



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA

"EXPRESION DE CITOQUERATINAS (CK) EN ORGANOS DE
RATONES BalbC/AnN EXPUESTOS SUBCRONICAMENTE A
ARSENITO DE SODIO (NaAsO_2)".

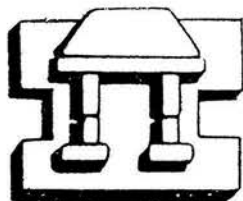
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

RUBEN GERARDO ZAMORA MENDOZA



IZTACALA

ASESOR DE TESIS: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BÓNAPARTE



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.



U.N.A.M. CAMPUS

IZT.

Agradezco al Programa de Becas de Tesis de Licenciatura (PROBETEL) de la F.E.S Iztacala por el apoyo dado durante el periodo de realización de esta tesis misma que entrego con satisfacción.

A mis padres

Bertha Mendoza Machado y Rubén Zamora Rojas

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a mis padres por darme el regalo de la vida, e inculcar en una mente novel la avidez por el saber y el descubrimiento. en especial este logro se lo dedico a mi madre, ya que no es hasta ahora cuando comprendo sus mortificaciones y sus desvelos que habrían de redundar en un profesionista y que donde este, no me alcanzan las palabras para decir mil gracias y que sus esfuerzos rindieron frutos.

A mi papá que con todo y lo que hemos pasado juntos hemos formado un vinculo muy estrecho y que me atrevería a decir que sin él no sería el hombre que hoy escribe estas palabras, gracias por estar conmigo y en especial por creer en mí aunque a veces no lo merezca.

A mis abuelitos de los dos lados por brindarme su cariño muy especial cada uno de ellos e impulsarme a superarme no importando las adversidades, yo se que desde un cachito del cielo me están viendo y que se sienten orgullosos de mí así como yo de ellos.

Ahora se que soy verdaderamente rico ya que tengo amigos que con sus particulares formas de pensar me han enriquecido con cada una de sus palabras y sus formas de ser y que me han enseñado que la vida es bella y que de alguna forma yo vivo en ellos, a mis amigas que me han brindado su cariño incondicional y sus palabras de aliento y uno que otro regaño que me ha hecho pensar en la pureza que hay al amar.

Al clan de los yemianos que con sus finos y selectos miembros he pasado ratos inolvidables que difícilmente podré olvidar, al Yemo por su sinceridad y altos conocimientos cibernéticos no se diga lo licenciado, al buti por su forma de ver la vida, misma que tendría que tener su sensibilidad para poder comprenderla y ese oscurantismo que anida en su ser, también licenciado, al Ignacio por ser la verdad andando, ser compañero y amigo del que he aprendido mucho fuera de las aulas, por esas pedotas que nos hemos puesto y por esas reuniones en las que siempre contamos los mismos cuentos y que nos saben como si fueran nuevos y porque se que algún día realizara los logros que enorgullecerá y llenara de dicha a sus padres.

Al Oscar por ser sencillito y carismático tener esa facilidad de palabra que te convence que lo único difícil e imposible esta en la mente, por brindarme su apoyo incondicional en los momentos de crisis, y por supuesto su amistad sincera, misma que sabe es reciproca de mi parte.

Al Mario men por su sinceridad y por contar con él en los momentos buenos y malos.

A los compadres Gito, Delfino, Toño (alias secre) y Cesar por ser los primeros en brindarme su amistad misma que a perdurado hasta ahora y que creo será para toda la vida, por esos momentos y conversaciones que habríamos de retomar al calor de un buen vino o bueno también chela.

A todas las chicas que me han acogido en su corazón sin preguntar razones ni causas en especial a mi Laura (rana) por brindarme su amistad pura y sincera y por darme a entender que puedo contar con ella aunque a veces no lo merezca, a mi Lety por ser puro corazón y ser la amiga ideal con la cual quisiera contar para toda la vida.

A ver por hacerme sentir alguien especial y estar en los momentos difíciles del corazón, por compartí conmigo alegrías pero también tristezas, y darme el ejemplo de que si algo deseas con todas las fuerzas lo alcanzaras, tu sola presencia le da sentido a mi vida, gracias por estar conmigo en cuerpo y espíritu..

Agradezco a todo el lab. A la doctora Gonsebatt que sin conocerme ni antecedente creyó en mi y me sentí gustosamente obligado a no fallarle.






A la Doctora Luz María Del Razo del departamento de Farmacología y Toxicología en el CINVESTAV I.P.N, por su colaboración en la parte técnica de este proyecto así como su experta asesoría, misma que conllevó a enriquecer y respaldar este trabajo

A Paty Guzmán que siempre oportuna y abierta me enriqueció no solo la mente sino también la forma de ser compañero y amigo en lo profesional y lo personal.

A Paty Ramírez que me asistió y entreno, con la paciencia que solo un excelente maestro tiene y compartió su conocimiento para que también viera la luz.

Y a Jorge, Wendy, Quitze, Bernardo y todos los que pasaron bajo el manto del lab. y que en buena medida han cambiado mi forma de ver la vida gracias por ser por ser compañeros y amigos.

CONTENIDO

| | Paginas |
|---|---------|
|  1. INTRODUCCIÓN | 1 |
|  2. JUSTIFICACIÓN | 2 |
|  3. ANTECEDENTES | 3-9 |
| 3.1 <i>¿ Qué es el arsénico?</i> | |
| 3.2 <i>Toxicología del arsénico</i> | |
| 3.3 <i>Toxico cinética</i> | |
| 3.3.1 <i>Absorción</i> | |
| 3.3.2 <i>Distribución</i> | |
| 3.3.3 <i>Metilación</i> | |
| 3.3.4 <i>Excreción</i> | |
|  4. Mecanismos de toxicidad | 9 |
|  5. Toxicidad del Arsénico | 9-11 |
| 5.1 <i>Toxicidad Aguda del arsénico</i> | |
| 5.2 <i>Toxicidad crónica</i> | |

| | | |
|------------|--|-------|
| 6. | Daños tisulares y celulares por arsénico | 11-13 |
| | 6.1 <i>Hígado</i> | |
| | 6.1.1 <i>Daño hepático inducido por arsénico</i> | |
| | 6.1.2 <i>Daño renal inducido por arsénico</i> | |
| 7. | Citoqueratinas | 13-21 |
| | 7.1 <i>Biología molecular de las citoqueratinas</i> | |
| | 7.2 <i>Función de CK 8/18 en varios procesos celulares</i> | |
| | 7.3 <i>Cambios post-traduccionales en CK</i> | |
| | 7.4 <i>¿El arsénico puede inducir CK?</i> | |
| 8. | Western Blotting | 22-23 |
| | 8.1 <i>¿Cómo se hace?</i> | |
| 9. | HIPÓTESIS | 24 |
| 10. | OBJETIVOS | 24 |
| | 10.1 <i>General</i> | |
| | 10.2 <i>Particulares</i> | |
| 11. | METODOLOGÍA | 25-27 |
| | 11.1 <i>Diagrama de metodología</i> | |
| 12. | TRATAMIENTO DE RESULTADOS | 28 |

| | | |
|------------|--|-------|
| 13. | MATERIAL | 29-30 |
| | 13.1 <i>Recursos</i> | |
| | 13.2 <i>Reactivos</i> | |
| | 13.3 <i>Soluciones</i> | |
| 14. | RESULTADOS | 31-46 |
| | 14.1 <i>Inducción de CKs en órganos de ratón</i> | |
| | 14.1.1 <i>Muestras de hígado</i> | |
| | 14.1.2 <i>Muestras de riñón</i> | |
| | 14.1.3 <i>Muestras de pulmón</i> | |
| | 14.1.4 <i>Muestras de vejiga</i> | |
| | 14.1.5 <i>Correlaciones entre CK , Asi y formas metiladas (DMA MMA/) acumulados en tejidos.</i> | |
| | 14.2 <i>Inmunorrélicas</i> | |
| 15. | DISCUSIÓN | 47-49 |
| 16. | CONCLUSIONES | 50 |
| 17. | REFERENCIAS | 51-57 |



APÉNDICES

A.1 Electroforesis

A1.1 Preparación de soluciones para el método de electroforesis en SDS-PAGE

A.2 Inmunotransferencia

A.2.1 Soluciones para Western Blotting

A.3 Cuantificación de Western Blotting

A.4 Separación de As y especies metiladas



Tablas y Figuras

| Figuras | Titulo | Paginas |
|---------|---|---------|
| FIG.1 | Estructura atómica del arsénico | 3 |
| FIG.2 | Configuración electrónica del arsénico | 4 |
| FIG.3 | El trióxido de arsénico es la forma más abundante en la naturaleza | 5 |
| FIG.4 | Biotransformación del arsénico en el ser humano | 7 |
| FIG.5 | Hipótesis de biotransformación del arsénico | 8 |
| Tabla.1 | Comparación de la toxicidad de compuestos arsenicales en roedores | 10 |
| Tabla.2 | Clasificación de los tipos de proteínas que conforman los filamentos intermedios | 14 |
| Tabla.3 | Distribución tejido-especifico de citoqueratinas (CK) | 15 |
| FIG.6 | Esquema de Moll. Muestra la localización de los tejidos en los que se sintetizan y expresan los dímeros de citoqueratinas tipo I y II | 16 |
| FIG.7 | Organización estructural de los filamentos de citoqueratinas | 17 |
| FIG.8 | Niveles de organización y ensamblaje de los filamentos intermedios | 17 |
| FIG.9 | Organización intron/exon de los genes de las queratina humanas | 19 |
| FIG.10 | Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE | 23 |
| FIG.11 | Electro transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa, nylon ó PVDF | 23 |
| FIG.12 | Gel SDS-PAGE 10% que corresponde a proteínas provenientes de órganos de ratón en este caso tratados con 2.5 mgAs/Kg de peso | 43 |
| FIG.13 | Gel SDS-PAGE 10 %que corresponde a proteínas provenientes de órganos de ratón en este caso tratados con 5.0 mgAs/Kg de peso | 44 |
| FIG.14 | Inmunoréplica de hígados tratados con 5.0 mgAs/kg de peso | 45 |
| FIG.15 | Inmunoréplica de vejiga de ratón tratados con 2.5 mgAs/kg de peso | 46 |
| Tabla.4 | Resumen de la expresión/inhibición encontrados en los órganos tratados y visualizados por cada banda. | 51 |



Gráficas

| Gráficas | Titulo | Paginas |
|-----------|---|---------|
| Gráfica.1 | Variación en la inducción de CK en hígados de ratones tratados con arsenito de sodio. | 32 |
| Gráfica.2 | Variación en la inducción de CK en riñones de ratones tratados con arsenito de sodio. | 34 |
| Gráfica.3 | Variación de la inducción de CK en pulmones de ratones tratados con arsenito de sodio. | 36 |
| Gráfica.4 | Variación en la inducción de CK en vejigas de ratones tratados con arsenito de sodio. | 38 |
| Gráfica.5 | Correlación entre la cantidad de Asi y bandas en hígados de ratón tratados con 5.0 mgAs/KG de peso. | 39 |
| Gráfico.6 | Correlación entre la cantidad de ácido dimetilarsínico (DMA) y bandas de hígados de ratón tratados con 5.0 mgAs/KG de peso. | 40 |
| Gráfica.7 | Correlación entre la cantidad de ácido monometilarsónico (MMA) y bandas de hígados de ratón tratados con 5.0 mgAs/kg de peso. | 41 |



Abreviaturas

| | |
|--------------------------|---|
| Asi | Arsénico inorgánico |
| GSH | Glutation reducido |
| GSSG | Glutation oxidado |
| MMA | Ácido monometilarsónico |
| DMA | Ácido dimetilarsínico |
| SAMe | S-Adenosilmetionina |
| - SH | Grupo sulfihidrilo |
| IF | Filamentos intermedios |
| CK | Citoqueratinas |
| SDS-PAGE | Gel de poliacrilamida sodio dodecil sulfato |
| NaAsO₂ | Arsenito de sodio |
| D.O | Densidades opticas |
| PBS | Amortiguador salino de fosfatos |

RESUMEN

El estudio de los efectos de algunos metaloides incluyendo el arsénico continúa siendo de interés por su papel en el proceso de carcinogénesis. Con el uso de modelos *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que el arsénico daña las estructuras de las macromoléculas biológicas en especial al ADN y proteínas interviniendo también en su ruta de síntesis y por lo tanto alterando su papel fisiológico. Uno de los efectos mejor conocidos del arsénico son los reportados en órganos tales como el hígado y en menor proporción sobre el riñón, existiendo un desconocimiento relativo de sus efectos sobre otros órganos vitales como el pulmón y la vejiga, sitios donde se sospecha la acumulación del metaloide.

Por este motivo en el presente estudio se utilizó un modelo *in vivo* para establecer, mediante el empleo de inmunorrélicas (*western blot*), una asociación entre la exposición subcrónica a arsenito de sodio y la alteración de algunas proteínas del citoesqueleto tales como las citoqueratinas, presentes en órganos como el hígado, el pulmón, el riñón y la vejiga de ratones BalbC/AnN.

En los resultados obtenidos se observó que el hígado tuvo una mayor inducción de CK en la dosis de 5 mgNaAsO₂/Kg de peso, sin embargo, no encontramos una correlación significativa entre la cantidad de arsenito o de sus metabolitos metilados y la inducción de CK. En los hígados de los animales tratados con 2.5 y 10.0mg/kg/As se vio una disminución en estas proteínas. En pulmón y riñón no obtuvimos indicios de inducción ni de inhibición en las CK presentes, no así en las vejigas, en donde la expresión de CK apunta hacia una posible inducción en la dosis 2.5 mg/Kg, mientras que en la dosis de 10 mg/Kg se observó una inhibición de esta expresión.

Los órganos en donde se visualizó una modulación de la expresión de CK son parte de la ruta metabólica y de depuración del arsénico, por lo que la exposición crónica, similar a la realizada en este trabajo producirá efectos similares modificando la expresión normal de proteínas estructurales. Las repercusiones fisiológicas a largo plazo de estos efectos deberían estudiarse por la asociación que existe entre los defectos en la expresión de las CK y la manifestación de patologías.

De este trabajo concluimos que el arsénico induce CK en el hígado y probablemente en vejiga. Este proceso también es observado en la intoxicación por As en poblaciones humanas. Por lo que sería importante realizar estudios similares en estas poblaciones expuestas ya que la inducción de CK podría constituir un indicio de efectos tóxicos.

Palabras clave: Arsenito de sodio, toxicidad crónica, citoqueratinas, cepa BalbC/AnN, inmunorrélicas.

1. INTRODUCCIÓN

Los metales constituyen un grupo importante de contaminantes que están fuertemente relacionados con el medio ambiente y las actividades humanas. Su toxicidad varía enormemente con su estado químico, sus propiedades fisicoquímicas, su capacidad para interactuar o reaccionar con otros contaminantes en el ambiente.

El arsénico existe naturalmente en rocas, suelo, agua, aire, plantas y animales. Puede además ser liberado dentro del medio ambiente a través de la actividad natural tales como la acción volcánica, la erosión de las rocas, los incendios forestales, o a través de las acciones humanas (EPA, 2000). Las fuentes antropogénicas del metaloide se originan principalmente de la minería, manufactura de preservadores forestales, pinturas, metales, drogas, jabones, semiconductores, producción del papel y manufactura de cemento (EPA, 2000), el uso de pesticidas y la incineración de combustibles fósiles (Ostrosky y Jager, 1997).

Este elemento ha estado siempre en constante uso desde tiempos antiguos como veneno, pero también ha tenido otros usos benéficos como tónico. Uno de ellos es la llamada "solución de Fowler" que fue usada en el tratamiento de asma bronquial, leucemia, sífilis, infecciones parasitarias y la soriasis (Wade, 1993).

Aun hoy el arsénico se usa en el tratamiento contra la tripanosomiasis y se ha propuesto su uso terapéutico en leucemias, pero entre sus mayores usos comerciales hoy en día están los pesticidas y conservadores forestales, en la manufactura de vidrio, papel, y semiconductores.

El arsénico inorgánico ha sido clasificado por la IARC (1980) como un agente carcinogénico. Cuando por exposición ocupacional se entra en contacto con él vía aérea hay evidencia de cáncer de pulmón; por otro lado en caso de exposición por vía oral se presenta un aumento de cáncer de piel, vejiga, riñón, hígado y pulmón (Chen y Lin, 1994).

El arsenito ha sido considerado como un compuesto más potente que el arseniato en la inducción de daño cromosómico en células de linfoma de ratones, estos resultados confirman la jerarquía de toxicidad atribuida generalmente al arsénico y a sus metabolitos orgánicos. Los compuestos insolubles inorgánicos tienden a ser de una orden de magnitud más tóxica y biológicamente más reactiva que los metabolitos orgánicos (Ostrosky y Jager, 1997), aunque recientemente se han encontrado que las especies trivalentes podrían ser más tóxicas que el arsenito (Aposhian y cols., 2000).

2. JUSTIFICACIÓN

Dado el gran uso que todavía tienen los derivados arsenicales como el arsénico mismo, y la extensa contaminación que presentan en diferentes regiones del mundo el agua extraída de pozos, el número de seres humanos que todavía se encuentran expuestos a sus efectos es de varios millones e incluyen poblaciones en países como México, Chile, Argentina, India y China. Es por ello que los estudios enfocados a investigar a escala celular los efectos de este carcinógeno ayudarán a comprender acerca de los mecanismos de acción y proveer datos básicos sobre los efectos de este elemento, y otros de efectos similares, en los organismos.

