



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES
CUAUTITLAN



Departamento
Exámenes Profesionales

**"INDUCCION DE ADUCTOS ADN-PROTEINAS EN
REBANADAS DE HIGADO DE RATON POR EFECTO DEL
ARSENICO"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
VERONICA CASTRO BEAR**

ASESORA: DRA. PATRICIA RAMIREZ NOGUERA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

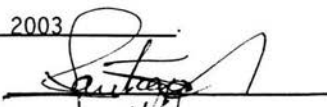
Inducción de aductos ADN-Proteínas en rebanadas de hígado de ratón
por efecto del arsénico

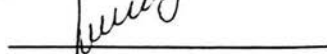
que presenta la pasante: Verónica Castro Bear
con número de cuenta: 9551999-9 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga


Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 3 de septiembre de 2003

PRESIDENTE Dr. Ricardo V. Santiago Díaz 

VOCAL Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez 

SECRETARIO Dra. Patricia Ramírez Noquera 

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. René Damián Santos 

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso 

DEDICATORIAS

A DIOS

Por permitirme conocer cada día y con cada respiración lo maravillosa que es la vida

A MI MAMÁ

Es difícil mencionar todo lo que tengo que agradecerte, sólo puedo decirte que sin ti nada de esto sería posible, tu has sido el motor de mi vida, me has demostrado que vale la pena luchar por conservarla y me has dado las mejores herramientas para vivirla . Pero sobre todo tengo que agradecerte al cáncer, porque me dio la oportunidad de cuidarte, de conocerte, de admirarte, de querer aún más a la mujer inteligente y valiosa que eres, y comprobarme que "el cáncer cura el alma", pero no sólo de quien lo padece, sino de los que lo rodean, pues a través de él, comencé a sanar la mía, MIL GRACIAS!!!!

A MI HERMANA

Por ser mi mejor amiga y confidente, por cuidarme siempre y tener esa generosidad a flor de piel.

A MIS HERMANOS

Por quererme y demostrármelo a su manera, pues me han dado las principales y más importantes lecciones de mi vida.

A MI CUÑADO Y CUÑADAS

Por formar parte de mi familia y estar conmigo durante mi crecimiento.

A MIS SOBRINOS

Por ser esas pequeñas lucecitas que han iluminado mi vida, por soportarme en mis malos momentos, por compartirme sus mejores sonrisas, sin esperar nada a cambio.

A OSCAR

Por llegar en el momento preciso y querer permanecer a mi lado, gracias por existir, por permitirme conocerte, por ser la única persona con la que quiero compartir mi vida, por que formas parte de ella, enriqueciendo cada día con tu presencia, con tu sonrisa, demostrándome que es posible ser feliz. TE AMO !!!

A MIS AMIGAS

A Mónica por que crecimos juntas, y aprendimos lo que es la amistad; a Esmeralda por preservar tu esencia y enseñarme que hay distintas maneras de ver la vida; a Lucía por ser la luz que cambió mi destino, indicándome que lo vamos formando con cada respiración ; a Sandra por todos los buenos momentos que compartimos y también por los malos pues fueron estos los que nos hicieron madurar.

A MIS AMIGOS

Quienes día a día contribuyeron en mi crecimiento, compartiendo su tiempo, regalándome los mejores momentos de mi vida; gracias: Martha, Bety, Iris, Israel, Manuel, Ana Luisa, Laura, Janette.

A QUIENES YA NO ESTAN CONMIGO

Por motivos distintos y aunque no hay punto de comparación, les agradezco el tiempo y el aprendizaje recibido, estuvieron a mi lado el tiempo necesario pues sabemos que la única constante es el cambio y que todo es como tiene que ser, aunque muchas veces no sepamos porqué.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM :

Por que me abrió sus puertas brindándome el acceso a algo tan valioso y preciado como lo es la educación, pero sobre todo por tener el privilegio de formar parte de ella

A la Dra. Paty :

Es demasiado lo que tengo que agradecerle, ya que no sólo compartió sus conocimientos, sino su tiempo, sus consejos, y lo que es más importante me brindó su amistad. Gracias por permitirme aprender de una persona tan admirable, completa y generosa, por ser tan gentil y demostrarme que se puede ser todo lo que uno se proponga.

A Isabel:

Por amar su profesión y ayudar incondicionalmente a quien lo necesite, siempre con las palabras indicadas y de la manera correcta. Gracias, porque sin su ayuda y apoyo no hubiera podido concluir y comenzar esta etapa de mi vida.

He notado que la mayoría de los peregrinos, en el Camino de Santiago, como en los caminos de la vida, siempre procuran seguir el ritmo de los demás. Al inicio de mi peregrinación, procuraba ir siempre a la par de mi grupo. Me cansaba, le exigía a mi cuerpo más de lo que podía dar, vivía en tensión, y acabé teniendo problemas en los tendones del pie izquierdo. Imposibilitada para andar durante dos días, comprendí que sólo conseguiría llegar a Santiago si obedecía a mi ritmo personal. "Tardé más que los demás, tuve que andar sola muchos trechos, pero fue el hecho de respetar mi propio ritmo el que me permitió completar el camino. Desde entonces aplico esto a todo lo que tengo que hacer en la vida".

MAKTUB
Paulo Coelho

INDICE GENERAL

CAPITULO I	PAGINA
<u>INTRODUCCIÓN</u>	
1.1 FUENTES DE EXPOSICIÓN	1
1.1.1 Fuentes naturales	2
a) Corteza terrestre	2
b) Suelos y sedimentos	3
c) Agua	4
d) Aire	5
e) Organismos	6
1.1.2 Fuentes antropogénicas	7
a) Insecticidas	7
b) Herbicidas	7
c) Desecantes y conservadores de madera	8
d) Aditivos de alimentos	8
1.1.3 Fármacos	8
1.1.4 Venenos	9

1.2 EFECTOS TÓXICOS	9
1.2.1 Efectos cutáneos	11
1.2.2 Efectos gastrointestinales	11
1.2.3 Efectos en el desarrollo y reproductividad	12
1.2.4 Efectos respiratorios	13
1.2.5 Efectos pulmonares	13
1.2.6 Efectos cardiovasculares	14
1.2.7 Efectos hematológicos	15
1.2.8 Efectos hepáticos	16
1.2.9 Efectos Renales	17
1.2.10 Efectos neurológicos	17
1.2.11 Efectos inmunológicos	18
1.2.12 Diabetes Mellitus	18
1.2.13 Genotoxicidad	19

CAPITULO II

ARSÉNICO

2.1 METABOLISMO DEL ARSÉNICO	21
2.2 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO PENTAVALENTE	25
2.3 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO TRIVALENTE	27

CAPITULO III

ADUCTOS ADN-PROTEÍNAS

3.1 ESTIMACIÓN DEL RIESGO	29
3.2 BIOMARCADORES	30
3.2.1 Marcadores internos de dosis	31
3.2.2 Marcadores de dosis biológicamente efectivas	31
3.2.3 Marcadores de respuesta biológica	32
3.2.4 Marcadores de enfermedades	32
3.2.5 Marcadores de susceptibilidad	32
3.3 ADUCTOS ADN-PROTEÍNAS COMO BIOMARCADORES	35

CAPITULO IV

DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
4.2 HIPÓTESIS	41
4.3 OBJETIVOS	41
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS	42
4.4.1 Preparación y cultivos de rebanadas de hígado	42
4.4.2 Viabilidad celular	42
4.4.2.1 Determinación de potasio	42
4.4.3 Determinación de glutatión reducido	43
4.4.4 Precipitación de los complejos ADN-proteína	44
4.5 RESULTADOS	45
4.6 DICUSIÓN	54
4.7 CONCLUSIONES	59
4.8 PERSPECTIVAS	60
4.9 REFERENCIAS	61

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	PAGINA
Tabla A. Toxicidad aguda del arsénico en animales de laboratorio.	10
Tabla 1. Entrecruzamientos ADN-proteínas inducidos por arsenito de sodio en rebanadas de hígado de ratón tratadas durante 3 hrs.	45
Tabla 2. Concentración de potasio en rebanadas de hígado de ratón inducidas por arsenito de sodio tratadas durante 3 hrs.	48
Tabla 3. Entrecruzamientos ADN-proteínas inducidos por arsenito de sodio en rebanadas de hígado de ratón durante 3 hrs.	50
Tabla 4. Inducción de GSH en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito de sodio durante 3 hrs.	52

FIGURAS

Figura A. Metabolismo del arsénico	22
Figura B. Estructuras de algunos compuestos de arsénico relevantes toxicológicamente.	23
Figura C. Esquema simplificado del metabolismo del arsénico en algunos mamíferos incluyendo el humano	24
	26
Figura D. Arsenólisis.	
Figura E. Inhibición de piruvato deshidrogenasa por arsenito.	28
Figura F. Biomarcadores de exposición y de efecto.	34
Figura 1. Inducción de DPC en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito durante 3hrs.	46
Figura 2. Inducción de GSH en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito de sodio durante 3 hrs.	47

