

205

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO GENOTOXICO PRODUCIDO POR LOS METABOLITOS TRIVALENTES DEL ARSENICO EN LINFOCITOS HUMANOS”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ERNESTO SOTO REYES SOLIS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2002





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "*Efecto genotóxico producido por los metabolitos trivalentes del arsénico en linfocitos humanos*"

realizado por *Ernesto Soto Reyes Solis*

con número de cuenta 9657743-9 , quién cubrió los créditos de la carrera de *Biología*

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario *Dr. Emilio Rojas del Castillo*

Propietario *Dra. Luz María del Razo Jimenez*

Propietario *Dra. Sandra Luz Gomez Arroyo*

Suplente *Dra. Maria Eugenia Gonselatt Bonaparte*

Suplente *Dr. René Cárdenas Vazquez*

Rojas del Castillo

Luz María del Razo Jimenez

Sandra Luz Gomez Arroyo

Maria Eugenia Gonselatt Bonaparte

René Cárdenas Vazquez

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de *Biología*

[Firma]



Dra. Patricia Ramos Morales
Coordinadora de la unidad
DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Emilio Rojas del Castillo**, por tu apoyo incondicional, tu tiempo, por haberme enseñado lo que es amar la investigación, por abrirme las puertas de tu laboratorio, por permitirme crecer y sobre todo por soportar uno que otro cuento de las mil y una noches.... por siempre tu amigo Sherezade. De corazón Mil y un Gracias!!!!

A la **Dra. Mahara Valverde**, por ser siempre la guía de mis más lúgubres problemas, por estar presente en todos y cada uno de mis logros, Mil gracias!!!

A mi **GRAN, GRAN** (los que lo conozcan sabrán porqué) amigo **Anselmo Rossier**, por ser mi donador estrella, compañero en las buenas y en las malas como también por ser un fiel caballero en las batallas contra los ratones.

A mis ratones Sr. Botija, y el Solitario, un saludo desde la tierra.

A la **Biol. Maricarmen López**, por sus sabios consejos que me condujeron a mejorarme como persona.

A la **Dra. Luz María del Razo Jiménez**. Gracias!!!, ya que sin su ayuda textualmente "esta tesis no se hubiera llevado a cabo", pues su tiempo, dedicación y excelentes sugerencias, hicieron posible este trabajo.

Al a **Dra. Sandra Gómez Arroyo**. Por dedicar todo su tiempo a la corrección de esta obra, ya que si sus comentarios me habría sido imposible llegar a la culminación de la misma.

Al **Dr. René Cárdenas Vázquez**, por sus valiosos comentarios y sugerencias a este trabajo, Muchas Gracias!!!

A la **Dra. María Eugenia Gonsebatt**, por sus acertados comentarios para mejorar la tesis.

A **Luis Serrano**, por ayudarme infinitas veces a sacarme sangre, muchas gracias por esa connotada experiencia.

Al **Dr. Luis Benítez B.** por haberme enseñado la disciplina en el trabajo. Gracias de todo corazón, El Argentino.

A la **Dra. Guadalupe Quiñónez**, por ser mi madre adoptiva en el laboratorio del S XXI

A mis compañeros de laboratorio y amigos: Rodrigo, Tsut-sui, Efraín, Patty, Andrés, Daniel, Mónica, Danna, Io, Montserrat, Carlos, y a todos aquellos ilustres que jamás olvidaré.

A mi hermano **Inti**, por fiin!!!! Lo ves, con un poco de entusiasmo se pudo lograr, Gracias por todo.

Gracias a todos mis compañeros del **SOS**, que me enseñaron que en esta vida accidentada se puede llegar a las metas deseadas.

A mis buenos amigos: Arie, Liz, Luis, Nala, Anais, Ana Elia, Pan, Russ, Paulina Karla, Azul, Roja, Amarilla, Daniel, Letty, Leslie, María, Tita, Rafa, y a todo aquella que por omisión no están aquí nombrados.

A Mary (la niña de las manos rojas), por haber sido un apoyo, que me permitió seguir adelante.

A Enry, por haberme alentado con todo su cariño y pasión, por aguantar mis malos genios después de días sin haber dormido, con todo mi amor, Ahuizote.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres **Ernesto y Narda**, pues sin ellos no estaría cumpliendo uno de mis mayores sueños, gracias por darme toda una vida llena de amor y cariño. Sin ustedes simplemente no sería lo que soy ahora... infinitamente les estaré muy agradecido.... y espero que este trabajo sea tan sólo uno de los tanto peldaños en los logros que pienso alcanzar.

A **Pochola**, mi segunda madre, fuente incondicional de cariño, que siempre me apoyaste en todas mis locuras, pues sin no hubiera crecido con todo el amor que siempre me has dado no hubiera llegado a donde estoy; te estoy infinitamente agradecido. Muchas gracias **Güela!!!**

A Mina, Jorge y Claus, muchas gracias por nunca perder las esperanzas en mí.

A la **Dra. Patricia Aceves**, por sus sabios consejos.

A mis primos y tíos Laura y Carlos y Rodrigo (el tigre), a mis hermanos.

A la familia **de Maria y Campos** por su enorme cariño.

A la familia **Pla-Casamitjana** por haberme enseñado valores inolvidables y experiencias únicas.

EN MEMORIA DE MI ABUELO, MI GÜELO

ERNESTO SOTO REYES BREMAUNTZ.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

- Antecedentes del arsénico. 1
- Características fisicoquímicas del arsénico. 2
- Usos. 3
- El arsénico como contaminante. 4

TOXICOLOGÍA DEL ARSÉNICO.

- Vías de exposición al arsénico. 8
- Absorción. 9
- Distribución. 9
- Metabolismo del arsénico. 10
- Excreción. 16
- Efectos en la salud. 17
- Efectos moleculares adversos. 19
- Genotoxicidad del arsénico. 20
- Arsénico y estrés oxidativo. 22
- Carcinogenicidad. 26
- Electroforesis unicelular ("Ensayo Cometa"). 28
- Sitios álcali lábiles (SAL) 32

JUSTIFICACIÓN. 34

HIPÓTESIS. 34

OBJETIVO GENERAL. 35

OBJETIVOS PARTICULARES. 35

METODOLOGÍA. 36

- Obtención de los metabolitos trivalentes del arsénico (MMA^{III} y DMA^{III}). 36
- Concentraciones utilizadas de los metabolitos trivalentes del arsénico (MMA^{III} Y DMA^{III}). 36
- Obtención de la muestra. 37
- Tratamiento "*in vitro*". 37
- Método dual por fluorocromos para la cuantificación de viabilidad. 38
- Electroforesis unicelular alcalina a pH >13. 39
- Electroforesis unicelular alcalina a pH 12.1. 41
- Electroforesis unicelular versión neutra. 42
- Peroxidación lipídica. 44
- Análisis estadístico 45

RESULTADOS	46
• Cuantificación de la viabilidad por fluorocromos.	46
• Electroforesis unicelular alcalina pH >13.	50
• Electroforesis unicelular alcalina pH 12.1.	52
• Inducción de sitios álcali lábiles.	54
• Electroforesis unicelular versión neutra.	56
• Peroxidación lipídica.	58
• Correlación entre el rompimiento en el DNA y peroxidación lipídica	60
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	67
LITERATURA CITADA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Países donde se han reportado concentraciones de arsénico	5
Figura 2.- Mapa de la República Mexicana en donde se señalan los estados con problemas de hidroarsenismo.	6
Figura 3.- Secuencia de reducción y oxidación para la vía de la metilación del arsénico.	11
Figura 4.- Esquema simplificado del metabolismo del arsénico en muchos de los Mamíferos.	12
Figura 5.- Imagen en donde se muestran los cometas de la técnica de electroforesis unicelular.	29
Figura 6.- Imagen digitalizada y analizada de un cometa por el software Komet.	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Especies de ROS y radicales libres, su nombre común y vida media.	23
Tabla 2.- Posibles eventos involucrados en el daño al DNA con relación a la variación del pH en el SCGE.	31
Tabla 3.- Diferencias metodológicas de la técnica de electroforesis unicelular (SCGE).	43
Tabla 4.- Porcentaje de viabilidad mediante el método dual por fluorocromos.	47

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1.- Porcentaje de viabilidad de las especies arsenicales en donador 1.	48
Gráfica 2.- Porcentaje de viabilidad de las especies arsenicales en donador 2.	49
Gráfica 3.- Efecto genotóxico producido por las especies arsenicales en el donador 1.	50
Gráfica 4.- Efecto genotóxico producido por las especies arsenicales en el donador 2.	51
Gráfica 5.- Efecto genotóxico producido a pH 12.1 en el donador 1.	52
Gráfica 6.- Efecto genotóxico producido a pH 12.1 en el donador 2.	53

Gráfica 7.- Análisis de correlación entre la inducción de daño al DNA a pH >13 y pH 12.1 en el donador 1.	54
Gráfica 8.- Análisis de correlación entre la inducción de daño al DNA a pH >13 y pH 12.1 en el donador 2.	55
Gráfica 9.- Efecto genotóxico producido a pH neutro en el donador 1.	56
Gráfica 10.- Efecto genotóxico producido a pH neutro en el donador 2.	57
Gráfica 11.- Peroxidación lipídica de leucocitos con DMA ^{III} en ambos donadores.	58
Gráfica 12.- Peroxidación lipídica de leucocitos con MMA ^{III} en ambos donadores.	59
Gráfica 13.- Correlación entre SCGE a pH >13 vs peroxidación lipídica	60

Soto-Reyes, E. 2001. **Efecto genotóxico producido por los metabolitos trivalentes del arsénico en linfocitos humanos.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

RESUMEN

El arsénico es un carcinógeno comprobado, y se cree que uno de sus efectos es la producción de radicales libres, formados por las diferentes especies de este metaloide. Nuevos estudios han reportado que las especies metiladas trivalentes del arsénico pudieran ser más tóxicas. Es por ello que este estudio tiene por objetivo evaluar por medio de la técnica de electroforesis unicelular en gel (SCGE) y la técnica de peroxidación lipídica; si la inducción de sitios álcali lábiles es el evento molecular involucrado en el daño genotóxico producido por dichas especies en linfocitos humanos. Para ello se utilizaron las especies trivalentes del arsénico (MMA^{III} , DMA^{III} y As^{III}), las cuales son consideradas como las más reactivas para este metaloide. Se obtuvieron linfocitos de dos donadores, para ser tratados con dichas especies arsenicales empleando un amplio rango de concentraciones. Los resultados obtenidos sugieren que los metabolitos trivalentes del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}) causan un daño genotóxico por acción de radicales libres, siendo el DMA^{III} más genotóxico a concentraciones altas, mientras que a concentraciones bajas el MMA^{III} es el metabolito que produjo más daño genotóxico.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES DEL ARSÉNICO

Se han reportado altas concentraciones de arsénico en el pelo de momias encontradas después de cientos de años de preservación en el desierto de Atacama, lo cual sugiere que el arsénico ha estado con el hombre a lo largo de la historia (Zaldivar y Ghai, 1980).

Los efectos tóxicos del arsénico fueron descritos por Dioscórides en el siglo I de la era cristiana y sus propiedades eran conocidas por los griegos, utilizando a este metaloide desde los tiempos de Hipócrates, quien recomendaba su administración para el tratamiento de úlceras (Gorby, 1994).

El arsénico (As) ha sido utilizado como un veneno por excelencia; un caso histórico muy polémico fue cuando, al morir Napoleón en 1821 durante el exilio, quedó la interrogante de si éste fue envenenado por arsénico o simplemente sucumbió a un cáncer estomacal; la Sociedad Internacional Napoleónica argumenta que fue asesinado por infusiones de arsénico colocadas en su vino, ya que en la autopsia realizada, se menciona que murió obeso, lo cual resulta inconsistente con una muerte por cáncer y apoya la tesis del envenenamiento por arsénico (Holden, 2000).

El arsénico ha llegado a tener un papel tan importante, que incluso en la literatura se ha utilizado como el arma perfecta en asesinatos, ejemplo de ello lo encontramos en *Arsénico y encaje* libro de Agatha Christie, donde una bebida con éste metaloide podía provocar una muerte instantánea (Holden, 2000).

A través de la historia ha desempeñado distintos papeles, en la actualidad tanto los metales como los metaloides han llegado a ser un grupo muy importante de contaminantes ambientales, ya sea por su distribución en la naturaleza o por la actual actividad antropogénica que han provocado una mayor emisión al ambiente, teniendo así un incremento en la exposición a este tipo de compuestos, repercutiendo en problemas de salud y del ambiente (Gebel, 2000; EPA, 2001).

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL ARSÉNICO

El arsénico (As) es un elemento que se sitúa en la tabla periódica en el grupo 15 antiguamente llamado VA bajo el nitrógeno y el fósforo. Su número y peso atómicos son de 33 y de 74.9 respectivamente. Está clasificado como un elemento de transición o metaloide (elemento que comparte características físicas y químicas tanto de los metales como de no metales) (Casarett, 1986).

Es un elemento natural de color gris metálico, que normalmente se encuentra en la naturaleza en combinación con otros elementos como oxígeno, cloro y azufre; también es común su unión con carbón (de una manera covalente) ó hidrógeno constituyendo compuestos orgánicos. Estos compuestos

son polvos de color blanco ó incoloros, inodoros e insípidos (Hodgson y Mailman, 1998).

Los compuestos inorgánicos tienen una valencia de 3 (como el trióxido de arsénico (As_2O_3) o valencia de 5 (como el pentóxido de arsénico As_2O_5). La mayoría de los compuestos inorgánicos del arsénico, excepto las sales de metales pesados son razonablemente solubles (Stokinger, 1981).

Existen tres grandes grupos de compuestos de arsénico:

- Arsenicales inorgánicos
- Arsenicales orgánicos
- Arsina (Gas)

La toxicidad comparativa de estos grupos depende tanto de su estado de oxidación, la ruta de exposición y de su solubilidad (Stokinger, 1981).

USOS

Los compuestos de arsénico se han empleado terapéuticamente por más de dos milenios. Su uso se ha distribuido a tratamientos en contra de enfermedades venéreas como la sífilis, en donde se utiliza un compuesto organoarsénico conocido como Salvarsan (Izumi e Isozumi, 2001); como también en los tratamientos para la psoriasis, asma o tripanosomiasis (Jager *et al.*, 1997). También se ha empleado como un agente quimioterápico en contra de leucemias tales como la promielocítica aguda en donde se aplica el trióxido de arsénico en contra de este tipo de cáncer (Chen *et al.*, 1996; Wang, 2001);

Tiene usos en la agricultura, un ejemplo de ello se observa en la producción de algodón, donde se utiliza el ácido arsénico (H_3AsO_4) para la desecación de las hojas (Casarett, 1986); en la taxidermia y preservación de la madera. Este metaloide a su vez se ha utilizado en productos como insecticidas, raticidas y herbicidas, donde el dimetil arsénico (DMA), uno de los metabolitos de dicho metaloide, se ha empleado como herbicida efectivo (Kaise *et al.*, 1985, 1989).

Se ha encontrado como un subproducto en la industria manufacturera de semiconductores y en la fabricación de vidrio. Inclusive puede presentarse en el humo de tabaco, la industria metalúrgica del oro, plomo, cobre así como en las termoeléctricas (Hodgson y Mailman, 1998; WHO, 1981).

El arsénico está ampliamente distribuido en la tierra y puede encontrarse como mineral en forma de arsenopirita ($FeAs_2 \cdot FeS_2$), enargita ($3Cu_2S \cdot As_2S_5$) y orpimento (As_2S_3) (ATSDR, 1998).

Recientemente se ha usado en componentes electrónicos como el arseniuro de galio (GaAs) y el arseniuro de Indio (InAs) (Bustamante *et al.*, 1997; Wexler, 1998).

EL ARSÉNICO COMO CONTAMINANTE

En la actualidad el arsénico ha adquirido gran importancia, ya que su uso y distribución han aumentado de manera alarmante a nivel mundial, siendo así un contaminante común en el agua de bebida y alimentos. La Agencia de

Protección Ambiental (USEPA), recientemente disminuyó los límites de arsénico en agua de 50 ppb a 10 ppb (EPA, 2001). Desgraciadamente la gran mayoría de la población se encuentra consumiendo agua por arriba de estos valores; siendo también que las concentraciones naturales totales de arsénico en agua de bebida varían dependiendo del lugar geográfico (Alpert, 2001),

Se han encontrado altos contenidos de este metaloide en el agua de Argentina (Astolfi, 1981), Chile (Borgoño *et al.*, 1977), Taiwán (Tseng *et al.*, 1968), Estados Unidos (Alpert, 2001), India (Das *et al.*, 1994, 1995; Chowdhury *et al.*, 2000; Mazumder *et al.*, 2001) y México (Cebrián *et al.*, 1994). En todos estos países se excede la norma permitida para el arsénico en agua de bebida; calculándose que más del 2×10^9 personas a nivel mundial han sido expuestas al arsénico (Rojas *et al.*, 1999).

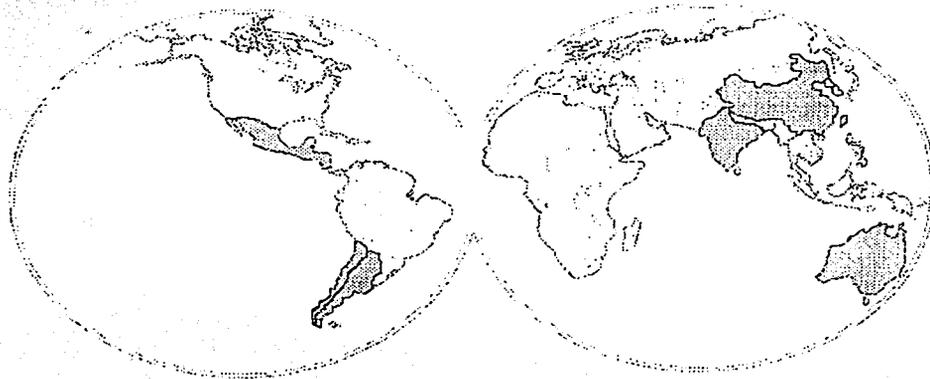


Figura 1. Países donde se han reportado concentraciones de arsénico mayores a la norma establecida por la USEPA.