En este trabajo se estudia el efecto del arsénico sobre proteínas involucradas en el mantenimiento de la estructura celular, más particularmente los filamentos intermedios, que es un grupo de proteínas que se encuentran formando parte del citoesqueleto. Dentro de este grupo se encuentran las citoqueratinas. El objeto de este trabajo es conocer si el arsénico provoca una modificación en la expresión de las citoqueratinas cuando se usan modelos *in vivo*. Acercándose un poco más hacia lo que ocurre cuando el arsénico está circulando en un sistema complejo como lo es el organismo de los mamíferos incluyendo al hombre.

3. ANTECEDENTES

3.1 ¿Qué es el Arsénico?

El arsénico es un elemento abundante en la naturaleza. Pertenece al grupo VA de la tabla periódica; su número atómico es 33 y su masa atómica de 74.9 (Fig.1); está clasificado como elemento de transición o metaloide, esto es que comparte algunas propiedades tanto físicas como químicas con los metales. Sus números de oxidación más comunes son 3-, 3+ y 5+.

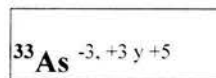


Fig.1 Estructura atómica del arsénico (Según modelo de Bohr)

No es un elemento simple, (Fig.2) pues su comportamiento químico es muy complejo, lo que da lugar a múltiples compuestos arsenicales presentes en forma inorgánica y orgánica.

Los compuestos arsenicales pentavalentes son los más estables en la naturaleza; en cuanto los trivalentes los más comunes son el arsenito de sodio NaAsO_2 , trióxido de arsénico As_2O_3 (Fig.3) y cloruro arsenioso AsCl_3 .

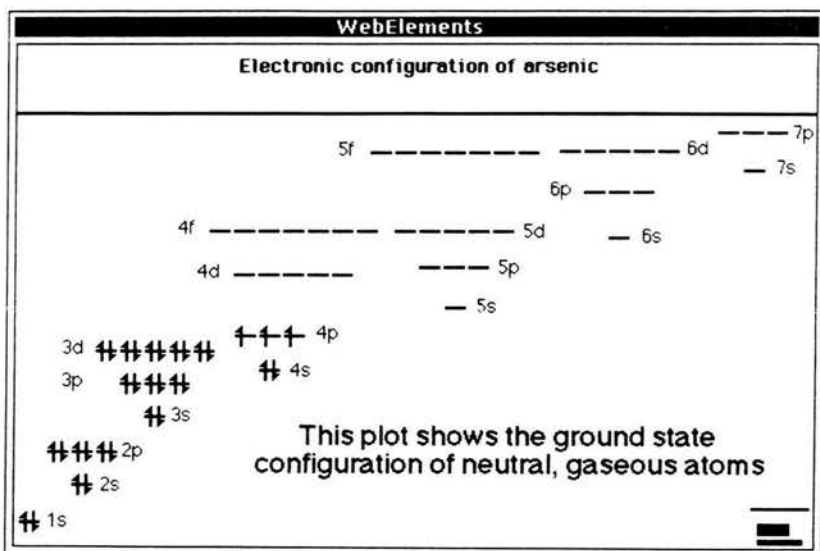


Fig. 2 Configuración electrónica del arsénico

Esta figura muestra la configuración electrónica en estado nativo de los átomos gaseosos neutros, en el caso del arsénico al tener en una de sus valencias +3 lo hace muy reactivo con otras macromoléculas en la célula.

Además de su existencia natural, existen actividades humanas que emiten arsénico al medio ambiente, tal es el caso de los combustibles fósiles (carbón, madera), las estaciones generadoras de energía eléctrica, en procesos de fundición y refinación de metales no ferrosos (plomo, zinc, cobre), el uso de preservativos para la madera, la manufactura de semiconductores para la industria electrónica elaborados a partir de arseniuro de galio (GaAs) e indio (InAs) y los depósitos de desechos químicos con grandes cantidades de arsénico almacenadas inadecuadamente.

Se ha utilizado de una forma u otra como pesticida, herbicida y roenticida; en la manufactura del vidrio, pigmentos, pinturas y aleaciones. El mortal gas arsina (AsH_3) es usado en la manufactura de microchips, en la industria de semiconductores.

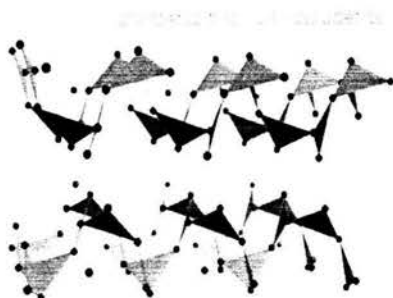


Fig.3 El trióxido de arsénico es la forma de este elemento más abundante en la naturaleza

3.2 Toxicología del arsénico

Como ya se mencionó anteriormente la toxicidad de varios compuestos del arsénico en mamíferos se extiende sobre un amplio rango, determinado no solo en parte por acciones bioquímicas únicas de cada compuesto, sino también por su absorbilidad, eficiencia de la biotransformación y disposición.

Generalmente, los arsenos presentan el riesgo tóxico más grande, seguido cercanamente por los arsenitos (compuesto inorgánicos trivalentes). Los compuestos pentavalentes inorgánicos (arseniatos) son menos tóxicos que los arsenitos, mientras que los compuestos pentavalentes orgánicos (metilados) representan los arsenicales menos peligrosos, son usados en pesticidas. (Malachowsky, 1990).

3.3 Toxicocinética

3.3.1 Absorción

Las principales vías de entrada del arsénico al organismo son la gastrointestinal y el tracto respiratorio, aunque también se ha reportado absorción a través de la piel.

La absorción gastrointestinal de compuestos arsenicales depende de su solubilidad en agua principalmente. En seres humanos y en la mayoría de las especies animales la absorción llega a ser mayor al 90% cuando es administrado en forma acuosa (Tam y col., 1979).

La absorción por tracto respiratorio depende del tamaño de la partícula inhalada así como la solubilidad del compuesto arsenical (ATSDR, 1993).

Los arsenicales pentavalentes son relativamente solubles y absorbibles a través de las membranas de las mucosas. Los arsenicales trivalentes, tienen una gran solubilidad en lípidos, y son mayormente absorbidos a través de la piel. (Ellenhorn, 1997)

La ingestión ha sido la base usual del envenenamiento. La eficiencia de la absorción intestinal depende de la forma física del compuesto, las características de la solubilidad, el pH gástrico, la motilidad gastrointestinal y la transformación microbiana intestinal. Una vez absorbido, muchos arsenicales causan daño a las células del sistema nervioso, los vasos sanguíneos, el hígado, y otros tejidos.

Dos mecanismos bioquímicos de toxicidad son reconocidos: (1) su combinación reversible con los grupos tiol (SH) contenidos en proteínas tisulares y enzimas, y (2) la substitución del anión arsénico por fosfato en muchas reacciones, incluyendo aquellas críticas en la fosforilación oxidativa (Reigart y Roberts, 1999).

3.3.2 Distribución

Una vez absorbido, el arsénico es transportado a través de la sangre a diferentes órganos y tejidos. Los compuestos arsenicales (orgánicos e inorgánicos) tienden a acumularse en grandes cantidades principalmente en pulmón, hígado, piel y riñón. El arsénico trivalente se une fuertemente a grupos sulfidrilo de la queratina, depositándose en grandes cantidades en pelo y uñas.

Previo a la metilación, el arsénico inorgánico, se une a algunas proteínas hepáticas, lo que sugiere que este evento representa el primer paso de detoxificación de la forma inorgánica ya que la hace menos disponible (Bodgan y cols. 1994).

La metilación del arsénico se realiza principalmente en la fracción citosólica del hígado, la S-adenosilmetionina (SAME) es el principal donador de grupos metilo y se cree que el glutatión reducido (GSH) es el donador de electrones para la reducción de los compuestos arsenicales (Fig.3).

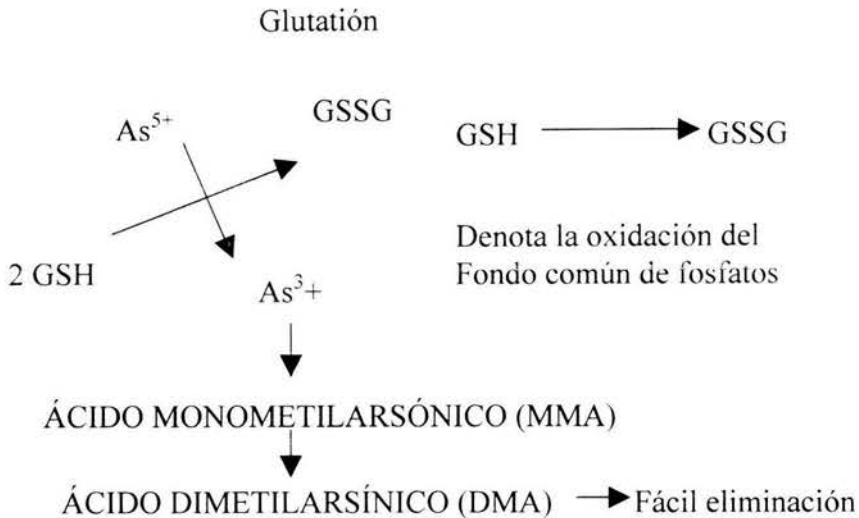


Fig.4 Biotransformaci6n del ars6nico en el ser humano (seg6n Goodman y Gilmann, 1996).

3.3.3 Metilaci6n

En la actualidad a6n no se conoce con exactitud el proceso de biotransformaci6n del ars6nico, sin embargo, se han aceptado hip6tesis como la propuesta por Cullen y cols. (1984) y Thompson (1993) en donde se sugiere que el metabolismo del ars6nico involucra dos procesos: A) las reacciones de reducci6n que interconvierten el ars6nico V a ars6nico III; y B) las reacciones de metilaci6n oxidante que convierten el ars6nico III en especie metiladas. (Fig.4).

Esto es, una vez reducido el ars6nico se adiciona el primer grupo metilo para formar el 6cido monometilars6nico (MMA) y sigue otra metilaci6n para formar el 6cido dimetilars6nico (DMA) considerado como el compuesto final en el metabolismo del ars6nico en mam6feros. Los compuestos metilados no-se desmetilan para liberar al ars6nico (Buchet y cols. 1981a).

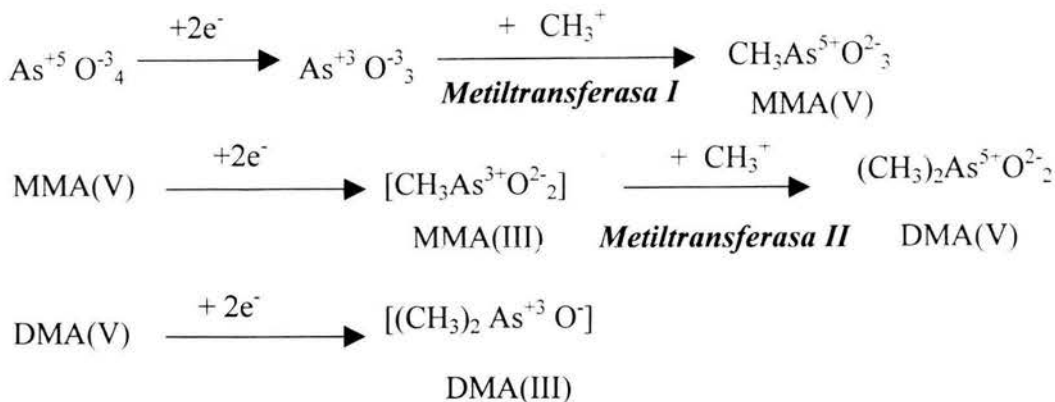


Fig.5 Hipótesis de biotransformación del arsénico: Thompson (1993).

La capacidad de metilación del arsénico puede ser modificada por factores como:

1. La dosis y el tiempo de exposición, esto es por la posible saturación del proceso de metilación del arsénico; a mayor exposición al arsénico hay una disminución en la eficiencia de metilación debido a una saturación de la capacidad metilante del organismo (Buchet y cols. 1981b).
2. Tipo de dieta, pues ciertos alimentos podrían alterar la metilación de arsénico, estos serían los relacionados con la obtención de los grupos metilo, de tal manera que nutrientes como la metionina, la colina, la vitamina B₁₂ y el ácido fólico que interviene en la síntesis y utilización de S-adenosilmetionina (SAMe) (donador de metilos) podrían modificar la metilación (Vather y Marafante, 1987).
3. Probablemente por el polimorfismo genético de las enzimas metilantes. Varias enzimas que catalizan la metilación de diferentes xenobióticos se encuentran bajo control genético. Aún no se ha determinado el papel del genotipo en la variación individual de la capacidad metilante de arsénico (Weinshilboum, 1988).

3.3.4 Excreción

Debido a la alta absorción de los compuestos arsenicales, su excreción por heces es muy baja, alrededor del 4% de la dosis administrada. La bilis es una vía de importancia considerable para la excreción relativa del arsénico, no obstante, debido a su reabsorción en el intestino, el arsénico queda disponible otra vez para su excreción por el riñón, como consecuencia la excreción de arsénico vía bilis no contribuye significativamente a su excreción total (Menzel y cols., 1994).

Se ha considerado que las especies de arsénico trivalente presentan mayor fijación tisular, por lo que comparativamente, las especies pentavalentes (inorgánicas y metiladas) se excretan más rápidamente por el riñón.

La acumulación de arsénico en pelo y uñas ha sido considerada una forma de eliminación. La principal vía de excreción es a través del riñón donde una parte (2 al 20%) del arsénico inorgánico absorbido es excretado en la orina sin metilar y el resto se excreta en forma metilada, siendo la dimetilada la forma predominante.

4. MECANISMO DE TOXICIDAD

El mecanismo más importante que se postula para explicar la toxicidad de los compuestos arsenicales trivalentes es a través de su afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Las enzimas son particularmente afectadas si el grupo sulfhidrilo (-SH) está ubicado en un sitio crítico para su actividad (Jha y cols. 1992).

5. TOXICIDAD DEL ARSÉNICO

5.1 Toxicidad aguda del arsénico

El daño agudo involucra sangre, corazón, cerebro, riñón y tracto gastrointestinal. Una ingestión aguda puede causar tanto trastornos agudos como crónicos. En humanos, en caso de exposición aguda, las molestias son principalmente gastrointestinales y se presentan una hora después de haberlo ingerido; si previamente se habían ingerido alimentos las molestias gastrointestinales se presentarán hasta 12 horas después de la ingestión. El individuo se queja de calambres intensos en músculo estriado y sed intensa. Al perderse líquido aparecen síntomas de choque. En fase terminal surgen a veces convulsiones hipóxicas con coma y muerte. Algunos casos reportan daño a cerebro (Goodman y Gilman 1996).

Se ha observado que el efecto de la exposición aguda a arsénico en ratones causa una disminución importante en la respiración tisular hepática.

En ratones expuestos a 50 ppm de arsénico trivalente en el agua de bebida, se observaron cambios estructurales en los hepatocitos, mismos que consistían en una invaginación de la membrana nuclear, engrosamiento de la superficie mitocondrial y pérdida de glucógeno; como cambios tardíos la presencia de estructuras laminares densas en los peroxisomas (Mohelska y cols. 1980).

La solubilidad de los compuestos de As(di) (arsénico inorgánico) también tiene una gran relación con la toxicidad por vía oral, ya que, por ejemplo el arsenito de sodio que es más hidrosoluble que el trióxido de As, es aproximadamente 10 veces más tóxico (Tabla 1)

Debido a su ubicuidad en el ambiente, estamos continuamente en contacto con él ya sea en el agua de bebida, en alimentos de origen marino; en herbicidas y plaguicidas o por su uso en la industria.

Tabla .1 Comparación de la toxicidad de compuestos arsenicales en roedores.

| COMPUESTO | DL ₅₀ (mg/kg.) | ANIMAL/VÍA |
|---|---------------------------|-----------------------------------|
| Trióxido de As (As ³⁺) | 34.5 | ratón/oral ^a |
| Arsenito de Sodio (As ³⁺) | 4.5 | rata/intraperitoneal ^b |
| Arseniato de sodio (As ⁵⁺) | 14-18 | rata/intraperitoneal ^b |
| Ácido monometilarsonico (As ⁵⁺) | 1.800 | ratón/oral ^c |
| Ácido dimetilarsínico (As ⁵⁺) | 1.200 | ratón/oral ^c |
| Arsenobetaina (As ⁵⁺) | 10.000 | ratón/oral ^a |
| Oxido de trimetilarsina (As ⁵⁺) | 10.600 | ratón/oral ^c |

^a Kaise y cols. 1985; ^b Franke y Moxon, 1936; ^c Kaise y cols. 1989

El valor límite al que se observan efectos adversos (LOAEL) para la exposición aguda a As por vía oral en seres humanos es de 8 mgAs/Kg/día (ATSDR, 1993). Un hecho a destacar es que comparado con los animales, los seres humanos somos más sensibles a los efectos tóxicos del As ya que la dosis 1-3 mg/Kg. causa la muerte (ATSDR, 1993).

5.2 Toxicidad crónica

Los efectos de la exposición crónica a compuestos de As dependen de la dosis y de la vía de exposición y presentan un amplio espectro de toxicidad. Se han descrito efectos adversos en varios órganos y sistemas entre los que destacan, la piel, el sistema cardiovascular, el sistema inmune, así como efectos genotóxicos y carcinogénicos.

Puesto que los efectos genotóxicos y de propensión al cáncer han sido extensamente estudiados, en este estudio nos enfocaremos a explorar a aquellas moléculas en las cuales el arsénico podría modificar su papel fisiológico, alterando la función de órganos que son claves para su detoxificación y eliminación, con principal interés en el hígado y el riñón.