Figura 3. Concentración de potasio en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito de sodio durante 3 hrs. **49**

Figura 4. Inducción de DPC en rebanadas de hígado de ratón BALB/c tratadas con arsenito de sodio durante 3 hrs. **51**

Figura 5. Inducción de GSH en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito de sodio durante 3 hrs. **53**

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
ADP	Adenosildifosfato
ATP	Adenosiltrifosfato
As	Arsénico
As³⁺	Arsénico trivalente
As⁵⁺	Arsénico pentavalente
Asi	Arsénico inorgánico
Ck	Citoqueratinas
DMA	Dimetilarsénico
DPC	Entrecruzamientos ADN-proteínas
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación-S-reductasa
GSSG	Glutación oxidado
MMA	Monometilarsénico
NAT	N-acetiltransferasa
P	Fosfato
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PDH	Piruvato deshidrogenasa
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TMAO	Oxido trimetilarsina

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 FUENTES DE EXPOSICIÓN

El arsénico es un conocido carcinógeno humano que se encuentra en la naturaleza en diferentes formas químicas y estados de oxidación (-3,0,+3, +5). (Hughes et al. 2002)

Episodios de envenenamiento por arsénico han sido reportados en todo el mundo, principalmente en Argentina , Chile, México, Taiwán, India y Bangladesh, y en menor número se han visto casos de toxicidad crónica en Polonia, E.U.A, Canadá, Hungría y Japón (Basu et al. 2001).

La exposición al arsénico puede provenir de fuentes naturales, industriales, de la comida o bebida. Así, estos incidentes en todo el mundo se pueden dividir en tres categorías (Badal et al. 2002) :

1. Contaminación natural del agua con arsénico.
2. Contaminación de arsénico por fuentes industriales.
3. Contaminación de arsénico por comida y bebida.

1.1.1 FUENTES NATURALES

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

a) Corteza terrestre

El arsénico es un elemento cristal raro que abarca cerca de 0.00005% del 1% de la corteza terrestre, y tiene una concentración promedio en rocas ígneas y sedimentarias de 2 mg/kg (Gulledge et al. 1973). En la mayor parte de las rocas su rango es de 0.5 a 2.5 mg/kg, aunque altas concentraciones fueron encontradas en sedimentos argiláceos de grano fino y fosforitos. El arsénico está concentrado en algunos sedimentos marinos, los cuales pueden contener más de 3000 mg/kg. Este metaloide puede coprecipitar con hidróxidos de hierro y sulfatos en rocas sedimentarias. Los depósitos de hierro, hierro sedimentario, y nódulos de manganeso son ricos en arsénico (Mandal et al. 2002).

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

b) Suelo y Sedimentos

Los niveles de arsénico en los suelos de varias ciudades se encuentra en un rango de 0.1 a 40 mg/kg (promedio de 6 mg/kg) (Bowen , 1979), de 1 a 50 mg/kg (media de 6 mg/kg) (Backer, 1975) y 5 mg/kg (Vinogradov, 1959), pero varía considerablemente entre regiones geográficas.

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

El arsénico se encuentra principalmente como especie inorgánica pero también puede estar unida a materiales orgánicos en el suelo. Bajo condiciones oxidantes, en ambientes aeróbicos, los arsenatos (iAs V) son las especies estables y son fuertemente asimiladas en arcillas, óxidos/hidróxidos de hierro y manganeso, y materia orgánica. El arsénico precipita como arsenato férrico en suelos ricos en hierro. En condiciones reductoras el arsenito (iAs III) es el componente predominante. Los componentes de arsénico inorgánico pueden ser metilados por microorganismos, produciendo bajo condiciones oxidantes, ácido monometilarsínico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) y óxido trimetilarsina (TMA₃O) (Reichert et al. 1921).

En condiciones anaeróbicas estas pueden ser reducidas a volátiles y fácilmente oxidadas metilarsinas. Las formas de arsénico presentes en los suelos dependen del tipo y cantidades de componentes absorbidos del suelo, el pH y el potencial redox. Los arsenatos de hierro y aluminio (AlAsO₄, FeAsO₄) son las fases dominantes en los suelos ácidos y son menos solubles que el arsenato de calcio (Ca₃AsO₄), el cual es la forma química principal en algunos

suelos alcalinos y calcáreos (Fordyce et al. 1995). La fracción de arsenato adsorbido en los suelos está estrechamente relacionado al pH del suelo y al potencial redox. Esto también varía de acuerdo al tipo de suelo bajo las mismas condiciones de pH (Li, 1982)

c) AGUA

El arsénico es encontrado en bajas concentraciones en el agua natural. Se han reportado concentraciones de arsénico en el agua en la mayor parte de las ciudades de menos de 10 $\mu\text{g/l}$, y en algunas ocasiones substancialmente menores (WHO 2001).

La concentración máxima permisible de arsénico en el agua de bebida es 50 $\mu\text{g/l}$ y el valor recomendado por la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) es de 10 $\mu\text{g/l}$. Sin embargo se han localizado en algunas partes de E.U.A concentraciones de arsénico de 50-100 $\mu\text{g/l}$ y en el oeste de Bengal concentraciones de 200-600 $\mu\text{g/l}$, siendo este último catalogado como la máxima desgracia por arsénico en el mundo (Das et al. 1995), mientras que los contenidos de arsénico en el agua de mar son de 0.001- 0.008 mg/l (Johnson 1972).

La forma química principal en la cual el arsénico se presenta por ser termodinámicamente estable es como ion arsenato. La proporción de arsénico inorgánico (iAs) iAs V - iAs III basada en cálculos termodinámicos es $10^{26} : 1$ para el agua de beber oxigenada a pH 8.1. En realidad, este es 0.1:1 a 10:1. Este alto contenido inesperado de iAs III es causado, al menos en parte, por reducción biológica en el agua de mar (Johnson, 1972).

La concentración de arsénico en agua impoluta es de 1-10 $\mu\text{g/l}$, encontrándose valores hasta de 100-5000 $\mu\text{g/l}$ en áreas de mineralización de

sulfatos y minería (Smedley et al. 1996). A potenciales redox altos o moderados el arsénico puede ser estabilizado como una serie de oxianiones pentavalentes (arsenato), H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-} . Sin embargo, en la mayor parte de las condiciones reductoras (ácido y alcalino) y menor potencial redox, las especies de arsenito trivalente (H_3AsO_3) predominan. As^0 y As^{3-} son raros en ambientes acuáticos.

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

d) AIRE

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

La exposición humana al arsénico a través del aire es generalmente muy baja y normalmente son concentraciones en el rango de 0.4 a 30 ng / m³ (WHO 1996) La absorción de arsénico inhalado es entre 30 y 85 %, dependiendo de las porciones relativas de vapor y materia particulada. USEPA estima que el público en general está expuesto en un rango de aproximadamente 40 - 90 ng por día por inhalación. La cantidad de arsénico inhalado por día es alrededor de 50 ng o menos (asumiendo que cerca de 20 m³ de aire es inhalado por día) en áreas contaminadas (Pontius et al. 1994).

e) ORGANISMOS

PLANTAS. El arsénico es un elemento, el cual es acumulado en tejidos vivos, desde su ingestión por algún organismo este es excretado muy lentamente. La cantidad de arsénico en una planta, entonces depende casi únicamente de la cantidad de arsénico a que esta expuesta. Su concentración varía desde menos de 0.01 a 5 $\mu\text{g} / \text{g}$ (peso seco) (Feed Additive Compendium, 1975). Esto podría ocasionar que los animales sean envenenados por consumir plantas que absorben residuos de arsénico de suelos contaminados, debido a que el daño a la planta ocurre antes de que las concentraciones tóxicas se presenten (Feed Additive Compendium, 1975).

ANIMALES. Así como en las plantas, el arsénico se acumula en los tejidos animales, variando la concentración debido a las diferencias en la ingesta en diferentes áreas. Entre los animales marinos, el arsénico se deposita hasta niveles de 0.005 a 0.3 mg/kg en algunos moluscos y crustáceos (Bowen, 1966). Algunos mariscos pueden contener más de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de arsénico. El promedio en el contenido de arsénico en los peces es de 0.54 $\mu\text{g}/\text{g}$ basándose en el peso húmedo, pero estos valores pueden aumentar hasta 77 $\mu\text{g}/\text{g}$ en el aceite de hígado del róbalo de agua dulce (Whitacre, 1972).

En mamíferos el arsénico se acumula en ciertas áreas del tejido ectodérmico, principalmente en pelo y uñas. Los animales domésticos generalmente contienen menos de 0.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ en peso húmedo (Smith 1964).