En México se tiene datos de que aproximadamente 16 millones de mexicanos están expuestos al arsénico de una manera crónica; ya que existen zonas de algunos estados de la república en donde se ha encontrado agua con concentraciones muy elevadas de este metaloide y cuya contaminación en el agua de bebida se ha convertido en un problema grave para los habitantes de poblaciones como son: Puebla, Chihuahua, Hidalgo, Morelos, Coahuila, Nuevo León, Durango, Baja California Norte, San Luis Potosí, entre otras. (Cebrián *et al.*, 1983, 1994; Ostrosky-Wegman *et al.*, 1991).



Figura 2. Mapa de la República Mexicana en donde se señalan los estados en donde existen problemas de hidroarsenismo.

México es considerado uno de los principales países productores de arsénico (Cebrián *et al.*, 1983), además de que actividades humanas tales como las plantas termoeléctricas, procesos de fundición y refinación de metales no ferrosos (Pb, Zn y Cu) pueden provocar la formación y liberación de este metaloide.

Inclusive de manera natural se puede dar la emisión de este elemento, ya que la actividad volcánica y la erosión pueden ser factores que desencadenen la liberación de arsénico al ambiente.

De manera natural el arsénico puede encontrarse de 2 a 5 ppm en forma de complejos en ciertas rocas y capas minerales ampliamente distribuidos en la corteza terrestre (IARC, 1987). Existen alrededor de 150 minerales que contienen arsénico en donde los más abundantes son los arseniuros de cobre, plomo, plata, oro y sulfuros, presentándose así como depósitos en la corteza terrestre, que por efecto antropogénico pueden llegar a ser liberados.

El arsénico en el agua se encuentra predominantemente (90%) en su forma pentavalente (As^{V}), cuando éste metaloide ingresa al organismo es reducido a As^{III} dentro de la célula (Yu y Snow, 1998).

TOXICOLOGÍA DEL ARSÉNICO

VÍA DE EXPOSICIONES AL ARSÉNICO

Desde una perspectiva clínica, las exposiciones agudas se dan usualmente en homicidios o suicidios, mientras que las crónicas son relacionadas más comúnmente con situaciones ocupacionales, ó en áreas geográficas con subsuelos ricos en minerales arsenicales, repercutiendo en la contaminación del agua y alimentos. La ingestión es la vía primaria de exposición para el arsénico, ya sea por agua de bebida o por la ingestión de comida contaminada por este metaloide (Mann *et al.*, 1996).

Los organismos marinos, como los crustáceos contienen altas concentraciones de arsénico orgánico, pero éstos no afectan de manera importante a los humanos debido al bajo consumo de éste tipo de alimentos (Tsuchiya *et al.*, 1997; Gebel, 2000).

Inhalación

La inhalación es considerada como una vía de menor importancia debido a una menor biodisposición (Wexler, 1998). El arsénico se distribuye en el aire, ya sea por la explotación de yacimiento minerales, por su uso en pesticidas, como por la combustión de carbón o gases que lo contienen.

ABSORCIÓN

El arsénico es absorbido en mayor medida por el tracto gastrointestinal y por los pulmones (un ejemplo de ello es la arsina (un gas)) (Wexler, 1998)

La absorción depende tanto de la forma química y física en que se presente. De cualquier manera, las más comunes (particularmente la arsina y el trióxido de arsénico son las más prevalentes) son absorbidas por inhalación y por el tracto gastrointestinal (USEPA, 1980; Tsuchiya *et al.*, 1997).

La absorción del arsénico a través de la piel es mínima, ya sea por lavarse las manos, bañarse, lavado de ropa etc, lo cual no constituye un riesgo a la salud (Wexler, 1998).

DISTRIBUCIÓN

Una vez absorbido, el arsénico se distribuye ampliamente a los tejidos por la sangre. Se concentra mayormente en el hígado, riñón, pulmones y piel y en menor medida en músculos y huesos (Casarett, 1986). Las exposiciones crónicas pueden provocar que el arsénico se acumule en el pelo, las uñas y la piel. La sangre no es un buen indicador de los niveles de exposición al arsénico, debido a su rápida distribución (Casarett, 1986). El arsénico puede distribuirse y acumularse en la grasa incluyendo componentes del tejido neural (como la mielina) en donde hay una gran cantidad de lípidos y fosfolípidos (USEPA,

1980). El arsénico también puede atravesar la placenta fetal, provocando así que el producto nazca con altas concentraciones de éste metaloide (Ferm, 1977; Kagey *et al.*, 1977).

METABÓLISMO DEL ARSÉNICO

A lo largo del tiempo el arsénico ha sido estudiado en muchos aspectos, siendo su metabolismo uno de los más publicados en la actualidad.

La vía bioquímica por la cual los organismos inferiores como las bacterias y hongos que llevan a cabo la biotransformación del arsénico inorgánico fueron propuestas tanto por Challenger (1945) y Cullen *et al.* (1984), en donde se propuso en general dos pasos bioquímicos básicos importantes, por un lado, la reducción y por el otro la metilación oxidativa (Zakharyan *et al.*, 1995), postulando a la S-Adenosilmetionina como agente metilante (Cullen *et al.*, 1979).

El análisis de los compuestos de arsénico encontrados en orina después de la administración de arsenato y arsenito a animales y en humanos ha sugerido que estos son biotransformados por la vía de la metilación (Le *et al.*, 2000). Se ha propuesto entonces, que en la mayoría de los mamíferos la vía de la metilación es la encargada de la desintoxicación para el arsénico, aunque existe una controversia con respecto a la biodiversidad de sus metiltransferasas para el arsénico, puesto que animales como el mono marmoset, el chimpancé, el gorila, el orangután y el cobayo presentan deficiencias en la metiltransferasa, mientras que el conejo, la rata, el ratón y el criceto tienen metiltransferasas del

arsénico en hígado, aunque es importante señalar que el hígado no es el único órgano que puede metilar al arsénico inorgánico (Goering *et al.*, 1999). Es sorprendente, considerando que los monos, especialmente el chimpancé, sea deficiente de metiltransferasa, pues éste presenta un metabolismo similar al de los humanos, siendo que éste último sí presenta las metiltransferasas. Existen variaciones de toxicidad entre especies de mamíferos, observándose que los humanos parecen ser más sensibles que los animales experimentales (Vahter, 2000).

La metilación de las especies inorgánicas arsenicales permite que sean más solubles y así que su excreción sea más rápida, por lo que este proceso ha sido considerado como una vía de desintoxicación. Aunque empiezan a aparecer reportes en donde se sugiere que algunas especies metiladas puedan ser aún más tóxicas que los compuestos iniciales (Kitchin, 2001).

En la figura 3 se observa como se desarrolla el proceso de reducción y metilación de las especies trivalentes metiladas.

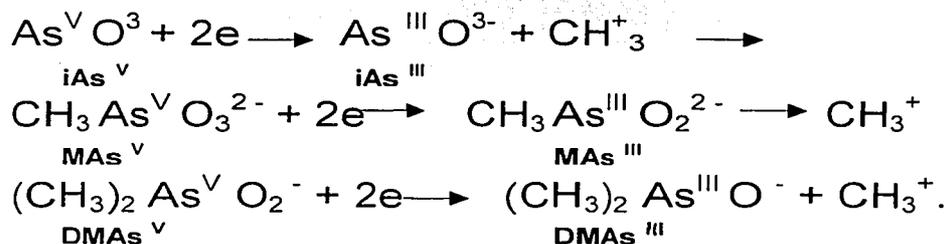


Figura 3. Secuencia de reducción y oxidación para la vía de la metilación del arsénico (Le *et al.*, 2000; Tomas *et al.*, 2001).

Actualmente los estudios de la vía metabólica del arsénico han avanzado, al punto que hay evidencias de la formación *in vivo* de las especies metiladas trivalentes, mejorando así la idea para la metilación del arsénico, es por ello que es vital abocarnos al estudio de la misma, pues esta puede ser un punto crucial de la carcinogénesis por arsénico en el humano.

La biotransformación del arsénico en mamíferos está basada en varios pasos aceptados:

METILACIÓN DEL ARSÉNICO

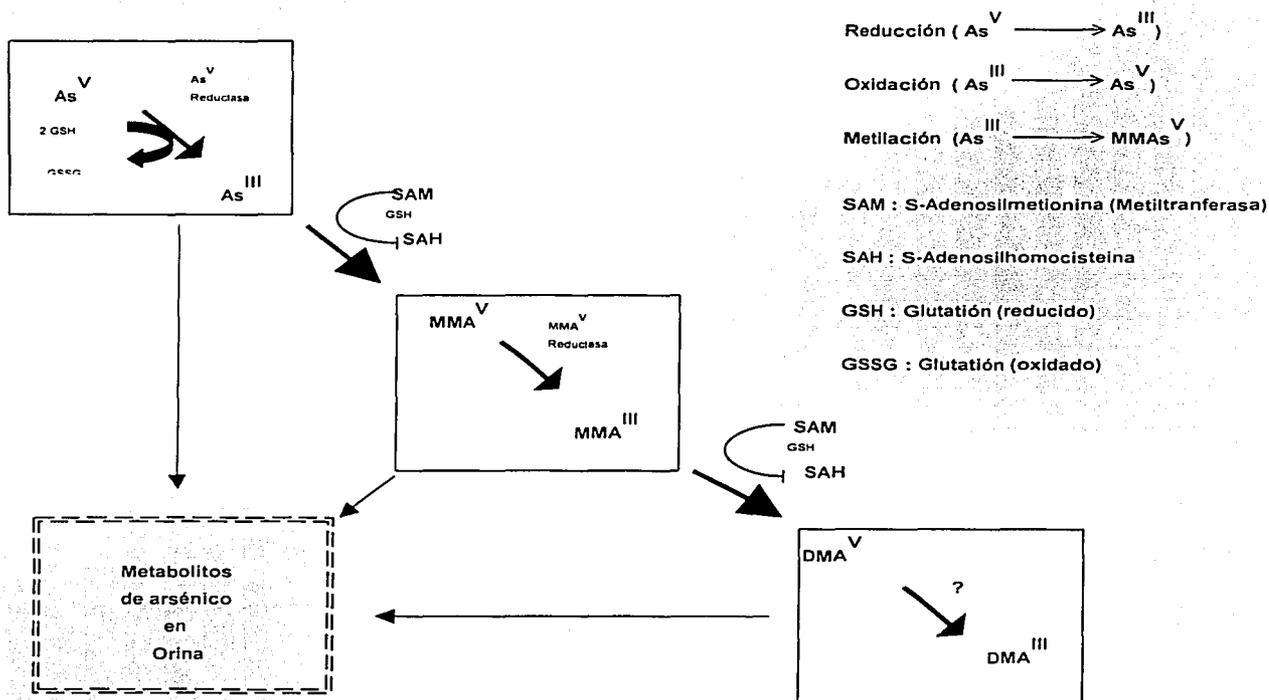


Figura 4. Esquema simplificado del metabolismo del arsénico presente en muchos de los mamíferos incluido el humano (Kitchin, 2001).

La oxidación y reducción son procesos que están involucrados dentro del metabolismo del arsénico en donde los substratos para este proceso son las especies trivalentes, teniendo como productos las formas metiladas pentavalentes. Las diferentes especies arsenicales que se pueden encontrar dentro del proceso de metilación del arsénico son: As^{III} (arsenito), As^{V} (arsenato), MMA^{III} , MMA^{V} , DMA^{III} , DMA^{V} (ésta última es la forma presente en varios mamíferos), y la forma trimetilada (TMAO). Se ha visto que el DMA se puede biotransformar para ser eliminado en la orina a manera de óxido trimetilarsina (TMAO) (Kenyon *et al.*, 2001).

La metilación que se da del As^{V} a As^{III} , se lleva a cabo por un evento de reducción, proceso que ocurre a través de reacciones en donde se encuentra envuelto el glutatión (GSH) (Buchet y Lauwerys, 1988; Kitchin, 2001).

El As^{III} (arsenito) es secuencialmente metilado, primero en su forma monometilada (MMA), y subsecuentemente a la dimetilada (DMA) por la incorporación de grupos metilos lo cual ocurre por enzimas caracterizadas como las metiltransferasas, con S – adenosil-metionina (SAM) como un cofactor donador de metilos. Después de la metilación, los subproductos como el dimetilarsénico (DMA) y el monometilarsénico (MMA) se encuentran en un estado pentavalente pudiendo ser reducidos al trivalente (Le *et al.*, 2000; Kitchin, 2001).

Recientemente se ha logrado separar las formas trivalentes y pentavalentes del DMA y MMA. Las especies pentavalentes son

termodinámicamente más estables, es por ello que los compuestos trivalentes tienden rápidamente a oxidarse a pentavalentes, aunque también es posible la reducción de los compuestos pentavalentes a los trivalentes (Kitchin, 2001).

En humanos, la biotransformación del arsénico se realiza por medio del proceso de metilación, formando a las especies como el ácido monometilarsénico (MMA) y el ácido dimetilarsénico (DMA), siendo estos productos intermediarios ó finales de las reacciones propias de la vía de desintoxicación (Styblo *et al.*, 2000).

Se ha encontrado que tanto en la orina de individuos expuestos a arsénico, como en células tratadas con este metaloide, se observa la presencia del MMA^{III} y DMA^{III}, siendo productos que dentro del metabolismo del arsénico en humanos podrían tener efectos adversos asociados con la exposición de arsénico (Styblo *et al.*, 2000).

Con respecto a la toxicidad existen muchos reportes que se contradicen sobre cuáles especies son las más reactivas. Hay publicaciones en donde se menciona que MMA^{III} es más tóxico que el arsenito o el arsenato teniendo su escala de toxicidad de la siguiente forma:



Al parecer estas variaciones dependen, por un lado, de la especie en la cual se esté llevando a cabo el experimento, y de manera paralela, su forma de metabolizar dicho metaloide (Petrick *et al.*, 2000).

Muchos autores coinciden en que los productos pentavalentes de las reacciones de metilación como MMA^V y DMA^V son significativamente menos

tóxicas que el arsénico inorgánico (As^{III} y As^{V}) (Yamauchi *et al.*, 1994; Petrick *et al.*, 2000), sin embargo reportes recientes sugieren que los metabolitos trivalentes son más reactivos que los pentavalentes (Ahmad *et al.*, 2000).

El arsénico es considerado como un elemento enigmático puesto que algunas evidencias indican que sus metabolitos pueden contribuir en la carcinogenicidad y toxicidad del metaloide (Yamamoto *et al.*, 1995). El entender la toxicidad del arsénico es complicado, por el hecho de que éste puede estar presente en múltiples estados de oxidación y esto acarrea consigo una toxicidad única para cada especie en cuestión (Winski, 1998).

Es entonces importante considerar que el metabolismo tiene en sí un papel crucial en la carcinogénesis provocada por el arsénico, lo cual se fundamenta en el hecho de que la reducción de As^{V} a As^{III} produce el substrato para arsenito metil-transferasa, enzima encargada de metilar al arsenito inorgánico a MMA y sucesivamente la metiltransferasa del MMA produce al DMA, productos finales o intermediarios que se sugiere que sean más genotóxicos. Se ha visto que muchos mamíferos tienen deficiencia o ausencia de esta metiltransferasa para el arsénico, y la pregunta quedaría en el aire, sobre si una de la vías de metilación sería la vía primaria de desintoxicación para el arsénico inorgánico, y si ésta vía es la responsable de la carcinogénesis en humanos (Petrick *et al.*, 2000; Zakharyan *et al.*, 2001)

Existe variación en la toxicidad entre especies de mamíferos y se ha visto que el humano puede llegar a ser más sensible, pero en los seres humanos se ha reportado diferentes factores que afectan la biotransformación del arsénico

como son: la edad, el estado nutricional, la exposición a otros agentes o factores ambientales, la magnitud de la exposición así como a un polimorfismo genético de las metiltransferasas (Vahter, 2000).

Las especies trivalentes tales como el As^{III} y el MMA^{III} tienen preferencia por substratos de arsénico metiltransferasa. La reducción del As^{V} a As^{III} y el MMA^{V} a MMA^{III} es un pre-requisito para ser completado el proceso de metilación. Las formas metiladas pentavalentes tales como el MMA^{V} y el DMA^{V} son menos tóxicas que el As^{V} y el As^{III} . De cualquier forma, sean o no sean más tóxicas, la vía de la metilación es considerada como la principal vía de desintoxicación para el arsénico. Sin embargo, hay evidencias que poco a poco se incrementan, que sugieren que dentro de esta vía de desintoxicación, las formas trivalentes metiladas podrían ser más citotóxicas en células humanas y animales (Styblo, *et al.* 2001).

La elucidación de los mecanismos moleculares en donde el arsenato y arsenito son desintoxicados y biotransformados en el humano son uno de los mayores intereses ambientales de presente tiempo (Zakharyan *et al.*, 1995).

EXCRECIÓN

El arsénico es excretado por la orina, las heces y por la desescamación de la dermis, pelo y uñas. Estas dos últimas han sido utilizadas como un método de monitoreo de la exposición ocupacional en la industria (Casarett, 1986; Carson *et al.*, 1986).