6. DAÑOS TISULARES Y CELULARES POR ARSÉNICO

6.1 Hígado

Los seres humanos en su vida y ambiente de trabajo ingieren, inhalan y absorben una gran cantidad de sustancias que pueden afectar al organismo y desencadenar daño a los tejidos a través de numerosos mecanismos. El hígado que es el sitio primario para la biotransformación de componentes propios y extraños, es particularmente vulnerable. Muchos compuestos ingeridos son detoxificados y eliminados por el hígado principalmente como conjugados, algunos actúan directamente, mientras otros son bioactivados a compuestos intermedios que pueden ser tóxicos y producir daño hepático y otros padecimientos y en el largo plazo, cáncer (Hodgson y Levi, 1994).

En otras palabras el hígado, como órgano responsable del metabolismo de xenobióticos, es particularmente susceptible a daño por drogas y toxinas.

Está estratégicamente localizado entre el tracto gastrointestinal y la circulación general. El tejido hepático está formado por numerosos lobulillos, a su vez constituidos por células hepáticas. Entre ellos hay nervios, conductos biliares, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. El hígado recibe sangre de dos fuentes, del sistema porta, sangre venosa desde el intestino y desde la arteria hepática, sangre arterial. La vena porta entra al hígado y se ramifica entre los lobulillos, penetrando hasta el centro de ellos en forma de vasos capilares que tienen paredes incompletas, lo que permite que la sangre se ponga en contacto con el tejido hepático. La arteria hepática también penetra al hígado y se ramifica en vasos capilares entre los lobulillos.

Los hepatocitos tienen microvellosidades que incrementan el área superficial para absorber materiales desde el plasma.

El hígado mantiene la concentración normal de azúcar en la sangre por almacenamiento de glucógeno y / o la liberación de glucosa. Además sintetiza numerosas proteínas y otros compuestos vitales del plasma. De esta manera el daño hepático o la interferencia con sus funciones vitales puede ser perjudicial, incluso letal para el organismo.

6.1.1 Daño hepático inducido por arsénico

Los arsenicales orgánicos e inorgánicos que son particularmente tóxicos al hígado están obsoletos y discontinuados en los Estados Unidos como resultado de regulaciones gubernamentales. Sin embargo los plaguicidas arsenicales continúan ampliamente distribuidos y en uso en algunos países. (Reigart y Roberts, 1999). En lo referente a los efectos hepáticos por exposición crónica al arsénico, se sabe que este se acumula en el hígado (Styblo y cols, 1999) Los trastornos asociados a este tipo de exposición son: fibrosis, cirrosis, hipertensión portal, angiosarcoma y daño por oclusión de las venas. Aunque no han sido muy documentados, es posible que el daño se presente al nivel del endotelio vascular más que por acción directa sobre el hepatocito.

Los hepatocitos se ocupan de diversas reacciones de transformación y conjugación de extraordinaria importancia para la detoxificación de algunos compuestos endógenos y exógenos nocivos para el organismo. Muchos de los fármacos liposolubles recetados, hasta plaguicidas y otras sustancias tóxicas al organismo son metabolizadas y detoxificadas por los hepatocitos.

El hígado posee diferentes formas de eliminar xenobióticos del organismo. Estas reacciones se dividen en dos grupos denominados de Fase I y de Fase II. Las reacciones de Fase I consisten en reacciones que hacen más polar a la molécula para su eliminación del organismo tal como la oxidación, reducción o hidrólisis. Las reacciones de fase II modifican a las moléculas por reacciones de conjugación que hace a los compuestos más excretables y en ocasiones menos tóxicos. (Albores y cols,1992).

6.1.2 Daño Renal inducido por Arsénico

El riñón es uno de los principales órganos que acumulan arsénico y representan la principal vía de excreción para las especies metiladas y para el arsénico inorgánico (Asi). Aunque no se ha considerado como órgano blanco de toxicidad, existen reportes que muestran niveles elevados de creatinina sérica (Hugues y Thompson, 1996) y una discreta proteinuria (Armstrong y cols. 1984).

La mitocondria renal parece ser el organelo más dañado por la exposición al arsénico. Brown y cols (1976) y Mahaffey y cols (1981) han descrito cambios estructurales en las células de los tubulos contorneados proximales de ratas expuestas a As^{+5} , caracterizados por hinchazón de mitocondrias y un incremento de inclusiones citoplasmáticas, posiblemente resultado de una inhibición "directa" de la respiración mitocondrial *in situ* y de la actividad enzimática.

7. CITOQUERATINAS [CK]

En el citoplasma de las células animales existe un andamiaje compuesto de microfilamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Los filamentos intermedios (IF) son llamados así a causa de que su diámetro de 10 ηm , es intermedio entre los microfilamentos (6 nanómetros) y microtúbulos (23 nanómetros) y están ensamblados en una red anastomosada dentro del citoplasma (Fuchs y Cleveland, 1998).

Las proteínas de los filamentos intermedios son uno de los tres grupos de proteínas del citoesqueleto que también incluyen a los microfilamentos y los microtúbulos (Fuchs y Weber, 1994. , Ku y Omary , 1997., Steinert y Roop, 1988). Junto con los microfilamentos de actina y microtúbulos, los microfilamentos de queratina forman el citoesqueleto de las células epiteliales de los vertebrados (Fuchs, 1995) .

Los filamentos intermedios se clasificaran en 6 distintos tipos en virtud de sus diferentes secuencias de aminoácidos (Steinert y Roop, 1988). Las queratinas se componen de tipos I y II, los IF de desmina, vimentina, GFAP, y periferina son el tipo III, los neurofilamentos el tipo IV, las láminas nucleares el tipo V, la nestina ha sido clasificada como tipo VI. Las citoqueratinas son expresadas en células epiteliales, mientras que la vimentina en tejidos derivados del mesénquima, la desmina en músculo, la proteína ácida fibrilar glial en células gliales, los neurofilamentos en neuronas y las lamininas en el núcleo (Zehner, 1991) (Tabla.2)

Una comparación de los tres mayores grupos de proteínas del citoesqueleto demuestra varias características únicas que distinguen a las proteínas de los IF: Tienen miembros nucleares (p.ej lamininas) y muchos miembros citoplasmáticos, los miembros del citoplasma parecen ser expresados solo en eucariontes superiores de una manera tejido-preferencial (Fuchs, 1995) .

Tabla.2 Clasificación de los tipos de proteínas que conforman los filamentos intermedios
 Tomado de Brown, 1995; Ohara, 1993

| Clase | Secuencia de identidad | Peso molecular | Tipo celular |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--|
| Tipo I | Queratinas ácidas | 40-64 | epitelio |
| Tipo II | Queratinas básicas | 52-68 | epitelio |
| Tipo III Tipo IV Tipo VI | Desmina | 53 | músculo astroglia |
| | GFAP | 51 | neuronal |
| | Peripherina | 54 | células en cultivo de tejido mesenquimal |
| | Vimentina | 55 | |
| | a-Internexina | 66 | neuronal inmaduro |
| | b-Internexina | 70 | |
| | NF-L | 68 | neuronal |
| | NF-M | 110 | neuronal |
| | NF-H | 130 | neuronal |
| Nestina | 240 | neuronal CNS células madre | |
| Tipo V | Lámina A | 70 | muchos |
| | Lámina B | 64 | muchos |
| | Lámina C | 58 | muchos |
| Sin clasificar | Septinas A,B,C | 50-60 | nucleadas |
| | IFPs | | cristalinos |
| | Filensina | 100 | cristalinos |
| | Faquinina No- α -IFA | variable | invertebrados |

Entre las diversas familias de proteínas que conforman los IF, el subgrupo de las citoqueratinas (CK) consiste en aproximadamente 20 diferentes oligopéptidos en tejidos humanos y bovinos. Una complejidad similar ha sido reportada para tejidos murinos. Esta familia está altamente expresada en células epiteliales (Moll y cols. 1982). Aparte de las citoqueratinas "duras" que se encuentran en los apéndices epidermales (p.ej., pelo y uñas), las queratinas (K) "suaves" consisten de más de 20 miembros que están divididos relativamente en tipo II básico (K1-K18) y tipo I ácido (K9-K20) (Moll y cols. 1982).

Todas las células epiteliales expresan al menos una queratina de tipo I y II que se asocian no covalentemente para formar conjuntos de filamentos extendidos. En general las células epiteliales expresan un par único de queratina dominante dependiendo del tipo celular del epitelio. Por ejemplo, el epitelio glandular expresa K8 y K18 (con niveles variables de K19 y K20) mientras los queratinocitos expresan K5/K14 basalmente y K1/K10 suprabasalmente (Tabla.3) (fig.6).

Tabla.3 Distribución tejido-específico de citoqueratinas (CK)

| | | |
|----|------------------------------|--------------------------|
| A. | Queratinas | |
| | Tipo I (ácidas) | Queratinas 9-20 (K9-K20) |
| | Tipo II (básicas) | Queratinas 1-8 (K1-K8) |
| B. | Distribución tisular | |
| | Epitelio simple ^a | K8, K18, K 19, K20 |
| | Queratinocitos Básales | K5, K14 |
| | Queratinocitos Suprabasales | K1, K10 |
| | Epitelio Esofageal | K4, K13 |
| | Epitelio Corneal | K3, K12 |
| | Piel herida-sanando | K6, K16 |

^a Ejemplos incluyen células en el tracto gastrointestinal hígado, páncreas exocrina y glándulas salivales

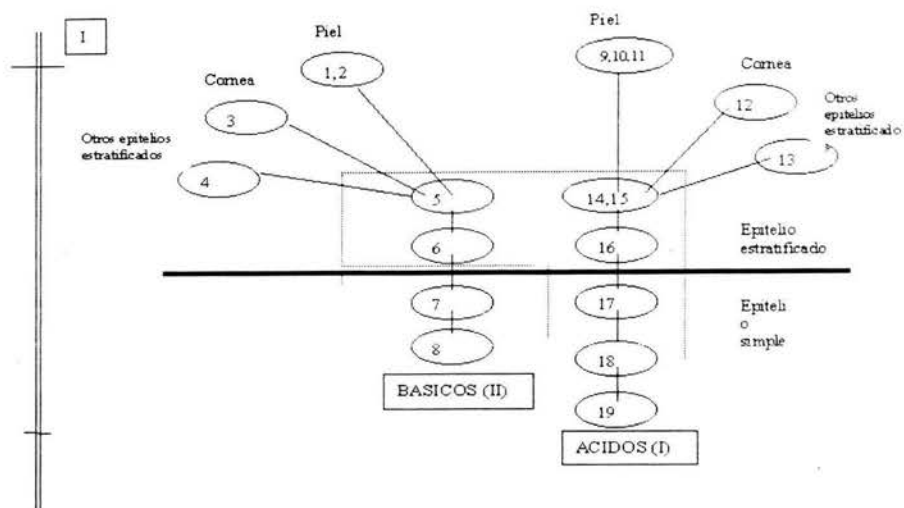


Fig.6 Esquema de Moll . Muestra la localización de los tejidos en los que se sintetizan y expresan los dímeros de citoqueratinas tipo I y II .

La queratina 18 (K18) es una proteína cuya expresión se restringe a capas epiteliales simples o "sencillas" incluyendo intestino, pulmón, hígado, pecho y útero, no es encontrada usualmente en músculo esquelético, cardíaco o tejidos linfoides tales como el bazo. (Abe, 1990, Moll, 1982).

Una función clara de las queratinas es proveer integridad mecánica a las células incluyendo aquellas en epidermis (Fuchs y Cleveland, 1998), córnea (Irvine y cols, 1997) e hígado (Omary y Ku, 1997).

Todas las proteínas de IF tienen una estructura prototipo consistente de una α -hélice central súper enrollada (310-350 aminoácidos) que está rodeada por una cabeza NH_2 -terminal globular y un dominio de cola COOH -terminal de longitud variable (Fuchs y Weber, 1994, Ku y Omary, 1997, Steinert y Roop, 1988)(fig.7 y 8).

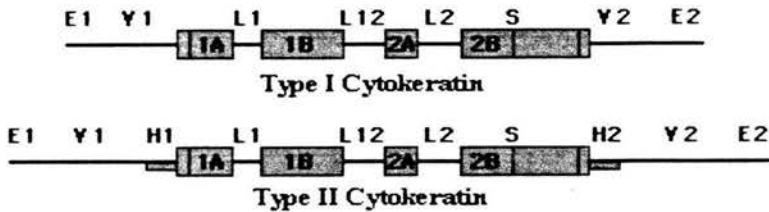


Fig.7 Organización estructural de los filamentos de citoqueratinas.

Tomado de Fuchs, 1994; Klymkowsky, 1995

Presentación esquemática de la organización estructural de los filamentos de citoqueratinas tipo I y II. Las áreas sombreadas corresponden a la porción hélice de la molécula, unidas junto por segmentos L. Los segmentos E y Y representan los extremos y las regiones variables. El segmento H corresponde a las regiones homologas. La porción discontinua esta indicada por una S en la porción 2B.

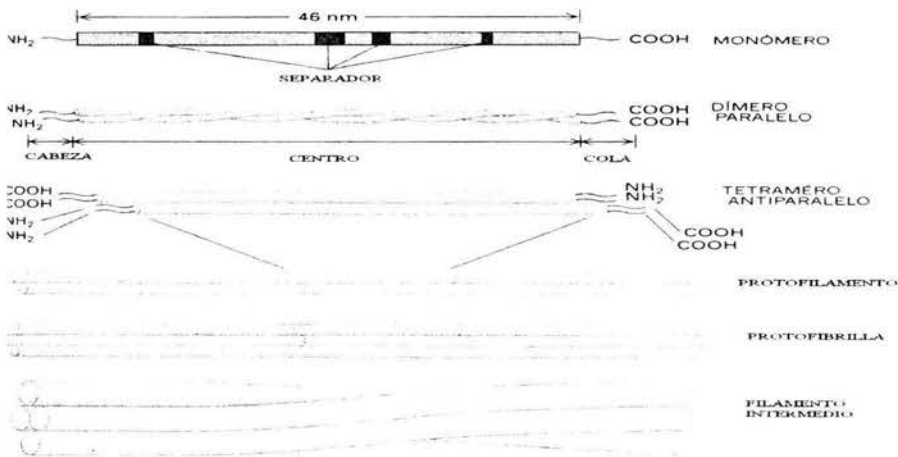


Fig.8 Niveles de organización y ensamblaje de los filamentos intermedios.

Tomado de Molecular Cell Biology, 4ª Ed., 2000)

Las proteínas de los filamentos intermedios forman homo o heterodímeros paralelos con un dominio nuclear super enrollado altamente conservado y cabezas y colas no hélices, los cuales son variables en longitud y secuencia. El dominio central nuclear contiene tres elementos espaciadores no hélices. Un tetrámero es formado por una agregación lado a lado antiparalela de dos dímeros idénticos. Los tetrámeros juntos por sus extremos, forman un protofilamento; los pares de protofilamentos se asocian entonces lateralmente en una protofibrilla. La asociación lateral de cuatro protofibrillas forma un filamento cilíndrico de 10 nm de grosor.

El dominio extremo globular provee mucha de la heterogeneidad estructural de las proteínas de las IF y todas contienen sitios de fosforilación de la citoqueratinas. Dentro de los dominios estructuralmente heterogéneos de cabeza y cola se sugiere que alguna modificación en estos dominios puede jugar un papel regulador en una función tejido-específica de aquellas proteínas (Ku y cols, 1998)

El término "citoqueratina" intenta distinguir las proteínas intracelulares "tipo-queratina" de las queratinas duras del pelo y uñas presentes en el exterior de las células. En la base de datos OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) aquellas proteínas de los filamentos intermedios son listadas como queratinas (K) y la abreviación KRT ha sido escogida por el comité de nomenclatura de la Organización del Genoma Humano (HUGO) para designar los genes correspondientes (Rogers y Powell, 1993)

7.1 Biología molecular de las citoqueratinas.

Las queratinas ácidas son codificadas por los genes KRT9 a KRT19. Estos genes están localizados en el cromosoma humano 17, excepto por KRT18 el cual puede estar localizado en el cromosoma humano 12. Las queratinas básicas son codificadas por genes KRT1 a KRT8, y están localizados en el cromosoma 12.

La comparación de la distribución intrón/exón revela una organización génica muy similar dentro de cada familia de queratina, pero hay una diferencia marcada entre las dos familias: los genes tipo I contienen ocho exones separados por siete intrones y los genes tipos II poseen nueve exones y ocho intrones. (Fig.9) (Rieger y Franke, 1998).

Con respecto a la regulación de la expresión de los genes de las citoqueratinas se han localizado hasta la fecha varios factores reguladores, que difieren en la medida del tipo celular y el sitio de expresión de una CK o de varias en particular.

En el caso de queratinocitos, se ha demostrado la presencia de elementos regulatorios candidatos con sus correspondientes factores *trans*. En este caso se ha descubierto un potenciador celular específico en la región río arriba del gen K6 bovino y el gen humano K14 ambos expresados en epitelios estratificados (Blessing y cols, 1989).

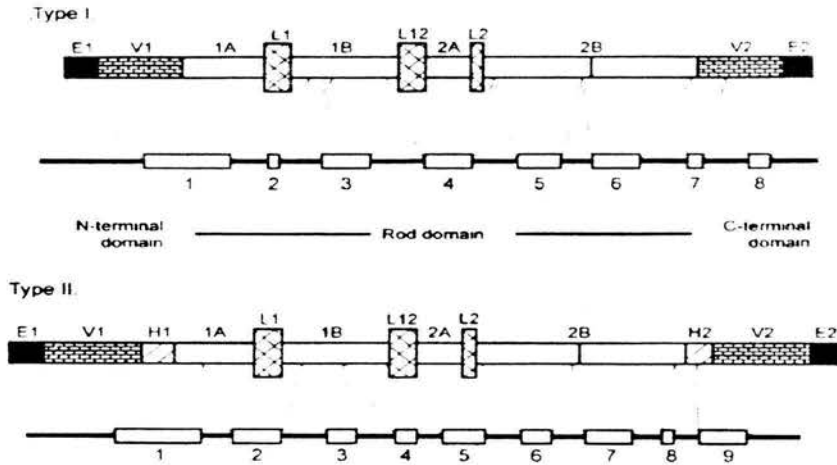


Fig.9 Organización intron/exon de los genes de queratinas humanas.

