, dimethylarsinic acid, requires reduced Glutathione to induce apoptosis, *Chemical research in toxicology*, **15**: 629-637.

Santra A., Chowdhury A., Ghatak S., Biswas A., Dhali G. K. (2007). Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by N-acetylcysteine, *Toxicology and Applied Pharmacology*. **220**:146–155

Schoen A., Beck B., Sharma R. and Dubé E. (2004). Arsenic toxicity at low doses: epidemiological and mode of action considerations. *Toxicology and Applied Pharmacology* **198**: 253-267.

Schuliga M., Chouchane S. and Snow E. (2002). Upregulation of glutathione-related genes and enzyme activities in cultured human cells by sublethal concentrations in cultured human cells by sublethal concentrations of inorganic arsenic, *Toxicological Sciences* **70**: 183-192.

Scott N., Hatleid K. M., MacKenzie N. E., Carter D. E. (1993), Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione, *Chemical research in toxicology*. **6**: 102-106.

Shi H., Hudson L. G., Ding W., Wang S., Cooper K. L., Lui S., Chen Y., Shi X. and Liu K. J. (2004), Arsenite Cause DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals, *Chemical research in toxicology*. **17**: 871-878

Shinichiro Hanada, Masaru Harada, Hiroto Kumemura, M. Bishr Omary, Takumi Kawaguchi, eitaro Taniguchi, Hironori Koga, Takafumi Yoshida, Michiko Maeyama, Shiniji Baba, Takato Ueno and Michio Sata (2005). Keratin-containing inclusions affect morphology and distribution of cytosolic cellular components. *Experimental Cell Research* **304**: 471-482.

Smedley, P.L.; Edmunds, W.M.; Pelig-Ba, K.B.; in : J.D. Appleton, R.; Fuge, G.J.H. Mc Call (Eds.), Environmental Geochemistry and Health, vol. 113, Geological Society Special Publication, London, 1996, p. 153.

Sollman, T.; A (1957). Manual of Pharmacology, WB Saunders Company, Philadelphia.

Soto-Reyes E., Del Razo L.M., Valverde M. and Rojas E. (2005), Role of the álcali labile sites, reactive oxygen species and antioxidants in DNA damage induced by methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic, *Biometals* **18**: 493-506.

Steinert, P. M. & Bale, S. J. (1993). Genetic skin diseases caused by mutations in keratin intermediate filaments. *Trends in genetics*. **9**: 280–284.

Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N. and Ames B.N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science*. **235**: 1043–1047.

Styblo M., Serves S.V., Cullen W.R. and Thomas D.J. (1997). Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols, *Chemical research in toxicology*. **10**: 27–33.

Tanaka-Kagawa T., Gino H., Hasegawa T., Makino Y., Seko Y., Hanioka N., and Ando M., (2003). Functional characterization of two variant human GSTO 1-1s (Ala 140Asp and Thr217Asn), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **301**, 516-520.

Tao G-Z., Toivola M. D., Zhong B., Michie A. S., Resurrección Z. E., Tamai K., Taketo M. M. and Omary B. (2003), Keratin-8 null mice have different gallbladder and liver susceptibility to lithogenic diet-induced injury, *Journal of Cell Science*. **116** (22), 4629-4638.

Thomas D., Styblo M. and Lin S. (2001). The cellular metabolism and systematic toxicity of arsenic, *Toxicology and Applied Pharmacology*. **176**: 127-144.

Thomas D., Waters S. and Styblo M. (2004). Elucidating the pathway for arsenic methylation, *Toxicology and Applied pharmacology* **198**: 314-326.

Toivola D. M., Baribault H., Magin T., Michie A. S. and Omary M. B. (2000). Simple epithelial keratins are dispensable for cytoprotection in two pancreatitis models, *American Journal of physiology*. **GI 279**: 1343-1354

Toivola D., Zhou Q., English L. and Omary B. (2002). Type II Keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and Mitosis in tissues and cultured cell, *Molecular Biology of the cell*, **13**: 1857-1870.

Thomas J. D., Li J., Waters B. S., Xing W., Adair M. B., Drobna Z., Devesa V. and Styblo M., (2007), Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase and the Methylation of Arsenicals. *Experimental Biology and Medicine*, **232**:3-13.

Tsuchiya Y., Yamaguchi M., Chikuma T., and Hojo H. (2005). Degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase triggered by 4-hydroxy-2-nonenal and 4-hydroxy-2-hexenal, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **438**: 217–222.

Tsuda T., Babazono A., Yamamoto E., Kurumatani N., Mino Y., Ogara T., Kishi Y. and Aoyama H. (1995), Ingested arsenic and internal cancer: a historical cohort study followed for 33 years, *American journal of epidemiology*. **141**: 198-209.

Uchida K. (2003). Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino acids*, **25**(3-4):249-57.

Uchida K., (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases *Free radical biology and medicine*, **28**: 1685–1696.

Vahter M., Concha G. (2001), Role of metabolism in arsenic toxicology, *Pharmacology and toxicology*. **89**: 1-5.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazura M. (2006), Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions* **160** (1) 1-40.

Valle, B.L.; Ulmer, D.D.; Wacker, W.E.C., (1960). The magnesium-deficiency tetany syndrome in man. *The New England journal of medicine*. **28** (262) 155-61

Vasken A. H., Zakharyan R., Avram M., Kopplin M., and Wollenberg M., (2003). Oxidation and detoxification of trivalent arsenic species, *Toxicology and Applied Pharmacology* **193**: 1-8.

Vega L., Stylbo M., Patterson R., Cullen W., Wang C., Germolec D. (2001), Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **172**, 225-232.

Vinogradov A. (1959). *The geochemistry of rare and dispersed chemicals elements in soils*, 2nd ed., New York. p.65.

Vogt B.. and Rossman T.G. (2001). Effects of arsenite on p53, p21 and cyclin D expression in normal human fibroblasts—a possible mechanism for arsenite's comutagenicity, *Mutat. Res.* **478**: 159–168.