1.1.2 FUENTES ANTROPOGÉNICAS

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

Los principales productores de arsénico fueron China, Rusia, Francia; México, Alemania, Perú, Namibia, Suecia y E.U.A., contando con casi el 90% de la producción mundial (Nelson, 1977). Durante los años 70's, cerca del 80% del consumo de arsénico fueron con propósitos agrícolas. En el presente esta forma de uso ha disminuido. Aproximadamente, 97% del arsénico producido era con fines de manufactura en la forma de arsénico blanco y el 3% restante se utilizaba como metal para adiciones metalúrgicas, en especial para aleaciones de plomo y cobre (U.S., 1973).

a) Insecticidas

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

b) Herbicidas

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

c) Desecantes y Conservadores de madera

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

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

d) Aditivos de alimentos

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

1.1.3 FÁRMACOS

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

Preparaciones medicinales comunes, las cuales contienen arsénico, incluyen la solución de Fowler (arsenito de potasio), la solución de Donovan (arsénico y yoduros de mercurio), tabletas asiáticas (trióxido de arsénico y pimienta negra), solución de Valagin (licor de cloruro de arsénico), cacodilato de sodio, arfenamina (Salvarsan), neoarfenamina, hidrocloreuro de oxoferasina (Marpharsen), artinol (Balarsen), acetarsona, triparsamida y carbasona. (Vallee et al. 1960).

1.1.4 VENENOS

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

1.2 EFECTOS TÓXICOS

La toxicidad va a depender de la cantidad de arsénico ingerida, la cual está clasificada en toxicidad aguda, subaguda, y crónica respectivamente. No obstante se ha encontrado evidencia de la tolerancia que pueden desarrollar los humanos expuestos a una toxicidad aguda, después de estar expuestos al metaloide de manera crónica (Vather et al. 1995). Sin embargo se ha comprobado que el arsénico es un conocido carcinógeno humano (International Agency for Research on Cancer, 1987). La mayor parte del arsénico ingerido es excretado del cuerpo a través de la orina, heces, piel, cabello, uñas y aliento. Casi todos los órganos son afectados; pero los síntomas clínicos aparecen insidiosamente después de 6 meses a 2 años o más dependiendo de la cantidad de arsénico (Das et al. 1995).

La toxicidad aguda del arsénico está relacionada a su forma química y estado de oxidación. Un principio básico es que la toxicidad aguda del arsénico trivalente es mayor que la del arsénico pentavalente (Hughes, 2002). Por muchos años se creyó que la toxicidad aguda del arsénico inorgánico era mayor que la del arsénico orgánico y por lo tanto, la metilación de arsénico inorgánico era una reacción de detoxificación. Este dogma fue sostenido debido a que el ácido dimetilarsínico (DMA³⁺), el principal metabolito excretado de arsénico inorgánico, es menos tóxico que el arsénico

inorgánico. Sin embargo, se ha encontrado que un derivado del ácido monometilarsínico (MMA III) es más tóxico que el arsenito. La mayor toxicidad aguda de los intermediarios trivalentes metilados del arsénico sugiere que la metilación del arsénico no es solamente un mecanismo de detoxificación (Cullen et al.1989).

SUSTANCIA QUÍMICA	ESPECIE	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	LD 50 (MG AS/KG)
Trióxido de arsénico	Ratón (m)	Oral	26
Trióxido de arsénico	Ratón (m)	Oral	26 - 48
Trióxido de arsénico	Rata (m/ h)	Oral	15
Arsenito	Ratón (m)	Intramuscular	8
Arsenito	Hamster (m)	Intraperitoneal	8
Arsenato	Ratón (m)	Intramuscular	22
MMA III	Hamster (m)	Intraperitoneal	2
MMA V	Ratón (m)	Oral	916
DMA V	Ratón (m)	Oral	648
TMAO V	Ratón (m)	Oral	5500
Arsenobetaina	Ratón (m)	Oral	>4260

Tabla A. Toxicidad aguda del arsénico en animales de laboratorio (Hughes et al. 2002) m = macho ; h = hembra

La toxicidad crónica del arsénico es la más discutida en términos de sistemas de órganos afectados: piel, hígado, sistema nervioso, sistema cardiovascular y sistema respiratorio (Cebrian et al. 1983; Yeh et al. 1968).

1.2.1 EFECTOS CUTÁNEOS.

Estudios en poblaciones de individuos expuestos a arsénico describen una progresión inusual de cambios patológicos en la piel. Seguido de una exposición inicial de aproximadamente de 8 a 10 años, individuos afectados desarrollan alteraciones en la pigmentación incluyendo ennegrecimiento difuso en las áreas axilar e inguinal. Paradójicamente al mismo tiempo, se presentan áreas definidas de despigmentación epidérmica. Coincidiendo con estas alteraciones de pigmentación, la piel afectada se vuelve hiperplástica y acantótica, con una acumulación excesiva de células escamosas. (Klimecki et al. 1997)

Las hiperqueratosis arsenicales aparecen predominantemente sobre las palmas de las manos y sobre la zona plantar de pies aunque el dorso de las extremidades y del tronco pueden también presentarlas. Ocasionalmente las lesiones pueden ser grandes (1cm aproximadamente) y pueden tener apariencia nodular. (Ratnam et al. 1992; Tay, 1974)

Sujetos expuestos a arsénico durante 5 a 10 años desarrollan una presentación peculiar de la enfermedad de Bowen. Carcinoma de células basales puede también ocurrir en este período de tiempo. Algunas de las lesiones de Bowen en los siguientes 5 a 10 años, pueden progresar a carcinoma de células basales escamosas (SCC) (Zaldivar et al. 1981).

1.2.3 EFECTOS GASTROINTESTINALES

La eficiencia de absorción de los arsenicales inorgánicos en el tracto gastrointestinal depende de su solubilidad en agua. En exposiciones agudas o subagudas el arsénico inorgánico (Asi) puede generar alteraciones gástricas que pueden ir desde dolor abdominal y diarrea hasta gastroenteritis

hemorrágica asociada al choque. En exposiciones crónicas a arsénico generalmente los síntomas gastrointestinales están ausentes. (Hernández-Zavala et al. 1998), aunque en ocasiones puede producir una ligera esofagitis, gastritis, o colitis con malestar abdominal, anorexia, malabsorción y pérdida de peso (Goebel et al. 1990).

1.2.4 EFECTOS EN EL DESARROLLO Y REPRODUCTIVIDAD

Por más de 50 años, es conocido que el arsénico inorgánico cruza la barrera placentaria y afecta el desarrollo fetal. Los arsenicales orgánicos no parecen atravesar la placenta de manera que son almacenados en ella (Squibb et al. 1983).

En un estudio realizado en Boston no se encontró una asociación entre agua de bebida con arsénico y defectos en el corazón congénitos, sin embargo si fue notoria una asociación con coartación de la aorta. (Zierler et al. 1988)

Estudios epidemiológicos de agua contaminada con arsénico indicaron la presencia de arsénico en tejidos fetales. Explantes de cerebro fetal humano expuestos a arsénico muestran disturbios en las enzimas del ciclo del glutatión, en el desarrollo neuronal, generación de especies reactivas de oxígeno y apoptosis (Chattopadhyay et al. 2002).

En modelos experimentales usando ratas ingiriendo agua con niveles variables de arsénico durante gestación, se observaron necrosis y apoptosis, así como incremento en la generación de óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS), peroxidación de lípidos y disminución del contenido de glutatión. (Chattopadhyay et al. 2002), conduciendo a un incremento en la incidencia de abortos.

Debido a la pérdida de proteínas, en general de las enzimas responsables para el balanceo de la generación y degradación de NO y ROS son inhibidas a causa del arsénico, se ha observado disminución en el crecimiento de la matriz (Chattopadhyay et al. 2002).

Algunos investigadores encontraron que bebés nacidos de mujeres expuestas a polvo de arsénico durante el embarazo presentaban una alta incidencia de malformaciones congénitas, así como peso por debajo del promedio. La incidencia de abortos espontáneos en mujeres quienes vivían cerca de una fundidora de cobre en Suecia tiende a disminuir conforme a la distancia. Estudios han reportado un aumento en el número de abortos espontáneos causados por la arsina entre mujeres que trabajaban en una industria de semiconductores (Nordstrom et al. 1979).

1.2.5 EFECTOS RESPIRATORIOS

Humanos expuestos de manera natural y ocupacional a arsénico inorgánico experimentan laringitis, bronquitis, rinitis, faringitis, sonidos del pecho, congestión nasal así como perforación del septum nasal (Milton et al. 2001)

1.2.6 EFECTOS PULMONARES

Borgono et al. reportaron que 38.8 % de 144 sujetos con pigmentación de la piel anormal estaba acompañada de tos crónica, comparada con 3.1% de 36 sujetos con piel normal en un estudio de 180 residentes de Antofagasta.