Los subdominios de ambos tipos de queratinas (Steinert y Roop, 1988) están indicados arriba y la distribución de exones (cajas) e intrones (líneas) están alineados abajo.

Otro factor de transcripción conocido, importante para la regulación del gen de la CK 14 humana, es el factor nombrado KER1 (Leask y cols, 1990) el cual se une a una secuencia palindrómica de 10 pb, este último ha sido identificado como el factor de transcripción AP2 (Leask y cols, 1990). El elemento identificado como AP2 que se une a ADN y a un elemento distal actúan sinérgicamente en dirigir la expresión del gen de la CK14 humana en células epidermales *in vitro* y ratones transgénicos *in vivo* (Leask y cols, 1990). Algunas regiones en el gen que codifica para K18 han sido implicadas en su regulación, se ha caracterizado un promotor proximal de 250 pares de bases el cual utiliza una caja TATA para una iniciación precisa y múltiple. (Kulesh y Oshima, 1988, Gunther y cols, 1995). Se sabe que el primer intrón contiene un elemento potenciador de 100 pares de bases el cual tiene unos sitios de unión a los factores de transcripción AP-1 y ETS (Oshima y cols, 1990) y media la expresión incrementada por la vía de transducción de señal MAPK Ras-mitogénico. (Pankov y cols, 1994).

7.2 Función de CK 8/18 en varios procesos celulares.

Caulín y Cols (1997) observaron que en el proceso de apoptosis K18 reorganiza los filamentos intermedios (IFs) en estructuras granulares enriquecidas por K18 fosforilada en la serina 53. Durante la apoptosis inducida por agentes químicos y luz U.V se observó la generación de un fragmento proteolítico que co-migraba con la K18 rota, el mencionado fragmento era producido por las caspasas 6, 3 y 7. El sitio de ruptura común para las tres caspasas fue la secuencia VEVD/A, localizada en la región vinculadora conservada L1-2 de K18.

Bauman y cols en 1994, menciona que la expresión de citoqueratinas, principalmente del tipo K8 y K18, profiere resistencia a algunas drogas quimioterapéuticas. Demostraron *in vitro* que las células expresando K18 y K8 resisten mecánicamente a drogas no relacionadas entre si, como mitoxantrona, doxorubicina, metotrexato, melfalan, vincristina y colcemida. El grado más alto de resistencia fue hacia las drogas antitubulina, colcemida y vincristina. Se ha vinculado la relación entre los filamentos intermedios y redes de microtúbulos, para explicar cómo el colapso químico de los microtúbulos y microfilamentos colapsan los filamentos intermedios (Knapp y cols, 1983). Puede ser que la introducción de una red de citoesqueleto adicional en la célula establezca la red de microtúbulos e inhiba la despolimerización por vincristina y colcemida.

7.3 Cambios Post-traduccionales en CK

Otro factor que modifica la expresión e inducción de citoqueratinas son las modificaciones post-traduccionales, los cuales son importantes desde el punto de vista regulatorio, mecanístico y funcional. En términos de regulación, la fosforilación de las queratinas y la glicosilación son modificaciones dinámicas (Chou y cols, 1992., Liao y cols, 1995a). Aquellas se presentan en los dominios que son responsables para la heterogeneidad y de aquí la expresión tejido específico entre las diferentes queratinas. Estas dos modificaciones juegan al menos un papel en la modulación de las queratinas la cual probablemente incluye la localización intracelular y la interacción con otras proteínas plasmáticas.

Un caso particular es la fosforilación de CK18 en las serinas por varias cinasas *in vitro*. *In vivo* el mayor sitio de fosforilación está en la serina 53 (Ku y Omary, 1994). La fosforilación de CK18 en la serina 53 ha sido implicada en un incremento de la solubilidad y polimerización alterada (Ku y Omary, 1994), la localización diferencial dentro de los hepatocitos (Liao y cols, 1995a), asociación con proteínas de la familia 14-3-3 (Liao y Omary, 1996) y con el estrés celular (Ku y cols, 1996).

7.4 ¿ El arsénico puede inducir CK?

Estudios anteriores han demostrado que el arsénico puede inducir la expresión de CK *in vitro*, así lo demostró Ramirez y cols. (2000) al descubrir que proteínas acomplejadas a DNA eran CK con masas moleculares de ~ 46, 48, 50 y 54 kDa, Una de estas CK fue la CK 18 la cual fue identificada por Inmunoréplica de las proteínas aisladas de DPCs (DNA-protein cross-linking) se observó que la cantidad de CK 18 aumentaba con la dosis, siendo 45% más alta que los controles.

Se sabe que el As⁺³ induce la expresión de muchas proteínas de estrés y factores de crecimiento (Germolec y cols. 1996 y Kachinskas y cols 1997), por lo que la alta cantidad de CK 18 podría explicarse por un mecanismo similar en la expresión de CK. A su vez la síntesis de CK esta sensiblemente correlacionada con los programas de diferenciación de varios tipos de células epiteliales, entre ellas las células hepáticas (Fuchs ,1996), por lo tanto el arsénico no solo podría dañar el DNA sino también modificar los patrones en tejidos donde este se acumula (Clewel y cols. 1999). Es por esto que este estudio pretende encontrar esta relación de dosis de arsénico con la expresión de CK en un modelo *in vivo*, para saber si el As es capaz de producir este tipo de daño a pesar de los mecanismos detoxificantes que presentan las células eucariontes en un organismo complejo.

8. WESTERN BLOTTING

Las inmunoréplicas (también llamados *western blotting* o *immunoblotting*) se utilizan para identificar y hacer una determinación semicuantitativa de proteínas. Es un método relativamente sencillo, y preciso que permite obtener información acerca de la cantidad de proteína presente en una muestra, con la ventaja de que permite analizar cantidades muy pequeñas de tejido. El *western blot* es una técnica relativamente simple la cual puede llevarse a cabo en laboratorios con escaso equipo, pero con los aparatos y reactivos correctos. Excepto por la necesidad de contar con los anticuerpos específicos para la(s) proteína(s) que interesa identificar, en cada experimento individual, el equipo y reactivos necesarios son accesibles y disponible en casi todos los laboratorios de bioquímica y biología molecular.

Su facilidad, precisión y resultados fácilmente observables han hecho su uso indispensable en casi todos los campos orientados a lo biológico. El *western blotting* es usado en las ciencias animales y en el campo de las ciencias alimenticias demostrando la presencia y cantidad de proteínas blanco en los animales y plantas estudiados. En inmunología y microbiología es usado para demostrar que un anticuerpo se une a una proteína en el organismo estudiado. En bioquímica y biología molecular es usado para visualizar proteínas desarrolladas a partir de técnicas moleculares y descubrir nuevas proteínas presentes en organismos vegetales y animales (Stryer, 1994)

8.1¿Cómo se hace?

Las inmunoréplicas, son usadas para identificar antígenos específicos reconocidos por anticuerpos policlonales o monoclonales. Las muestras de proteínas son solubilizadas usualmente con sodio dodecil sulfato (SDS) y agentes reductores tales como el ditioneitol (DIT) o 2-mercaptoetanol (2-ME). Siguiendo a la solubilización el material es separado en un gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE). Los antígenos son electroforéticamente separados y transferidos a membranas de nitrocelulosa, PVDF o nylon. Este proceso puede ser monitoreado por tinción reversible o por "Poncea S", los gels previamente preteñidos también pueden ser transferidos.

Las proteínas transferidas son unidas a la superficie de las membranas, permitiendo el acceso para la reacción con reactivos de inmunodetección. Todos los sitios de unión remanente son bloqueados sumergiendo las membranas en una solución que contiene un agente detergente bloqueante. Después se sondea con un anticuerpo primario, la membrana es lavada y el complejo antígeno-anticuerpo son identificados con

peroxidasa de rábano (HRPO) o enzimas fosfatasa alcalina acoplada con un anticuerpo anti-IgG secundario (p.ej anti-IgG de conejo huésped cabra).

Las enzimas son unidas directamente o vía un puente avidina-biotina al anticuerpo secundario. Substratos luminiscentes o cromogénicos son usados entonces para visualizar la actividad (Ausebel y cols, 2000).

Muchos protocolos de *western blot* pueden ser divididos en 6 pasos:

1. Preparación del antígeno.
2. Electroforesis (Fig.10)
3. Transferencia de proteínas a membrana (Fig.11).
4. Bloqueo de sitios de unión no específicos en la membrana.
5. Adición de anticuerpo.
6. Detección enzimática o radioactiva.

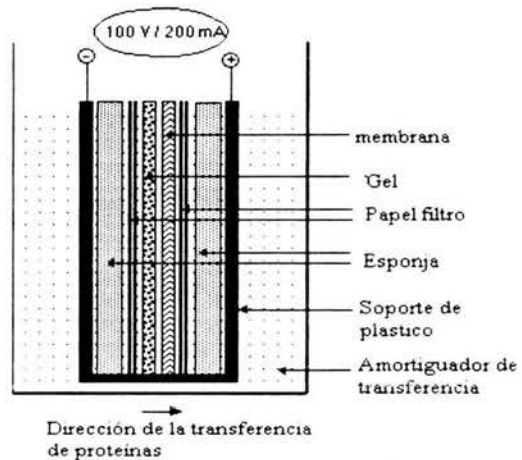
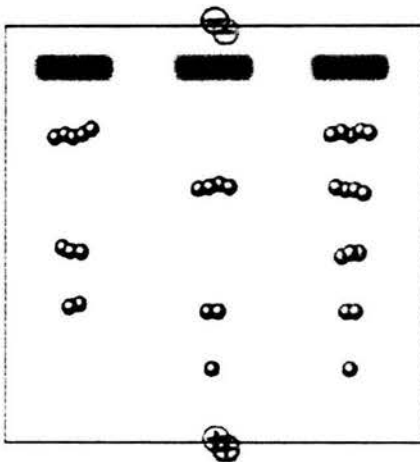


Fig.10 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE **Fig.11** Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa, nylon o PVDF. (Tomado de Lodish y cols CD-ROM Molecular Cell Biology 4.0 © 1996 Freeman y Co. y Info.)

9. HIPÓTESIS

La ingestión de NaAsO_2 durante 20 días modificará la expresión de citoqueratinas en homogenizados de hígado, pulmón, riñón y vejiga de ratón de una manera dosis dependiente.

10. OBJETIVOS

10.1 General

- Establecer una relación dosis-efecto entre la exposición crónica del arsénico y la expresión de citoqueratinas en tejidos y órganos de ratón donde se acumula el metaloide .

10.2 Particulares

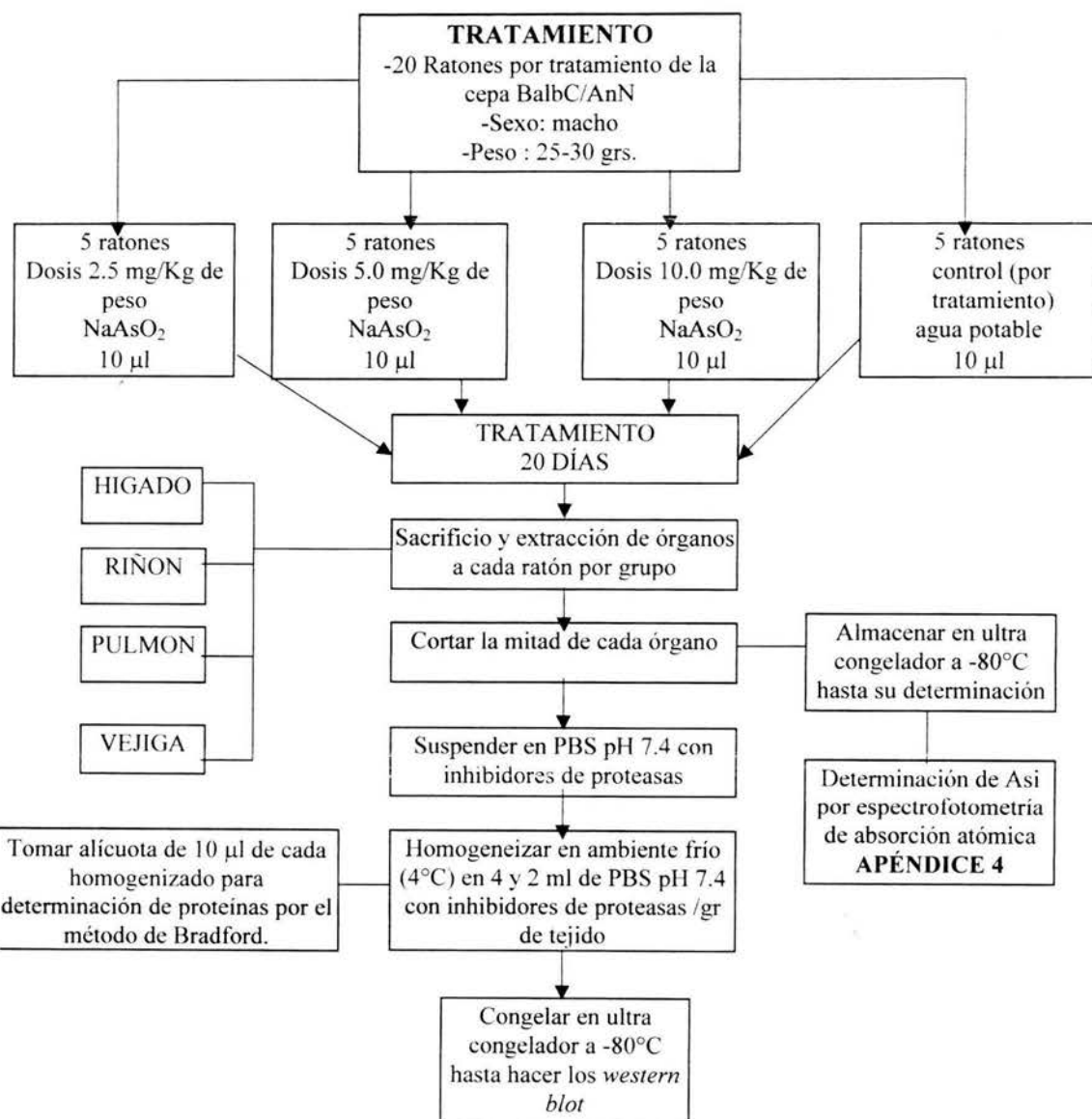
- Evaluar la presencia y cantidad de citoqueratinas en el hígado, pulmón, riñón y vejiga de ratones de la cepa BalbC/AnN mediante la utilización de inmunoréplicas.
- Estimar la cantidad de arsénico presente en los órganos en donde se demuestre un aumento de CK y correlacionar su presencia con la dosis de exposición estableciendo un patrón de acumulación evaluado al final del tratamiento.

11. METODOLOGÍA

Se hicieron lotes de 5 ratones a cada uno se les administró por vía oral, un volumen de 10 μ l de soluciones crecientes de arsenito de sodio: 2.5 mg/Kg, 5.0 mg/Kg y 10 mg/Kg de peso. La administración se hizo diariamente, durante las mañanas. Simultáneamente, al grupo control se les administraron 10 μ l de agua por vía oral en condiciones idénticas a los tratados. A todos los ratones se les registró el peso diariamente. Después de 20 días de tratamiento los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se les extrajo el hígado, los pulmones, los riñones y la vejiga. Cada órgano se colocó en una caja de Petri inmersa en hielo con amortiguador de fosfatos salinos (PBS) pH 7.4 en frío. Una porción de los órganos se congeló para posteriormente usarse para determinar la concentración de As presente. Los órganos extraídos fueron homogeneizados manualmente en 4 ml y 2 ml de amortiguador PBS pH 7.4 con inhibidores de proteasas (Sigma Cat P 8340) y se mezclaron perfectamente. Los tubos se mantuvieron siempre en hielo y se almacenaron a -70 °C, para su procesamiento posterior.

Se realizaron electroforesis SDS-PAGE (10%) para cada órgano correspondiente corriéndose simultáneamente los grupos controles y tratados y se procedió a realizar inmunoréplicas, después se cuantificó la intensidad de las bandas visualizadas en las membranas usando un equipo analizador de imágenes Fluor-S (BioRad) y el software Quantify One para PC windows 95/98/2000. Se tomó como parámetro de medición los resultados expresados en volumen por densidades ópticas (DO) por milímetro cuadrado.

11.1 Diagrama de metodología



WESTERN BLOTTING

(según método de Laemmli)

Cargar cada carril con 100µg de proteína por cada órgano

Carriles
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
- PM - C T C T C T -
C = CONTROL
T = TRATADO

Correr 90 minutos a 100 V. al pasar el gel concentrador aumentar a 120 volts

Teñir geles con azul de Coomassie por 2 hr. y desteñir toda la noche

*ELECTROFORESIS
SDS-PAGE 10%*
(Apéndice 1)

*TRANSFERENCIA
DE PROTEÍNAS*
(Apéndice 2)

BLOQUEO DE
MEMBRANAS

ANTICUERPOS

REVELADO

ANÁLISIS DE
RESULTADOS

Preparar sándwich transferir a 100 V 90 min. en frío y con agitación

Después del bloqueo lavar por 15.10 y 5min con TBS y TBS -Tween (0.1%).
Adicionar α -anti-pancitoqueratina.
Lavar por 15.10 y 5min con TBS y TBS -Tween (0.1%).
Adicionar anticuerpo secundario α -IgG de ratón acoplado a peroxidasa

- Revelado por Diaminobencemida (10 mg DAB en 20 ml de PBS pH 7.4 mas 2µl de peroxido de hidrógeno. Inactivar con agua destilada.