Waalkes M. P. and Lui J. (2002). Purine Nucleoside Phosphorylase: A Fortuitous Cytosolic Arsenate Reductase?, *Toxicological Sciences* **70**: 1-3.

Wang T. and Huang H. (1994). *Mutagenesis* **9**, 253–257

Wang T.S., Huang H. (1994). Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells, *Mutagenesis*. **9**: 253–257.

Wang Z. and Rossman, T. G. (1993). Stable and inducible arsenite resistance in Chinese hamster cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **118**: 80-86.

Wang, Z., Dey, S., Rosen, B. P., and Rossman, T. G., (1996). Efflux-mediated resistance to arsenicals in arsenic-resistant and hypersensitive Chinese hamster cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **137**: 112-119.

Waters B. S., Devesa V., Fricke M. W., Creed T. J., Styblo M. and Thomas J. D., (2004), Glutathione Modulates Recombinant Rat Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase-Catalyzed Formation of Trimethylarsine Oxide and Trimethylarsine, *Chemical research in toxicology*, **17** (12), 1621-1629.

Wei M., Wanibuchi H., Yamamoto S., Li W. and Fukushima S. (1991). Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats, *Carcinogenesis* **20**: 1873–1876.

Wen-C., Chiang M., Ho I., and Lee T. Lee, (2004). Association of Chromosomal alterations with Arsenite-Induced tumorigenicity of Human HaCaT keratinocytes in nude Mice, *Environmental Health Perspectives* 112, No. **17**: 1704-1710.

WHO Arsenic compounds, *Environmental health criteria* 224, 2nd. Ed., World Health Organization, Geneva (2001).

Woolson, E.A, in: W.H. Lederer, R.J. Fensterheim (Eds.), *Industrial, Biomedical and Environmental Perspective*, Van Nostrand Reinhold Company, New York, (1983) p.239.

Xie S., Wang Q.I., Lou Ruan Q. and Liu T., Haanwar-Uniyal M., Darzynkiewicz Z., Traganos F. and Dai W. (2002), Proteasome-dependent downregulation of p21 Waf1/Cip1 induced by reactive oxygen species. *J. Interferon Cytokines res.* **22**: 957-963.

Yamanaka K., Hasegawa A., Sawamura R., Okada S. (1991). Cellular response to oxidative damage in lung induced by the administration of dimethylarsinic acid, a major metabolite of inorganic arsenics, in mice, *Toxicology and Applied Pharmacology*. **108**: 205–213.

Yamanaka K., Kato K., Mizoi M., An Y., Takabayashi F., Nakano M., Hocino M. and Okada S. (2004). The role of active species produced by metabolic reduction of dimethylarsinic acid in genotoxicity and tumorigenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* **198**:385-393.

Yamanaka K., Mizoi M., Kato K., Hasegawa A., Kakano M., and Okada S. (2001). Oral Administration of Dimethylarsinic acid, a Main Metabolite of Inorganic Arsenic, in mice Promotes Skin Tumorigenesis Initiated by dimethylbenz(a)anthracene with or without Ultraviolet B as a Promoter, *Biological and pharmaceutical bulletin* **25**:(4) 510-514.

Yamanaka K., Takabayashi F., Mizoi M., An Y., Hasegawa A. and Okada S., (2001). Oral exposure of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in mice leads to an increase in 8-Oxo-2-deoxyguanosina level, specifically in the target organs for arsenic carcinogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* **287**: 66-70.

Zakharyan R.A., Sampayo-Reyes A., Healy S.M., Tsaprailis G., Board P. G., Liebler D. C. and Aposhian H. V. (2001), Human monomethylarsinic acid (MMA^V) reductase is a member of the glutathione S-transferase superfamily, *Chemical research in toxicology*. **14**: 1051-1057.

Zaman, G. J. R., Lankelma J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Dekker, H., Paulusma, C., Elferink, P. J. O., Baas, F., and Bosrst P., (1995) Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 7690-7694.

Zatloukal K, Stumptner C., Fuchsbichler A., Fickert P., Lackner C., Trauner M. and Denk H. (2004). The keratin cytoskeleton in liver diseases, *Journal of Pathology* **204**: 367-376.

Zhang T.C., Schmitt M. and Mumford J. (2003). Effects of arsenic on telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells in vitro, *Carcinogenesis* 24, **11**: 1811-1817.

Zhao, C. Q., Young, M. R. Diwan, B. A., Coogan, T. P. and Waalkes, M. P. (1997). Association of arsenic-induced malignant transformation with DNAhypomethylation and aberrant gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**:10907-10912.

Zhong B. and Omary M. B. (2004). Actin overexpression parallels severity of pancreatic injury, *Experimental Cell Research* **299**: 404-414.

Zhong B., Zhou Q., Toivola D., Tao G. Z., Resurrección E. and Omary B. (2003). Organ-specific stress induces Mouse pancreatic keratin overexpression in association with NF- κ B activation, *Journal of Cell Science* 117, **9**:1709-1718.

Zhou Q., Toivola D.M., Feng N.G., Greenberg H.B., Franke W.W. and Omary M.B. (2003). Keratin 20 helps maintain intermediate filament organization in intestinal epithelia, *Molecular biology of the Cell* **14**: 2959–2971.