Existen reportes en donde la administración vía oral del DMA (50 mg/kg) a cricetos sirios dorados es absorbido por el tracto gastrointestinal, provocando que el DMA pueda ser eliminado hasta un 49% por la orina y 36 % por las heces (Yamamura y Yamauchi, 1984), pero se ha reportado que existen variaciones intraindividuales y entre diferentes especies relacionadas con la absorción y eliminación, encontrando así, diferencias significativas interespecie (Vahter *et al.*, 1984).

EFFECTOS EN LA SALUD

Las exposiciones agudas son normalmente observadas en sobredosis ya sean accidentales, suicidas u homicidas. Muchos efectos se han visto en el sistema gastrointestinal. Incluyendo vómito, dificultad para deglutir, malestar abdominal, náuseas dolores en el pecho, diarrea. Largas dosis producen un colapso sistémico, hipotensión, convulsiones, coma y muerte, normalmente por fallas cardiacas (Casarett, 1986; WHO, 2001).

Algunos compuestos tienen efectos peculiares como el gas arsina (AsH_3) que causa una hemólisis extensa, provocando ictericia, orina pigmentada, anuria, anemia severa y muerte por fallas del miocardio o por la anemia (Hsueh *et al.*, 1999).

Entre las lesiones que se presentan en piel por efecto de la toxicidad del arsénico se encuentra la dermatitis. Comienzan como un eritema local con quemaduras y prurito; dando a la piel una apariencia amoratada. Seguida por la

aparición de pápulas y erupción de vesículas (Uede *et al.*, 1999; Hundeiker *et al.*, 2001). Una dermatotoxicidad crónica puede ser distinguible por melanosis, hiperqueratosis e hiperhidrosis (sudor excesivo en las palmas y plantas de los pies) y verrugas (Casarett, 1986). Según lo estimado al menos 100,000 casos de lesiones en piel al año fueron provocadas por arsénico a nivel mundial, pero se presume que puedan ser más (WHO, 2001).

En las membranas mucosas de los ojos se presenta una irritación (conjuntivitis) y en las de la nariz (rinitis), faringe y pasajes bronquiales (Casarett, 1986).

En el sistema nervioso periférico se presenta neuritis periférica tanto de las extremidades superiores como de las inferiores. Se observan problemas sensores, dolor, paratesias, debilidad muscular e incluso parálisis. Los efectos pueden ser unilaterales o bilaterales asociados con degeneración neuronal, en donde se cree que se da por la inhibición de algunas enzimas (Stokinger, 1981; Tsuchiya *et al.*, 1997)

A nivel de sistema gastrointestinal la ingestión crónica de este metaloide puede provocar la pérdida del apetito y desórdenes gastrointestinales.

En el sistema cardiovascular y sanguíneo, el arsénico puede causar en algunos casos anemia y leucopenia; este efecto se debe a desórdenes metabólicos. Existen algunos reportes de daño al miocardio por envenenamiento por arsénico (Hsueh *et al.*, 1999).

Existen evidencias de que tanto el arsenito (As^{III}), como el arsenato (As^{V}) tienen la capacidad de atravesar la placenta en los mamíferos. El arsenato de

sodio y el arsenito tienen efectos letales para el embrión, siendo también un potente teratógeno en muchas especies de mamíferos, pues una gran variedad de malformaciones pueden ser inducidas por este metaloide (Li *et al.*, 1998).

Dentro de los compuestos más utilizados en contra de intoxicación del arsénico es en el uso del "BAL" (British Anti-Lewisite) como también el "DMPS" (2,3 dimercaptopropanol (DMPS) que es un derivado del BAL, pero sin los efectos colaterales del BAL (Casarett, 1986) ambos han sido empleados históricamente como antidotos en contra del envenenamiento por arsénico (Aposhian *et al.*, 2000).

EFFECTOS MOLECULARES ADVERSOS

El arsénico inhibe enzimas mitocondriales, afectado a la respiración, que parece estar relacionado con la toxicidad (Vahter, 2001).

Está descrito que el arsénico puede inhibir de manera indirecta las enzimas de reparación como la DNA polimerasa β , y las DNA ligasas I y III entre otras, afectando cambios en la expresión de los genes o en la modificación post-transcripcional de la ligasa, polimerasa u otras enzimas de reparación del DNA (Yu y Snow, 1998; Bernstam *et al.*, 2000). También se ha observado que las especies trivalentes como el As^{III} tienen un potencial inhibitorio de varias enzimas, como la glutatión reductasa (Mize y Langdon, 1962); La glutatión reductasa juega un papel muy importante en el metabolismo del Glutatión (GSH), pues mantiene el balance de la reducción y las formas oxidadas de este

importante antioxidante celular (Freedman *et al.*, 1989). El mecanismo por el cual se da esta inhibición es debido a la interacción del As^{III} con grupos tioles de ciertas enzimas o sus cofactores; ejemplo de ello lo observamos en la interacción que tiene el As^{III} con los grupos tioles de los residuos de cisteína vecinas en los sitios activos de la glutatión reductasa (GR), siendo así la responsable de la inhibición de esta enzima por el arsénico trivalente (Knowles, 1985).

A su vez el arsénico puede provocar una amplificación génica en células de humanos y otros mamíferos, en donde se ha visto que puede inducir a genes como al dihidrofolato reductasa (DHFR) (Te-Chang *et al.*, 1988; Lee-Chen, 1992), así como la expresión de la proteína p53 (Salazar *et al.*, 1997; Salazar, 1998).

GENOTOXICIDAD DEL ARSÉNICO

La genotoxicidad y citotoxicidad de arsénico ha sido ampliamente reportada (Gerhart y Rossman, 1991; Jager y Ostrosky-Wegman, 1997), siendo considerado el arsénico carente de actividad mutagénica en la mayoría de los modelos y ensayos con bacterias en células de mamíferos, sin embargo se le considera un agente comutagénico (Rossman *et al.*, 2001); A nivel cromosómico el arsénico induce aberraciones cromosómicas tanto estructurales como numéricas y la formación de micronúcleos (IARC, 1980; Ostrosky-Wegman *et al.*, 1991; Vega *et al.*, 1995; Gómez-Arroyo *et al.*, 1997; Gonsebatt *et al.*, 1997).

El As^{III} (arsenito) es más tóxico que el As^{V} (arsenato) y se cree también que es más genotóxico que el As^{V} (Yu y Snow, 1998).

Se ha demostrado que en cultivo de linfocitos humanos tratados con arsenito de sodio tanto *in vivo* como *in vitro* se presenta un efecto aneugénico, dado por la alteración de la estructura del citoesqueleto inhibiendo tanto la polimerización como la despolimerización de huso mitótico, asimismo se ha descrito un efecto de entre cruzamiento DNA-Proteína (Ramírez *et al.*, 1997, 2000).

Con respecto a la genotoxicidad producida por los metabolitos pentavalentes del arsénico, existen reportes en los cuales se sugiere que el ácido dimetilarsénico (DMA) como el monometil arsénico (MMA) pueden causar efectos genotóxicos pero a concentraciones mayores que las del arsénico inorgánico (Yamanaka y Okada, 1994; Moore *et al.*, 1997; Sordo *et al.*, 2001). La conexión entre la demostración de su clastogenicidad y como exactamente éste pueda causar cáncer en humanos se desconoce (Kitchin, 2001). Sin embargo es claro que individuos que han sido expuestos al arsénico, presentan un incremento en la incidencia de aberraciones cromosómicas que pueden ser detectadas tanto en pacientes que hayan sido tratados con compuestos arsenicales, así como en trabajadores ocupacionalmente expuestos a este tipo de compuestos (IARC, 1980).

ARSÉNICO Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Se ha observado que la célula tiene varias formas de protección en contra de agentes tóxicos, como los metales pesados, que en muchos casos producen radicales libres, los cuales afectan de manera indirecta al DNA. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), se han visto envueltas en fenómenos de mutagenicidad, clastogenicidad y apoptosis en células de mamíferos (Chen *et al.*, 1998; Ahmad *et al.*, 2000; Namgung y Xia, 2000)

Las reacciones de oxidación son procesos normales *in vivo* que pueden formar radicales libres, las cuales son especies químicas con uno ó más electrones no apareados en el último orbital. Esta imparidad de electrones es lo que les confiere su alta inestabilidad.

La mayoría de los radicales libres celulares derivan de especies de oxígeno y de especies de nitrógeno. La atmósfera está constituida por un 21 % de oxígeno y un 78 % de nitrógeno.

Las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres se pueden clasificar en:

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	ACTIVIDAD O VIDA MEDIA
O_2	Molécula de oxígeno	Reactivo
$O_2^{\cdot-}$	Anión superóxido	Inestable
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno	Reactivo
HO_2	Radical hidroperoxilo	Reactivo
HO^{\cdot}	Radical Hidroxil	1×10^{-9} segundos
RO^{\cdot}	Radical alcoxil	1×10^{-6} segundos
ROO^{\cdot}	Radical peroxil	7 segundos
RNO^{\cdot}	Radical Nitroxil	5 segundos

Tabla 1. Especies de ROS y radicales libres, su nombre común y vida media (Daniel y Bankson, 1997).

Los radicales libres pueden reaccionar de tres formas distintas:

- Por un lado el electrón impar de un radical libre puede unirse con un electrón de otro radical libre formando así una unión estable.
- El radical libre puede donar su electrón a otra molécula y así desestabilizarla.
- Puede también obtener un electrón de otra molécula y desestabilizarla (Daniel y Bankson, 1997).

Los radicales libres se originan de manera natural en cualquier parte de la célula como productos de reacciones como los macrófagos y fagocitos. En condiciones normales las células no permiten que estos compuestos tóxicos se almacenen, pero cuando se rompe el balance entre los radicales libres y los antioxidantes, compuestos encargados de reducir a los radicales libres para evitar su daño al DNA, es el momento en que se da un evento de estrés oxidativo, en donde su daño puede ser reversible o irreversible, dependiendo de la extensión del mismo y de la capacidad de reparación (Daniel y Bankson, 1997).

Muchas enfermedades como la diabetes, fibrosis quística, cáncer entre otras se encuentran asociadas a un daño producido por estrés oxidativo (Matsui *et al.*, 1999; Jakus, 2000)

Los estudios del estrés oxidativo y cáncer provocado por el arsénico son relativamente nuevos. Fue hasta 1990 cuando empezaron a publicarse reportes en donde se sugería que el estrés oxidativo por arsénico podía ser un modelo de acción para la carcinogénesis. Las primeras descripciones que sugieren este modelo de acción fue propuesto por Yamanaka *et. al.* (1990), en donde sus datos experimentales mostraban que había ciertos detalles del metabolismo del arsénico que podrían influenciar a un evento carcinogénico. Dentro de estos reportes se sugería que el DMA podía reaccionar con una molécula de oxígeno, formando así a un radical $(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}\cdot$ y un anión superóxido.

Es claro que el arsénico puede provocar un estrés oxidativo en la célula, pero existen datos contradictorios con respecto a que especie específica es la que daña al DNA (Rice-Evans *et. al.*, 1991). Existen varios reportes donde el As^{III} induce apoptosis por efecto de las ROS (Wang, 1996). También se ha observado que este metaloide puede provocar la formación de óxido nítrico (NO). Se sabe que el NO está involucrado en aspectos de genotoxicidad, encontrando así que el As^{III} tiene una mayor especificidad para inducir especies reactivas del nitrógeno como el NO (Font, 2000). En ciertos experimentos se ha mencionado que el arsénico por efecto de una reacción del NO con un superóxido puede llegar a formar peroxinitrilo, un potente oxidante que puede causar daño al DNA. El aumento de este óxido nítrico se ha observado en células de endotelio bovino, siendo prevalente la formación de especies reactivas de nitrógeno (Liu *et. al.*, 2000). Otros estudios advierten que además del peroxinitrilo, se da la producción de radicales hidroxil y ácido hipocloroso, causantes de daño al DNA (Wang *et.al.*, 2001). En otro reporte Barchowsky en 1999 demostró que la presencia de arsenito provoca un estrés oxidativo causado únicamente por un aumento de las concentraciones de las especies reactivas de oxígeno como el peróxido y el anión superóxido, evidenciando que las especies reactivas de nitrógeno como el $\cdot\text{NO}$, no intervienen en el papel de estrés oxidativo, pues éstas disminuyen, ya que se ha observado que el arsenito afecta a los niveles de ATP, el cual es necesario para el aumento de Ca^{2+} intracelular y la formación de las especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrilo (Barchowsky, 1999).

En experimentos con cultivos de linfocitos humanos expuestos a As^{III} (arsenito), se ha visto que existe un aumento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, pero con la presencia de una mayor cantidad de antioxidantes como la superóxido dismutasa y catalasa, se ha observado que se previene este efecto (Nordenson *et al.*, 1991), por lo que se ve, los radicales libres y los antioxidantes juegan un papel crucial en el estrés oxidativo provocado por arsénico.

CARCINOGENICIDAD

Desde 1888 algunos doctores comenzaron a asociar que algunas personas que habían ingerido arsénico, eran propensas a contraer cáncer de piel y otras patologías relacionadas con este metaloide (ver en, Kaiser, 1998).

En la actualidad es sabido que la ingestión crónica de este metaloide puede causar cáncer en piel, hígado y bazo en el humano, pero su mecanismo carcinogénico se desconoce con exactitud (Hoffmann, 1991; Yu y Snow, 1998).

El arsénico es carcinogénico en humanos, pero esta carcinogenicidad se encuentra como un enigma, ya que en modelos animales tratados con éste metaloide no se induce cáncer, al parecer el mecanismo de acción por el cual este metaloide induce cáncer queda aún como un paradigma que necesita ser estudiado (Jager *et al.*, 1997; Huff, 2000). Lo que está claro es que el arsénico es clasificado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer como un agente carcinogénico en humanos (IARC, 1980, 1987); aunque hay datos

experimentales que indican que la carcinogenicidad por arsénico no se ajusta a una relación totalmente lineal (Rudel, 1996).

Existen datos en donde se sugiere que el arsénico puede ser cocarcinógeno junto otros agentes, incluyendo a la radiación UV, por un efecto de inhibición de las enzimas de reparación (Rossman *et al.*, 2001). Con respecto a los animales existen evidencias inadecuadas que confirmen su potencial carcinogénico (Hartwig, 1998). Muchos reportes sugieren que estas diferencias entre el humano con respecto a otros animales se debe al hecho del metabolismo propio de cada especie, siendo esta característica la que pudiera hacer más sensible a los humanos; de ahí se deriva la hipótesis de desencadenar un evento carcinogénico por efecto de un estrés oxidativo (Vahter, 2000; Williams *et al.*, 2000).

Esta carcinogénesis por arsénico provocada por un estrés oxidativo se encuentra explicada parcialmente, pues se sugiere que en los órganos como el pulmón, la vejiga y la piel se dan por eventos órgano específicos. Por un lado los pulmones contienen una alta cantidad de oxígeno, lo cual le proporciona a éste órgano una mayor susceptibilidad a desarrollar un evento carcinogénico por efecto del arsénico, ya que tanto el oxígeno (elemento formador de ROS) como la arsina (un gas derivado del arsénico) son excretados por los pulmones (Yamanaka *et al.*, 1994). La incidencia de cáncer de vejiga por arsénico podría darse ya que en el lumen de la misma se han encontrado almacenadas altas concentraciones de DMA y MMA trivalentes, que posiblemente fueron generadas por un proceso de reducción, siendo que a estas especies se les

atribuye una mayor toxicidad, desarrollando así un evento carcinogénico (Kitchin, 2001). Hay reportes en donde se menciona la presencia de metabolitos trivalentes como el MMA^{III} en la orina de personas expuestas crónicamente al arsénico (Mingsheng, 2000), el cual podría ser una clave importante en como este metaloide es posible que provoque un evento carcinogénico en vejiga, mientras que por otro lado existen evidencias de peso que indican que el DMA puede ser promotor multiorgánico de tumores (Kenyon, 2001).

Características únicas de los órganos como la de la piel, que tiende a almacenar altos contenidos de arsénico en la queratina y que su recambio se presenta en un tiempo no tan corto, esto provoca una exposición crónica a este metaloide, repercutiendo así en un posible evento carcinogénico (Kitchin, 2001).

Si bien este metaloide tiene un efecto carcinogénico comprobado se desconocen los posibles mecanismos moleculares por los cuales se lleva a cabo este proceso. Debido a ello se han utilizado muchos tipos de ensayos con los cuales se pretende dilucidar estos mecanismos. Dentro de estas metodologías encontramos la electroforesis unicelular (SCGE) la cual es capaz de detectar daño al DNA (Rojas *et al.*, 1999).

ELECTROFORESIS UNICELULAR ("ENSAYO COMETA")

En la búsqueda constante de una técnica sensible y rápida que pudiera detectar el daño al DNA, así como su reparación, Ostling y Johanson (1984) propusieron

un ensayo con el cual se pudiera detectar el daño genotóxico en células individuales. Para lo cual se realizó una electroforesis en un microgel, donde las células eran embebidas en agarosa y sometidas a un campo eléctrico bajo condiciones de un pH de 9.5, para después ser analizadas al microscopio con un fluorocromo conocido como naranja de acridina.

Con las modificaciones de Singh, las células que presentan un daño al DNA al ser observadas al microscopio asemejaban a un "cometa", por ello se denominó a esta técnica "ensayo cometa" (Singh *et al.*, 1988).