-Identificación y cuantificación de bandas detectadas en western blot medidas en Vol. /D.O /mm²
APÉNDICE 3

12. TRATAMIENTO DE RESULTADOS

El análisis de los resultados fue efectuado comparando los valores de los volúmenes por densidades ópticas por milímetro cuadrado de las bandas analizadas en las membranas para el grupo control y tratado para cada tratamiento y órgano. Los datos se expresaron en porcentajes de los animales controles. Como para cada experimento hubo un grupo de ratones testigos, la variación en la densidad óptica entre los dos grupos se comparó mediante una prueba no paramétrica de Mann-Whitney, de dos colas, para datos no pareados, asumiendo que los datos no muestran una distribución gaussiana y utilizándose como el valor de significancia la $p \leq 0.05$. Para presentar los datos de una manera gráfica se realizó el cociente porcentual promedio de variación entre bandas controles (tomadas como el 100%) y bandas tratadas. Así mismo se realizó la correlación entre la cantidad de arsénico inorgánico y formas metiladas presentes en los órganos de ratón tratados que mostraran una diferencia significativa en el cociente de variación controles / tratados, la cual se estableció mediante la aplicación de un análisis de regresión lineal y correlación de Pearson.

13. MATERIAL

13.1 Recursos.

- Baño María (Presicion Serie 180)
- Campana de flujo vertical (Envirco corp.)
- Incubadora de CO₂ (Lab-line)
- Microscopio óptico (Olimpus CH30)
- Ultracongelador (REVCO)
- Centrifuga eppendorff (5415 C)
- Centrifuga para tubos falcon (International Equipment Company)
- Balanza analítica (OHAUS plus)
- Potenciómetro (Corning 430)
- Parrilla (Corning)
- Espectroscopio UV /visible (Pharmacia Biotech)

13.2 Reactivos.

Albúmina suero de bovino (BSA ,GIBCO), SDS (Bio-Rad laboratories Cat 161-0300), EDTA (Sigma ED4SS), cloruro de potasio KCl cristal (J.T Baker^R 3040-01), Arsenito de sodio (Sigma Cat S-7400), fosfato monobásico de potasio (J.T Baker^R 3818-01), fosfato dibásico de potasio (J.T Baker^R 3828-01), cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma Cat P 8340) cloruro de magnesio (MERCK Art. 5833), (J.T. Baker^R 3624-05), metanol, glicina, leche en polvo (*Sveltis*), acrilamida (BioRad), *Bis*-acrilamida (Bio Rad), persulfato de amonio (Bio Rad), azul brillante de Coomasie R-250 (Bio Rad), azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol, glicerol, Diaminobenzemida (DAB ,Sigma), peroxido de hidrogeno (Merck).

Reactivos.....

Anticuerpo anti-pancitoqueratina (Sigma),coctel de anticuerpos dirigidos a las siguientes citoqueratinas (CK): citoqueratina 1 (68 kD), citoqueratina 4 (59 kD), citoqueratina 5 (58 kD), citoqueratina 6 (56 kD), citoqueratina 8 (52 kD), citoqueratina 10 (56 kD), citoqueratina 13 (54 kD), citoqueratina 18 (45 kD) y citoqueratina 19 (40 kD).

Marcador de peso molecular (Gibco BRL BenchMark™ Protein Ladders) preteñido con los siguientes pesos 10, 15, 20, 30, 40, 60, 70, 90, 130 y 220 kDs

13.3 Soluciones.

Las preparación de las soluciones correspondientes para llevar a cabo la electroforesis en SDS-PAGE se pueden ver en el **APÉNDICE 1.1**.

Así mismo las soluciones utilizadas en la transferencia e inmunodetección en la técnica de *western blot* se pueden ver en el **APÉNDICE 2.1**

14. RESULTADOS

14.1 Inducción de CK en órganos de ratón

Los ratones recibieron durante 20 días diferentes dosis de arsenito de sodio vía oral. Al término del tratamiento se sacrificaron, con los homogenizados de los órganos se hicieron inmunorrélicas para citoqueratinas. En cada membrana se obtuvieron entre 3 y 4 bandas principales que fueron las que se cuantificaron. Estas bandas se ubicaban como proteínas con un peso molecular entre 30 y 68 kDa. La estimación semicuantitativa se realizó determinando la densidad óptica de cada banda, las que se expresaron como porcentajes de las bandas controles adyacentes en la membrana.

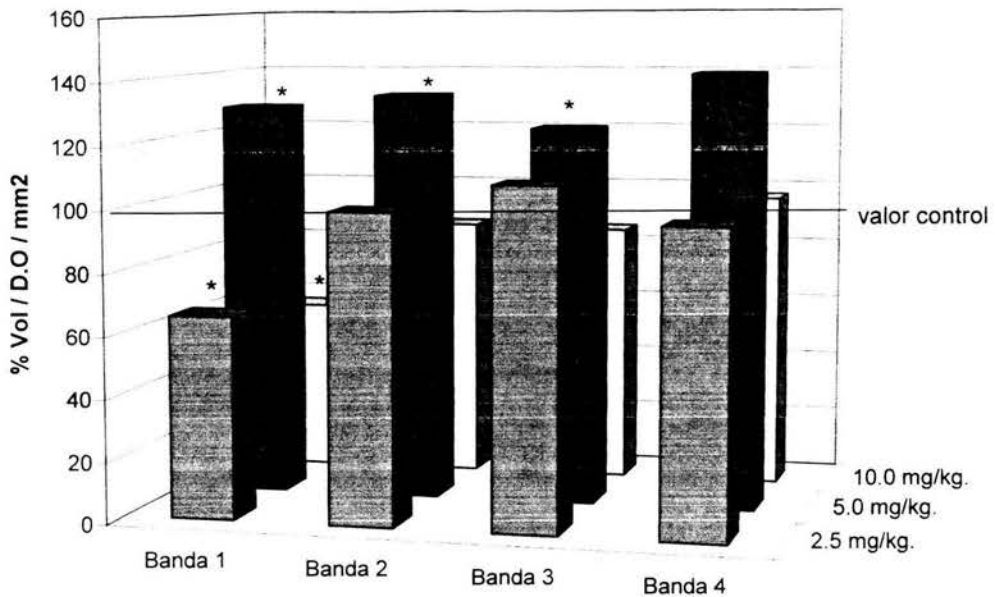
14.1.1 Muestras de hígado

Los resultados obtenidos de la cuantificación de las inmunorrélicas de hígado mostraron para la dosis de 2.5 mg/kg un total de cuatro bandas con un porcentaje de variación promedio para la banda 1 de 65% y de 99 % para la 2, ambas por debajo del valor control, por su parte en la banda 3 se vio un incremento del 8% con respecto al valor control, mientras que la banda 4 mostró una variación del 97%, con respecto al valor control. Una prueba Mann-Whitney mostró que las CK expresada en la banda 1 se inhibió significativamente. ($T = 40.000$ $t_{est} = 0.017$, $t_{esp} = 0.012$ $p = 0.008$).

En la dosis de 5.0 mg/kg, las bandas 1 y 2 mostraron un incremento de 29% y 33% mientras que las bandas 3 y 4, 22% y 40%, con respecto al valor control, la prueba de Mann-Whitney mostró diferencias significativas en la banda 1 ($T = 15.000$ $t_{est} = 0.012$, $t_{esp} = 0.008$ $p = 0.008$), 2 ($T = 15.000$ $t_{est} = 0.012$, $t_{esp} = 0.008$ $p = 0.008$) y 3 ($T = 15.000$ $t_{est} = 0.012$, $t_{esp} = 0.008$ $p = 0.008$) por lo que se podría tratar de una inducción de estas bandas, sin embargo la banda 4 aunque tuvo el valor porcentual más alto no mostró una diferencia estadísticamente significativa.

En la dosis de 10.0 mg/kg, las bandas 1 y 2 presentaron una variación de 56% y 86% respectivamente, mientras que las bandas 3 y 4 obtuvieron valores de 85% y 97%; todas por debajo del valor control. La prueba de Mann-Whitney mostró solo en la banda 1 una diferencia significativa ($T = 40.000$ $t_{est} = 0.012$, $t_{esp} = 0.008$ $p = 0.008$), como se ve esta banda tiene el porcentaje de variación más bajo, por lo que esta diferencia podría significar una inhibición (Grafica.1).

Grafica.1
Variación en la inducción de CK en hígados de ratón tratados con
arsenito de sodio



| | Banda 1 | Banda 2 | Banda 3 | Banda 4 |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ■ 2.5 mg/kg | 65.56740308 | 99.65234913 | 108.6038977 | 97.0307785 |
| ■ 5.0 mg/kg | 129.4006694 | 133.5013957 | 122.9912099 | 140.9137404 |
| □ 10.0 mg/kg | 56.35747858 | 86.33237532 | 85.3339533 | 97.03378187 |

En este órgano se puede observar tanto incremento como decremento en la variación de CK, siendo las dosis más afectada con una posible inducción la de 5.0 mg/kg, en tres de las CK visualizadas, mientras que en las dosis 2.5 y 10.0 mg/kg, se observó más bien una inhibición en la CK correspondiente a la banda 1.

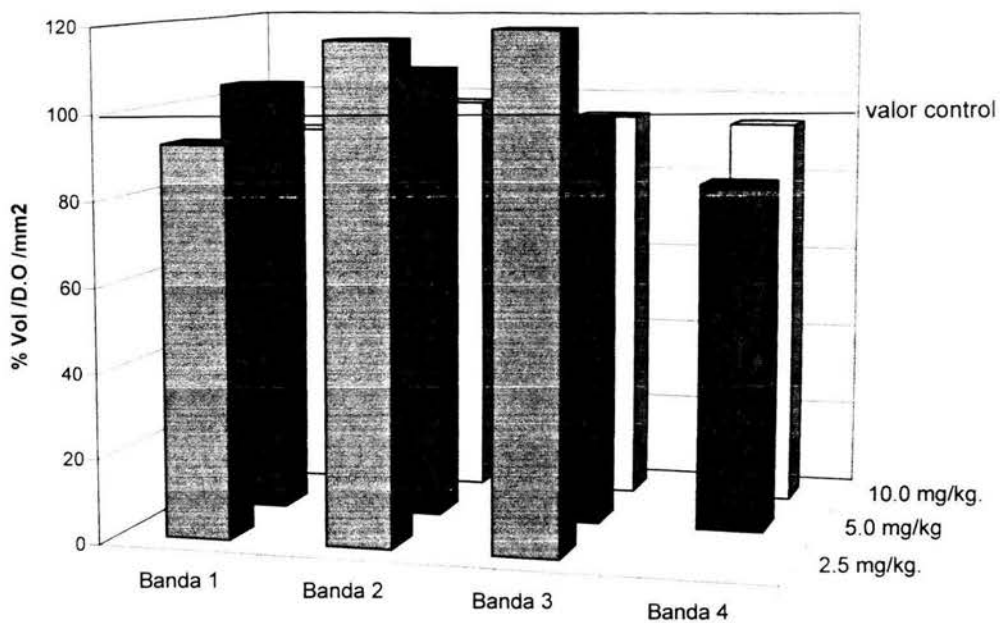
* $p \leq 0.05$

14.1.2 Muestras de riñones

En los riñones se cuantificaron 4 bandas para las dosis de 5.0 y 10.0 mg/kg. Para la dosis de 2.5 mg/Kg sólo se lograron identificar y cuantificar tres bandas. Para la dosis de 2.5 mg/kg las bandas 1, 2 y 3 mostraron un porcentaje de variación del 92% y un incremento del 16% y 19% respectivamente. Sin embargo las diferencias observadas no fueron significativas.

En la dosis de 5.0 mg/kg se visualizaron 4 bandas en las que se logró ver un leve incremento del 4% encima del valor control para la banda 1, la banda 2 mostró un aumento del 8% con respecto al valor control, la banda 3, 96% y la banda 4, 82% abajo del valor control. El aparente incremento en las bandas 1 y 2 no resultó ser estadísticamente significativo aunque en general para esta dosis no hubo diferencias significativas. En la dosis de 10.0 mg/kg, las bandas 1, 2, 3 y 4 obtuvieron valores de 90%, 98%, 95% y 93% respectivamente, todas por debajo del valor control, y a su vez no mostraron alguna diferencia significativa. Se concluye que para esta dosis no hubo cambios positivos hacia un posible inducción de CK. (Grafica.2)

Grafica.2
Variación en la inducción de CK en riñones de ratón tratados con
arsenito de sodio



| | Banda 1 | Banda 2 | Banda 3 | Banda 4 |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ■ 2.5 mg/kg. | 92.6970701 | 116.8663145 | 119.5391277 | |
| ■ 5.0 mg/kg | 104.3379301 | 108.2319528 | 96.74605503 | 82.04171128 |
| □ 10.0 mg/kg. | 90.7494386 | 98.03041247 | 95.06577998 | 93.47483882 |

En este órgano no se observó ni inducción ni inhibición de CK, en ninguna de las tres dosis, ya que los valores del porcentaje de variación no sobrepasaron el 20% respecto al control, por lo que la presencia de las CK no fue alterada por esta dosis de arsenito.

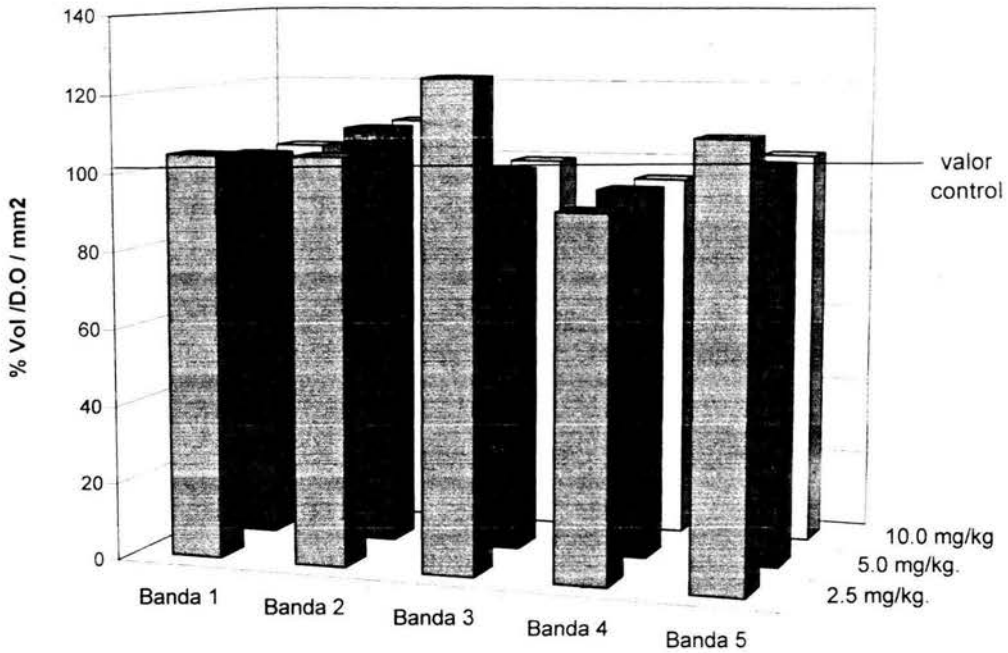
14.1.3 Muestras de pulmones

En los pulmones se cuantificaron un total de cinco bandas por membrana. En la dosis de 2.5 mg/kg se observó una variación del 4% por encima del control para las bandas 1 y 2. Mientras que la banda 3 tuvo un valor de 24% por encima del valor control. La banda 4 no sobrepasó el valor control (92%). En el caso de las bandas 3 y 5 se observó un ligero incremento de un 24% y 11% en promedio encima del valor control, sin embargo no fueron significativos.

En la dosis 5.0 mg/kg, las bandas 1, 2, 3, 4 y 5 obtuvieron valores de variación de 92%, 93%, 95% y 98% respectivamente ninguna de ellas sobrepasó el valor control, ni tuvo alguna diferencia estadística.

Para la dosis de 10.0 mg/kg de arsenito de sodio, también se cuantificaron cinco bandas cuyo porcentaje de variación para las bandas 1 y 2 fue de 2% y 9% por arriba del valor control y para las bandas 3 y 4 un porcentaje del 99% y 95% respectivamente, por debajo del valor control, mientras que la banda 5 mostró un ligero incremento del 11% con respecto al valor control. Aunque las bandas 1, 2 y 5 mostraron los valores de variación con una tendencia hacia el incremento acercándose y sobrepasando el valor control, no fueron estadísticamente significativas. (Grafica.3)

Grafica.3
Variación en la inducción de CK en pulmones de ratones tratados con
arsenito de sodio



| | Banda 1 | Banda 2 | Banda 3 | Banda 4 | Banda 5 |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ■ 2.5 mg/kg. | 104.6567493 | 104.8605517 | 124.9276406 | 92.6359433 | 111.2312194 |
| ■ 5.0 mg/kg. | 102.3747054 | 109.756492 | 99.35432307 | 95.07180547 | 102.1526721 |
| □ 10.0 mg/kg | 102.3747054 | 109.756492 | 99.35432307 | 95.07180547 | 102.1526721 |

En este órgano no se observó algún indicio de decremento o inducción en las bandas analizadas y sus porcentajes de variación no mostraron alguna diferencia con respecto al control, ya que sus valores están en el límite con el valor control. El escaso incremento que se observó en algunas bandas no bastó para ejercer una diferencia significativa.