En un estudio de arsénico en el agua de bebida en el este de India, Guha Mazumder et al. notaron una queja de tos en 89 (57%) de 156 pacientes con hiperpigmentación arsenical.

Pruebas de la función del pulmón dirigidas en 17 de estos pacientes mostraron señales de enfermedad pulmonar restrictiva en 9 (53%) y enfermedad obstructiva y restrictiva combinada en 7 pacientes (41%).

1.2.7 EFECTOS CARDIOVASCULARES

Tanto el corazón como el árbol arterial periférico comúnmente manifiestan efectos de toxicidad por arsénico, observándose de esta forma anomalías cardiovasculares, enfermedad de Raynaud, infarto al miocardio, depolarización miocárdial, arritmias cardíacas, engrosamiento de vasos sanguíneos y su oclusión, así como enfermedad del pie negro.

Estudios en Taiwán demostraron más claramente que la exposición a arsénico vía agua de bebida esta asociada con enfermedad del pie negro, con una significativa relación exposición-respuesta asociando la duración y el nivel de exposición de los efectos observados, lo cual es caracterizado por una pérdida progresiva de circulación en las manos y en los pies, conduciendo a la formación de gangrena severamente dolorosa en las extremidades (particularmente del dedo gordo del pie), seguida de la amputación necesaria del miembro (Dixon et al 1997; Nagvi et al. 1994).

Zaldivar et al. reportaron numerosos casos de infarto al miocardio y engrosamiento arterial en niños quienes consumían agua conteniendo 0.60 mg de As l⁻¹.

La forma extrema y la alta prevalencia de enfermedad del pie negro encontrada en Taiwán no es observada en otras regiones. Es probable sin embargo, que otros factores, tales como malnutrición o exposición concurrente, jueguen un papel en la patofisiología de la enfermedad. En

contraste, hay evidencia limitada de una asociación entre la exposición a arsénico y enfermedad cerebrovascular. Estudios en Taiwán muestran un elevado riesgo de muerte derivada de enfermedad cerebrovascular por elevada exposición al arsénico (WHO 2001).

Por su parte Chen et cols. sugirieron que la exposición a arsénico a largo término puede inducir hipertensión en humanos, al igual que Rahaman et cols. quienes reportaron hipertensión en personas afectadas por arsénico en Bangladesh.

1.2.8 EFECTOS HEMATOLÓGICOS

El sistema hematopoyético es también afectado por una exposición al arsénico a corto y largo término. Anemia (normocítica normocrómica, aplásica y megaloplástica) y leucemia (granulocitopenia, trombocitopenia, mielodisplasia) son los efectos comunes de envenenamiento y es reportado como resultado de exposiciones orales de manera aguda, intermedia y crónica (Armstrong et al. 1984). Estos efectos pueden ser debidos a efectos hemolíticos o citotóxicos directos en las células rojas y a una supresión en la eritropoyesis. Altas dosis de arsénico son reportadas como la causa de depresión en la médula ósea en humanos (Lerman et al 1980).

Winski y Carter examinaron el efecto de arsenito inorgánico y arsenato en la morfología del eritrocito humano en un modelo in vitro. Ellos estimaron que los eritrocitos son al menos 1000 veces más sensibles a arsenato que a arsenito.

El mecanismo de hemólisis involucra disminución de GSH intracelular, resultando en oxidación de grupos sulfhidril en la hemocianina de Fe^{2+} a Fe^{3+} en ratones y ratas.

1.2.9 EFECTOS HEPÁTICOS

Desde que se tiene conocimiento que el hígado tiende a acumular arsénico con exposiciones repetidas, la implicación hepática es reportada más comúnmente como una complicación de exposiciones crónicas en períodos de meses o años. La acumulación del arsénico se da de manera significativa en el hígado. Una importante característica de toxicidad crónica es una forma de fibrosis hepática que causa hipertensión portal, pero no progresa a cirrosis (Nagvi et al. 1994).

Los exámenes histopatológicos del hígado en individuos crónicamente expuestos a elevadas concentraciones de As (0.2-2.0 µg/L) muestran la presencia de fibrosis en el tracto portal que ocasionalmente causan hipertensión y sangrado de varices esofágicas (Mazumder et al. 1988). Otras alteraciones comúnmente asociadas a la intoxicación por arsénico son cirrosis (Lin y Chen, 1986), y angiosarcoma (Falk et al. 1981).

El arsénico de manera crónica induce cambios hepáticos incluyendo cirrosis, hipertensión portal sin cirrosis, degeneración grasa y neoplasia hepática primaria. Los pacientes pueden recurrir a la atención médica con pérdida de sangre por varices esofageal, ictericia, daño mitocondrial, funciones mitocondriales dañadas y del metabolismo de la porfirina (Guha 2001; Santra et al. 1999; Nagvi et al. 1994), congestión, infiltración grasa, colangitis, colecistitis e hígado crecido (Chakraborty et al. 1987; Ding et al. 1987). El análisis de sangre algunas veces muestra niveles elevados de enzimas hepáticas, infiltración grasa hepática y cirrosis del hígado de pacientes que usaron solución de Fowler (Franklin et al. 1950). No hay evidencia de disfunción hepática de numerosos trabajadores expuestos a polvo de arsénico por inhalación (Ide et al., 1988).

1.2.10 EFECTOS RENALES

Como el hígado, el riñón acumula arsénico inorgánico durante exposiciones repetidas. Los riñones son la principal ruta de excreción del arsénico, así como el sitio principal de conversión del arsénico pentavalente (Armstrong et al. 1984). En humanos, los riñones parecen ser menos sensibles al arsénico que la mayoría de los otros órganos. Los efectos de organoarsenicales en el sistema renal humano no son reportados. Los sitios de daño por arsénico en el riñón incluye capilares, glomérulo y túbulos, lo cual conduce a hematuria y proteinuria (Clarkson et al. 1991), oliguria, shock y deshidratación con un riesgo de falla renal (Giberson et al. 1976), necrosis cortical y cáncer (Hopenhayn-Rich et al. 1998).

1.2.11 EFECTOS NEUROLÓGICOS

Numerosos estudios indican que la ingestión de arsénico inorgánico puede resultar en daño neuronal. Una exposición alta aguda (1 mg As Kg-1 por día o más) causa encefalopatía con síntomas como dolor de cabeza, letargia, confusión mental, alucinación, ataques y coma (Grantham, 1977).

Exposiciones crónicas e intermedias (0.05-0.5 mg As/ kg por día) causan neuropatía periférica simétrica, la cual comienza como adormecimiento de las manos y pies pero después puede degenerar en una sensación dolorosa de hormigueo (Wagner et al. 1979), nervio frenico bilateral asimétrico y neuropatía periférica de neuronas sensoriales y motoras causando dolor, pérdida de reflejos y debilidad muscular (Morton et al., 1989; Base et al. 1996).

1.2.12 EFECTOS INMUNOLÓGICOS

Los efectos en el sistema inmune por inhalación de arsénico no han sido bien estudiados. No se han detectado anomalías en los niveles de inmunoglobulinas en el suero de trabajadores expuestos a arsénico en una planta de combustión del carbón (Benko et al. 1988). A bajas dosis de arsenito (2×10^{-6} M) y arsenato (5×10^{-6} M), en un cultivo de linfocitos humanos su estimulación con fitohemaglutinina es incrementada 49% con arsenito y 19% con arsenato, pero a altas dosis de arsenito (1.9×10^{-5} M) y arsenato (6×10^{-4} M) la estimulación es completamente inhibida con un daño a la respuesta inmune (McMabe et al. 1983).

En un estudio realizado por Gonsebatt et al. en el cual se comparó la habilidad de replicación de los linfocitos en 33 individuos consumiendo agua con una concentración de arsénico de $37 \mu\text{g l}^{-1}$, el conteo de linfocitos de sangre periférica de los sujetos expuestos al metaloide se encontró ligeramente incrementado a los controles.

1.2.13 DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus ha sido asociada con el agua de bebida expuesta a arsénico. Lai et cols. calcularon la relación entre la ingestión de arsénico inorgánico y la prevalencia de diabetes mellitus en 891 adultos residentes en el sur de Taiwán. Este estudio encontró que residentes en el área endémica tienen un incremento dos veces mayor en la incidencia de diabetes mellitus.

Tsai et cols. reportaron un exceso en la mortalidad por diabetes entre la población expuesta a arsénico. La incidencia de diabetes mellitus en habitantes de áreas endémicas en Taiwán está relacionada con la exposición

acumulativa al arsénico en el agua de beber. Rahman et al. utilizaron la presencia de queratosis como un indicador de la exposición al arsénico y mostró un elevado riesgo para la diabetes en personas expuestas al arsénico en el agua de beber en Bangladesh. Dos estudios ocupacionales encontraron una asociación entre la exposición al arsénico y diabetes mellitus entre trabajadores del vidrio en Bangladesh (Rahman et al 1996).