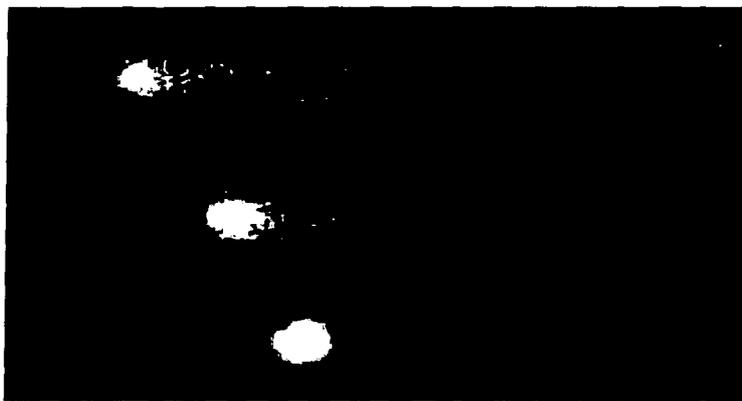


Figura 5. Imagen en donde se muestran los cometas de la técnica de electroforesis unicelular. Dentro de esta fotografía se pueden observar dos cometas con daño en el DNA (la cual se representa con la migración en su cola) y uno sin daño al DNA (<http://www.cometassay.com>).

Con el tiempo esta técnica ha sufrido modificaciones, que permitieron una mayor sensibilidad y a su vez un mayor campo de aplicaciones de estudio.

Entre las modificaciones que se le han hecho a esta técnica se encuentran:

- El pH de la solución de lisis.
- El pH de la solución amortiguadora de corrida de electroforesis.
- Las condiciones propias de la electroforesis.
- El tiempo de desenrollamiento de las cadenas del DNA.

En la actualidad existen varias versiones de aplicación de esta técnica.

En 1988 Singh *et al.* propusieron por primera vez la técnica de electroforesis unicelular alcalina, la cual se basa en una electroforesis alcalina (pH >13) que es capaz de detectar rompimientos de una cadena, sitios alcali lábiles y sitios retardados de reparación del DNA en células individuales. Una segunda propuesta se dio por Olive *et al.* (1990), donde se hicieron modificaciones de la técnica de Ostling y Johanson, la cual consistía en utilizar una solución de lisis alcalina seguida por una electroforesis, ya sea en condiciones neutras, donde se observan rompimientos de doble cadena del DNA o en condiciones no tan alcalinas como pH 12.1 ó 12.3, en las cuales se detectan rompimientos de cadena sencilla del DNA y sitios retardados de reparación (Rojas *et al.*, 1999).

pH neutro	pH 12.1	pH >13
<ul style="list-style-type: none"> • Rompimientos de doble cadena del DNA. 	<ul style="list-style-type: none"> • Rompimientos de cadena sencilla del DNA. • Sitios retardados de reparación del DNA. 	<ul style="list-style-type: none"> • Rompimientos de cadena sencilla del DNA. • Sitios retardados de reparación del DNA. • Sitios Álcali Lábilés.

Tabla 2. Posibles eventos involucrados en el daño al DNA con relación a la variación del pH en el SCGE''.

Las condiciones de pH bajo las cuales se realizó esta técnica es un punto crucial de esta técnica, esto permite que sea más sensible y específica, ya que dependiendo de cambios en la solución de lisis y su electroforesis pueden observarse las variaciones que se advierten en la tabla 2.

Siendo así que al emplear un pH de 12.1 se detectan únicamente los sitios retardados de la reparación y rompimientos de cadena sencilla; mientras que a pH >13 se pueden evaluar tanto el rompimiento de una cadena sencilla, sitios retardados de reparación como sitios álcali lábilés (SAL). La diferencia entre estas dos condiciones de pH (12.1 vs >13) determinará el efecto clastógeno provocado por los sitios álcali lábilés (SAL) (Rojas *et al.*, 1999).

La sensibilidad de esta técnica permite su uso como una potente herramienta en el estudio de la genotoxicidad, debido a que presenta un 95% con resultados obtenidos con otros métodos (Sasaki *et al.*, 2000).

SITIOS ALCALI LÁBILES (SAL)

La integridad del genoma es permanentemente alterada por la agresión de agentes exógenos como endógenos (Lhomme *et al.*, 1999) Los sitios abásicos (apurínicos y/o apirimídicos (AP)), son probablemente las lesiones más comunes.

Estas son el resultado de huecos formados en la hebra del DNA. Este proceso puede ocurrir de manera espontánea. La formación de los sitios abásicos se incrementan dentro del proceso de reparación de bases nucleicas dañadas. La reparación por escisión de bases (BER) es una vía en la cual están envueltas tanto AP endonucleasas (como las HAP1 Y APE1 entre otras), DNA ligasas y glicosilasas específicas que remueven las bases nucleicas modificadas o anormales, generando así sitios abásicos como un proceso intermediario dentro del proceso de BER (Kolaczowski *et al.*, 2001). Se estima que aproximadamente 10,000 sitios AP son generados diariamente en una célula bajo condiciones fisiológicas normales (Nickloff y Hoekstra, 1998).

Los sitios abásicos son el resultado de un hueco hidrolítico de los puentes N-glicosílicos. Este proceso puede incrementarse por factores exógenos, tales como agentes oxidantes que dañen las bases, formando así los sitios AP. Las

deoxipurinas se forman en mayor medida que para las deoxipirimidinas, siendo las deoxiguaninas el nucleósido más lábil (Lhomme *et al.*, 1999).

Los sitios abásicos de tipo aldehidos son altamente sensibles a condiciones alcalinas, las cuales inducen rompimientos de las hebras del DNA, y pueden ser estimadas por sedimentación de gradiente de sacarosa, elusión alcalina y por la electroforesis unicelular entre otras (Lhomme *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 1999).

JUSTIFICACIÓN.

Debido a que el arsénico se ha convertido en un problema de contaminación, que ha afectado a gran parte de la población mundial provocando cáncer de piel, bazo e hígado entre otros, ya que altos contenidos de este metaloide se han encontrado en agua de Argentina, Chile, Taiwán, Estados Unidos, India y México, calculándose que más del 2×10^9 personas a nivel mundial han sido expuestas al As. Se tiene la idea de que la vía de metilación del arsénico es un punto crucial en el proceso carcinogénico, pues se cree que dentro de esta vía se forman especies metiladas que posiblemente sean inclusive más reactivas que las especies iniciales (As^{V} , As^{III}).

Esta tesis pretende examinar a uno de los mecanismos de acción por el cual se cree que el arsénico causa daño al DNA, la generación de SAL. Es por ello que se evaluará el impacto que puedan tener los metabolitos trimetilados intermediarios de la vía de metilación del arsénico, sobre la inducción genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana.

HIPÓTESIS.

Si los metabolitos trimetilados del arsénico producen daño al DNA por efecto de los sitios álcali lábiles (SAL), entonces al ser tratados los linfocitos humanos con dichos metabolitos, se observará una mayor valor de rompimiento del DNA a pH >13 , que a pH 12.1 y debido a que los SAL se les ha asociado a la inducción de

radicales libres muy posiblemente se encontrará un mayor efecto biológico de estos reflejado en los niveles de la peroxidación de lípidos de membrana.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar por medio de la técnica de electroforesis unicelular, cual es el posible evento molecular involucrado en el daño genotóxico producido por las especies trivalentes del arsénico en linfocitos humanos.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Establecer que tipo de daño al DNA se produce por efecto de las especies trivalentes metiladas del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}) en linfocitos humanos.
- Evaluar el porcentaje de sitios álcali lábiles (SAL) generados por la exposición a DMA^{III} , MMA^{III} y As^{III} .
- Correlacionar la inducción de sitios álcali lábiles generados por el efecto de estos metabolitos y los niveles de lipoperoxidación.

METODOLOGÍA

Obtención de los metabolitos trivalentes del arsénico (MMA^{III} y DMA^{III})

Los arsenicales trivalentes metilados MMA^{III} y DMA^{III} fueron sintetizados como previamente lo describieron Cullen *et al.* (1984) y Styblo *et al.* (1997).

La identidad y pureza de los arsenicales fue confirmada usando un HNMR, espectrofotómetro de masa y un espectrofotómetro de absorción atómica (HG-AAS) como lo describieron Hughes *et al.*, 2000; Del Razo *et al.*, 2001.

Concentraciones utilizadas de los metabolitos trivalentes del arsénico (MMA^{III} Y DMA^{III})

Los rangos de las concentraciones de los metabolitos usados, tanto para el MMA^{III} y DMA^{III} son de 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 100 μ M, respectivamente; abarcando así un amplio espectro. Estas dosis fueron escogidas con base en diferentes reportes existentes en la literatura (Tatum, *et al.*, 1999; Mass *et al.*, 2001).

Los metabolitos fueron disueltos en medio RPMI 1640 (Gibco®); y estas soluciones "stock" de los metabolitos trivalentes (MMA y DMA) fueron preparadas diariamente.

Obtención de la muestra

De dos donadores sanos de sexo masculino, de 19 y 25 años respectivamente se extrajeron por punción venosa 12 ml de sangre entera con una jeringa previamente heparinizada. En tubos cónicos de 50 ml se adicionó 12 ml de Ficoll (Gibco®), para después colocar los 12 ml de sangre entera quitando la aguja de la jeringa para evitar la hemólisis de la muestra, y sin romper el gradiente que se forma por el ficoll, como lo describe la técnica de Sanderson *et al.* (1977).

Tratamiento "in vitro"

Para dar el tratamiento a las células se utilizaron tubos Eppendorf de 1 ml, en donde se colocaron 5×10^5 células resuspendidas en 950 μ l de medio RPMI 1640, más 50 μ l del tratamiento, alcanzando así la concentración final de 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M y 100 μ M, tanto de MMA^{III} y DMA^{III}, respectivamente; como lo describe Mass *et al.* (2001). De la misma forma y para tener un punto comparativo con los metabolitos trimetilados se realizó un tratamiento similar con As^{III} (arsenito de sodio) a concentraciones finales de 5 μ M y 10 μ M, respectivamente.

Se agitaron suavemente los tubos y se colocaron a una temperatura constante de 37°C durante 4 horas. Transcurrido el tiempo, se cuantificó la viabilidad por el método dual por fluorocromos (diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio), para posteriormente realizar la técnica de electroforesis unicelular. Los experimentos de la técnica de electroforesis unicelular a pH

neutro, pH 12.1 y pH >13 se realizaron por triplicado, mientras que los experimentos de lipoperoxidación se hicieron por duplicado.

Método dual por fluorocromos para la cuantificación de viabilidad.

Esta técnica pretende evaluar el estado metabólico de los lisosomas, como también la integridad de la membrana nuclear (Strauss, 1991).

Para esta metodología se utilizaron dos fluorocromos; el Bromuro de Etidio (Br-Et) (2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), el cual es indicativo de la integridad de la envoltura nuclear, y por el otro el 5,6 carboxinacetato de fluoresceína (FDA) (5.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), que evalúa la actividad metabólica de los lisosomas. En donde las células de color rojo son células muertas, y células de color verde son células vivas. Esta técnica se empleó como lo han descrito Hartman y Speit (1995).

Se tomó 3 μl de la suspensión de linfocitos, y se le adicionó 3 μl de la mezcla de FDA y Br-Et; inmediatamente después estos son observados en un microscopio de fluorescencia Olympus BX-60, empleando un filtro de excitación de 494 a 510 nm y un filtro de barrera de 590 nm, usando un objetivo de 20 X.

Se evaluaron 100 células por condición, y los resultados de esta se expresan en porcentaje. Las células fueron evaluadas inmediatamente después de que éstas salieron de su tratamiento.

Electroforesis unicelular alcalina a pH >13

Esta técnica se realizó conforme a la versión propuesta por Singh *et al.* (1988) y descrita por Rojas *et al.* (1999) con ciertas modificaciones. La cual consiste en que a un portaobjetos lavado, se le adiciona 150 μ l de agarosa regular al 0.5% (Sigma USA); estas laminillas son colocadas en un horno hasta que dicha agarosa forma una capa uniforme solidificada.

Al término del tratamiento de 4 horas con los metabolitos MMA ^{III}, DMA ^{III} y As ^{III} se centrifugaron los tubos Eppendorf a 4000 rpm en una centrifuga PicoFuge Stratagen por 10 segundos, respectivamente. Se retiró el sobrenadante y del botón obtenido se tomó la muestra de 3 μ l para la viabilidad por fluorocromos. Al botón se le adicionaron 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (Sigma, USA), se mezcló gentilmente y se distribuyó dicha mezcla a una laminilla. Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y así las laminillas se refrigeraron a 4°C por un minuto para su solidificación. Se removió el cubreobjetos y se le adicionó otra capa de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%, colocándose de nuevo en refrigeración por un minuto más. Posteriormente las laminilla se introdujeron a una solución de lisis previamente hecha de una que contenía 30 ml de una solución de NaCl a 2.5 M, 5 ml de otra solución de EDTA al 100 mM y Tris-base a pH 10, más 10% de DMSO y 1% de Tritón X-100 (Sigma USA) refrigerada a 4°C por al menos una hora en un vaso de Köplin.

Transcurrido el tiempo de lisis, las laminillas fueron colocadas en una cámara de electroforesis, sobre hielo y que contenía un amortiguador alcalino (300 mM de NaOH, 1 mM de Na₂ EDTA (Sigma, USA) a un pH > 13). Estas

laminillas estuvieron inmersas durante 10 minutos en este amortiguador con el fin de permitir que las hebras de DNA se pudieran desenrollar, y al cabo de este tiempo se realizó una electroforesis durante 20 minutos a 0.8 V/cm (Todo este procedimiento se realizó bajo condiciones de luz amarilla, para no permitir que los fotones dañen al DNA). después de la electroforesis, las laminillas fueron lavadas con una solución amortiguadora de neutralización (Tris al 0.4M pH 7.5) por 15 minutos y fueron fijadas con etanol absoluto por un minuto, para después ser secadas al aire. Las laminillas fueron codificadas a doble ciego.

Para observar las laminillas al microscopio se les adicionó 20 μ l de una solución de 2.0 μ g/ml de bromuro de etidio (Et-Br). fueron analizadas en un microscopio de epifluorecencia Olympus BX60 con un filtro de excitación de 515 a 560 nm y un filtro de barrera de 590 nm, usando un objetivo de 20X y utilizando un digitalizador de imágenes Kinetic Image con una computadora personal en donde se leyeron 50 células por laminilla, y 2 laminillas por condición utilizando un programa de analizador de cometas "Komet 3.0 (Kinetic Imaging); el cual permite calcular el momento de Cola de Olive (OTM) con la fórmula:

Tail Moment = tamaño de la cola x % de DNA total en cola / 100.

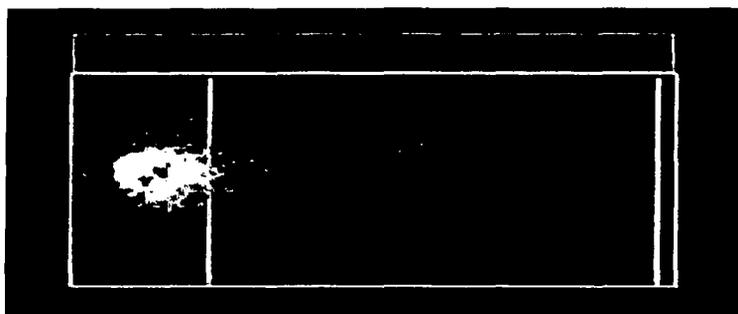


Figura 6. Imagen digitalizada y analizada de un cometa por el software Komet (<http://www.cometassay.com>).

Electroforesis unicelular alcalina a pH 12.1

La electroforesis unicelular a pH 12.1 se realizó como lo describen Rojas *et al.* (2000) y Tice *et al.* (2000). Después del tratamiento con los metabolitos trivalentes de arsénico, As^{III} y la lisis a 4°C durante al menos 1 hora (30 ml de una solución de NaCl a 2.5 M, 5 ml de otra solución de EDTA AL 100 mM y Tris-base a pH 10, más 10% de DMSO y 1% de Tritón X-100 (Sigma USA)), las laminillas fueron colocadas en una cámara horizontal de electroforesis sobre hielo, con una solución de corrida (300 mM NaOH; y 1 mM de Na₂ EDTA a pH 12.1). Las laminillas permanecieron en dicha solución por 10 minutos. Al cabo del tiempo se procedió a la electroforesis durante 20 minutos a 0.8 V/cm; para posteriormente neutralizarse con una solución de Tris-base a 0.4 M a pH 7.5 por 15 minutos. Después se fijaron dichas laminillas con etanol absoluto durante 1 minuto, dejándolas secar al aire. Se tiñeron con 20 µl de una solución de 2.0

$\mu\text{g/ml}$ de Br-Et. Evaluando así 100 células por condición en el microscopio de fluorescencia con las características ya mencionadas. Dichas células se evaluaron con el programa de analizador de cometas "Komet 3.0 (Kinetic Imaging); tomando el parámetro de OTM.

Electroforesis Unicelular Versión Neutra

Esta técnica tiene como fin el detectar rompimientos de doble cadena del DNA, para lo cual después del tratamiento con los metabolitos trivalentes de arsénico y As^{III} , se prepara una lisis que contenga EDTA di sódico (0.03 M) y SDS (2.5 %), de esta solución stock se llenaron los vasos Köplin en donde se quedaron las laminilla a 4°C durante al menos 1 hora. Terminando el tiempo de lisis las laminillas fueron colocadas en una cámara horizontal de electroforesis sobre hielo, con una solución de corrida (90mM de Ácido Bórico, 5 mM de EDTA disódico, 117 mM de Tris-Base a pH 7.0). Las laminillas permanecieron en dicha solución por 2 horas, para permitir así que en condiciones neutras el DNA pudiera estabilizarse. Al término del tiempo se procedió a la electroforesis durante 20 minutos a 0.57 V/cm; para posteriormente lavarse con una solución de Tris-base a 0.4 M a pH 7.5 por 15 minutos. Después se fijaron dichas laminillas con etanol absoluto durante 1 minuto, dejandolas secar al aire. Se tiñeron con 20 μl de una solución de 2.0 $\mu\text{g/ml}$ de Br-Et. Evaluando así 100 células por condición en el microscopio de epifluorescencia con las características ya mencionadas. Dichas células se evaluaron con un digitalizador

de imágenes (Kinetic Image) utilizando un programa de analizador de cometas "Komet 3.0 (Kinetic Imaging); tomando el parámetro de OTM.