Arsenite induced oxidative damage in mouse liver is associated with increased cytokeratin 18 expression

M. E. Gonsebatt · L. M. Del Razo · M. A. Cerbon ·
O. Zúñiga · L. C. Sanchez-Peña · P. Ramírez

Received: 23 October 2006 / Accepted: 13 February 2007 / Published online: 6 March 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Cytokeratins (CK) constitute a family of cytoskeletal intermediate filament proteins that are typically expressed in epithelial cells. An abnormal structure and function are effects that are clearly related to liver diseases as non-alcoholic steatohepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. We have previously observed that sodium arsenite (SA) induced the synthesis of CK18 protein and promotes a dose-related disruption of cytoplasmic CK18 filaments in a human hepatic cell line. Both abnormal gene expression and disturbance of structural organization are toxic effects that are likely to cause liver disease by interfering with normal hepatocyte function. To investigate if a disruption in the CK18 expression pattern is associated with arsenite liver damage, we investigated CK18 mRNA and protein levels in liver slices treated with low levels of SA. Organotypic cultures were

incubated with 0.01, 1 and 10 μ M of SA in the absence and presence of *N*-acetyl cysteine (NAC). Cell viability and inorganic arsenic metabolism were determined. Increased expression of CK18 was observed after exposure to SA. The addition of NAC impeded the oxidative effects of SA exposure, decreasing the production of thiobarbituric acid-reactive substances and significantly diminishing the up regulation of CK18 mRNA and protein. Liver arsenic levels correlated with increased levels of mRNA. Mice treated with intragastric single doses of 2.5 and 5 mg/kg of SA showed an increased expression of CK18. Results suggest that CK18 expression may be a sensible early biomarker of oxidative stress and damage induced by arsenite in vitro and in vivo. Then, during SA exposure, altered CK expression may compromise liver function.

Keywords Arsenic · Cytokeratin 18 · Oxidative damage · *N*-acetyl cysteine

Introduction

Cytokeratins (CK) constitute a family of cytoskeletal intermediate filament proteins that are typically expressed in epithelial cells. CK associate to form heterodimers containing one member of each subfamily. Type I CK includes CK9 through CK20, while type II CK includes CK1 through CK8. In simple epithelia such as liver, exocrine pancreas, and intestine, the two major intermediate filament proteins are cytokeratin polypeptides 8 and 18 (CK8/CK18) with variable expression of CK19 and CK20 (Moll et al. 1982; Moll 1993; Calnek and Quaroni 1993). Traditionally, CK

M. E. Gonsebatt
Dep. Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, AP 70-228,
Ciudad Universitaria, México DF, 04510, México

L. M. Del Razo · L. C. Sanchez-Peña
Sección de Toxicología, CINVESTAV,
AP 14-740, México DF, 07000, México

M. A. Cerbon
Departamento de Biología, Facultad de Química,
UNAM, México DF, México

O. Zúñiga · P. Ramírez (✉)
Laboratorio de Toxicología Celular, Coordinación
General de Estudios de Posgrado e Investigación,
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM,
Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Cuautitlán Izcallí,
Estado de México, CP 54714, México
e-mail: ramireznoquera@correo.unam.mx

were considered only as skeletal proteins providing mechanical stability, but lately evidence has shown that they also exert several non-skeletal functions (Omary et al. 2004). The presence of wild-type CK seems to protect hepatocytes from the transmittal of apoptotic stimuli under stress conditions (Caulin et al. 2000; Gilbert et al. 2001; Ku et al. 2003) by hyperphosphorylation of CK (Ku et al. 1998; Coulombe and Omary 2002) or possibly by overexpression of CK, as noted in mouse liver and gallbladder injury models (Cadrin et al. 2000; Denk et al. 2000; Fickert et al. 2002; Tao et al. 2003).

In humans, altered patterns of cytokeratin expression are observed in pathological conditions such as alcoholic liver, cirrhosis, chronic hepatitis and liver cancer (Rhodes and Oshima 1998). Also, chronic intoxication with griseofulvin or 3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine (DDC) in mice can induce cytoskeleton alterations highly similar to those seen in human alcoholic hepatitis (Zatloukal et al. 2000). The increase in cytokeratin expression in response to liver injury suggests that these proteins may behave as stress proteins, similar to heat shock proteins (hsp). This hypothesis is supported by the known physical and ATP-dependent association of hsp70 with CK8/CK18 that increases with heat shock (Liao et al. 1995).

Inorganic arsenic (iAs) is a known human carcinogen that contaminates well water worldwide, affecting large groups of people in many countries. Human exposure to iAs is associated with cancer and organ injury, including squamous and basal cell carcinomas in the skin, hepatocellular carcinoma, angiosarcoma, cirrhosis and hepatoportal sclerosis (IPCS 2001; Centeno et al. 2002; Patrick 2003). There is evidence suggesting that iAs toxicity involves oxidative damage (Izquierdo-Vega et al. 2006; Hughes and Kitchin 2006), mainly by the interaction of iAs with protein thiols that are central components of redox-sensitive proteins in redox signaling and control pathways (Hansen et al. 2006). Several studies have demonstrated that liver is the primary arsenic metabolizing organ (Hughes et al. 2003). Metabolic conversion of iAs into methylated products is a multistep process that yields mono-di and trimethylated arsenic forms that have different toxic potential than that of the parent compound iAs.

Using the WRL-68 human hepatic cell line, we observe that sodium arsenite (SA) induces the synthesis of CK18 protein and promotes a dose-related disruption of cytoplasmic CK18 positive filaments (Ramírez et al. 2000). We speculate that these effects result from a stress-response to oxidative damage caused by SA.

To investigate whether the expression of CK18 could be associated with the oxidative damage induced by iAs in liver, organotypic cultures of mouse liver slices were treated with SA. Cells upregulated both CK18 mRNA and CK18 protein. This effect was inhibited when the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) (Hirano et al. 2004) was added to cultures. Furthermore, mice treated systemically with 2.5 or 5 mg/kg of SA also showed an increase of CK18 in the liver. Our results suggest that CK18 induction occurs in response to the oxidative damage generated by the iAs and should be considered as an early indicator of iAs toxicity in the liver.

Materials and methods

Chemicals and solutions

SA, NAC, thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, perchloric acid, DMEM culture media, antibiotics and the protease inhibitor cocktail were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

Animals

Inbred male BALB/c mice (5–6 weeks old, weighing 22–25 g), obtained from the animal care facility of the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico (UNAM), were acclimated for 1 week before experiments were initiated.