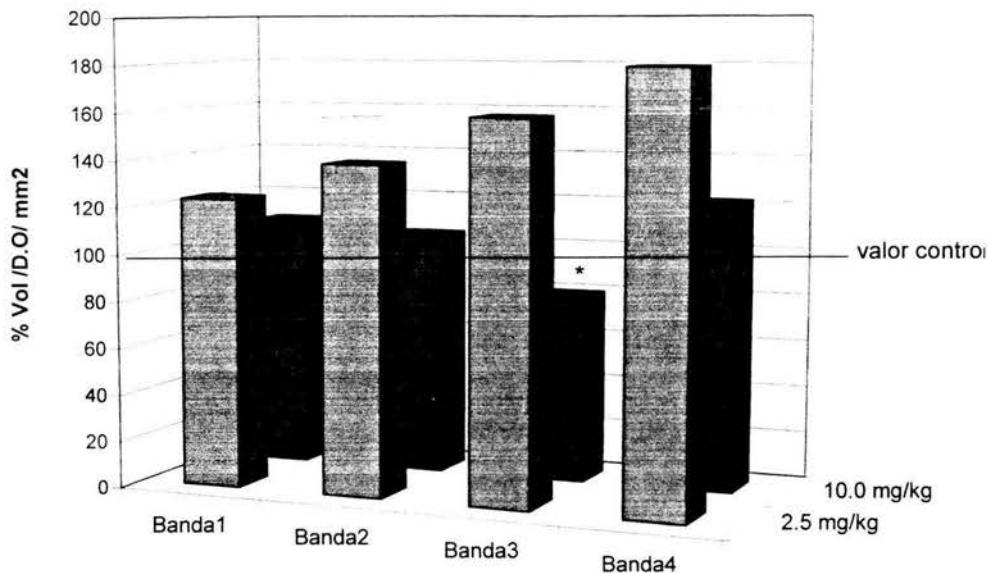
14.1.4 Muestras de vejigas

Las vejigas en la dosis de 2.5 mg/kg de arsenito de sodio mostraron en promedio una variación hacia el incremento con 23% (banda1) 39% (banda 2) y 60% (banda 4) con respecto al valor control. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Por motivos no experimentales el material correspondiente a la dosis de 5.0 mg /Kg. no se pudo analizar.

Las bandas correspondientes a 10.0 mg/kg mostraron un aumento de entre 8% (banda1), 4% (banda 2) y 22% (banda 4), mientras que la banda 3 tuvo 79% por abajo del valor control, aunque las bandas 1, 2 y 4 mostraron un leve incremento no fue suficiente para establecer una relación estadísticamente significativa. Sin embargo la prueba de Mann-Whitney mostró que la banda 3 de esta dosis tuvo una diferencia significativa con respecto al control ($T = 57.000$ $t_{est} = 0.005$, $t_{esp} = 0.002$ $p = 0.002$) por lo que esta diferencia podría significar una inhibición en la CK correspondiente a esta banda (Grafica.4)

Grafica.4
Variación en la inducción de CK en vejigas de ratones tratados con
arsenito de sodio



| | Banda1 | Banda2 | Banda3 | Banda4 |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ■ 2.5 mg/kg | 123.5996438 | 139.4999172 | 160.0035053 | 180.782962 |
| ■ 10.0 mg/kg | 108.6454549 | 104.0783969 | 79.7585485 | 122.0717598 |

En este órgano a pesar de los altos valores de variación observados en la dosis de 2.5 mg/kg, la prueba de *U* no mostró diferencias. Por el contrario la dosis de 10.0 mg/kg, mostró en la banda 1 una diferencia significativa lo cual indica una inhibición de la CK correspondiente a esta banda

* $p \leq 0.05$



IZT.

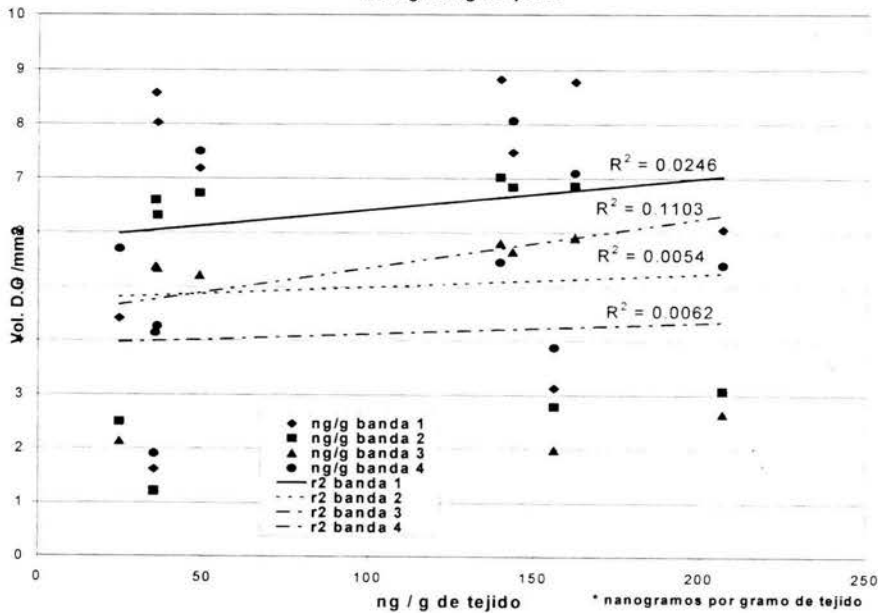
U.N.A.M. CAMPUS

14.1.5 Correlación entre CK y Asi y formas metiladas (DMA/MMA).

Se realizaron las correlaciones entre la cantidad de arsénico inorgánico trivalente (Asi III) (Grafica.5) y las formas metiladas del arsénico como el ácido dimetilarsínico (DMA) (Grafica.6) y el ácido monometilarsónico (MMA) (Grafica.7) contra el volumen en D.O /mm² de las bandas presentes en los hígados de ratón tratados con 5.0 mg/Kg de arsenito de sodio y sus respectivos controles, efectuándose una prueba de correlación de Pearson y una post-prueba con valor de P para cada correlación efectuada.

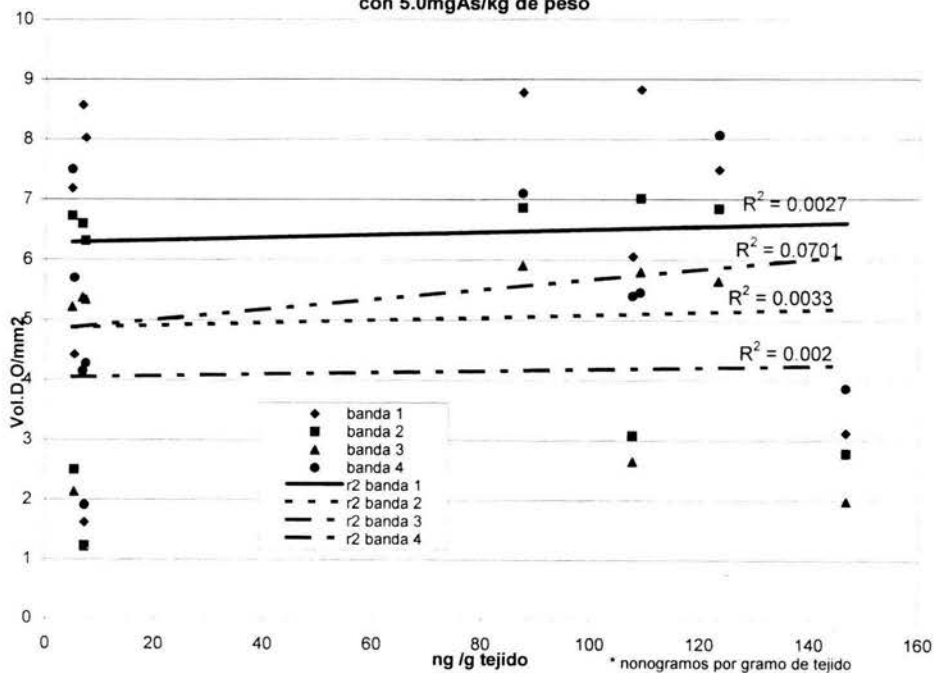
Para la correlación entre el Asi(III) y sus formas metiladas con el Vol. /D.O/ mm² se observó en la banda 4 el valor de correlación más alto ($r = 0.3320$), aunque el valor de p no fue significativo. En el caso del DMA la banda 4 se mantuvo con el valor más alto de correlación ($r = 0.2647$) no siendo significativa. Lo mismo se observó en el caso del MMA, en la cual se mantiene la correlación más alta con la banda 4 ($r = 0.3075$), en ambos casos no se alcanzó una relación estadísticamente significativa. En ninguno de los casos se encontró una relación lineal entre la dosis y la expresión de las CK.

Gráfica.5
Correlación entre Asi y bandas en hígados de ratón tratados con 5.0mgAs/kg de peso



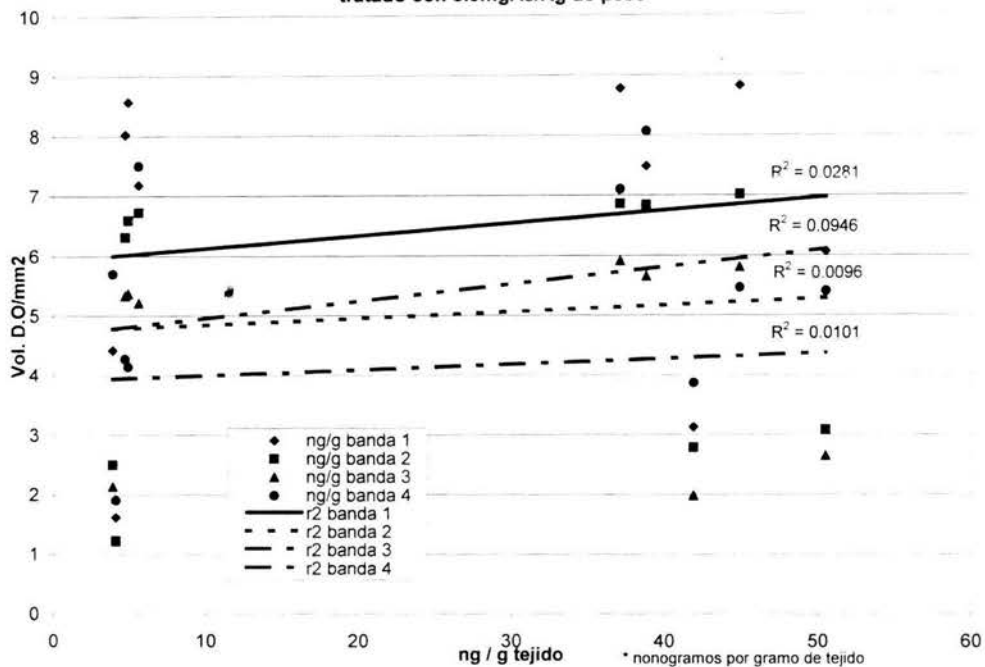
En el gráfico 5 se observa que la correlación entre Asi y el volumen calculado para cada banda en los hígados tratados con 5 mg/kg de arsenito de sodio no mostró una correlación significativa en casi todas las bandas, por lo que se puede decir que no existe relación entre la presencia de CK y la cantidad de Asi en este órgano. Sin embargo en la banda no. 4 mostró el coeficiente de correlación es más alto con una r de 0.3320 lo que indica que esta CK si pudo tener una influencia más directa en su inducción por el Asi, aunque no alcanzo un valor estadísticamente significativo.

Gráfica.6
Correlación entre ácido dimetilarsínico (DMA) y bandas ds hígado tratados con 5.0mgAs/kg de peso



Este gráfico muestra la correlación entre la forma dimetilada del As y la presencia de CK, dando como resultado una correlación negativa, por lo que el DMA (ácido dimetilarsínico) no influye en la inducción de CK.

Gráfica.7
Correlación entre ácido monometilarsónico (MMA) y bandas de hígado de ratón
tratado con 5.0mgAs/Kg de peso



El gráfico 7 muestra la correlación entre el metabolito derivado del Asi el MMA (ácido monometilarsónico) y la presencia de CK en hígados tratados con 5 mg/kg de arsenito de sodio, estableciéndose una correlación negativa entre esta y las bandas analizadas, aunque como en los casos anteriores la CK correspondiente a la banda 4 a fue la que mostró el coeficiente de correlación más alto aunque no estadísticamente significativo con una r de 0.3075, interesante sería saber que citoqueratina es y conocer su estructura para determinar si tiene algunos sitios que la hagan susceptible de interactuar de un modo directo con el As y sus metabolitos que la inducen y sobre expresan en el hígado.

14.2 INMUNORÉPLICAS

Se corrieron geles de SDS-PAGE (10%) cargados con 100 μ g de proteínas de los homogenizados de hígado, riñón y pulmón de ratón tratados con las dosis 2.5 mg/kg (Fig.12), 5.0 mg/kg (Fig.13) y 10.0 mg/kg de arsenito de sodio. con el objeto de visualizar el patrón de bandas característico de cada órgano y observar la localización aproximada de citoqueratinas con base a su peso molecular.

Se realizaron inmunorrélicas de todos los órganos de los ratones tratados con arsenito de sodio, encontrándose una diferencia estadística considerable en la inmunorréplica correspondiente a hígados de ratón tratados con 5.0mgAs/kg de peso (Fig.14).

Se encontraron diferencias estadísticas en las vejigas de ratón tratados con 10 mgAs/Kg de peso y un incremento sustancial en 2.5 mg/kg y (Fig.15) .

Una ANOVA de Kruskal-Wallis reveló una diferencia significativa entre la cantidad de proteínas totales en homogenizados de hígados tratados con 2.5, 5.0 y 10 mg/kg/As y sus controles ($p = 0.030$), así mismo el método de Dunn indicó una diferencia significativa entre la dosis de 2.5 mg/kg y el control. Estos datos se pueden relacionar también con la formación de nuevas proteínas visualizadas en los geles de las dosis probadas. (Fig.12 y 13)

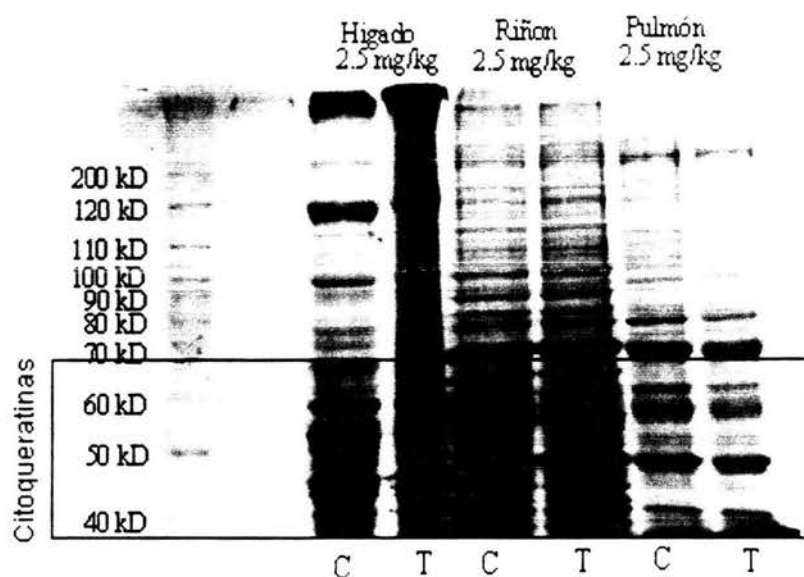


Fig.12

Gel SDS-PAGE 10% que corresponde a proteínas provenientes de órganos de ratón en este caso tratados con 2.5 mgAs/Kg de peso, teñidos con Azul de Coomasie y a la cual se le tomó fotografía y se escanéo, editándose en el programa Adobe Photoshop 6.0. Se menciona que las CK se encuentren entre los pesos moleculares de 68 kD a 40 kD (rectángulo negro).

C = control

T = tratado

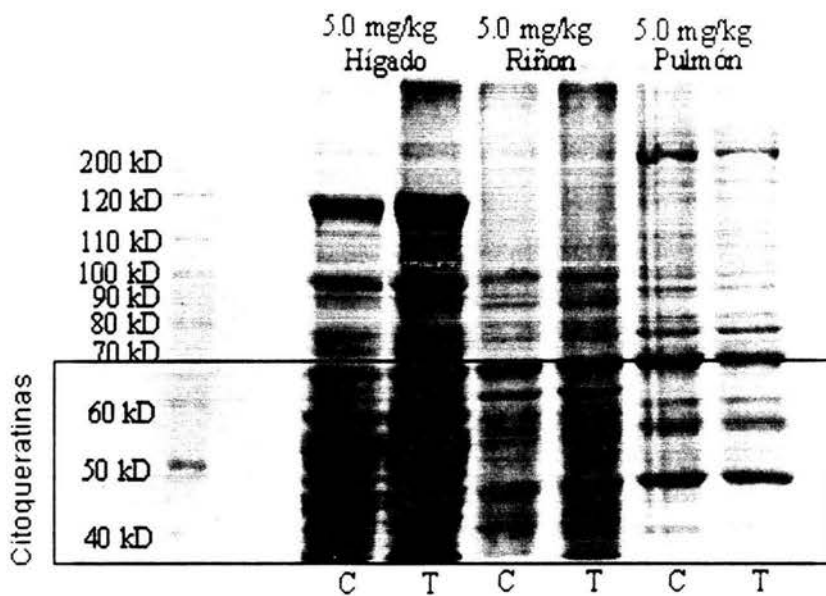


Fig.13

Gel SDS-PAGE que corresponde a proteínas provenientes de órganos de ratón en este caso tratados con 5.0 mgAs/Kg de peso, teñidos con Azul de Coomasie y al cual se le tomó fotografía y se escaneó, editándose en el programa Adobe Photoshop 6.0 . Se menciona que las CKs se encuentran entre los pesos moleculares de 68 kD a 40 kD (rectángulo negro)

C = control

T = tratado

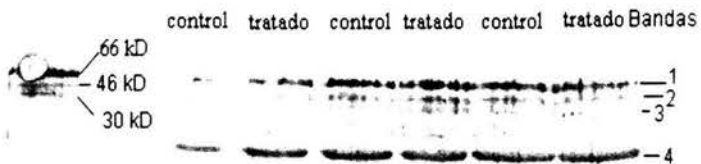


Fig.14

Inmunoréplica de hígados tratados con 5.0 mgAs/kg de peso en el que se utilizó un anticuerpo anti pan citoqueratina y donde se pueden ver 4 bandas bien definidas que corresponden a CK con pesos moleculares aproximados entre 61.3 kDa y 49 kDa, los números corresponden a las bandas que fueron cuantificadas en el análisis de imagen.