En la siguiente tabla se muestra las diferencias metodológicas de la técnica de electroforesis unicelular (SCGE).

VARIABLES DE LA TÉCNICA	pH neutro	pH 12.1	pH >13
Concentración de la agarosa y número de capas	Con 3 capas a 0.75%	Con 3 capas a 0.75%	Con 3 capas a 0.75%
Solución de Lisis	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA (0.03 M) • SDS (2.5 %) 	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA (100 mM) • NaCl (2.5 M) • Tris (10 mM), pH 10 • 1% de Triton X-100. • 10% de DMSO. (y se ajusta el pH a 12.1) 	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA (100 mM) • NaCl (2.5 M) • Tris (10 mM), pH 10 • 1% de Triton X-100. • 10% de DMSO.
Solución de Corrida (Electroforesis)	Ac. Borico (90 mM) EDTA (2 a 5 mM) Trizma Base (40 a 117 mM) Duración: 2 horas en solución de lisis, 20 minutos de corrida.	EDTA (1 mM) NaOH (0.3 M) PH 12.1 Duración: 10 minutos de desenrollamiento, 20 minutos de corrida.	EDTA (1 a 2 mM) NaOH (0.3 M) PH >13 Duración: 10 minutos de desenrollamiento, 20 minutos de corrida
Electroforesis	0.57 V/cm	0.8 V/cm	0.8 V/cm 25 V y 300 mA.
Neutralización	0.4 M Tris a pH 7.5 por 15 minutos.	0.4 M Tris a pH 7.5 por 15 minutos.	0.4 M Tris a pH 7.5 por 15 minutos.

Tabla 3. Diferencias metodológicas de la técnica de electroforesis unicelular (SCGE) modificado de Rojas *et al.*, 1999.

Peroxidación Lipídica

La Peroxidación lipídica se realizó conforme a lo descrito por Sinnhuber y Yo (1967 y 1998). Para efectuar ésta técnica se necesitó obtener 18 ml de sangre de cada uno de los donadores por punción venosa; para lo cual previamente la jeringa contenía 0.2 ml de EDTA (10%) con el fin de prevenir la coagulación de la muestra. Inmediatamente después se dio un tratamiento de 4 horas con los metabolitos trivalentes del arsénico y con el arsenito (MMA^{III}, DMA^{III} y As^{III}) y en sangre entera a una temperatura constante de 37°C; después se separó el plasma sanguíneo por centrifugación en una PicoFuge Stratagen por un periodo de 5 minutos a 4000 rpm. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se mezcló con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, 0.375%), y 15% de ácido tricloroacético que contenía HCl al 0.25% obteniendo así un volumen final de 3 ml por cada condición (2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 100 µM, H₂O₂ como control positivo (100 mM)).

Las mezclas fueron llevadas a punto de ebullición por un lapso de 15 minutos. Transcurrido el tiempo, estas muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos.

El sobrenadante fue recolectado y se determinó su absorbancia por duplicado a 532 nm en un Espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000. Los resultados se presentan en nanomoles de malonaldehído (MDA)/ ml de plasma.

Análisis Estadístico

Para determinar si las diferencias entre el comportamiento de cada una de las concentraciones de las distintas especies arsenicales, analizadas con la electroforesis unicelular, se utilizó la prueba no paramétrica de U-Mann-Whitney, debido a que los datos no presentan una distribución normal (Zar, 1984).

Mientras que para la prueba de peroxidación lipídica se aplicó la prueba de T- Student, tomando así una $p < 0.05$ como positiva. Para el análisis de los datos se empleó el programa de software STATISTICA versión 5.0.

RESULTADOS

Cuantificación de la viabilidad por fluorocromos.

Esta técnica se aplicó para cuantificar la viabilidad de células expuestas a los metabolitos trivalentes del arsénico y el arsenito (DMA^{III} , MMA^{III} y As^{III}) a concentraciones de: 2.5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM , 100 μM , más 100 mM H_2O_2 como control positivo para la peroxidación lipídica y EMS (1×10^{-7}) para el SCGE.

Los resultados sugieren que a las concentraciones a 40 μM , 80 μM , 100 μM de los metabolitos DMA^{III} y MMA^{III} tienen un efecto citotóxico en los linfocitos de ambos donadores; mientras que las concentraciones 2.5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , los valores se encuentran por arriba del 96.48 % de viabilidad después de un tratamiento a 4 horas. Estos resultados se pueden observar en la tabla 4. de viabilidades abajo expuestas. Las cuales se cuantificaron por triplicado.

En las gráficas 1 y 2 se presentan dichos resultados en donde se observa cual es la tendencia de efecto citotóxico a dichas concentraciones con los respectivos metabolitos.

El MMA^{III} a concentraciones de 40 μM , 80 μM y 100 μM , parece tener un mayor efecto citotóxico que el DMA^{III} , esto se ve aún más marcado para el donador 2 como se puede observar en la gráfica 2.

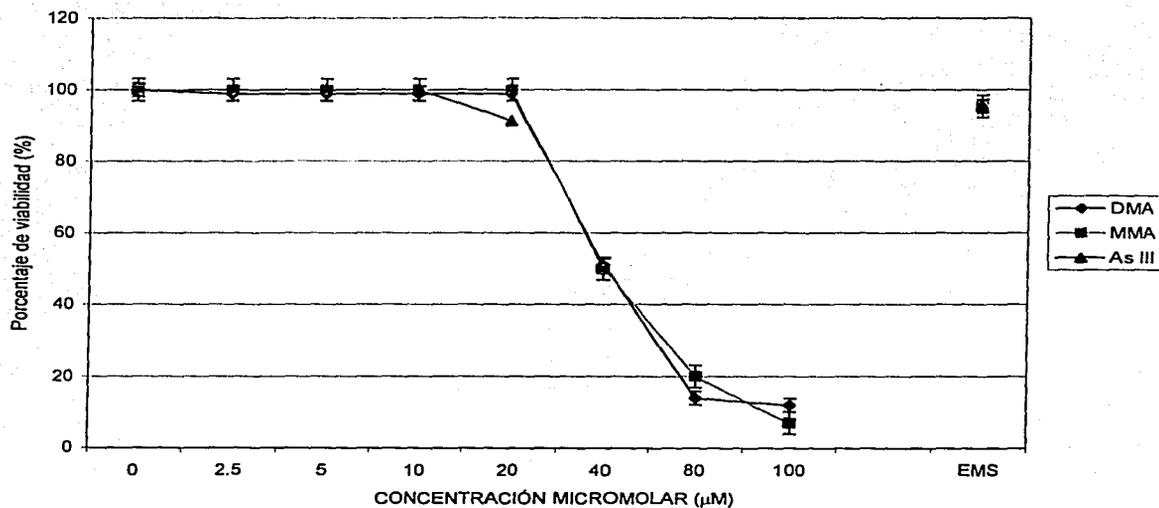
Donador 1

Donador 2

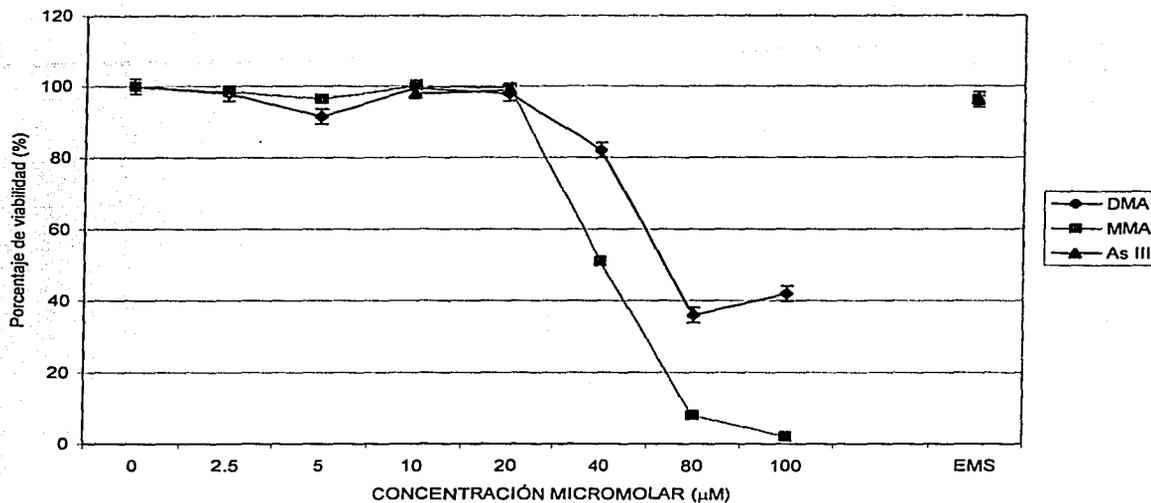
CONCENTRACIONES	As ^{III}	DMA ^{III}	MMA ^{III}	As ^{III}	DMA ^{III}	MMA ^{III}
CONTROL	100	100	100	100	100	100
2.5 μ M		98.9	100		97.9	98.5
5 μ M	100	98.9	100	97.9	91.5	96.4
10 μ M	91.3	98.9	100	98.9	99.5	100
20 μ M		98.9	100		97.9	99.5
40 μ M		51.0	50.0		82.0	51.0
80 μ M		14.0	20.0		36.0	8.0
100 μ M		12.0	7.0		42.0	2.0
EMS (0.1 μ M)	95.42	95.42	95.42	96.26	96.26	96.26

Tabla 4. Porcentaje de viabilidad mediante el método dual por fluorocromos, promedio de dos experimentos por donador después de 4 horas de tratamiento a distintas concentraciones de las tres especies.

Las gráficas 1 y 2 muestran el efecto citotóxico de las especies arsenicales cuantificadas por el método dual por fluorocromos en linfocitos humanos, en donde se observa que a concentraciones por arriba de 40 μM hay un efecto citotóxico importante.



Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad de las especies arsenicales (DMA^{III}, MMA^{III} y As^{III}) en donador 1.

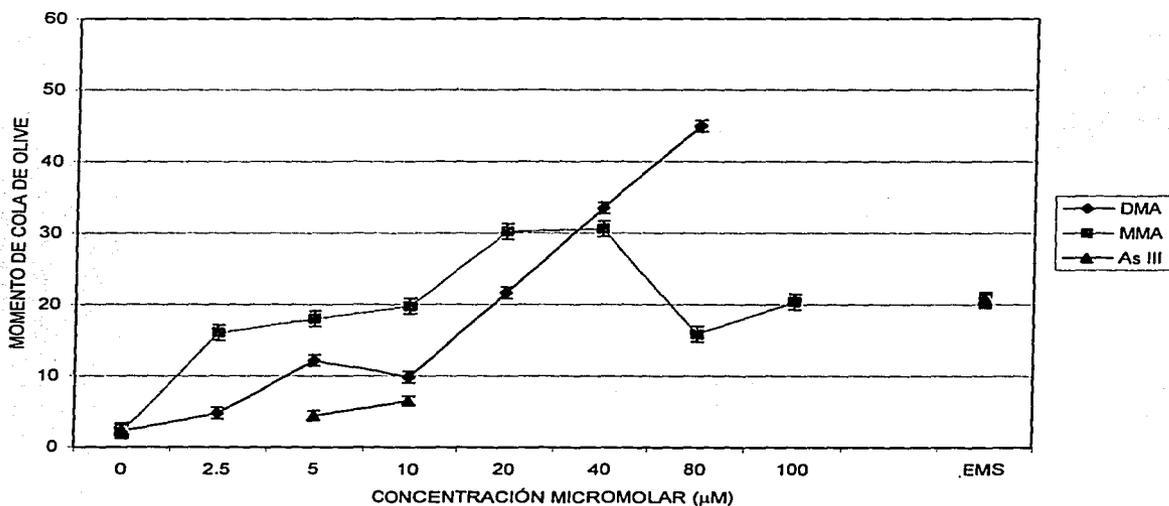


Gráfica 2. Porcentaje de viabilidad de las especies arsenicales (DMA^{III}, MMA^{III} y As^{III}) en donador 2.

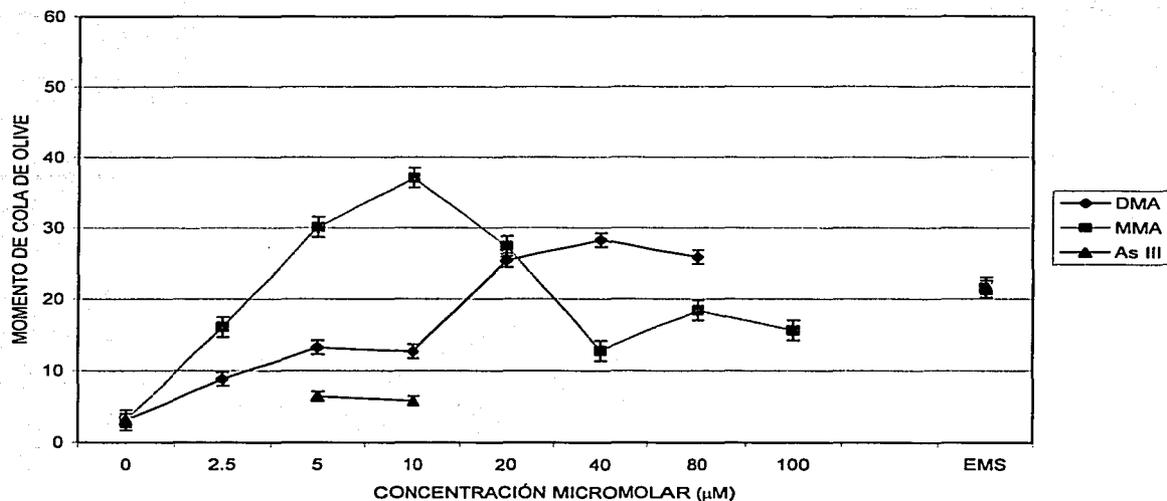
En la gráfica 2 se advierte que el donador 2 presentó un menor efecto citotóxico para el DMA que al MMA.

Electroforesis unicelular alcalina pH >13

Las gráficas 3 y 4 muestran el daño al DNA detectado por la electroforesis unicelular a pH >13, por efecto de los metabolitos trivalentes del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}) después de 4 horas de tratamiento en dos donadores. El daño al DNA está expresado en OTM.



Gráfica 3. Efecto genotóxico producido por las especies arsenicales como los metabolitos trivalentes del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}) y el arsenito (As^{III}) después de un tratamiento de 4 horas a pH >13 en el donador 1. Daño al DNA expresado en momento de cola de Olive. (Momento de cola de Olive = tamaño de la cola x % de DNA total en cola / 100). Los resultados de DMA a 100 μM no se presentan, ya que estos no pudieron valorarse por la intensidad del daño genotóxico (presencia de nubes) ± Std. Er.



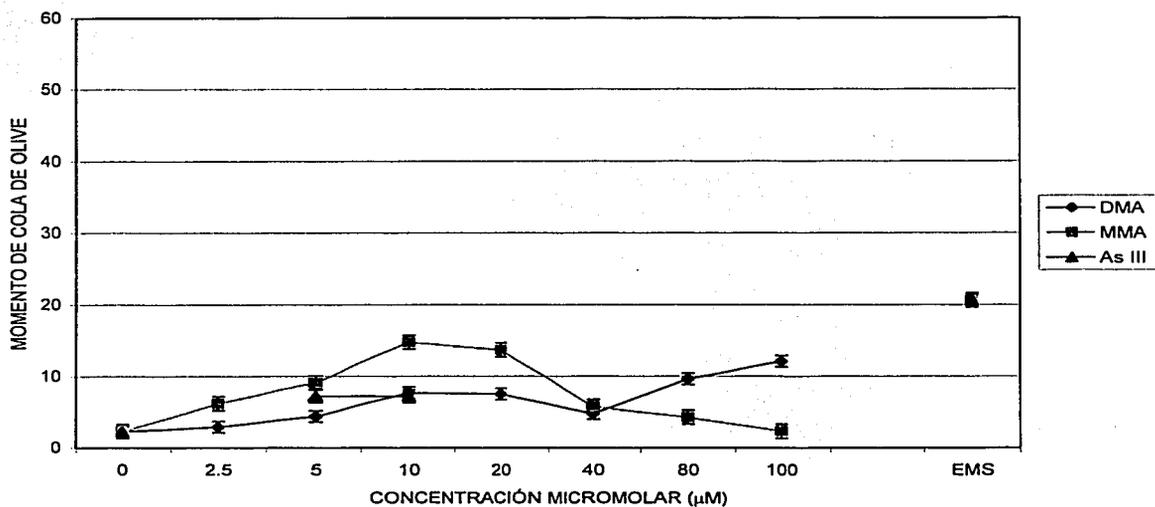
Gráfica 4. Efecto genotóxico producido por las especies arsenicales como los metabolitos trivalentes del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}) y el arsenito (As^{III}) después de un tratamiento de 4 horas a pH >13 en el donador 2. Daño al DNA expresado en momento de cola de Olive. (Momento de cola de Olive= tamaño de la cola x % de DNA total en cola / 100). Los resultados de DMA a 100 µM no se presentan, ya que estos no pudieron valorarse por la intensidad del daño genotóxico (presencia de nubes) ± Std. Er.