Organotypic liver culture

SA solutions were prepared daily in deionized water. Livers from BALB/c mice were cut to obtain 250–500 μm thick slices of approximately 5,000 μm in diameter. Slices were weighed and placed in culture plates (two slices per well) containing DMEM culture media supplemented with 8% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin and 1% streptomycin. Organotypic cultures were stabilized at 37°C with 5% carbon dioxide for 2 h. The liver slices were then exposed to 0.01, 1 or 10 μM SA for 3 h, followed by incubation with 1 or 2.5 mM NAC for 2 h. At the end of these treatments, tissues were washed in ice-cold phosphate saline buffer (PBS), pH 7.4, containing a protease inhibitor cocktail and were homogenized in the same buffer. The protein concentrations were determined using the Bradford method (BioRad Laboratories, Hercules CA) using albumin as standard (Bradford 1976). For polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting, tissues were homog-

enized in ice-cold 0.1 M PBS, pH 7.4. Samples were then aliquoted and frozen by immersion in liquid nitrogen.

Viability of liver slices

The viability of liver slices after treatment was determined by measuring intracellular K^+ levels using the method described by Azri et al. (1990) with some modifications. Briefly, slices were washed in ice-cold PBS and homogenized. An aliquot of tissue homogenate was added to 0.02 ml of concentrated perchloric acid. The mixture was gently shaken and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4°C. K^+ levels in the supernatant fractions were then analyzed by air-acetylene flame atomization using an atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer 3100) at 766.5 nm and reported as μmol per gram of tissue.

Animal exposure

BALB/c mice received a single dose of 0, 2.5 or 5.0 mg of SA per kg of body weight via the intragastric route and were sacrificed 24 h later by cervical dislocation. The dose of SA, in this study, represents one-eighth and one-fourth of the LD_{50} dose for mice, respectively (ATSDR 2000). Livers were extracted and washed in ice-cold isotonic saline solution to remove debris and blood. For PAGE and immunoblotting, tissues were homogenized in ice-cold 0.1 M PBS, pH 7.4, in the presence of a proteinase inhibitor cocktail, aliquoted and frozen by immersion in liquid nitrogen.

Determination of arsenic species

We measured the levels of arsenic species in tissue homogenates by hydride-generation atomic absorption spectroscopy after column chromatographic separation of inorganic arsenic and its metabolites: monomethylarsenic (MMA), dimethylarsenic (DMA) and trimethylarsenic (TMAO), as described by Hughes et al. (2003).

Western blot analysis

Normalized homogenates were separated by standard procedures (Laemmli 1970) on 10% acrylamide gels under reducing conditions [25 mM β -mercaptoethanol (BioRad) or 10 mM dithiothreitol (BioRad)]. The proteins were visualized by western blotting using primary mouse monoclonal antibodies against mouse CK18 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and secondary peroxidase-coupled antibodies against mouse IgG (Santa Cruz). Immunoblot analysis was performed

using a Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Rochester, NY).

Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation by liver slices was determined based on the formation of thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) as described elsewhere (Buege and Aust 1978). Briefly, 0.5 ml of liver homogenate were added to a reaction mixture containing 2 ml of 2.5% trichloroacetic acid (pH 1.0) and 1 ml of 0.6% thiobarbituric acid, followed by 30 min heating at 95°C. After cooling, the chromogen was read spectrophotometrically at 532 nm against a “blank” reaction mixture lacking homogenate but subjected to the entire procedure. To correct for background absorption, absorbance values at 572 nm were subtracted from those at 532 nm, the latter representing the absorption maximum of the 2:1 TBA:MDA adduct. The concentration of TBARS was expressed in μmol per gram of tissue.

RT-PCR

CK18 mRNA levels were quantified by RT-PCR. Total RNA was isolated using the TRIZOL method (Invitrogen). RNA samples were transcribed into first strand cDNA using RT-MLV retrotranscriptase (Invitrogen). The cDNA was amplified by PCR with the following primers: 5'-GACGCTGAGACCACACT and 5'-TCCATCTGTGCCTTGTAT (Zhong et al. 2003). Actin primers were used as an internal reference. Image analysis was performed using a Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

Statistical analysis

A total of three samples from each of the five mice was used for each treatment dose for both the in vitro and the in vivo experiments. Values always represent mean \pm SD of the five triplicate liver slices. Data were analyzed by ANOVA followed by a Dunn's post hoc test. These statistical tests were performed using the software Stata 8.0 (Stata Corp., College Station, TX). Differences between treatments were considered significant when $P < 0.05$.

Ethics

The experiments reported in this article were carried out following the guidelines stated in “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication #85–23, revised 1985) and the ‘Norma Oficial Mexicana de la

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)” titled “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (Clave NOM-062-ZOO-1999) (published in August 2001).

Results

To test the hypothesis that SA induces expression of the cytokeratin CK18, we used an organotypic liver culture model. Culturing liver slices in the presence of SA did not affect cell viability, since K^+ levels remained above $100 \mu\text{mol } K^+/\text{g}$ of tissue (Table 1). Liver slices were able to uptake SA and metabolize it to MMA and DMA metabolites in the presence and absence of the reduced thiol NAC, which has antioxidant activity

Table 1 Intracellular K^+ as an indicator of cell viability

SA (μM)	K^+ ($\mu\text{mol/g}$) Mean \pm SD
0	107.0 \pm 13.5
0.01	101.5 \pm 11.3
1.0	115.5 \pm 11.5
10	106.4 \pm 14.2

(Table 2). Consistent with our hypothesis, incubation of liver tissue with different concentrations of SA resulted in a dose-dependent increase in CK18 mRNA levels. This induction was statistically significant at 1 and $10 \mu\text{M}$ SA, which caused a three to sevenfold increase in basal expression over control cultures (Fig. 1a). Furthermore, the upregulation of CK18 mRNA correlated with increased levels of the protein (Fig. 2a). NAC inhibited the induction of CK mRNA

Table 2 Arsenic methylated species present in the organotypic cultures after 3 h of SA and SA + 2.5 mM NAC treatments (mean \pm SD)