C =control T = tratado



Fig.15

Inmunoréplica de vejiga de ratón tratados con 2.5 mgAs/kg de peso en el que se utilizó un anticuerpo anti pan citoqueratina y donde se pueden ver 4 bandas bien definidas que corresponden a CK con pesos moleculares aproximados entre 61.3 kDa y 49 kDa .

C = control T = tratado

15. DISCUSIÓN

Aunque el impacto de la exposición aguda al arsénico en varios procesos celulares ha sido extensivamente estudiado, la relación entre aquellos efectos y el desarrollo de cáncer y otras enfermedades, en poblaciones expuestas crónicamente permanece sin esclarecerse (Trouba y cols, 2000).

En estudios previos utilizando una línea celular derivada de hepatocitos fetales humanos, encontramos un aumento en la cantidad de CK y específicamente de CK18 después de recibir tratamientos con arsenito de sodio (Ramírez y cols., 2000). Es por este motivo que nos interesó investigar este efecto del arsenito de sodio (AsIII) *in vivo*, sobre las CK que se expresan en diferentes órganos de ratones de la cepa BalbC/AnN. Para ello medimos la variación de la expresión de citoqueratinas después de tratamientos subcrónicos en órganos donde se ha observado se acumula el arsénico como el hígado, el pulmón, el riñón y la vejiga.

Observamos un incremento en la cantidad de proteínas totales en los homogeneizados de los hígados y riñones de los ratones tratados con las tres dosis de arsénico, aunque esta diferencia fue significativa solo en los hígados, mientras que este incremento no fue tan evidente en los homogeneizados de pulmón. Esto se puede observar en las figuras 12 y 13. Este aumento en la cantidad de proteínas nos indica que se induce una síntesis de proteínas que se puede asociar a los tratamientos. Se ha reportado que el arsénico trivalente induce la expresión de numerosas proteínas de estrés (Del Razo y cols. 2001) Por lo que pensamos que el encontrar una mayor cantidad de proteína por gramo de órgano puede estar representado por este efecto y podría deberse a la inducción de enzimas de detoxificación, como las encargadas de la síntesis y reducción del glutatión. Por otro lado Limón (2001) observó un decremento en la cantidad de glutatión reductasa presente en riñón y en hígado de los animales tratados con 10 mg/kg mientras que en el pulmón se observó una mayor cantidad de la enzima a esta misma dosis.

Esto concuerda con lo observado por Santra y cols. (2000), en la cual vieron una depleción de GSH (por ¿ inhibición de la glutatión reductasa?), en hígados de rata después de una exposición por 12 meses de una dosis de 18 mg/kg de arsenito de sodio.

Las bandas identificadas en los homogeneizados de hígado mostraron variaciones que van desde la inhibición hasta la inducción. Como la banda 2 observada en los ratones tratados con 5.0 mg/kg (Fig.14) que basándonos en el rango del peso molecular de esta proteína puede sospechar que se trata de la CK 18 la cual tiene un PM de 45 kDa y es específica de hígado y que esté inducida en este órgano de manera similar a lo observado por Ramírez y cols. (2000).

Sin embargo, el aumento de CK no resultó tan evidente como en los experimentos *in vitro*. Atribuimos estas diferencias al modelo utilizado y al régimen de tratamiento, dado que en este caso los tratamientos fueron por 20 días, lapso en el cual los mecanismos de inducción iniciales pudieron haberse modificado por homeostasis.

Se sabe que existen elementos potenciadores de la expresión de CK18 que son sitios de unión para AP-1 y ETS (Oshima y cols, 1990), que a su vez son factores de respuesta a estrés oxidativo, ya que Flora en 1999 al exponer a ratas por 12 semanas observó una depleción de glutatión (GSH) y un incremento en el glutatión oxidado (GSSG) y malondialdehído en hígado y cerebro que son cambios bioquímicos producidos por estrés oxidativo

Alteraciones en la expresión y organización de estas queratinas (CK8/18) han sido asociadas a efectos de otros agentes como el alcohol y el cobre. Problemas de cirrosis por ingestión de alcohol y por acumulación de cobre en el hígado han sido vinculados con la formación de inclusiones citoplasmáticas características conocidas como cuerpos de Mallory y que son agregaciones de CK 8 y CK18 principalmente (Haschek y Rousseaux, 1996), por lo que sería importante verificar estos hallazgos en hígado.

Los otros órganos (riñón, pulmón y vejiga) a pesar de que en el primero se observó una mayor presencia de proteínas en los lisados, no mostraron alguna inducción en la expresión de CK, salvo por el caso de las vejigas en la que una de las CK observadas en la dosis de 10.0 mgAs/kg, presentaba una inhibición de su expresión, por otra parte, aunque se logró ver un incremento en la variación de CKs presentes en la dosis 2.5 mg/kg y que estas pudieran apuntar a una inducción no fueron lo suficientemente afectadas en su expresión como tal (Grafica.4), por lo que podemos pensar que tal vez en la siguiente dosis (5.0 mg/kg) si se pueda ver una inducción.

Además se ha mencionado que existe una diversidad de metiltransferasas que metabolizan el arsénico en varios tejidos dentro de la misma especie, así mismo hay evidencia que en ratones B6C3F1 la actividad metiltransferasa del arsenito ocurre en el siguiente orden: Testículos > riñón > pulmón = hígado (Healy y cols, 1998), por lo tanto está claro que el hígado no es el único órgano que puede metilar el arsénico inorgánico. Esto sugiere que la vejiga puede ser sitio de actividad metilante, por lo tanto, el arsénico pudiera tener efecto sobre las moléculas residentes o específicas de ese órgano alterando su expresión y función. ¿Pudieran estar estos datos relacionados con la aparición de cáncer en este órgano?

El grupo de Kurttio y cols. (1999) observó una relación entre la ingesta diaria de As existente en fuentes de agua potable de la que se abastecen los habitantes de algunas poblaciones en Finlandia y la aparición de cáncer en vejiga durante un período de tres a nueve años antes del diagnóstico, lo que refrenda una vez más que en humanos y tal vez también en ratones el proceso por el cual el As causa daños visibles es lento y acumulativo.

Se ha establecido como uno de los signos característicos observados en el caso de la exposición crónica al arsénico la hiperqueratosis palmo-plantar y una fibrosis hepática que son signos asociados a la elevada afinidad del arsénico por residuos sulfhidrilos (Black, 1967., Morris y cols, 1974) que son abundantes en citoqueratinas. No resultaría extraño que en el hígado o en la vejiga pudieran formarse este tipo de estructuras por acción del arsénico considerando que el arsénico es capaz de acumularse en estos tejidos (Styblo y cols. 1999).

No encontramos una correlación lineal entre la cantidad de arsénico presente en el hígado y la inducción de CK, probablemente porque este modelo no pueda describir de manera adecuada esta relación, tal vez porque la cantidad de arsénico presente no refleja exclusivamente la proporción del estrés oxidativo y la presencia de radicales libres, sino también la proporción de arsenito unido a los grupos sulfhidrilos de las proteínas. De tal manera que la inducción de la CK podría ocurrir como respuesta a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyendo el anión radical súper oxido y el radical hidroxilo, a través de una reacción en cadena a la que le atribuimos la activación de los factores de transcripción involucrados en la expresión de CKs (Yamanaka y cols, 1989), así como a una síntesis de compensación que podría ocurrir para "secuestrar" el As^{+3} que se encuentra en el citoplasma ya que las CK son ricas en grupos tioles

Sin embargo otros autores (Cavigelli y cols, 1996), mencionan que la activación de algunos factores reguladores de genes, sensibles al estrés oxidativo como el AP-1 es activado eficientemente por $As(III)$ en tratamientos agudos no así en crónicos. Por otro lado Trouba y cols. (2000) demostraron que los niveles de RNAm de c-fos y c-jun que forman el factor AP-1, permanecían invariables ante la exposición crónica al arsénico por lo que podrían existir otros factores de transcripción para las CK, que todavía no se conocen y que sería importante investigar

Ello refuerza nuestras observaciones en el sentido de que cada tejido responde de manera diferente al tratamiento, de ahí que resulten relevantes los estudios *in vivo* para conocer los cambios que pueden ocurrir en el organismo, ante un carcinógeno que no tiene un órgano blanco (Gonsebatt y cols., 1997)

16. CONCLUSIONES

El presente estudio tuvo como objetivo establecer la relación entre proteínas constituyentes del citoesqueleto en particular las pertenecientes a los filamentos intermedios. No se observó una relación directa entre la cantidad de arsenito de sodio acumulado en hígado y la expresión de CK, aunque hubo un incremento en la cantidad de CK por inmunodetección. De manera similar los homogeneizados de vejiga mostraron una mayor cantidad de CK así como inhibición a dosis altas.

Otros órganos como el riñón, el pulmón, no parecen sufrir cambios a este respecto.

Sería importante determinar si la respuesta observada en este estudio ocurre a exposiciones más prolongadas (15 meses) y se encuentran cambios en la expresión de CK que pueda ser asociada a la fibrosis hepática. De la misma manera habría que realizar experimentos de tipo agudo con dosis diferentes para estudiar este tipo de respuestas en el tejido. Además sería importante caracterizar el tipo de CK cuya expresión esta siendo modulada por el tratamiento.

A pesar de la variabilidad mostrada en los modelos animales, creemos que con estudios de este tipo se pueden obtener respuestas fisiológicas más claras que las que se observan *in vitro* (Wijeweera y cols, 2001).

| DOSIS mg/kg/As | ORGANO | | | | EXPRESIÓN | |
|-------------------|------------|-------|--------|--------|------------|-----------|
| | HIGADO | RIÑON | PULMON | VEJIGA | INHIBICIÓN | INDUCCIÓN |
| 2.5 | B1 | 0 | 0 | | * | |
| 5 | B1, B2, B3 | 0 | 0 | | | *** |
| 10 | B1 | 0 | 0 | B3 | ** | |

Tabla.4 Resumen de la expresión/inhibición encontrados en los órganos tratados y visualizados por cada banda.

17. REFERENCIAS

- Abe, M. y Oshima, R.G (1990).A single human keratin 18 gene is expressed in diverse epithelial cells of transgenic mice. *J.Cell.Biol.* 111 : 1197-1206
- Albores, A., Cebrián, M.E., Connelly, J.C., Bach,P.H. y Bridges, J.W. (1992). Effects of arsenite on hepatic mixed-function oxidase activity in rats. *Xenobiotica* 22:5, 591-597.
- Armstrong, C.W., Stroube, R y Rubio, T.(1984). Outbreak of fatal arsenic poisoning caused by contaminated drinking water . *Arch. Environ. Health* 39: 276-279.
- ATSDR (1993). U.S. Agency for toxic substances and disease registry toxicological profile for arsenic. Public Health Service. Atlanta G.A.
- ATSRD (2000). Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, U.S Department of Health and Human Services
- Ausebel, M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith.J.A y Struhl,K. (2000).Currents protocols in Molecular Biology, Edit Wiley, Vol.2 pag 10.8.1 suppl 39,
- Bauman, P.A., Dalton, W.S., Anderson, J.M y Cress, A.E. (1994). Expression of cytokeratin confers multiple drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 : 5311-5314
- Black, M.M (1967). Prolonged ingestion of arsenic. *Pharm, J.* 9 : 593-597
- Blessing, M., Jorcano, J.L y Frank, W.W (1989) Enhancer elements directing cell-type-specific expression of cytokeratins genes and changes of the epithelial cytoskeleton by transfection of hybrid cytokeratins genes. *EMBO* 8 :117-126
- Bodgan, G.M., Sampayo-Reyes, A. y Aposhian, H.V.(1994). Arsenic binding proteins of mammalian system: I. Isolation of three arsenite-binding proteins of rabbit liver. *Toxicology* 93, 175-194.
- Brown, M.M., Rhyme, B.C., Goyer, R.A y Fowler, B.A.(1976). Intracellular effects of chronic arsenic administration on renal proximal tubule cells. *J. Toxicol. Environ. Health* 1 : 505-514
- Brown R.H. Jr., (1995). Amyotrophic Lateral Sclerosis : Recent Insights From Genetics and Transgenic Mice. *Cell*, 80 : 687-692.
- Buchet, J.P., Lauwerys, R. y Roels, H. (1981a). Comparasion of the urinary excretion metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate or dimethylarsinate in man. *Int. Arch. Occup. Env. Health.* 48, 71-79.

Buchet, J.P., Lauwerys, R. y Roels, H. (1981b). Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers. *Int. Arch. Occup. Env. Health.* 48, 111-118.

Caulin, C., Salvensen, G.S y Oshima, R.G (1997). Caspase cleavage of keratin 18 reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell. Biol.* 138 (6) :1349-1394.

Cavigelli, M., Li, W.W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K y Karin, M (1996). The tumor promoter arsenite stimulated AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J.* 15 : 6269-6279

Chen, C.J. y Lin, L.J. (1994). Human carcinogenicity and atherogenicity induced by chronic exposure to inorganic arsenic. In: Nriagu, J.O. Eds. *Arsenic in the Environment. Part II.* John Wiley & Sons, New York, pp. 109-131.

Chou, C-F., Smith, A.J y Omary, M.B (1992). Characterization and dynamics of O- Linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J. Biol. Chem.* 267:3901-3906

Clewell, H.J., Gentry, P.R., Barton, H.A., Shipp, A.M., Yager, J.W. y Andersen, M.E (1999). Requirements for a biologically realistic cancer risk assessment for inorganic arsenic. *Int. J. Toxicol.*, 18. 131-147

Cullen, W.R., McBride, B.C. y Reglinski, J. (1984). The reaction of methylarsenicals with dithiols. Some biological implications. *J. Inorg. Biochem.* 21: 179-194.

Dietmar Mischke (1998). The complexity of Gene Families Involved in Epithelial Differentiation : Keratin Genes and Epidermal Differentiation Complex. In *Intermediate Filaments. Subcellular Biochemistry Vol 31 Chap. 3.* Ed by Herrmann and Harris. Plenum Press, New York p.p 71-95

Del Razo, M.L (1997). Biotransformación del arsénico y su relación con las lesiones de piel en individuos expuestos crónicamente al metaloide. Tesis Doctoral. CINVESTAV. I.P.N

Del Razo, M.L., Quintanilla-Vega, B., Colombre-Brambila, E., Calderan-Aranda, E.S., Manno, M., y Albores, A.(2001). Stress Proteins Induced by Arsenic. *Toxicol. Appl. Pharm.* 177 : 132-148

Ellenhorn, M.J. (1997). Arsenic: metals and related compounds. In : *Ellenhorn's Medical Toxicology diagnosis and Treatment of Human Poisoning.* 2° ed Baltimore : Williams & Wilkins, P.1540

EPA (1984) Health Assessment Document for Inorganic Arsenic Washington D.C, Office of Environmental assessment. Environmental Protection Agency U.S 600/8-83/028bF

EPA (2000) Proposed Revision To Arsenic Drinking Water Standar. Office of

Ground Water and Drinking Water, May 2000. Environmental Protection Agency U.S 815-F-00-012. <http://www.epa.gov/safewater/ars/proposalsfs.html>

Flora, S.J.S. (1999). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of *N*-acetylcysteine and meso 2,3 dimercaptosuccinic acid in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 865-869

Franke, K.W y Moxon, A.L. (1936) A comparison of the minimum fatal doses of selenium, tellerium, arsenic and vanadium. *J. Pharmacol. Exp. The.* 58 : 454-459

Fuchs, E (1995). Keratins and the Skin. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11 : 123-53

Fuchs, E (1996) The cytoskeleton and disease : genetic disorders of intermediate filaments. *Annu. Rev. Genet.*, 30. 197-231

Fuchs, E., y Weber, K .(1994). Intermediate Filaments :structure dynamics, function and disease. *Annu. Rev. Biochem* 63 : 345-382

Fuchs, E., and Cleveland, D.W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279 : 514-519

Germolec, D.R., Yoshida, T., Gaido, K.J., Wilmer, J.L., Simeonova, P.P., Kayama, F., Bursleson, F., Dong, W., Lange, R.W y Luster, M.I (1996). Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 141. 308-318

Goodman y Gilman, Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W.; Gilman, A.G.: (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª Edición. México, Pp. 1766-1770.

Gonsebatt, M.E., Vega, A.M., Salazar, R., Montero, P., Guzmán, J., Blas, L.M., Del Razo, G., García-Vargas, A., Cebrián, M.E., Kelsh, M y Ostrosky-Wegman, P. (1997). Cytogenetics effects in human exposure to arsenic. *Mutation Research.* 386 : 219-228.

Gunther, M., Frebourg, T., Laithier, M., Fossar, N., Bouziane-Quartini, M., Iaviolles, C., y Brison, O. (1995) *Mol. Cell. Biol* 15 : 2490-2499

Haschek, W.M y Rousseaux, C.G (1998). *Fundamentals of Toxicology Pathology*. Academic Press. San Diego California USA.

Hodgson, E. y Levi, E.P (1994). *Introduction to Biochemical toxicology*. 2nd. Edition. Norwalk, Connecticut, Appleton & Lange. Pp 459-489.