1.2.14 GENOTOXICIDAD

El arsénico, como se ha visto, no se distingue por ser un mutágeno puntual en ensayos estándar. El arsenito de sodio no es mutagénico en cepas de *Escherichia coli* triptófano + revertientes o células de ovario de hamster chino (Rossman et cols. 1980)

Se han observado en células de hamster embrión (Kochhar et al, 1996; ; Lee et cols. 1985; Rossman et al, 1980), en linfocitos humanos (Jha et al. 1992), en hepatocitos humanos (Ramírez et cols. 2000), y fibroblastos (Donj et cols. 1993) aberraciones cromosómicas, entrecruzamientos DNA-proteínas, e intercambios de cromátides hermanas, después de la exposición a arsénico inorgánico.

La inhibición de la reparación puede ser un mecanismo básico para la comutagenicidad y presumiblemente la cocarcinogenicidad del arsénico.

Las aberraciones cromosómicas son caracterizadas por rompimientos, fragmentación y pérdida de cromátides, endoreduplicación y rompimientos cromosómicos. Estos efectos son dosis-dependiente y el arsenito es más potente que el arsenato (Hughes et al. 2002), sin embargo el DMA es genotóxico en mamíferos y células humanas y el MMA es menos potente que el DMA, y el TMAO es más potente en la inducción de arresto mitótico y

tetraploidías. Esto sugiere que la alta toxicidad mitótica reportada por los organoarsenicales en algunos estudios es una función de sus efectos de interrupción en la organización microtubular de la célula. (Mandal et al. 2002)

Los arsenicales orgánicos pentavalentes son genotóxicos en células (V79) de pulmón de hamster chino (Eguchi et al. 1997) y células de pulmón humanas (Tezuka et cols. 1993), pero requieren dosis muchos más altas que los arsenicales inorgánicos. Los efectos incluyen exceso de tetraploidias (DMA V, TMAO V), arresto mitótico (MMA V, DMA V y TMAO V), cortes en la cadena sencilla de DNA (DMA V), y entrecruzamientos DNA-proteínas (DMA V).

Mass et cols. (2001) mostró que los arsenicales trivalentes, MMA III y DMA III son genotóxicos directamente. El DMA III y el MMA III dañan linfocitos humanos, y son 386 y 77 veces más potentes, respectivamente, que el arsenito.

CAPITULO II

ARSÉNICO

2.1 METABOLISMO DEL ARSÉNICO

El metabolismo del arsénico tiene un papel importante en sus efectos tóxicos. El arsénico que ingresa al cuerpo por ingestión es rápidamente absorbido hacia el torrente sanguíneo y transportado principalmente al hígado. En este órgano, los compuestos de arsénico más comúnmente conocidos, arsenato y arsenito (los cuales son las formas aniónicas del ácido arsénico y ácido arsenoso, respectivamente) son metilados a dos derivados, el ácido monometilarsínico (MMA) y el ácido dimetilarsínico (DMA) los cuales junto con la especie no metilada son excretados en la orina (Vahter, 2002).

Muchas, pero no todas las especies de mamíferos metilan arsénico inorgánico. Entre poblaciones de humanos existe una diversificación en el índice de metilación de arsénico inorgánico y en algunas poblaciones étnicas como los Atacameños se han encontrado casos de tolerancia a altas concentraciones (Vather, 1995). Esta selección biológica de tolerancia al As puede estar basada en la prevalencia, en esas regiones, de la enfermedad de Chagas, ocasionada por *Tripanosoma cruzi*, el cual es muy sensible al As (Hopenhayn-Rich et al. 1996).

El arsénico inorgánico es metabolizado por un proceso secuencial involucrando una reducción de arsénico pentavalente a arsénico trivalente, seguido de metilación oxidativa a arsénico orgánico pentavalente (Thomas et al. 2001). La reducción puede ocurrir no enzimáticamente en presencia de un tiol, tal como glutatión. Sin embargo, el arsenato en el hígado humano y reductasas ácido monometilarsenato MMA^v han sido parcialmente purificados y la última enzima fue una glutatión-S-transferasa. La metilación del

arsénico es enzimática, requiriendo S-adenosilmetionina (SAM) y una metiltransferasa (Aposhian et al 2000).

El metabolito predominante del arsénico inorgánico, el ácido dimetilarsínico ((CH₃)₂As^VO(OH)), es rápidamente excretado por la mayoría de los mamíferos. El óxido trimetilarsino (TMAO, ((CH₃)₃As^VO)) es el producto final en la figura A, pero se encuentra en muy bajas cantidades en la orina.

Por muchos años, el ácido monometilarsenoso (MMA^{III}) y el ácido dimetilarsinoso (DMA^{III}) fueron propuestos como intermediarios en el metabolismo del arsénico. Recientemente, el MMA^{III} y el DMA^{III} fueron detectados en la orina de humanos crónicamente expuestos a arsénico inorgánico en el agua de bebida y la bilis de ratas a las que se les administró arsénico intravenosamente (Aposhian et al. 2000; Del Razo et al. 2001)

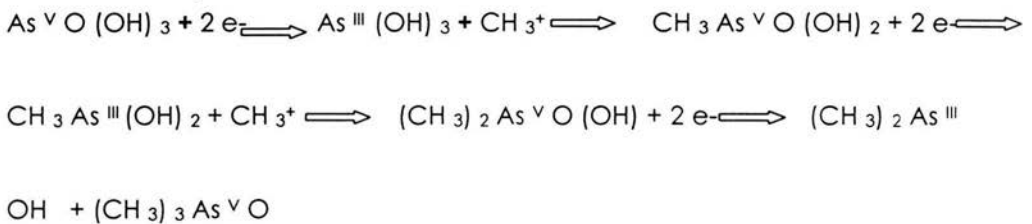
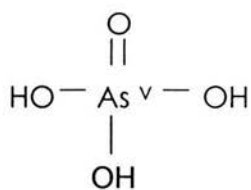
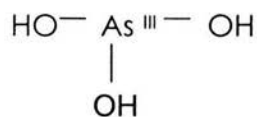


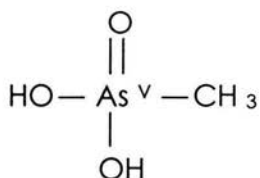
Fig. A Metabolismo del arsénico (Hughes,2002)



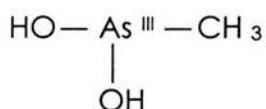
Ácido Arsénico



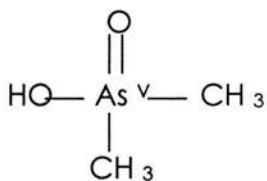
Ácido arsenoso



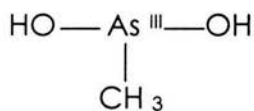
Ácido monometilarsínico



Ácido monometilarsenoso



Ácido dimetilarsínico



Ácido dimetilarsenoso

Figura B. Estructuras de algunos compuestos de arsénico relevantes toxicológicamente. (Hughes, 2002)

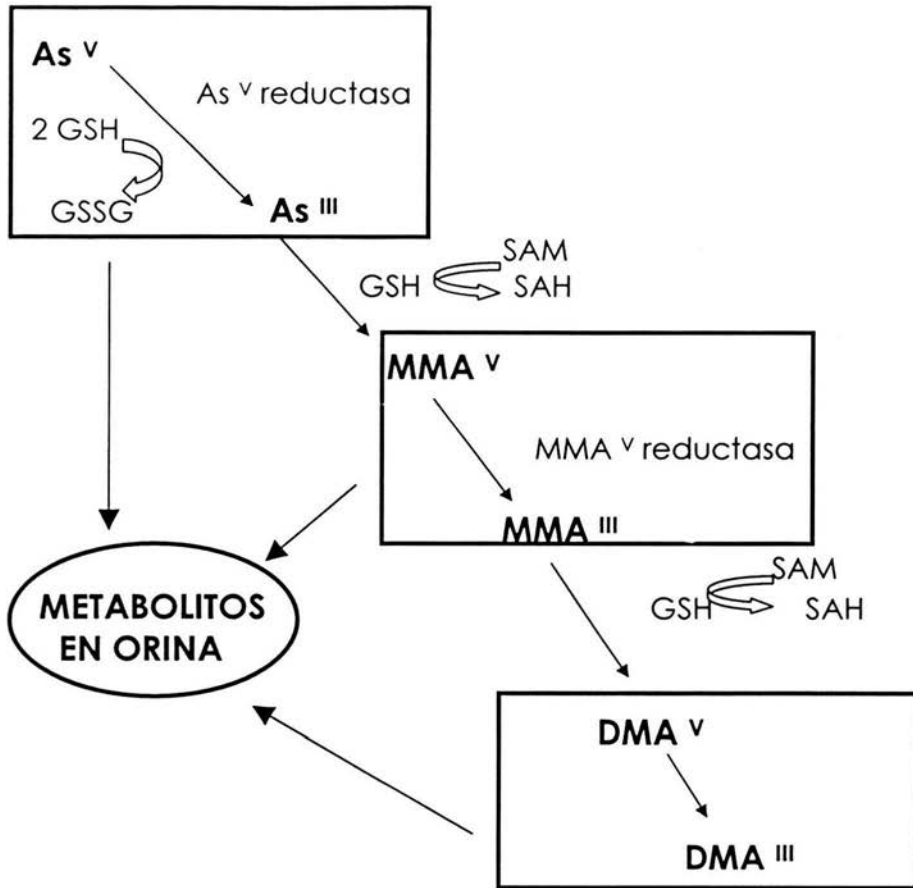


Figura C. Esquema simplificado del metabolismo del arsénico en algunos mamíferos incluyendo el humano (Kitchin, 2001).