	IAs (ng/g)	MMA (ng/g)	DMA (ng/g)	Total As (ng/g)
SA (μM)				
0	7.22 \pm 0.67	<1	<1	7.22 \pm 0.67
0.01	11.4 \pm 1.37	<1	<1	11.4 \pm 1.37
1	181.81 \pm 17.55	12.73 \pm 1.61	20.02 \pm 5.20	206.97 \pm 10.74
10	1,052.40 \pm 54.41	49.08 \pm 7.89	176.23 \pm 56.75	1,277.72 \pm 35.60
SA (μM) + 2.5 mM NAC				
0	4.03 \pm 0.43	<1	<1	2.03 \pm 0.43
0.1	8.25 \pm 0.78	<1	<1	8.25 \pm 0.78
1	113.99 \pm 1.71	<1	<1	113.99 \pm 1.71
10	908.02 \pm 85.03	45.24 \pm 8.53	24.33 \pm 5.87	977.61 \pm 93.37

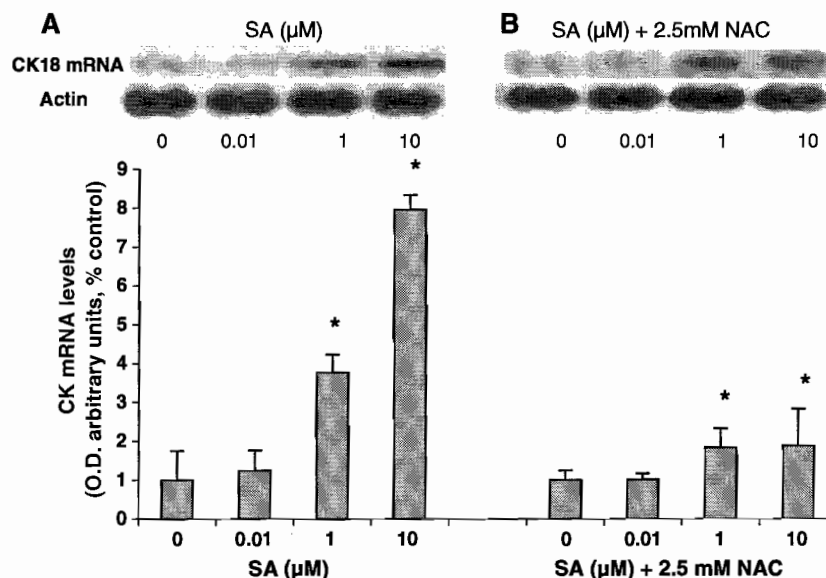
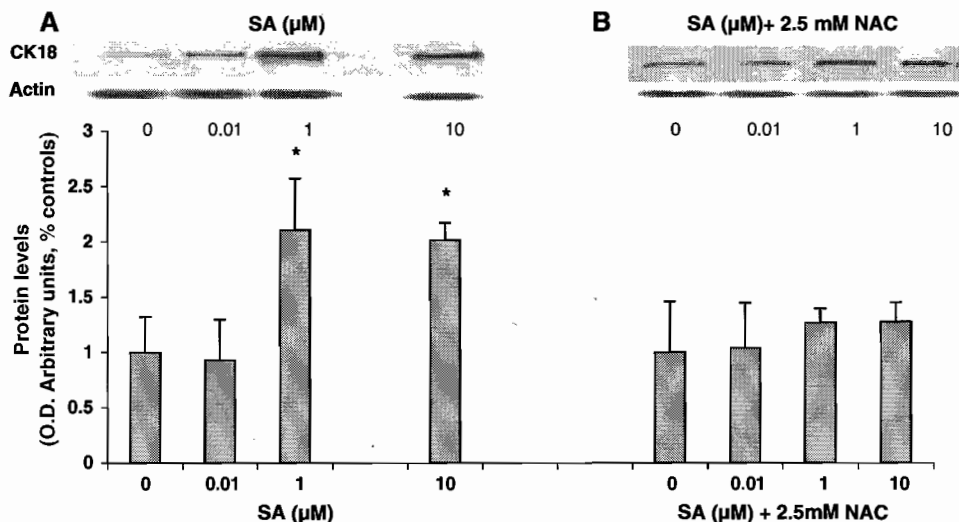


Fig. 1 Semi-quantitative RT-PCR of CK18 mRNA levels in mouse liver organotypic cultures treated with 0, 0.01, 1 and $10 \mu\text{M}$ of SA (a) and with the same concentrations of SA but in the presence of 2.5 mM NAC (b). Densitometric evaluation of the agarose gel images was performed using β -actin mRNA as loading

control. CK18mRNA levels are expressed as a percentage of loading control. Bars represent mean \pm SD of triplicate cultures. Asterisks indicate significance ($P < 0.05$) compared to control cultures according to Dunn's post hoc test

Fig. 2 CK18 protein levels in mouse liver organotypic cultures treated with 0, 0.01, 1 and 10 μM of SA (a) and with the same concentrations of SA but in the presence of 2.5 mM as percentage NAC (b). Densitometric evaluation of Western blots was performed using β -actin protein of loading control. Bars represent mean \pm SD of triplicate cultures. Asterisks indicate significance ($P < 0.05$) compared to control cultures according to Dunn's post hoc test



and protein by SA but did not modulate the basal expression of CK18 mRNA or protein (Figs. 1b, 2b).

We speculated that the increase in CK18 resulted from oxidative damage caused by SA. To test this idea, we treated liver slices with SA and then with 2.5 mM of NAC, a GSH agonist with antioxidant effects.

The presence of intracellular arsenic clearly induced CK18 mRNA, and this effect was modulated by the addition of NAC (Table 2; Fig. 3). A significant dose-related effect was demonstrated by a quadratic regression using CK18 mRNA levels and iAs concentrations in liver slices exposed to SA and to SA in the presence of NAC. The slope values of the positive relationships were 0.015 and 0.0087, respectively (Fig. 3).