Hugues, M.F. y Thompson, D.J.(1996). Subchronic dispositional and toxicological effects of arsenate administred in drinking water to mice .*J Toxicol Environ. Health* 49 : 177-196

IARC (1980). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some metal and metallic compounds, Vol. 23, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

Irvine, A.D., Corden, L.D., Swensson, O., Swensson, B., Moore, J.E., Frazer, D.G., Smith, F.J.D., Knowlton, R.G., Christophers, E., Rochels, R., Uitto, J. y McLean, W.H. (1997). Mutations in cornea-specific keratin K3 or K12 genes cause Meesmann's corneal dystrophy. *Nat. Genet* 16 : 184-187

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

Kaise, T., Watanabe, S. y Ito, K.(1985). The acute toxicity of arsenobetaine. *Chemos* 14 : 1327-1332.

Kaise, T., Yamauchi, H., Horiguchis, Y., Tani, T., Watanabe, S., Hirayama, Tanel y Fukui, S (1989) A comparative study on acute toxicity of methyl arsonic acid, dimethyl arsinic acid and trimethyl arsine oxide in mice. *Appl. Organomet.Chem* 3: 237-277.

Kashinkas, D.J., Qin, Q., Phillips, M.A y Rice, R.H (1997). Arsenate suppression of human keratinocytes programming. *Mutat. Res.*, 386. 253-261

Kreppel, H., Bauman, J.W., Liu, J., Mckim, J.M., Klaassen, C.D (1993). Induction of Methalothionein by Arsenicales in Mice., *Fundam. Appl. Toxicol* 20: 184-189

Klymkowsky MW (1995)Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions. *Current Opinion in Cell Biol*;7:46-54.

Knapp, L.W., O'Guin, W.M y Sawyer, R.H (1983).Drug induced alterations of cytokeratin organization in cultured epithelial cells. *Science.* 219 4584 :501-503

Ku, N.-O., y Omary, M.B (1997). Phosphorylation of human keratin 8 in vivo in conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor stimulated tail domain serine 431. *J. Biol. Chem.* 272 : 7556-7564.

Ku, N-O., Liao, J, y Omary, M.B (1998). Phosphorylation of human keratin 18 serine-33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ)* 17 : 1892-1906

Kulesh, D.A y Oshima, R.G (1988). *Mol. Cell. Biol* 8: 1540-1550

Kurtio, P., Pukkala, E., Kahelin, H., Auvinen, A. y Pekkanen, J. (1999). Arsenic Concentrations in Well Water and Risk of Bladder and Kidney Cancer in Finland. *Sept* 107 (9) : 705-709

Leask, A., Byrne, C. y Fuchs, E (1991). Transcription factor AP2 and its role in epidermal-specific gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88 :7948-7952

Leask, A., Rosenberg, M., Vassar, R. y Fuchs, E (1990). Regulation of a human epidermal keratin gene :sequences and nuclear factors involved in keratinocyte-specific transcription. *Genes Dev* 4 :1985-1988

Liao, J., Lowthert, , N-O, Ku, R.F. y Omary, M.B. (1995a). Dynamics of human Keratin 18 phosphorylation :polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelila tissues. *J. Cell. Biol.* 131 : 1291-1301

Liu, J., Kadisska, M.B., Liu, Y.,. Lu, T. ,Qu, W. y Waalkes, M.P (2001). Stress-Related Gene Expression in Mice Treated with Inorganic Arsenicals. *Toxicological Sciences* 61 :314-320

Mahaffey, K.R., Caspar, S.G., y Gladen, B.C (1981). Concurrent exposure to lead, cadmium and arsenic . Effects on toxicity and tissue metal concentrations in the rat. *J. Lab. Clin. Med* 98 : 463-481.

Malachowsky, ME. (1990). An update on arsenic. *Clin Lab Med* ;10(3):459-72.

Menzel, D.B., Ross, M., Oddo, S.V., Bergstrom, P., Greene, H., y Roth, R.N. (1994). A physiologically based pharmacokinetic model for ingested arsenic. In: Chapell WR Abernathy C.O. and Cothem C.R. Eds. *Arsenic. Exposure and Health, Science Rewievs Ltd.* 40. Norwood, England, pp 209-218.

Mohelska, H., Benko, V., Smetana, K., y Hyncica, V. (1980). Ultrastructural changes in hepatocytes of mice exposed to arsenic in drinking water. *Exp. Pathol.* 18:275-281.

Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geoger, B, y Krepler, R (1982). The catalog of human cytokeratins :Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells . *Cell* 31 :11-24

Morris. J.S., Schmid, M. y Newman, S. (1974). Arsenic and noncirrothic poratl hypertension. *Gastroenterology.* 64 : 86-94

NRC (1999).*Arsenic in Drinking Water.* National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C

Ohara,O., Gahara,Y., Miyake, T., Teraroka, H., y Kiyamura, T. (1993). Neurofilament deficiency in quail caused by non sense mutation in neurofilament gene *J. Cell Biol.*, 121, 387-395.

Omary, M.B., y Ku, N-O .(1997). Intermediate filaments proteins on the liver : emerging disease association and functions. *Hepatology* 25 : 1043-1048

- Omary, M.B., Ku, N-O., Liao, J., y Price, D. (1998). Keratin Modifications and Solubility Properties in epithelial Cells and *in vitro*. In Intermediate Filaments. Subcellular Biochemistry. Vol 31 Chap. 4 .Ed by Herrmann and Harris. Plenum Press, New York
- Oshima, R.G., Abrams, L., y Kulesh, D (1990).Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c.jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Dev* (4) :835-848
- Pankov,R., Umezawa, A., Maki, R., Der, C., Housser, J.C.A y Oshima, R.G (1994). Oncogene activation of Human Keratin 18 transcription via the ras signal transduction pathway.*Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* .91 :873-877
- Ramirez, P., Del Razo, L.M., Ruiz-Gutierrez, M.C. y Gonsebatt, M.E. (2000). Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expresión in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis* 50 (4) :104-106.
- Reigart, R. y Roberts, J Ed. (1999). Recognition and Management of pesticide Poisonings. Publicado por la Oficina del programa de pesticidas de la EPA.
- Rieger, M., y Franke, W.W (1998). Identification of n orthologous mammalian cytokeratin during evolution of human cytokeratin 10. *J. Mol. Biol* 204 : 841-850
- Rogers, G.E., y Powell, B.C (1993). Organization and expression of hair follicle genes . *J. Invest. Dermatol* 101 :505-535
- Schafër, S.G., Dawes, R.F.L., Eisenhans, B., Forth, W y Schümann, K.(1999). Metals Chap.32 p.p 760-766. In *Toxicology Part III. Toxicology of compounds*. Ed by Marquadt. H .*et al.* Academic Press.
- Steinert, P.M., y D.R. Roop (1988). Molecular and cellular biology of Intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem* 57 : 563-625
- Styblo, M., Vega, L., Germolec, D.R., Luster, M.I., Del Razo, L.M., Wang, C., Cullen, W.R. y Thomas, D.J (1999). Proceedings of the 3° International Conference on the health effects of arsenic . In Press
- Tam, G.K.H., Charbonneau, S.M., Bryce, F., Pomroy, C., y Sandi, E. (1979). Metabolism of inorganic arsenic (⁷⁴As) in humans following oral ingestion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50: 319-322
- Tam, GKH, Charbonneau, SM, Bryce, F y Lacroix,G (1978). Separation of arsenic metabolites in dog plasma and urine following intravenous injection of ⁷⁴As. *Anal. Biochem.* 86:505-511
- Thompson, D.J. (1993). A chemical hypotesis for arsenic methylation in mammals. *Chem. Biol. Interact.* 88: 89-114.

Trouba, K.J., Wauson, E.M y Vorce, R.L (2000). Sodium arsenite Induced Dysregulation of proteins Involved in Proliferative Signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 164: 161-170

Vather, M., y Marafante, E. (1987). Effects of low dietary intake of methionine, choline or proteins on the biotransformation on arsenite in the rabbit . *Toxicol. Lett.* 37: 41-46.

Wade, M.J., Davis, B.K., Carlisle, J.S., Klein, A.P. y Valoppi, L.M (1993). Environmental transformation of toxic metals. *Occup. Med* 3 : 575-601

Wegman-Ostrosky. y Jager, J.W. (1997). Arsenic : A paradoxical human carcinogen. *Reviews in Mutation Research* Vol 386 No.3

Weinshilboum, R.M. (1988). Pharmacogenetics of methylation: relationship to drug metabolism. *Clin. Biochem.* 21: 201-210

Wijeweera, J.B., Gandolfi, A.J., Parrish, A y Lantz, R.C (2001). Sodium arsenite Enhances AP-1 and NF κ B DNA Binding and Induced Stress protein Expression in Precision Cut Rat Lung Slices. *Toxicological Sciences*. 61 : 283-294

APENDICES

APENDICE 1

ELECTROFORESIS

Se tomó una alícuota de 10 μ l de los tejidos previamente homogeneizados en PBS frío, a los cuales se les adicionó un cóctel de inhibidores de proteasas por gramo de tejido homogenizado. Se determinó la cantidad de proteína en cada muestra. Esta determinación se realizó por el método colorimétrico de cuantificación de proteínas descrito por Bradford y se midió en espectrofotómetro. Se ajustó la cantidad de proteína de cada muestra a 100 μ g de proteína, se diluyó 1:4 o 1:2 según la muestra, con buffer de aplicación el cual contenía β -mercaptoetanol, se calentaron por cuatro minutos a 90°C y se mantuvieron en hielo hasta proceder con la electroforesis (SDS-PAGE). Se utilizó un gel de poliacrilamida al 10% para la separación de las proteínas. Se cargaron los carriles considerando uno el para el peso molecular. Se corrieron a 100 V, durante aproximadamente 90 minutos.

Cuando terminó de correr se utilizó el gel para realizar la transferencia.

APENDICE 1.1

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA EL MÉTODO DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE .

| | | |
|----------------------------|-------|-------|
| 1. Acrilamida/bis : | 100ml | 50ml |
| Acrilamida | 29.2g | 14.6g |
| N'N-bis metilen acrilamida | 0.8g | 0.4g |

Agregar 100 ml de agua bidestilada y filtrar, guardar en oscuridad a 4°C en envase ámbar (< 30 días).

2. Buffer de corrida. :

| | |
|------------|---------|
| Glicina | 14.48 g |
| Tris- base | 3 g |
| SDS 10% | 1.0 g |

Aforar a 1 lt con agua bidestilada no ajustar pH, guardar a 4°C

| | | |
|---------------------------|--------|-----|
| 3.Buffer de aplicación : | 500 µl | 1ml |
| Agua desionizada (µl) | 253 | 506 |
| Tris-HCl pH 6.8 | 63 | 126 |
| Glicerol | 53 | 106 |
| SDS 10 % | 105 | 210 |
| Azul de bromofenol (0.1%) | 26 | 52 |

Para 500µl agregar 25µl de β-mercaptoetanol

| | |
|----------------------------------|--------|
| 4.Buffer Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M) | 100 ml |
| Tris-base | 18.15g |
| Agua desionizada | 80ml |

Aforar a 100ml , ajustar pH 8.8 con HCl concentrado y guardar a 4°C

| | |
|---------------------------------|-------|
| 5.Buffer Tris-HCl pH 6.8 (0.5M) | 100ml |
| Tris-base | 6g |
| Agua desionizada | 60ml |

Aforar a 100 ml ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado y guardar a 4 °C

6. Persulfato de Amonio 10 %

Pesar 0.1g y disolver en 1 ml de agua desionizada, guardar a 4°C

7.SDS (Sodium Dodecil Sulfato) 10%

Pesar 10 g , agregar 90 ml de agua desionizada, aforar a 100 ml y guardar a 4°C

APÉNDICE 2

INMUNOTRANSFERENCIA

1. Una vez teniendo el gel de la electroforesis, se procedió a efectuar la electrotransferencia según el manual de instrucción de BIO-RAD donde el gel estabilizado previamente 30 min en buffer de transferencia se coloca sobre una membrana de nitrocelulosa, previamente humedecida por 15 min en buffer de transferencia teniendo en todo momento cuidado de no dañarla. La transferencia se lleva a cabo a 100 V durante 1h en frío y con agitación.
2. Al terminar la transferencia se extrajo la membrana del sandwich de transferencia y se bloqueó con TBS leche al 2%, BSA al 0.5%, toda la noche en agitación moderada y en frío (4°C). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie por dos horas y se destiñeron toda la noche.
3. Los lavados después del bloqueo se realizaron con TBS-Tween al 0.1% cuidando de no lastimar la membrana, se efectuaron como sigue: un primer lavado en agitación durante 15 minutos, el segundo durante 10 minutos y finalmente un lavado de 5 minutos.
4. Se adicionó el anticuerpo anti-citoqueratinas¹ diluido 1:100 en TBS, leche al 1%, BSA al 1%, y se incubó durante una hora en agitación moderada.
5. Se vuelve a lavar como previamente se describió. Enseguida se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:2000 en TBS leche al 1% BSA al 1%, durante una hora en agitación moderada.
6. Se volvió a lavar como se describió previamente. Para la detección de las proteínas se utilizó el método de revelado con Diaminobenzemida (10mg de DAB en 20 ml de PBS pH 7.4 mas 2 µl de peróxido de hidrógeno comercial). Se hizo reaccionar por el tiempo que fue necesario para identificar las bandas, la reacción se detuvo con agua destilada y las membranas se secaron en papel filtro.

¹ En el caso del anticuerpo anti-citoqueratinas se trata de un cóctel que consiste en las siguientes: Cit 1 (68kd), Cit 4 (59kd), Cit 5 (58kd), Cit 6 (56kd), Cit 8 (52kd), Cit 10 (56kd), Cit 13 (54kd), Cit 18 (45kd) y Cit 19 (40kd). Anti-Pancitoqueratina de Sigma (Cat C2562).

APÉNDICE 2.1

SOLUCIONES PARA WESTERN BLOTTING

| | |
|----------------------------|--------|
| 1. Buffer de Transferencia | 1000ml |
| Tris-base | 3.03g |
| Glicina | 14.4g |
| Metanol | 200ml |

Adicionar 650 ml de agua desionizada. Mezclar y disolver. Aforar a 1000ml. Almacenar de 2 a 8°C

2. TBS (Tris Buffered Saline) pH 7.6

| | |
|-----------|------|
| Tris-base | 2.4g |
| NaCl | 8.0g |

Aforar a 1000 ml con agua desionizada. Ajustar pH con HCl concentrado. Almacenar de 2 a 8°C.

3. TBS - Tween 20 0.1%

A 250 ml de TBS pH 7.6 agregar 2.5 ml de Tween - 20 guardar a 4 °C

4. Preparación de Anticuerpos

4.1 Anti- Pancitokeratina Dil 1:100 según manual de Sigma

| | |
|---------------|--------|
| TBS | 9.90ml |
| Leche Sveltys | 0.1g |
| BSA | 0.1g |
| anticuerpo | 100 µl |

El anticuerpo se agrega hasta el final en condiciones de esterilidad y se almacena según instructivo.

Almacenar el preparado a -20°C

4.2 Anti- IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Sigma) Dil 1:2000

| | |
|----------------|-----------|
| TBS | 9.95ml |
| Leche Sveltyts | 0.1g |
| BSA | 0.1g |
| Anticuerpo | 5 μ l |

El anticuerpo se agrega hasta el final en condiciones de esterilidad y se almacena según instructivo.

Almacenar el preparado a -20°C

SOLUCIÓN BLOQUEADORA

| | | |
|---------------|-------|------|
| Para : | 10ml | 20ml |
| TBS | 10ml | 20ml |
| Sveltyts (2%) | 0.2g | 0.4g |
| BSA(0.5%) | 0.05g | 0.1g |

METODO DE REVELADO DAB/H₂O₂ SOBRE MEMBRANA

Pesar 10 mg de DAB en 20 ml de PBS pH 7.4 + 2-5 μ l de H₂O₂ (30%)

Se prepara al momento.

- Quitar el TBS
- Agregar mezcla (se verán bandas)
- Quitar la mezcla DAB/H₂O₂
- Enjuagar en agua destilada
- Secar en papel Whatman No 1



U.N.A.M. CAMPUS

APÉNDICE 3

IZT. CUANTIFICACIÓN DE WESTERN BLOTING

El análisis de las bandas identificadas sobre las membranas se llevó a cabo utilizando el sistema Fluor-S (BioRaD) con el Software Quantify One PC Windows , ajustado para analizar blottings por colorimetría, valorándose los siguientes parámetros: colorimetría (claro, blanco, alta resolución, epiluminiscencia), volumen * mm², vol. Adj * mm², % Vol .Adj, valor medio, Desv. standar y Densidad* mm², los resultados fueron dados en volumen /densidades ópticas (OD's)/ mm². Los datos se importaron a una hoja de Excell para Windows 95/98/ME para su procesamiento estadístico.

APENDICE 4

SEPARACIÓN DE Asi Y ESPECIES METILADAS

La separación de Asi y metabolitos se llevo a cabo utilizando una resina de intercambio iónico en cromatografía, de acuerdo al método descrito por Tam y col (1978).

1. Se ajusta el pH de la muestra (homogenizado) a 2.0
 2. Se colocan (.5-2 ml) de homogenizado en la parte superior de la columna.
 3. Se eluye con HCl 0.5 N, (fracción A).
 4. Agua (Fracción B).
 5. NH₄OH 5% para tener un pH alcalino (Fracción C) y,
 6. NH₄OH 20% (Fracción D)
 7. El Asi es recuperado en la fracción y las formas metiladas en la fracción B y C respectivamente.
- Cada fracción fue resuspendida en HCl al 10% y se cuantificó la concentración de As utilizando espectrofometría de absorción atómica con generación de hidruros interpolando la respuesta obtenida (cm²) de cada fracción, en su correspondiente gráfica de calibración. La exactitud fue de 91 a 114% y el coeficiente de variación entre 0.5 y 12%.