2.2 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO PENTAVALENTE

El arsenato puede reemplazar fosfato en muchas reacciones bioquímicas debido a su estructura y propiedades similares (Dixon, 1997). El arsenato desacopla in vitro la formación de adenosin-5'-trifosfato (ATP) por un mecanismo de arsenólisis. A nivel de sustrato, la arsenólisis puede ocurrir durante la glicólisis. En un paso de la ruta glicolítica, el fosfato es unido enzimáticamente a D-gliceraldehído-3-fosfato para formar 1,3-bifosfo-D-glicerato. El arsenato puede reemplazar fosfato en esta reacción para formar el anhídrido 1-arsenato-3-fosfo-D-glicerato. Sin embargo, este anhídrido es inestable y se hidroliza a arsenato y 3-fosfoglicerato. La baja estabilidad del anhídrido arsénico puede ser debida al largo de la unión As-O, la cual es aproximadamente 10% más larga que la unión P-O. El ATP es generado durante glicólisis en la presencia de fosfato, pero no de arsenato (Dixon, 1997).

A nivel mitocondrial, la arsenólisis puede ocurrir durante fosforilación oxidativa. L-adenosin a 5'-difosfato-arsenato es sintetizada por partículas submitocondriales de adenosin-5'-difosfato (ADP) y arsenato en la presencia de succinato. Tanto a nivel de sustrato como a nivel mitocondrial, la arsenólisis disminuye in vitro la formación de ATP por el remplazo de fosfato con arsenato en las reacciones enzimáticas (Gresser, 1981).

El arsenato puede también reemplazar los fosfatos en el DNA y esto ocasiona la inhibición de los mecanismos de reparación del DNA. Tal acción puede explicar la clastogenicidad del arsénico, debido a que una unión arsenodiéster es más débil que la unión fosfodiéster normal. Sin embargo, no hay evidencia directa que muestre que el arsenato es incorporado en el DNA (Aposhian et al 2000).

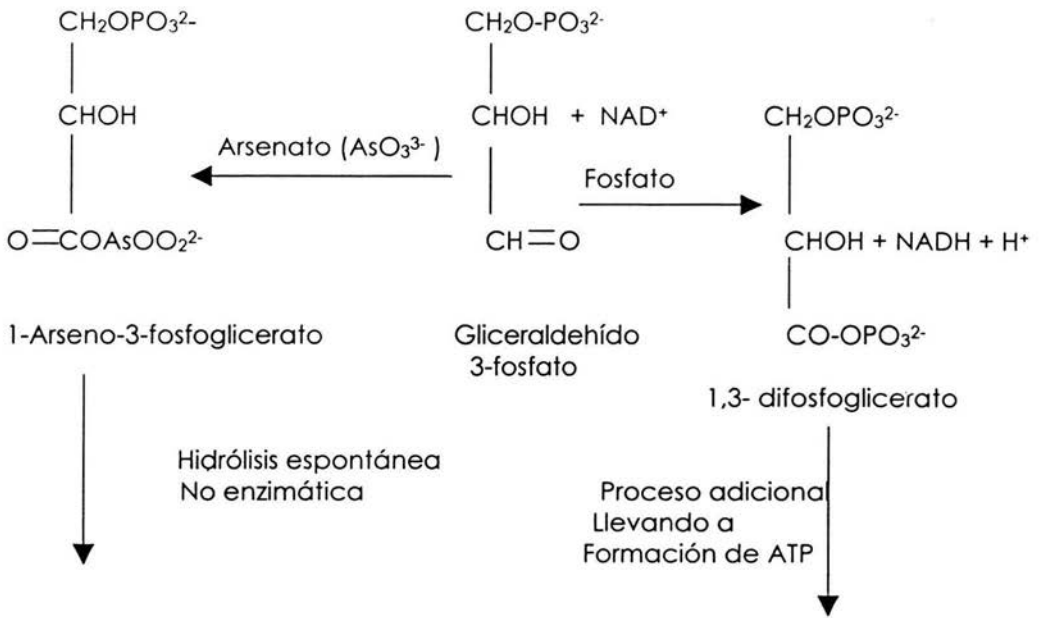


Figura D. Arsenólisis (Mandal et al., 2002)

2.3 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO TRIVALENTE

Grupos funcionales específicos en enzimas, receptores o coenzimas, tales como tioles o sulfhidrilos cercanos, juegan un papel principal en la actividad de estas moléculas. Los arsenicales trivalentes fácilmente reaccionan in vitro con moléculas que contienen un grupo tiol como GSH y cisteína (Scott et al. 1993).

La unión a proteínas in vitro ocurre principalmente con MMA^{III} y DMA^{III} que con las formas orgánicas pentavalentes. El arsenito tiene una mayor afinidad a los ditiolos que a los monotiolo. La unión del arsénico trivalente a grupos tiol importantes puede inhibir eventos bioquímicos importantes lo cual puede provocar toxicidad. Sin embargo, la unión de arsenito a sitios no esenciales en proteínas puede ser un mecanismo de toxicidad (Aposhian et al. 2000).

La piruvato deshidrogenasa (PDH) es un complejo multi-subunidad que requiere el cofactor ácido lipoico, un ditiol, para actividad enzimática (Peters, 1955). El arsenito inhibe PDH, tal vez, debido a la unión al ácido lipoico (fig. E). Se ha demostrado que el MMA^{III} es un inhibidor más potente de la PDH que el arsenito. La PDH oxida piruvato a acetil-CoA, un precursor para los intermediarios del ciclo del ácido cítrico. El ciclo del ácido cítrico degrada los intermediarios, y esto provee equivalentes reduciendo el sistema de transporte de electrones para la producción de ATP. La inhibición de PDH puede llevar a la disminución de ATP. También, los intermediarios del ciclo del ácido cítrico pueden ser usados en la gluconeogénesis (Szincz y Forth, 1998).

La fuerte unión entre el iAs^{III} y el sulfuro puede ser la razón por la cual el arsénico se acumula en la queratina de cabello y uñas. Se ha propuesto que el arsénico trivalente forma una estructura de anillo con los ditiolos vecinos de la queratina en el cabello (Peters et al. 1955). El arsénico inhibe enzimas, tales

como piruvato oxidasa, aminoácido-S-oxidasa, colina oxidasa y transaminasa. Aunque el iAs III es la forma más tóxica, el iAs V como el arsenato puede interrumpir las reacciones al competir con el fosfato.

Arsenicales trivalentes metilados como MMA III son potentes inhibidores de la GSH reductasa y tioredoxin reductasa. La inhibición puede ser debida a la interacción del arsénico trivalente con grupos tiol importantes en esas moléculas. La actividad de arsenicales trivalentes metilados es mayor que la del arsenito, MMA V y DMA V. La inhibición de esas enzimas puede alterar estados redox y eventualmente llevar a citotoxicidad (Styblo et al 1997).

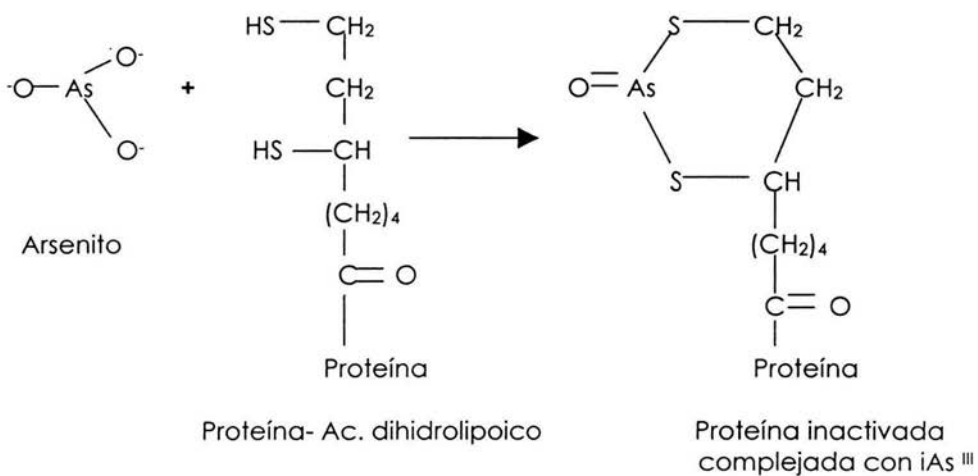


Figura E. Inhibición de piruvato deshidrogenasa por arsenito (Mandal et al., 2002).