We also observed that the total arsenic was slightly reduced by NAC treatment, similar to what was

observed by Santra et al. (2007) reducing the amount of methylated species formation.

Our model postulates that SA induces oxidative damage, which induces CK18 expression. We therefore measured oxidative damage following SA treatment by measuring the formation of TBARS during lipid peroxidation. We found that arsenite treatments indeed induced the TBARS production indicative of oxidative damage. Furthermore, the addition of 2.5 mM of NAC in the incubation media significantly prevented the production of TBARS, as expected (Fig. 4).

Finally, we tested our model in vivo. Similar to what was observed in vitro, 24 h after mice were given 2.5 or 5 mg/kg of SA orally, their livers showed statistically significant increased levels of CK18 mRNA and protein (Fig. 5).

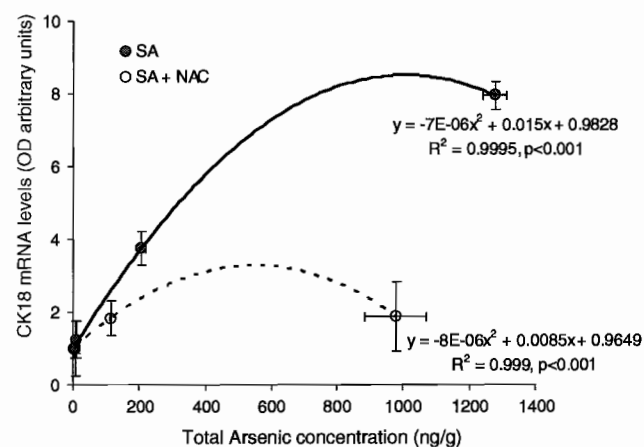


Fig. 3 Relationship between CK18 mRNA levels (O.D. arbitrary units as a percentage of loading control) and intracellular arsenic (ng/g of tissue) in liver organotypic cultures treated with 0, 0.01, 1 and 10 μM SA in the absence or presence of 2.5 mM NAC. The data represent mean \pm SD of triplicate cultures

Discussion

CK participate in the network of cytoskeletal intermediate filaments, performing a variety of important cellular functions including cell division, motility, maintenance of cellular mechanical integrity, stress responses and vesicle transport. Importantly, CK also play an essential “guardian” role in the liver that is unmasked after exposure to environmental stresses (Omary et al. 2004) such as iAs exposure. In this paper, we tested the hypothesis that arsenite treatment of liver would generate oxidative damage that would in turn induce the expression of the major type I cyokeratin found in hepatocytes CK18.

Cultured mouse liver slices in fact showed a dose-dependent modulation of CK18 gene expression following SA treatment. By measuring both CK18 mRNA and protein levels (Figs. 1a, 2a), we found that

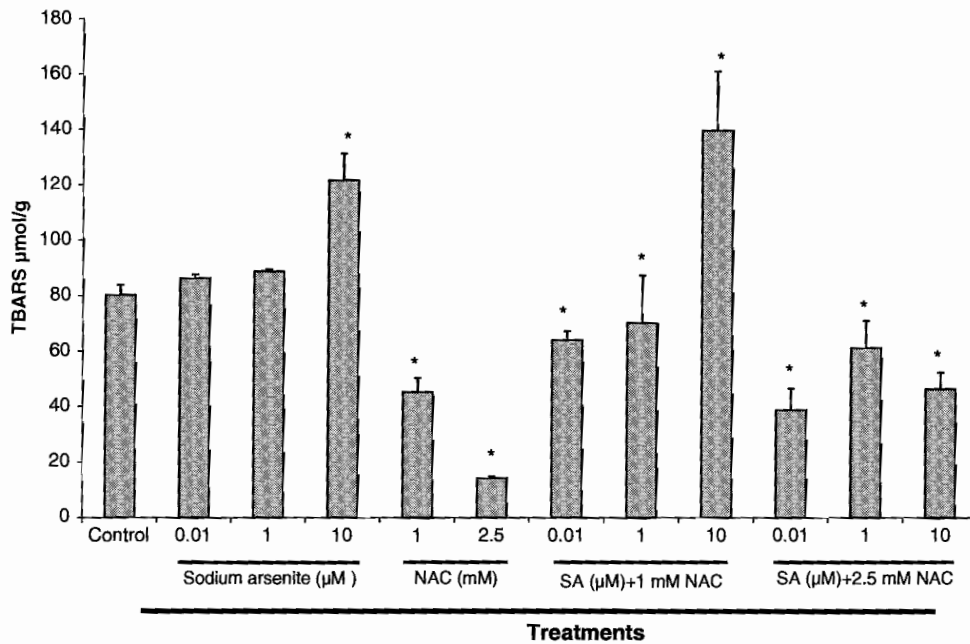


Fig. 4 Thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) production as a measure of oxidative damage in mouse liver organotypic cultures treated with different concentrations of SA and NAC.

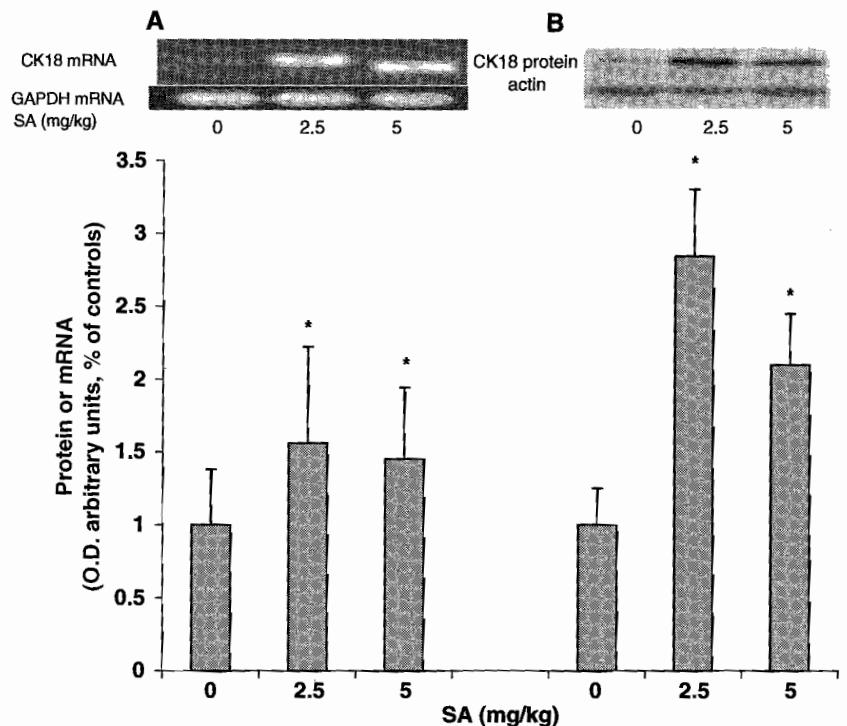
Bars represent mean \pm SD of triplicate cultures. Asterisks represent Dunn's post hoc test, $P < 0.05$