En ambas gráficas se puede observar que a altas concentraciones (40 µM, 80 µM, 100 µM) el DMA tiende a producir mayor daño al DNA expresado en OTM para ambos donadores, mientras que el MMA tiene un efecto menor a las mismas concentraciones, pero a concentraciones bajas (2.5 µM, 5 µM, 10 µM,

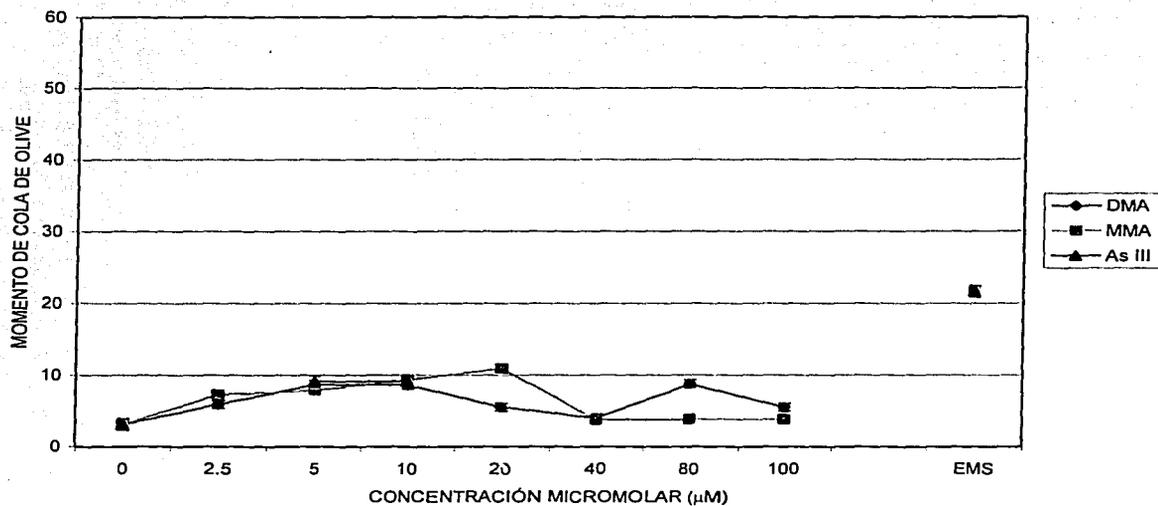
20 μM), el MMA presenta un mayor valor de OTM, mientras que a estas mismas concentraciones el valor de OTM para DMA es menor.

Electroforesis unicelular alcalina pH 12.1

A continuación en las gráficas 5 y 6 se muestra el efecto genotóxico producido por los metabolitos trivalentes del arsénico a pH de 12.1.



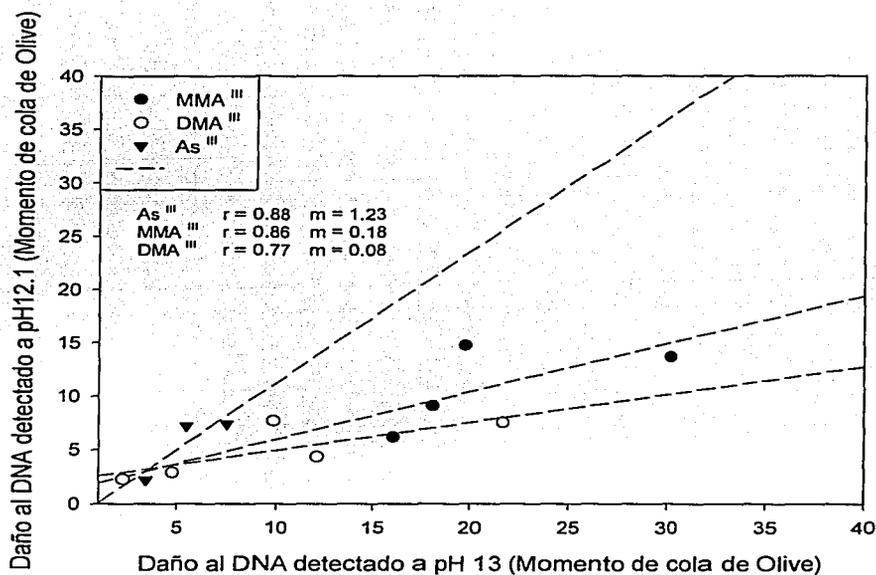
Gráfica 5. Efecto genotóxico producido por las especies arsenicales como los metabolitos trivalentes del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}) y el arsenito (As^{III}) después de un tratamiento de 4 horas a pH 12.1 en el donador 1. Daño al DNA expresado en momento de cola de Olive. (Momento de cola de Olive = tamaño de la cola x % de DNA total en cola / 100) \pm Std. Er.



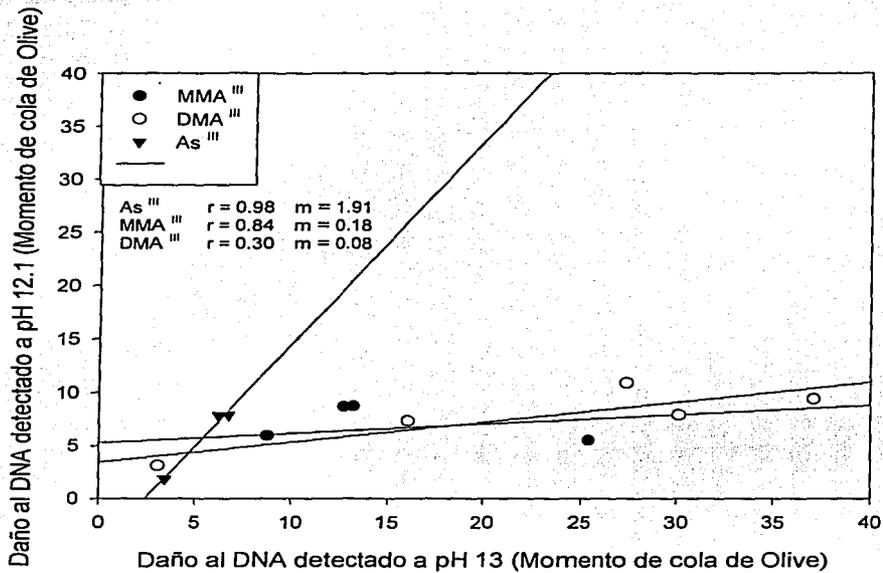
Gráfica 6. Efecto genotóxico producido por las especies arsenicales como los metabolitos trivalentes del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}) y el arsenito (As^{III}) después de un tratamiento de 4 horas a pH 12.1 en el donador 2. Daño al DNA expresado en momento de cola de Olive. (Momento de cola de Olive= tamaño de la cola x % de DNA total en cola / 100) ± Std. Er.

Inducción de sitios álcali lábiles

Al graficar los valores de OTM entre pH >13 y pH 12.1 a las diferentes concentraciones utilizadas se encontró que el daño al DNA por el As^{III} a pH 12.1 y pH > 13, es similar indicando que no hay inducción de sitios álcali lábiles (SAL), mientras que con los metabolitos MMA^{III} y DMA^{III} el daño genotóxico observado se presenta mayormente a pH > 13, lo cual es indicativo de una inducción de SAL, como se puede apreciar en la gráfica 7 y 8.



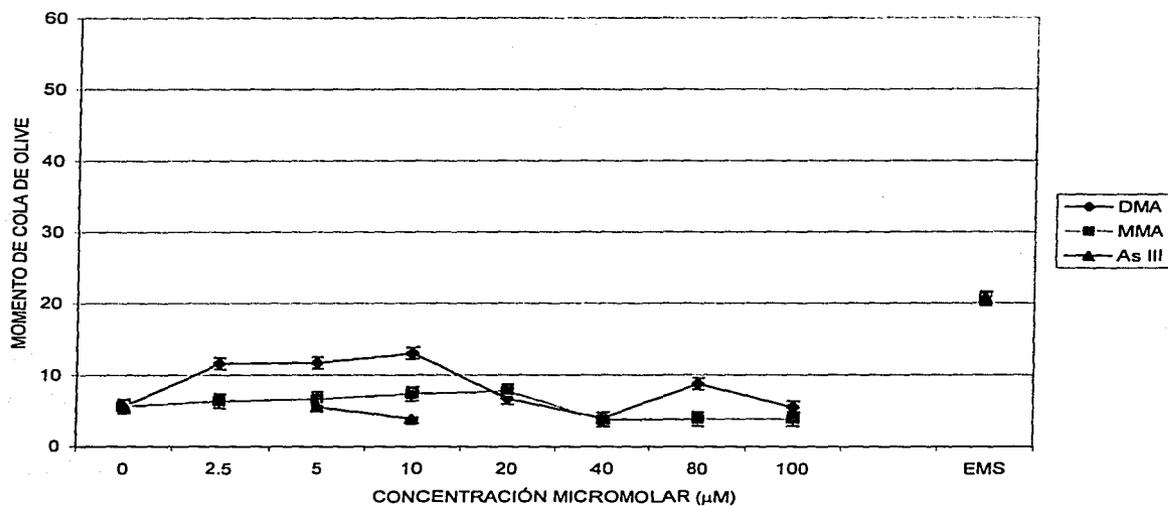
Gráfica 7. Análisis de correlación entre la inducción de daño al DNA a pH >13 y pH 12.1 para linfocitos tratados con arsenito y los metabolitos trimetilados en el donador 1.



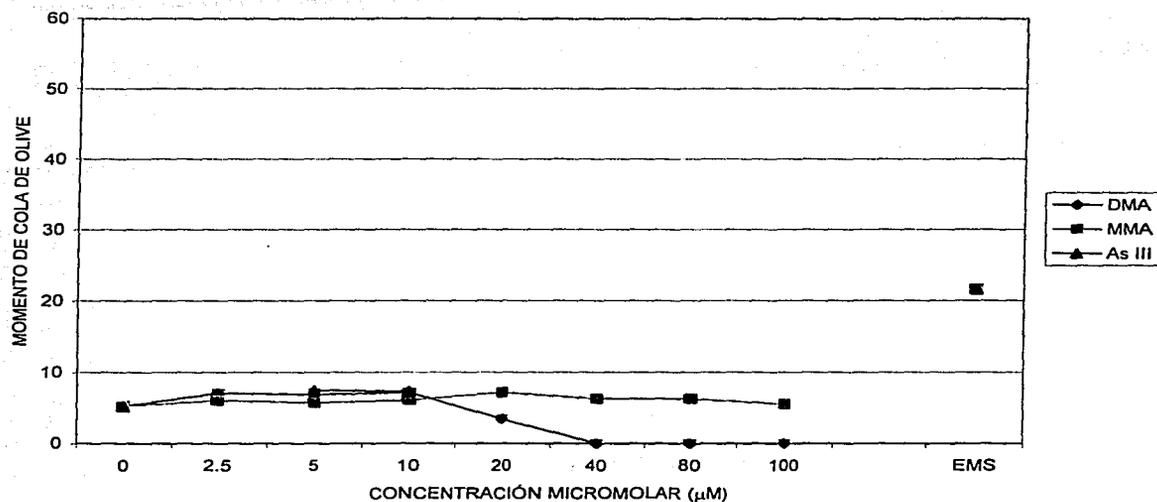
Gráfica 8. Análisis de correlación entre la inducción de daño al DNA a pH >13 y pH 12.1 para linfocitos tratados con arsenito y los metabolitos trimetilados en el donador 2.

Electroforesis unicelular versión neutra

En las gráficas 9 y 10 lo que se observa es el daño genotóxico producido por los metabolitos trivalentes del arsénico en ambos donadores, utilizando la técnica a pH neutro en donde lo que se evidencia es que no hay rompimientos de doble cadena.



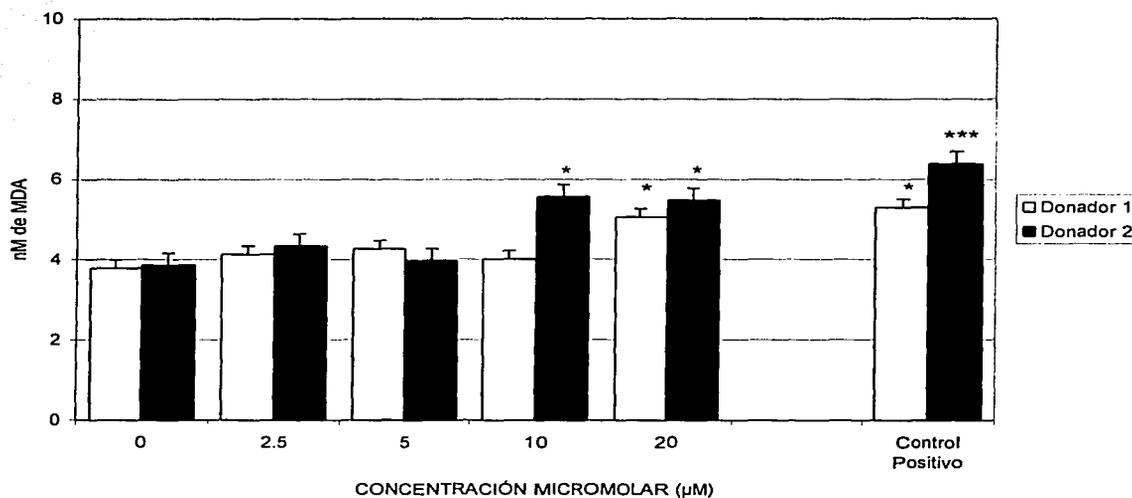
Gráfica 9. Efecto genotóxico producido por las especies arsenicales como los metabolitos trivalentes del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}) y el arsenito (As^{III}) después de un tratamiento de 4 horas a pH neutro en el donador 1. Daño al DNA expresado en momento de cola de Olive. (Momento de cola de Olive = tamaño de la cola x % de DNA total en cola / 100) \pm Std. Er.



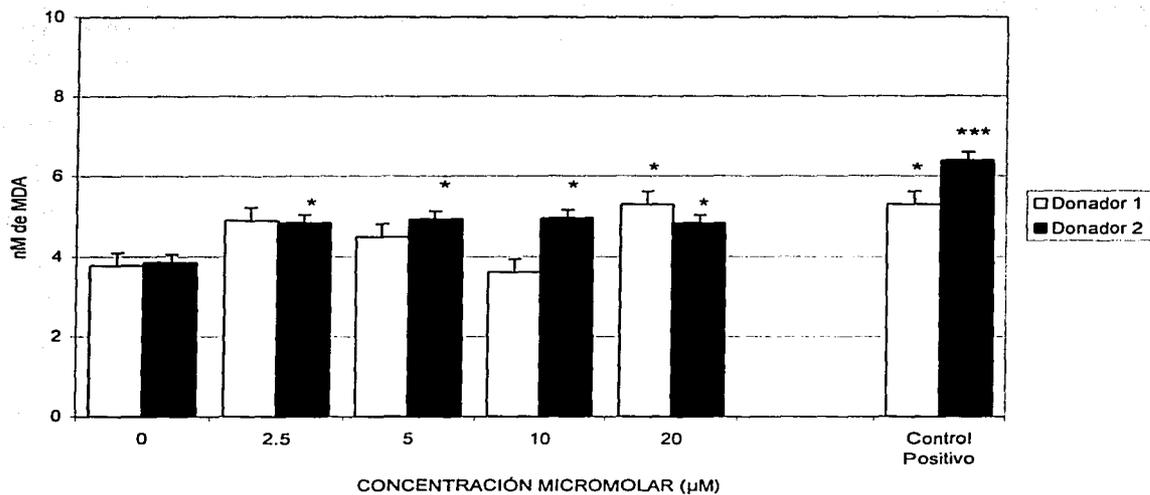
Gráfica 10. Efecto genotóxico producido por las especies arsenicales como los metabolitos trivalentes del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}) y el arsenito (As^{III}) después de un tratamiento de 4 horas a pH neutro en el donador 2. Daño al DNA expresado en momento de cola de Olive. (Momento de cola de Olive= tamaño de la cola x % de DNA total en cola / 100) ± Std. Er.

Peroxidación lipídica

Las gráficas 11 y 12 muestran los resultados de la peroxidación lipídica hecha con los metabolitos trivalentes del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}); en donde se puede observar que para ambos donadores hay un incremento significativo de MDA en la concentración más alta de ambos metabolitos.



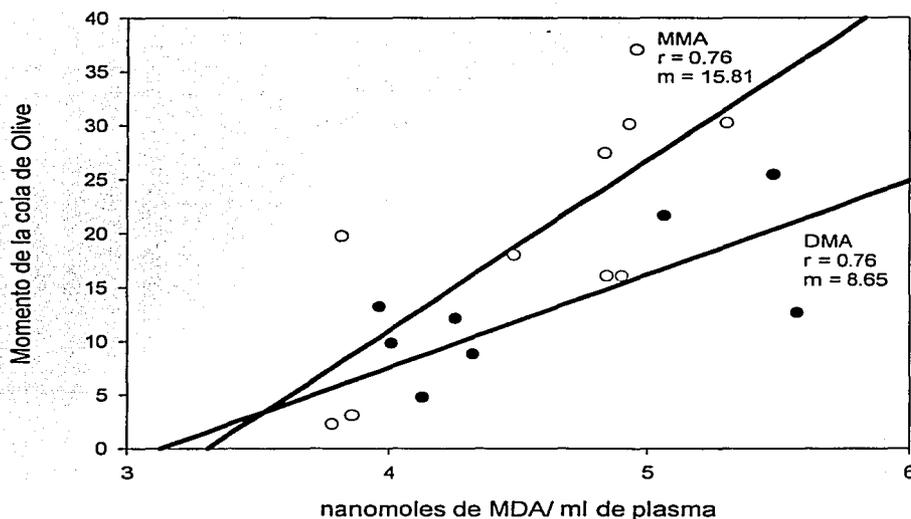
Gráfica 11. Peroxidación lipídica de leucocitos después de un tratamiento de 4 horas con DMA^{III} en ambos donadores. (los * representan aquellas muestras que fueron estadísticamente significativas en donde $p < 0.0005 = \text{***}$, $p < 0.005 = \text{**}$, $p < 0.05 = \text{*}$) \pm Std. Desv.