CAPITULO III

ADUCTOS ADN-PROTEINAS

3.1 ESTIMACIÓN DE RIESGO

El modelo convencional para llevar a cabo evaluaciones de riesgo (Alatorre R, 1997) consta de cuatro fases : a) identificación del peligro, b) evaluación de la relación dosis-respuesta, c) evaluación de la exposición y d) caracterización del riesgo (Alatorre, 1997; IARC 1992).

a) Identificación del peligro

Incluye la recolección y evaluación de datos sobre el tipo de daños en la salud o de enfermedad que puede producir una sustancia y acerca de las condiciones de exposición en que se manifiesta el daño o la enfermedad (Alatorre, 1997; IARC 1992).

b) Evaluación de la relación dosis-respuesta

El siguiente paso en la evaluación de riesgos es la estimación de la relación dosis-respuesta para varias de las formas de toxicidad que pueden tener una determinada sustancia (Alatorre, 1997; IARC 1992).

c) Evaluación de la exposición

En esta etapa incluye la estimación de la cantidad de individuos expuestos a determinado agente ambiental así como de la magnitud, duración y frecuencia de la exposición (Alatorre, 1997; IARC 1992).

e) Caracterización del riesgo

Consiste en el análisis de la información obtenida en los pasos anteriores. Para ello, no solamente se deben tomar en consideración las estimaciones de riesgo realizadas para unas consideraciones específicas de exposición sino que se deben especificar las limitaciones de los supuestos de los que se partió y las incertidumbres cuantitativas y cualitativas que hayan surgido a lo largo de todo el proceso. (Alatorre, 1997; IARC,1992)

3.2 BIOMARCADORES

El monitoreo del medio ambiente y la evaluación del riesgo a la exposición de agentes xenobióticos, se realiza utilizando sistemas de pruebas biológicas. En ellos se intenta establecer la existencia, naturaleza o grado del daño tóxico provocado por un agente y da pautas acerca del mecanismo de acción a través de indicadores o biomarcadores (Ramírez, 2000).

Los marcadores biológicos o biomarcadores son los cambios medibles, ya sean estos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición a un tóxico (Universidad de Arizona, Centro de Toxicología).

Los biomarcadores se utilizan para:

- 1) detectar la presencia de una exposición.
- 2) determinar las consecuencias biológicas de la exposición.
- 3) detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico.
- 4) identificar a los individuos sensibles de una población.
- 5) fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

En el diseño de una rutina de muestreo es necesario considerar lo siguiente:

- 1) especificidad y sensibilidad del biomarcado.
- 2) dificultad de muestreo.
- 3) cinética de la formación del biomarcador y estabilidad.

Los biomarcadores más útiles son los que se pueden obtener menos invasivamente, por eso es que se prefieren los que se encuentran en sangre.

A continuación se describen varios tipos de biomarcadores :

3.2.1 Marcadores internos de dosis

Indican que el tóxico ha entrado al organismo. Proporcionan información cuantitativa sobre la exposición y corroboran el ingreso de tóxicos al organismo. Son los resultados de la dosimetría interna, o sea la concentración de los xenobióticos y sus metabolitos en los medios biológicos (Universidad de Arizona, Centro de Toxicología).

3.2.2 Marcadores de dosis biológicamente efectivas

Indican que el tóxico ya ha producido daños en el organismo. Son los compuestos de adición estables que forman el tóxico o sus productos de bioactivación con los ácidos nucleicos y proteínas (Universidad de Arizona, Centro de Toxicología). Cuando se encuentran compuestos de adición del ADN se puede concluir lo siguiente:

- 1 que el tóxico ha llegado a su blanco
- 2 que ha reaccionado con él y que probablemente ha producido una lesión la cual puede ser reparada o conducir a un daño permanente

Los productos de la bioactivación normalmente tienen una vida media muy corta y es difícil medir directamente su concentración. En este caso se determinan los marcadores de dosis biológicamente efectivas que producen. Los compuestos de adición de hemoglobina y albúmina son biomarcadores de dosis biológicamente efectivas muy convenientes debido a que se pueden obtener fácilmente de la sangre (Universidad de Arizona, Centro de Toxicología).

3.2.3 Marcadores de respuesta biológica

Representan estados avanzados del proceso de daño. Son más persistentes y a menudo representan alteraciones genéticas. Ejemplos de estos son las mutaciones de ciertos oncogenes y los intercambios entre cromátides hermanas (Universidad de Arizona, Centro de Toxicología).

3.2.4 Marcadores de enfermedades

Son manifestaciones preclínicas o tempranas de enfermedades, representan el último paso antes de que se establezca la enfermedad que produce la exposición. Los pólipos en el colon son un marcador de enfermedad ya que la continuación de la exposición puede conducir a la generación de un cáncer.

3.2.5 Marcadores de susceptibilidad

Se utilizan para identificar a los individuos más susceptibles a daños en una población. Algunos individuos tienen probabilidades más altas que otros de recorrer completo el camino exposición-enfermedad. Esto se puede deber a que tienen más activos los procesos de bioactivación o a que tienen disminuidas sus capacidades de detoxificar, de excretar o de reparar daños.

Ejemplo de un marcador de susceptibilidad es la actividad de la N-acetiltransferasa (NAT). Los individuos con una alta actividad NAT tienen un riesgo más alto si son expuestos a los compuestos que son bioactivados por NAT (por ejemplo 2-aminofluoreno). (Universidad de Arizona, Centro de Toxicología).

Los biomarcadores son muy útiles, pero es necesario validar la relación entre el nivel del biomarcador y la exposición. Los marcadores de respuesta biológica y de enfermedad no pueden identificar el tóxico que produjo el daño, pero sí indican al investigador qué el daño ha ocurrido y es necesario iniciar la intervención (Universidad de Arizona, Centro de Toxicología).

Cuando un organismo se expone a un agente tóxico

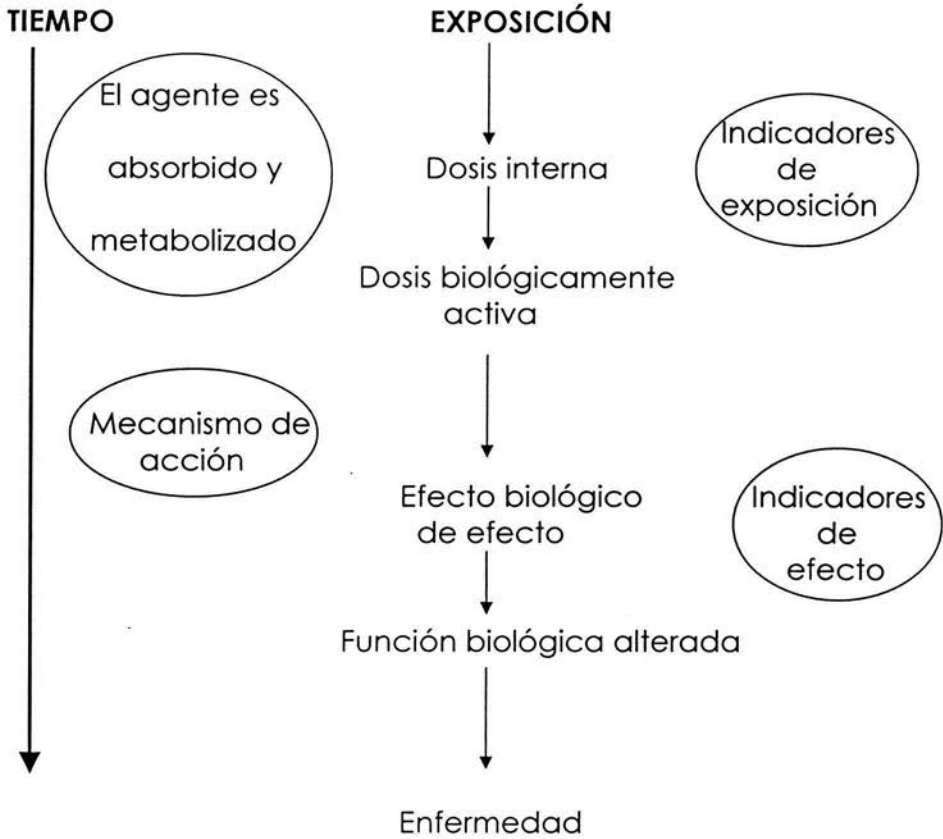


Figura E. Biomarcadores de exposición y efecto. Los indicadores de exposición nos van a señalar que un tóxico se ha introducido en el organismo a través de la cuantificación de su presencia en algún órgano o tejido, mientras que los indicadores de efecto nos señalan que el tóxico ha provocado un cambio medible u observable por medio de uno o diferentes mecanismos de acción.