the increased transcription of the gene results in increased translation into protein in the hepatocyte cytoplasm. We reported similar results in the WRL-68 human hepatic cell line, where we also observed alterations in the distribution pattern of the CK filaments after treatment with SA (Ramírez et al. 2000). The increased levels of CK18 mRNA were clearly related

to the intracellular levels of arsenic (Fig. 3), even at the low level of 1 μ M.

N-acetylcysteine (NAC) inactivates free radical species thereby protecting cells against oxidative damage (De Flora et al. 2001). The induction of CK18 was significantly inhibited (by approximately twofold) by the presence of NAC. We also observed (Table 2; Fig. 3)

Fig. 5 CK18 mRNA (a) and CK18 protein (b) levels in mouse liver 24 h after being treated with 0, 2.5, and 5.0 mg/kg of sodium arsenite. Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA and β -actin protein were used as loading controls for a and b, respectively. Both molecules are expressed as a percentage of loading control. Bars represent mean \pm SD of five animals in duplicate determinations after densitometric analysis. Asterisks represent Dunn's post hoc test, $P < 0.05$



that the total arsenic burden in liver slices was slightly reduced by NAC reducing the amount of methylated species formation. The key point in the metabolism of arsenic is the repetitive reduction of pentavalent forms of arsenic and oxidative methylation of trivalent forms of arsenic (Thomas et al. 2004). There is ample evidence demonstrating in these series of reactions, the generation of reactive oxidative species that cause cell and tissue damage (Yamanaka and Okada 1994; Kitchin and Ahmad 2003). Thus, a reduction in the formation of methylated species would also reduce the formation of reactive damaging species. Taken together, these results strongly support the idea that oxidative stress could be modulating the expression of CK18 in mouse hepatocytes. In this regard, several studies have proposed oxidative stress as a mechanism of action of arsenic toxicity (Hansen et al. 2006).

Arsenic compounds have high affinity for thiol groups such as those present in NAC. It is therefore possible that some arsenite may be trapped by NAC so that its delivery to liver cells may be impaired. However, the cysteine analog is readily taken up by cells and can directly scavenge ROS (Kelly 1998; De Flora et al. 2001). Moreover, a number of studies have demonstrated that NAC is able to reduce or counteract oxidative damage. Electron spin resonance and confocal microscope studies showed that As (III) stimulated ROS generation and Hsp70 expression in human pulmonary epithelial and MDA231 cells, and these effects were inhibited by NAC (Han et al. 2005; Kim et al. 2005). In addition, NAC was able to inhibit the cytotoxicity of the iAs metabolites, monomethylarsonous acid (MMAIII), dimethylarsinic acid (DMAV), dimethylarsinous acid (DMAIII) and trimethylarsine oxide (TMAO) in rat bladder cells (Wei et al. 2005).

It is important to mention that NAC did not modulate basal CK18 expression (Figs. 1, 2) although 2.5 mM of NAC was able to reduce significantly TBARS formation (Fig. 4). Similar results were obtained while TBARS formation and antioxidant enzyme activities (Sudheer et al. 2007) or gene expression modulation were evaluated (Chen et al. 2005) in the presence or absence of NAC.

Our observations together with the effect observed in the animals after SA administration suggest that CK18 expression could be an early biomarker of the oxidative stress and damage induced by iAs in vitro and in vivo. Consistent with this idea, the overexpression of CK18 was dramatically elevated in the hepatocellular carcinomas that developed in adult mice exposed transplacentally to arsenic during gestation (Liu et al. 2004). In humans, accumulation of CK18 is a histopathological feature seen in hepatocellular

carcinoma, a tumor type associated with iAs exposure (Centeno et al. 2002). It is also well documented that arsenic accumulates in tissues with high keratin content such as hair and skin. If this accumulation is due to sequestration of arsenic by CK, the induction of CK18 by iAs in hepatocytes would increase the accumulation of arsenic in the liver.

Our in vitro and in vivo results (Ramírez et al. 2000 and this paper) indicate that the increased presence of CK18 protein could be considered as an early indicator of iAs liver toxicity. CK18 synthesis in liver cells is tightly correlated with differentiation programs and with several cellular processes such as apoptosis and cell proliferation. In addition, CK18 seems to be a substrate for a variety of protein kinases involved in mitosis, apoptosis and stress (Caulin et al. 2000; Gilbert et al. 2001; Omary et al. 2004). Thus during chronic iAs exposure, the altered CK18 expression could modify differentiation patterns in liver, compromising the cellular physiology by impairing the protective role of CK18 and inducing hepatic susceptibility to further toxic injury (Ku et al. 2003; Omary et al. 2004).

Acknowledgments This work was partially supported by PAPIIT IN203405.