Gráfica 12. Peroxidación lipídica de leucocitos después de un tratamiento de 4 horas con MMA^{III} en ambos donadores. (los * representan aquellas muestras que fueron estadísticamente significativas en donde $p < 0.0005 = ***$, $p < 0.005 = **$, $p < 0.05 = *$) \pm Std. Dev.

Correlación entre rompimiento en el DNA y la peroxidación lipídica

La gráfica 13 muestra la correlación que existe entre el SCGE y la peroxidación lipídica hecha con los metabolitos trivalentes del arsénico (DMA^{III} y MMA^{III}) en ambos donadores.



Gráfica 13. Correlación entre la electroforesis unicelular a pH >13 vs peroxidación lipídica de ambos donadores expuestos a MMA^{III} y DMA^{III}.

Los resultados en general sugieren que los metabolitos trivalentes (DMA^{III} y MMA^{III}) son más genotóxicos que el arsenito (As^{III}), siendo este último considerado como una de las especies más genotóxicas de este metaloide.

Ambos donadores presentan un comportamiento similar, advirtiendo que a concentraciones bajas, el metabolito MMA^{III} presentó mayor daño genotóxico, mientras que el DMA^{III} a concentraciones altas produjo un mayor efecto genotóxico. Se observó una inducción de peroxidación lipídica para ambos donadores con ambos metabolitos siendo más marcada para el MMA^{III} .

DISCUSIÓN

El arsénico ha llegado a convertirse en un problema grave de contaminación y de salud. Este metaloide está documentado por la IARC como un carcinógeno en humanos (WHO, 1993), pero poco se conoce acerca del mecanismo o mecanismos por los cuales ejerce su efecto carcinogénico, debido por un lado, a que no existe un modelo adecuado en animales que pueda reflejar el mismo modo de acción (Kitchin, 2001).

Se cree que la clave de la carcinogenicidad del arsénico en humanos se debe a características metabólicas propias, siendo posiblemente los humanos más sensibles al arsénico que otras especies (Vahter, 1995).

Cullen *et al.* en 1984, estudiaron el metabolismo de los arsenicales, caracterizando la presencia de productos intermediarios formados por la reducción de los precursores pentavalentes y considerándolos como la vía de desintoxicación más importante para este metaloide. Sin embargo, en 1989 Cullen *et al.* reportan que estos productos, los arsenicales metilados trivalentes, eran altamente tóxicos en bacterias.

Recientemente este mismo efecto lo reporta Styblo *et al.* (2000) en mamíferos, añadiendo que la toxicidad del MMA^{III} y el DMA^{III} es mayor a la del arsenito (As^{III}), mientras que los arsenicales pentavalentes son significativamente menos tóxicos que sus análogos trivalentes. Si bien se ha caracterizado a los arsenicales y se ha evaluado su toxicidad, en el presente trabajo se estudió el efecto genotóxico de los metabolitos trivalentes del arsénico

(MMA^{III} y DMA^{III}) en linfocitos humanos no estimulados, empleando un rango amplio de concentraciones. Estas concentraciones se dividieron en dos grupos principales, por un lado las bajas como: 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M y las altas, en las cuales se encuentran: 40 μ M, 80 μ M, 100 μ M, respectivamente. Debido al efecto citotóxico descrito por estos metabolitos como se muestra en las gráficas 1 y 2.

En los linfocitos tratados durante 4 horas con MMA^{III} y DMA^{III}, se observó una alta citotoxicidad, lo cual concuerda con lo reportado por Petrick *et al.* (2000); Petrick *et al.* (2001). Si bien, se evaluó el comportamiento tanto del arsenito como de los metabolitos trivalentes, empleando un amplio rango de concentraciones, las altas entre 40-100 μ M, no se ha mostrado que sean alcanzadas en individuos expuestos crónicamente, haciendo de éstas, concentraciones biológicamente irrelevantes, puesto que en los individuos expuestos que las alcanzaran, provocaría efectos adversos a la salud de tal magnitud, como la muerte por envenenamiento; esto normalmente se ve en casos de suicidio o asesinato, como lo ocurrido a Napoleón (Holden, 2000).

Con respecto a la genotoxicidad evaluada como rompimientos de cadena sencilla empleando la electroforesis unicelular, los resultados obtenidos para las concentraciones altas (40-100 μ M) sugieren que el DMA^{III} y el MMA^{III} son genotóxicos en linfocitos humanos, siendo el DMA^{III} más genotóxico (gráfica 3); estos datos coinciden con los descritos por Mass *et al.* (2001), que de igual manera usan el SCGE a pH >13 con el mismo rango de concentraciones. Sin embargo dicho autor reporta el siguiente potencial genotóxico:

DMA^{III} > MMA^{III} > iAs^{III} ~ iAs^V > MMA^V ~ DMA^V.

Sin embargo, hasta el presente trabajo, la genotoxicidad de las concentraciones bajas que representan mayor importancia biológica no habían sido estudiadas. Esto se muestra en la gráfica 3 y 4 donde se observa que ambos metabolitos continúan siendo genotóxicos, encontrando que el que tuvo un mayor efecto genotóxico en los linfocitos de ambos donadores fue el MMA^{III}, esta diferencia se puede deber a la toxicidad que mostraron ambos metabolitos, ya que a altas concentraciones la viabilidad se ve afectada sustancialmente, por lo que el efecto que Mass *et al.* reportan utilizando esta misma técnica se puede deber tanto a un efecto genotóxico como citotóxico.

La variación del ensayo, empleando condiciones de pH 12.1 permite detectar solo rompimientos de cadena sencilla del DNA y sitios retardados de reparación, mientras que a pH >13 se identifican tanto rompimientos de cadena sencilla del DNA, sitios retardados de reparación y sitios álcali lábiles (Rojas *et al.*, 2000). La diferencia entre estas variaciones de la técnica (pH 12.1 y pH >13) permite conocer si el daño genotóxico producido por las especies arsenicales es debido a la generación de sitios álcali lábiles. Al graficar comparativamente el daño al DNA detectado a pH > 13 y 12.1 se demostró la presencia de SAL (gráficas 7 y 8) en donde se observa que el DMA^{III} y el MMA^{III} son inductores de SAL a concentraciones bajas, puesto que las pendientes (m) descritas por las rectas son menores a uno, es decir, que el daño al DNA es detectado en su mayoría por las condiciones alcalina (pH > 13). Este fenómeno sugiere por lo tanto que el daño que se produce al DNA de los linfocitos es por la formación de

SAL, mientras que el arsenito (As^{III}) a concentraciones de $5\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$ no induce la formación de SAL, indicando que el daño que presenta se da por rompimientos francos al DNA, esto se puede observar en las gráficas 7 y 8, en donde el comportamiento de la pendiente (m) para dicha especie, es mayor a uno, lo cual sugiere que se detecta mayor daño a pH 12.1, indicativo principalmente de rompimientos directos al DNA.

Estos resultados podrían sugerir que la genotoxicidad observada para los metabolitos trimetilados (DMA^{III} y MMA^{III}) se debe por la generación de radicales libres, corroborándose con la peroxidación lipídica (gráficas 11 y 12). Los resultados del SCGE en condiciones neutras, tienden a presentar valores de cero, indicando que las especies arsenicales no producen rompimientos de doble cadena de forma estadísticamente significativa. Esto podría deberse a que con sólo 4 horas de tratamiento es difícil observar rompimientos de doble hebra.

Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre la peroxidación lipídica y el SCGE, lo cual indica que el daño detectado en el DNA se debe a la presencia de radicales libres (gráfica 13), sin embargo para identificar el tipo de radicales libres es necesario realizar estudios más específicos.

Los resultados demostraron que el evento molecular por el cual los metabolitos trimetilados causan daño al DNA es a través de la formación de radicales libres, mientras que el daño producido por el arsenito, es por un rompimiento franco al DNA. La variación encontrada en la formación de radicales libres, muy posiblemente se debió al estado individual de compuestos antioxidantes presentado por cada donador (Vahter, 2000).

Si bien la metilación de los arsenicales inorgánicos ha sido propuesta como un proceso de desintoxicación, los resultados obtenidos en este estudio, así como en los reportes recientes en la literatura (Kitchin, 2001; Mass *et al.*, 2001; Sordo *et al.*, 2001) indican que esto no es absolutamente cierto, quedando en el aire la interrogante sobre cual es el papel de estos metabolitos en individuos expuestos crónicamente en cuanto a la inducción de genotoxicidad, que pudiera a largo plazo, llevar al establecimiento de un proceso carcinogénico.

Asímismo es necesario conocer la capacidad de metilación y/o retención de los metabolitos en las personas expuestas crónicamente (Mass *et al.*, 2001; Del Razo *et al.*, 1997), para poder evaluar el posible riesgo que esto implica en el desarrollo de neoplasias.

CONCLUSIONES

- La viabilidad celular mostró un daño citotóxico únicamente en las concentraciones altas (40 μM , 80 μM , y 100 μM) en los metabolitos trimetilados; mientras que para las concentraciones bajas (2.5 μM , 5 μM , 10 μM y 20 μM), no mostró un efecto citotóxico para todas las especies arsenicales.
- En nuestro estudio se observó que tanto el MMA^{III} como el DMA^{III} son agentes genotóxicos potentes capaces de inducir rompimientos de cadena sencilla del DNA en linfocitos no estimulados por la formación de sitios álcali lábiles, mientras que el As^{III} produjo genotoxicidad por rompimientos francos al DNA.
- El grado de genotoxicidad que pudimos encontrar para nuestros resultados fueron de la siguiente forma: MMA^{III} ~ DMA^{III} > As^{III}.
- Se encontró que los metabolitos trivalentes del arsénico incrementan la peroxidación lipídica a concentraciones de 10 μM y 20 μM con DMA^{III} y el MMA^{III} incrementa la lipoperoxidación en todas sus concentraciones para el

donador 2, mientras que para el donador 1 tan solo se observa en la concentración de 20 μM .

LITERATURA CITADA.

- Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR), 1998.** Toxicological profiles for arsenic. *U.S. Public Health Persp.* **107**: 593-597.
- Ahmad, S., K. T. Kitchin, and W .R. Cullen, 2000.** Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activate oxygen. *Arch . Biochem. Biophys.* **382**: 195-202.
- Alpert, M. 2001.** A touch of poison the epa may weaken a regulation limiting arsenic in water. *Sci. Am.* **284**: 10-11.
- Aposhian, H. V., B. Zheng, M. M. Aposhian, C. Le, M. Cebrian, W. R. Cullen, R. Zakharyan, M. Ma, R.C. Dart, Z. Cheng, P. Andrewes, L. Yip, G. O'Malley, R. Maiorino, W. Voorhies, S. Healy, A. Titcomb, 2000** DMPS-Arsenic challenge test. II modulation of arsenic species, including monomethylarsonous acid (MMA^{III}), excreted in human urine.- *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **165**: 74-83.
- Astolfi, E., A. Maccagno, J. C. García-Fernández, R. Vaccaro, R. Stímola, 1981.** Relation between arsenic in drinking water and skin cancer. *Biol. Trace Elements Res.* **3**: 134-143.
- Barchowsky, A., L. R. Klei, E. J. Dudek, H. M. Swartz, P. E. James, 1999.** Stimulation of reactive oxygen, but not reactive nitrogen species, in vascular endothelial cells exposed to low levels of arsenite. *Free Rad. Biol and Med.* **27**: 1405-1412.
- Bernstam, L., J. Nriagu, 2000.** Molecular aspects of arsenic stress. *J. Toxicol. Environ. Health.* **B 3**: 293-322.

- Borgoño, J., P. Vicent, H. Venturino, A. Infante, 1977.** Arsenic in the drinking water of the city of Antogagsta: epidemiological and clinical study before and after the installation of a tretment plants. *Environ Health Perspect.* **19**: 103-105.
- Buchet, J. P., R. Lauwerys, 1988.** Role of thiols in the *in-vitro* methylation of inorganic arsenic by rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 3149-3153.
- Bustamante, J., L. Dock, M. Vahter, B. Fowler, S. Orrenius, 1997.** The semidconductor elements arsenic and indium induce apoptosis in rat thymocytes. *Toxicology* **118**: 129-136.
- Carson, B. L., H. V. Ellis, J. L. McCann, 1986.** Toxicology and biological monitoring of metals in humans Including feasibility and need. *Lewis publishers inc.* U.S.A. pp 328.
- Casarett, J. L. 1986.** Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. *Macmillan Publ. Co.* New York USA. pp 974.
- Cebrián, M. E., A. Albores, M. Aguilar, E. Blakely, 1983.** Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Human Toxicol.* **2**: 121-133.
- Cebrián, M. E., A. Albores, G. García-Vargas, L. M. Del Razo, 1994.** Chronic arsenic poisoning in humans: The case of Mexico. in : Nriagu *JO eds.* Arsenic in the Enviroment , Part II. *John Wiley and Son*, New York, 93-100 p.
- Challenger, F. 1945.** Biological methylation. *Chem. Rev.* **36**: 315-361.
- Chen, G. Q., J. Zhu, X. G. Shi, J. H. Ni, H. J. Zhong, G.Y. Si, X. L. Jin, W. Tang, X.S. Li, S. M. Xong, Z. X. Shen, G. L. Sun, J. Ma, P. Zhang, T. D. Zhang, C. Gazin, T. Naoe, S. J. Chen, Z. Y. Wang, Z. Chen, 1996.** *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of

- acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 - induced NB4 apoptosis with downregulation of Bcl-w expression and modulation of PML- RAR- alpha /PML proteins. *Blood* **88**: 1052-1061.
- Chen, Y. C., S. Y. Lin-Shiau, J. K. Lin. 1998.** Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **177**: 324-333.
- Chowdhury, U. K., B. K. Biswas, T. R. Chowdhury, G. Samanta, B. K. Mandal, G. C. Basu, C. R. Chanda, D. Lodh, K. C. Saha, S. K. Mukherjee, S. Roy, S. Kabir, Q. Quamruzzaman, D. Chakraborti, 2000.** Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and west Bengal, India. *Environ. Health Perspect.* **108**: 393-397.
- Cullen, W. R., B. Mc Bride, A. Pickett, 1979.** Transformation of arsenicals by *Candida humicola*. *Can. J. Microbiol.* **25**: 1201-1205.
- Cullen, W. R. , B. McBride, J. Reglinski, 1984.** Reduction of trimethylarsine oxide to trimethylarsino by thiols: A mechanistic model for the biological reduction of arsenicals. *J. Inorg. Biochem* **21**: 45-60.
- Cullen, W. R., B. C. McBride, J. Reglinski, 1984.** The reaction of methylarsenicals with thiols: Some biological implications. *J. Inorg. Biochem.* **21**: 179-194.
- Cullen, W. R., B. C. McBride, J. Reglinski, 1989.** The metabolism of methylarsine oxide and sulfide. *Appl. Organomet. Chem.* **3**: 71-78.
- Daniel, D. Bankson, S. M. 1997.** Micronutrient antioxidants and oxidative stress. *Diag. Endocrin. Metabol.* **15**: 271-291.
- Das, D., A. Chatterjee, G. Samanta, B. Mandal, T. R. Chowrabort, P. P. Chodhury, C. Chanda, G. Basu, D. Lodh, S. Nandi, T. Chakrabort, S. Mandal, S. M.**

- Bhattacharya, D. Chakraborty, 1994.** Arsenic contamination in ground water in six districts of West Bengal, India; The biggest arsenic calamity in the world. *Analyst.* **119**: 168-170.
- Das, D., A. Chatterjee, B. Mandal, G. Samanta, B. Chanda, 1995.** Arsenic contamination in ground water in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in drinking water, hair , nails, urine. Skin scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst.* **120**: 917-924.
- Del Razo, L. M., G. G. Garcia-Vargas, H. Vargas, A. Albores, M. E. Gonsebatt, R. Montero, P. Ostrosky-Wegman, M. Kelsh, M. E. Cebrian. 1997.** Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study. *Arch. Toxicol.* **71**: 211-217.
- Del Razo, L. M., M. Styblo, W. R. Cullen, D. J. Thomas, 2001.** Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **174**: 282-293.
- EPA, 2001.** National primary drinking water regulations; arsenic and clarifications to compliance and new source contaminants monitoring; final rule. *Fed. Reg.* (EPA) **VIII :40** CFR parts 9: 141, 142.
- Ferm, V. H. 1977.** Arsenic as teratogenic agent. *Environ. Health Perspect.* **19**: 215-217.
- Font L., Y. Kun, 2000.** DNA damage in arsenite- and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* **28**: 55-63.
- Freedman, J. H., M. R. Ciriolo, J. Peisach, 1989.** The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* **264**: 134-140.

- Gebel, T. 2000.** Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology* **144**: 155-162.
- Gerbhart, E., G. Rossman 1991.** Mutagenicity, carcinogenicity, teratogenicity in E. Merian. *Metals and their compounds in the environment*. 1991. pp 617-640.
- Goering, P., H. V. Aposhian, M. Mass, M Cebrián, B. D. Beck, M. P. Waalkes, 1999.** Forum; the enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol. Sci.* **49**: 5-14.
- Gomez-Arroyo, S., M. A. Armietta, J. Cortés-Eslava, R. Villalobos-Petrini, 1997.** Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, México. *Mutat. Res.* **394**: 1-7.
- Gorby, M.S., 1994.** Arsenic in the Environment, Part II: Human Health and Ecosystem effects. *John Wiley & Sons, Inc.* **27**: 1-17.
- Gonsebatt, M. E., L. Vega, R. Montero, G. García-Vargas, L. M. Del Razo, A. Albores, M. E. Cebrián, P. Ostrosky-Wegman, 1997.** Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res.* **386**: 219-228.
- Hartmann, A. G. Speit, 1995.** Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat. Res.* **346**: 49-56.
- Hartwig, A. 1998.** Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol. Letters.* **102-103**: 235-239.
- Hodgson, E., R. B. Mailman, 1998.** Dictionary of toxicology. *Macmillan Ref.* U.K. 504 p.
- Hoffman, G. R., 1991.** Genetic toxicology. In *M.O Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen, (Eds), Toxicology.* Pergamon, New York 4th., 201-225.

- Holden, C. 2000.** Napoleon death debate continues. *Science* **288**: 26 May.
- Hsueh, Y. M., W. L. Wu, Y. L. Huang, H. Y. Chiou, C. H. Tseng, C. J. Chen, 1999.** Low serum carotene level and increased risk of ischemic heart disease related to long term arsenic exposure. *Atherosclerosis-Amsterdam* **141**: 249-257.
- Huff, J. 2000.** Is the human carcinogen arsenic carcinogenic to laboratory animals? *Toxicol. Sci.* **55**: 17-23 .
- Hughes, M. F., L. M. Del Razo, E. M. Kenyon, 2000.** Dose-dependent effects on tissue distribution and metabolism of dimethylarsinic acid in the mouse after intravenous administration. *Toxicology.* **143**: 155-166 .
- Hundeiker, M., 2001.** Occupational skin tumors.6. Disease through arsenic and arsenic compounds. *Internistis Che praxis* **41**: 113-119.
- I.A.R.C., 1980.** International agency for research on cancer. Some metals and metallic compounds, arsenic and arsenic compounds. I.A.R.C. *Monogr Eval Carcinog Risk Chem Human* **23**: 39-141.
- I.A.R.C., 1987.** Overall evaluations of carcinogenicity, in IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. *International Agency for Research* . Lyon **Supp 7**: 100-106.
- Izumi Y., K. Isozumi, 2001.** Modern Japanese medical history and the European influence. *Keio J. Med.* **50**: 91-9
- Jakus, V., 2000.** The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratsl lek Listy* **101**: 541-551.
- Jager, J. W., P. Ostrosky-Wegman, 1997.** Arsenic: A Paradoxical Human Carcinogen. *Mutat. Res.* **386**: 181-184.

- Kaise, T., S. Watanabe, K. Itoh, 1985.** The acute toxicity of arsenobetaine. *Chemosphere* **14**: 1327-1332.
- Kaise, T. H. Yamauchi, Y. Horiguchi, T. Tani, S. Watanabe, T. Hirayama, S. Fukui, 1989.** A comparative study on acute toxicity of methyl arsonic acid, dimethylarsinic acid and trimethylarsine oxide in mice. *Appl. Organomet. Chem.* **3**: 273-277.
- Kaiser, J. 1998.** Toxicologists shed new light on old poisons. *Science* **279**: 20.
- Kagey, B. T., J. E. Bumgarner, J. P. Crason, 1977.** Arsenic levels in maternal fetal tissue set. *In Hemphill. Trace Substances in Environ. Health. XI.* University of Missouri Press Columbia. USA. 252-256.
- Kenyon, E. M., M. F. Hughes, 2001.** A concise review of the toxicity and carcinogenicity of dimethylarsinic acid. *Toxicology* **160**: 227-236.
- Kitchin, K. T., 2001.** Review. recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172**: 249-261.
- Kolaczkowski, S. V., A. Perry, A. Mckenzie, F. Johnson, D. E. Budil, P. R. Strauss. 2001.** A spin-labeled abasic DNA substrate for AP endonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**: 722-726.
- Knowles, C. 1985.** Reactions of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase with arsonic acids and arsonous acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **242**: 1-10
- Le, X. C., M. Mingsheng, L. Xiufen, W. R. Cullen, V. A. Aposhian, Z. Baoshan, 2000.** Determination of monomethylarsonous acid, a key arsenic methylation intermediate, in human urine. *Environ. Health Perspect.* **108**: 1015-1018 .

- Lee-Chen, S. F., C. T. Yu, K. Y. Jan, 1992. Effect of arsenite on the DNA repair of UV-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 7: 51-52
- Lhomme, J., J. F. Constant, M. Demeunynck, 1999. Abasic DNA structure, reactivity, and recognition. *Biopolymers* 52: 65-83.
- Li, Y. H. Zhu, Y. Pan, 1998 Teratogenic effects of arsenic on rats chinese. *J. Preventive Med.* 32: 37-39.
- Liu, F., K. Y. Jan, 2000. DNA damage in arsenite-and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells. *Free Rad. Biol Med.* 28: 55-63.
- Mann, S., P. O. Droz, M. Vahter, 1996. A physiologically based pharmacokinetic model for arsenic exposure (development in hamsters and rabbits). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137: 8-22.
- Mass, M., A. Tennant, C. Roop, W. R. Cullen, M. Styblo, D. Thomas, A. Kligerman, 2001. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 355-361.
- Matsui, M., C. Nishigori, S. Toyokuni, J. Takada, M. Akaboshi, M. Ishikawa, S. Imamura, Y. Miyachi, 1999. The role of oxidative DNA damage in human arsenic carcinogenesis: detection 8-Hydroxy-2"-deoxyguanosine in arsenic-related Bowen"s disease. *J. Invest. Dermatol.* 113: 26-31.
- Mazumder, D. N., R. Haque, N. Gosh, B. K. De, A. Santra, D. Chakraborti, A. H. Smith, 2001. Arsenic in drinking water and the prevalence of respiratory effects in West Bengal, India. *International J. Epidemiol.* 29: 1047-1052.

- Mingsheng, M., L. Xiufen, C. Le, B. Zheng, W. R. Cullen, V. Aposhian, 2000.** Determination monomethylarsonous acid, a key arsenic methylation intermediate in human urine. *Environ. Health Perspect.* **108**: 1015-1018.
- Mize, C., R. G. Langdon, 1962.** Hepatic glutathione reductase I. Purification and kinetic properties. *J. Biol. Chem.* **237**: 1589-1595.
- Moore, M. M., K. Harrington-Brock, C. L. Doerr, 1997.** Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat. Res.* **386**: 279-290.
- Namgung U. K., Z. Xia, 2000.** Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neuroscience* **20**: 6442-6451.
- Nickoloff, J. A., M. F. Hoekstra, 1998.** DNA damage and repair. *Humana Press*. Totowa, N. J. USA. pp 626.
- Nordenson, G., L. Beckman, 1991.** Is genotoxic effects of arsenic mediated by oxygen free radicals?. *Hum. Hered.* **41**: 71-73
- Olive, P. L., J. P. Banáth, R. E. Durand, 1990.** Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individuals chinese hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 779-783.
- Ostlin, O., K. J. Johanson. 1984.** Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **123**: 291-298.
- Ostrosky-Wegman, P., M. A. Gonsebatt, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas, G. García-Vargas, L. M. Del Razo, M. Cebrián, 1991.**

- Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res.* **250**: 477-482.
- Petrick, J. S., F. Ayala-Fierro, W. R. Cullen, D. E. Cater, H. V. Aposhian, 2000.** Monomethylarsonous acid (MMA^{III}) is more toxic than arsenite in chang human hepatocytes. *Toxicol and Appl. Pharmacol.* **163**: 203-207.
- Petrick, J., B. Jagadish, E. Mash, and H. V. Aposhian, 2001.** Monomethylarsonous acid (MMA^{III}) and Arsenite: LD₅₀ in hamsters and *in vitro* inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* **14**: 651-656.
- Ramírez, P., D. A. Eastmond, J. P. Laclette, P. Ostrosky-Wegman, 1997.** Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cell by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* **386**: 291-298.
- Ramirez, P., L. M. Del Razo, M. C. Guitierrez-Ruiz, M. E. Gonsebatt. 2000.** Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Cacinogenesis.* **21**: 701-706.
- Rice-Evans C .A., A. T. Diplock, M. C. R. Symons, 1991.** Laboratoy techniques in biochemisty and molecular biology: Techniques in free radical research. *Elservier* New York USA **22**: pp 291.
- Rojas, E., L. A. Herrera, L. A. Poirier, and P. Ostrosky-Wegman, 1999.** are metals dietary carcinogens? *Mutat. Res.* **443**: 157-181 .
- Rojas E., M. C. Lopez, M. Valverde.1999.** Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B* **727**: 225-254.

- Rojas, E., M. Valverde, S. B. Kala, G. Kala, M. W. Liberman 2000. Accumulation of DNA damage in the organs of mice deficient in γ -glutamyltranspeptidase. *Mutat. Res.* **447**: 305-316.
- Rossmann, T. G., A. N. Uddin, F. J. Burns, M. C. Bosland. 2001. Arsenite is a cocarcinogen with solar ultraviolet radiation with mouse skin: An animal model for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **176**: 64-71.
- Rudel, R., T. M. Slayton, B. D. Beck, 1996. Implications of arsenic genotoxicity for dose response of carcinogenic effects. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **23**: 87-105.
- Salazar, A. M., P. Ostrosky-Wegman, D. Menéndez, E. Miranda, A. García Carrancá, 1997. Induction of P53 protein expression by sodium arsenite. *Mutat. Res* **381**: 259-265.
- Salazar, A. M., 1998. Mecanismos moleculares de la alteración proliferativa inducida por el arsénico. *Tesis de Doctorado IIB, UNAM.*
- Sanderson, R.J., R. T. Shepperdson, A. E. Vatter, D. W. Talmage, 1977. Insolation and enumeration of peripheral blood monocytes. *J Immunol.* **118**: 1409-1414.
- Sasaki, Y. F., K. Sekihashi, F. Izumiyama, E. Nishidate, A. Saga, K. Ishida, S. Tsuda. 2000. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity database. *Crit. Rev. Toxicol.* **30**: 629-799.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice, E. L. Schneider, 1988. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**: 184-191.

- Sinnhuber, R. O., T. C. Yo, 1998.** 2-Thiobarbithuric acid method for measurement of rancidity in fishery products. Quantitative determination of malonyaldehyd. *Food Technol.* **12**: 9.
- Sordo, M. L. A. Herrera, P. Ostrosky-Wegman, E. Rojas. 2001.** Cytotoxic and genotoxic effects of As, MMA and DMA on leukocytes and stimulated human lymphocytes. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **21**: 249-260.
- Stokinger H. E., 1981.** The metals. In: Patty's industrial hygiene and toxicology. 3rd e.d. Capitulo 29. 2A. Clayton G.D. Clayton F.E. eds. *A wiley-Interscience Publication. John Wiley and sons, New York: 2A*: 1493-2060.
- Strauss, G. H. S., 1991.** Non random cell killing in cryopreservation; implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.* **252**: 1-15.
- Styblo, M., D. J. Thomas, 1997.** Binding of arsenicals to proteins in an *in vitro* methylation system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **147**: 1-8.
- Styblo, M., W. R. Cullen, D. J. Tomas, 1997.** Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols. *Chem. Res. Toxicol.* **10**: 27-33.
- Styblo, M., L. M. Del Razo, L. Vega, D. R. Germolec, E. L. LeCluyse, G. A. Hamilton, W. Reed, C. Wang, C. W. R. Cullen, D. J. Thomas, 2000.** Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archiv.Toxicol.* **74**: 286-299.

- Styblo, M., L. M. Del Razo, W. R. Cullen, D. J. Thomas, 2001.** Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices *Toxicol Appl. Pharmacol.* **174:** 282-293.
- Tatum, F. M., R. D. Hood. 1999.** Arsenite uptake and metabolism by rat hepatocyte primary cultures in comparison with kidney- and hepatocyte-derived rat cell lines. *Toxicol. Letters* **52:** 20-25.
- Te-Chang, L., N, Tanaka, P. W. Lamb, T. M. Gilmer, J. C. Barrett. 1988.** Induction of gene amplification by arsenic. *Science* **241:** 79-81.
- Tice, R. R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu Y. F. Sasaki, 2000.** Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* **35:** 206-221.
- Thomas, D. J., M. Styblo, S. Lin, 2001.** The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **176:** 127-144.
- Tseng, W. P., A. M. Chu, S. W. How, J. M. Fong C. S. Lin and S. Yen, 1968.** Prevalence of skin cancer in an epidemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J. Natl. Cancer Inst.* **40:** 453-463.
- Tsuchiya K., N. Ishinishi, B. A. Fowler, 1997.** In: Toxicology of metals, Volumen II. Springfield, Va: *National Technical Information Service*, **268-324:** 30-70.
- Uede, K., A. Shiotani, 1999.** Skin manifestation accompanying acute massive criminal arsenic poisoning. *Nippon higuka gakkai osaka chihokai osaka daigaku igakulou hifuka kyoshitsu* **41:** 511-517.

- U.S.E.P.A., 1980.** (U.S. Environmental Protection Agency). Ambient water quality criteria for arsenic . springfield, Va: *National Technical Information Service*, **81**: 117-327.
- Vahter, M., E. Marafante, L. Dencker, 1984.** Tissue distribution and retention of ⁷⁴As-dimethylarsinic acid in mice and rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **13**: 259-264.
- Vahter, M., R. Couch, B. Nermell, R. Nilsson, 1995.** Lack of methylation of inorganic arsenic in the chimpanzee, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **133**: 262-268.
- Vahter, M., 2000.** Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and it's role in toxicity. *Toxicol. Letters* **112-113**: 209-217.
- Vahter, M., G. Concha. 2001.** Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacol Toxicol.* **89**: 1-5
- Vega, L., M. E. Gonsebatt, P. Ostrosky-Wegman, 1995.** Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes *in vitro*: an individual susceptibility effect detected. *Mut. Res.* **334**: 365-373.
- Wang T. S., C. F. Kuo, K. Y. Jan, H. Huang, 1996.** Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *J. Cell. Physiol.* **169**: 256-268.
- Wang, Z. Y. 2001.** Arsenic compounds as anticancer agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **48**: 72-76.
- Wang, T. S., T. Y. Hsu, C. H. Chung, A. S. S. Wang, D. T. Bau, and K. Y. Jan, 2001.** Arsenite induce oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Free Rad. Biol. Med.* **31**: 321-330.

- Wexler, P., 1998.** Encyclopedia of toxicology. *Academic Press USA 1*: pp 605.
- World Health Organization. (WHO), 1981.** Arsenic. World Health Organization. *Environ. Criteria*, **18**, Ginebra.
- World Health Organization. (WHO), 1993.** Guideline for drinking-water quality. 2da edición. Ginebra. **1**: 41-42.
- World Health Organization. (WHO), 2001.** Arsenic in drinking water. **Hoja 210**: May.
- Williams, G. M., A. M. Jeffrey, 2000.** Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induce. regulatory *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **32**: 283-292.
- Winski S. L., 1998.** Arsenate toxicity in human erythrocytes: characterization of morphologic changes and determination of the mechanism of damage. *J. of Toxicol. Environ. Health Part A*, **53**: 345-355.
- Yamamoto, S., Y. Konishi, T. Matsuda, T. Murai, M. A. Shibata, I. Matsui-Yuasa, S. Otani, K. Kuroda, G. Endo, S. Fukushima, 1995.** Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in f344/ducrl rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Res.* **55**: 1271-1276.
- Yamamura, Y., H. Yamauchi, 1984.** Metabolism and excretion of orally administered dimethylarsinic acid in the hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **74**: 130-140.
- Yamanaka, K., M. Hoshino, M. Okamoto, R. Sawamura, A. Hasegawa, S. Okada, 1990.** Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenic, is for the mayor part likely due to its peroxy radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**: 58-64.

- Yamanaka, K., S. Okada, 1994.** Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environ. Health Perspect.* **102:** 37-40.
- Yamauchi, H., B. A. Fowler, 1994.** Toxicity and metabolism of inorganic and methylated arsenicals in: Nriagu Jo. *Arsenic in the Environment, Part II; Human Health and Ecosystem Effects* Wiley New York pp 35-43.
- Yo T. C., R.O. Sinnhuber, 1967.** An improved 2-Thiobarbituric acid (TBA) procedure for the measurement of autoxidation in fish oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **44:** 256-258.
- Yu H., S. Lin, E. T. Snow, 1998.** Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. *Mutat. Res.* **408:** 203-218.
- Zakharyan, R. Y., Wu, G. Bogdan, H. V. Aposhian, 1995.** Enzymatic methylation of arsenic compounds: Assay, partial purification, and properties of arsenite methyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase of rabbit liver. *Chem. Res. Toxicol.* **8:** 1029-1038.
- Zakharyan, R. A., A. Sampayo-Reyes, S. M. Healy, G. Tsapralis, P. G. Board, D. C. Liebler, and H. V. Aposhian. 2001.** Human monomethylarsonic acid (MMA^V) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem. Res. Toxicol.* **14:** 1051-1057

Zaldivar, R., G. L. Ghai, 1980. Clinical epidemiological studies on chronic arsenic poisoning in children in adults, including observations on children with high- and low- intake of dietary arsenic. *Zentrabl. Bakteriol. [B]* 170: 409-421.

Zar, J. H. 1984. Biostatistical Analysis. *Prentice-Hall*, Englewood Cliffs, New Jersey. 718 p.

SITIOS WEB

Comet assay interest website

<http://www.cometassay.com>