References

- ATSDR (2000) Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta
- Azri S, Gandolfi AJ, Brendel K (1990) Carbon tetrachloride toxicity in precision cut tissue slices. *In vitro Toxicol* 3:127–138
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302–310
- Cadrin M, Hovington H, Marceau N, McFarlane-Anderson N (2000) Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver. *J Hepatol* 33:199–207
- Calnek D, Quaroni A (1993) Differential localization by in situ hybridization of distinct keratin mRNA species during intestinal epithelial cell development and differentiation. *Differentiation* 53:95–104
- Caulin C, Ware CF, Magin TM, Oshima RG (2000) Keratin dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol* 149:17–22
- Centeno JA, Mullick FG, Martinez L, Page NP, Gibb H, Longfellow D, Thompson C, Ladich ER (2002) Pathology related to chronic arsenic exposure. *Environ Health Perspect* 110:883–886
- Chen YH, Wang JP, Wang H, Sun MF, Wei LZ, Wei W, Xu DX (2005) Lipopolysaccharide treatment downregulates the expression of the *pregnane X receptor*, *cyp3a11* and *mdr1a* genes in mouse placenta. *Toxicology* 211:242–252
- Coulombe PA, Omary MB (2002) ‘Hard’ and ‘soft’ principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 14:110–122

- De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM (2001) Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 22:999–1013
- Denk H, Stumtner C, Zatloukal K (2000) Mallory bodies revisited. *J Hepatol* 32:689–702
- Fickert P, Trauner M, Fuchsichler A, Stumtner C, Zatloukal K, Denk H (2002) Cytokeratins as targets for bile acid-induced toxicity. *Am J Pathol* 160:491–499
- Gilbert S, Loranger A, Daigle N, Marceau N (2001) Simple epithelium keratins 8 and 8 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol* 154:763–773
- Han SG, Castranova V, Vallyathan V (2005) Heat shock protein 70 as an indicator of early lung injury caused by exposure to arsenic. *Mol Cell Biochem* 277:153–164
- Hansen JM, Zhang H, Jones DP (2006) Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic Biol Med* 40:138–145
- Hirano S, Kobayashi Y, Cui X, Kanno S, Hayakawa T, Shraim A (2004) The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: important roles of thiol compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 198:458–467
- Hughes MF, Kitchin KT (2006) Arsenic, oxidative stress and carcinogenesis. In: *Oxidative stress. Disease and cancer*, chapter 29
- Hughes MF, Kenyon EM, Edwards BC, Mitchell CT, Del Razo LM, Thomas DJ (2003) Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol* 191:202–210
- IPCS/WHO (2001) *IPCS (International Programme on Chemical Safety) Environmental Health Criteria 224. Arsenic and arsenic compounds*, 2nd edn. World Health Organization, Geneva
- Izquierdo-Vega JA, Soto CA, Sanchez-Peña LC, De Vizcaya-Ruiz A, Del Razo LM (2006) Diabetogenic effects and pancreatic oxidative damage in rats subchronically exposed to arsenite. *Toxicol Lett* 160:135–142
- Kelly GS (1998) Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 3:114–127
- Kim YH, Park EJ, Han ST, Park JW, Kwon TK (2005) Arsenic trioxide induces Hsp70 expression via reactive oxygen species and JNK pathway in MDA231 cells. *Life Sci* 77:2783–2793
- Kitchin KT, Ahmad S (2003) Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol Lett* 137:3–13
- Ku NO, Michie SA, Soetikno RM, Resurrección EZ, Broome RL, Omary MB (1998) Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice. *J Cell Bio* 143:2023–2032
- Ku NO, Darling JM, Krams SM, Esquivel CO, Keefe EB, Sibley RK (2003) Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6063–6068
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Liao J, Lowthert LA, Ku NO, Fernandez R, Omary MB (1995) Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. *J Cell Biol* 131:291–301
- Liu J, Xie Y, Ward JM, Diwan BA, Waalkes MP (2004) Toxicogenomics analysis of aberrant gene expression in liver tumors and non-tumorous livers of adult mice exposed in utero to inorganic arsenic. *Toxicol Sci* 77:249–257
- Moll R (1993) Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors. *Veroff Pathol* 142:1–197
- Moll R, Franke W, Schiller D, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11–24
- Omary MB, Coulombe PA, McLean WH (2004) Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* 351:2087–100
- Patrick L (2003) Toxic metals and antioxidants: part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Altern Med Rev* 8:106–128
- Ramírez P, Del Razo LM, Gutierrez-Ruiz MC, Gonsbatt ME (2000) Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis* 21:701–706
- Rhodes K, Oshima RG (1998) A regulatory element of the human keratin 18 gene with AP-1-dependent promoter activity. *J Biol Chem* 273:26534–26542
- Santra A, Chowdhury A, Ghatak S, Biswas A, Dhali GK (2007) Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by n-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharm*. doi:10.1016/j.taap.2006.12.029
- Sudheer AR, Muthukumaran S, Devipriya N, Menon VP (2007) Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. *Toxicology* 230:11–21
- Tao GZ, Toivola DM, Zhong B, Michie SA, Resurrección EZ, Tamai Y, Taketo MM, Omary MB (2003) Keratin-8 null mice have different gallbladder and liver susceptibility to lithogenic diet-induced injury. *J Cell Sci* 116:4629–4638
- Thomas DJ, Waters SB, Styblo M (2004) Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 198:319–326
- Wei M, Arnold L, Cano M, Cohen SM (2005) Effects of co-administration of antioxidants and arsenicals on the rat urinary bladder epithelium. *Toxicol Sci* 83:237–45
- Yamanaka K, Okada S (1994) Induction of lung-specific DNA-damage by metabolically methylated arsenicals via the production of free-radicals. *Environ Health Perspect* 102:37–40
- Zatloukal K, Stumtner C, Lehner M, Denk H, Baribault H, Eshkind LG, Franke WW (2000) Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies. *Am J Pathol* 156:1263–1274
- Zhong B, Zhou Q, Toivola DM, Tao GZ, Resurrección EZ, Omary MB (2003) Keratin-8 null mice have different gallbladder and liver susceptibility to lithogenic diet-induced injury. *J Cell Sci* 116:4629–4638