3.3 ADUCTOS ADN-PROTEÍNAS COMO BIOMARCADORES

En las células, el ADN está fuertemente asociado con una variedad de proteínas, en la cromatina el ADN se encuentra en un complejo con histonas y muchas proteínas no histonas diferentes, que sirven tanto para mantener la organización estructural del material genético, así como para coordinar los procesos celulares incluyendo replicación, reparación, recombinación y transcripción (Minko et al. 2001).

Investigaciones en células de mamífero irradiadas muestran dos efectos de las proteínas: 1) Protegen al DNA de rompimiento de la cadena; 2) Se entrecruzan covalentemente con el DNA (Distel et al., 2002). Muchos compuestos endógenos (ej. metabolitos de peroxidación de lípidos) así como agentes ambientales son reactivos con el DNA y las proteínas, produciéndose de esta forma enlaces covalentes entre estos dos tipos de macromoléculas (Minko et al. 2001).

Los entrecruzamientos ADN-proteínas (DPC's) representan una forma relativamente abundante de daño al ADN haciéndose esto evidente en datos indicando que el nivel de DPC's en eritrocitos humanos se encuentran en un rango de 0.5 a 4.5 por 10^7 bases (Voitkun et al. 1999). Una acumulación de DPC's relacionada a la edad se observó en órganos de ratón (Izzotti et al. 1999), sosteniendo la hipótesis de que los mecanismos oxidativos contribuyen a la formación de este daño al ADN (Kulcharyk et al. 2001).

Los niveles de DPC's han sido propuestos como un indicador de efectos biológicos tempranos debido a que se ven dramáticamente incrementados después de la exposición de una variedad de agentes químicos, incluyendo luz U.V. (Shettlar 1980), radiación ionizante (Oleinick et al., 1987), β -propiolactona (Nietert et al. 1974), aldehídos (Voitkun et al., 1999), arsenito

(Ramírez et al. 2000), nitrilotriacetato férrico (Toyokuni et al., 1995), así como agentes quimioterapéuticos, tales como cisplatino (Miller et al., 1991). La exposición a numerosos agentes inductores de DPC's llevan el riesgo de producir efectos genotóxicos y carcinogénicos, y algunos agentes, como formaldehído, sus efectos mutagénicos primarios se creen que son mediante la formación de DPC's (Casanova et al., 1991).

El arsénico es reducido y metilado principalmente en las células del hígado a través de una serie de reacciones que requieren glutatión intracelular (GSH), generando un número de formas intermediarias reactivas, que pueden llevar a la formación de DPC's (Styblo et al., 1995). Para investigar y caracterizar los mecanismos de carcinogenicidad del arsénico, se han cuantificado los DPC de células hepáticas humanas WRL-68 tratadas con arsenito, probando la posibilidad que citoqueratinas o proteínas similares a citoqueratinas, debido a su alto contenido de grupos tiol (SH), puedan participar en estos entrecruzamientos. Por inmunoblot se identificaron numerosas citoqueratinas involucradas en los entrecruzamientos con el ADN, incluyendo la citoqueratina 18 (CK18), un filamento intermediario específico del hígado. Así mismo se encontró que la formación de DPC esta relacionada linealmente al arsénico intracelular, indicando que esto representa el efecto de la dosis intracelular de As (III). Debido a que la formación de DPC es dependiente de la presencia de arsenito podría ser usada para estimar la dosis efectiva y el daño temprano (Ramírez, 2000).

Existen estudios de químicos industriales como acetaldehído, diepoxibutano, paraformaldehído, y arsenito, en los que se ha encontrado una producción de DPC, originada por estos agentes en cultivos de células humanas de linfoma, encontrándose un incremento significativo a concentraciones citotóxicas (Costa, 1997).

La presencia de los DPC después de la exposición a estos agentes podría indicar dificultades en la eficiencia de los mecanismos de reparación, ya que estos entrecruzamientos de no ser removidos, estarían presentes durante la replicación del ADN, causando pérdida del material genético. Varios estudios indican la asociación de los DPC con rompimiento de las cadenas de ADN, intercambio de cromátides hermanas, transformación celular y aumento de la citotoxicidad, eventos cruciales en la carcinogénesis (Fornace et al. 1982; Bradley et al. 1979).

Cuando los DPC son inducidos por agentes como el cromato, son relativamente persistentes en las células y no se reparan rápidamente (Tsapakos et al. 1983), mientras que cuando los DPC son generados por el formaldehído o la radiación ionizante los entrecruzamientos son menos estables y se reparan más fácilmente (Oleinick et al. 1985; Speit et al. 2000).

Por otra parte, cuando el arsenito es removido de las células WRL-68 se encuentra una remoción o disminución en los niveles de DPC relacionados a la dosis. La remoción eficiente de DPC a bajas dosis sugiere la inducción de los mecanismos de reparación (Ramírez et al. 2001).

Las rutas bioquímicas para el reconocimiento y reparación de estas lesiones no son bien entendidas, debido, en parte, a las dificultades metodológicas en encontrar el sitio específico de unión de estos DPC (Minko et al. 2001).

Desde el reconocimiento del significado biológico de los DPC, hay datos muy limitados acerca de su reparación. Análisis de datos generados de cultivos celulares revelaron la existencia de mecanismos de remoción de DPC activos, sugiriendo más de una ruta de reparación involucrada (Fornace et al. 1982).

Debido a la amplia especificidad de sustrato hacia una variedad de lesiones de DNA, la reparación de escisión de nucleótido (NER) ha sido propuesta como potencialmente responsable de la remoción de los DPC, la cual procede inicialmente a través de una ruta de degradación proteolítica (Quiévryn et al. 2000). La reparación de escisión del nucleótido puede reparar el daño causado por grandes cambios en la estructura de la doble hélice del ADN, tales como las reacciones covalentes de las bases del ADN con grandes hidrocarburos (ej. benzo(a)pireno), así como dímeros de pirimidina (T-T, T-C, y C-C) causados por la luz solar. En esta ruta un gran complejo multienzimático reconoce la distorsión en la doble hélice del ADN, se lleva a cabo el desenrollamiento del ADN alrededor del sitio dañado, el complejo nucleasa multiproteína incide en los lados 5' y 3' de la cadena lesionada, se remueve el fragmento conteniendo la lesión, y por último se lleva a cabo la síntesis y ligación para formar un parche de aproximadamente 30 nucleótidos (Minko et al. 2001).

Existen estudios que apoyan el interés por proponer a los DPC como biomarcadores en la exposición a carcinógenos, debido a que son detectables a bajas dosis de agentes contaminantes o quimioterapéuticos (Fang-Yang W. et al. 2002). En el caso del formaldehído, los DPC se han detectado en concentraciones no citotóxicas o carcinogénicas y representa uno de los efectos genotóxicos primarios en tejidos blanco (Casanova et al. 1994). En cuanto al cromo, elemento carcinógeno, existen datos experimentales que permiten proponer a los DPC como biomarcador de exposición, debido a que se ha encontrado una correlación positiva entre el nivel de exposición a este agente y el incremento de cáncer de pulmón (Hughes et al. 1994). Por su parte Fang-Yang Wu propone que el incremento de los valores de DPC pueden ser utilizados como un biomarcador de riesgo de cáncer de mama.

CAPÍTULO IV

DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Son pocos los estudios dirigidos a investigar los aspectos citotóxicos de los entrecruzamientos ADN-proteínas inducidos por agentes ambientales, especialmente por metales o metaloides, además de contemplar la relación existente entre la presentación de estos efectos y las características de cada elemento.

Diversos estudios señalan la capacidad del arsénico para producir entrecruzamientos ADN-proteínas (Costa et al., 1996; Ramírez et al. 2000). Estos entrecruzamientos podrían ocurrir con algunas proteínas de la matriz nuclear y/o celular, originando el daño cromosómico observado *in vivo* e *in vitro*. Se sabe que el metabolismo del arsénico tiene un papel importante en sus efectos tóxicos. El arsénico ingresa al cuerpo por ingestión siendo rápidamente absorbido hacia el torrente sanguíneo y transportado principalmente al hígado en este órgano, los compuestos de arsénico más comúnmente conocidos, arsenato y arsenito, son metilados a dos derivados, el ácido monometilarsínico (MMA) y el ácido dimetilarsínico (DMA) los cuales junto con la especie no metilada son excretados en la orina (Hughes et al. 2002).

Considerando que estos eventos de bioactivación y detoxificación ocurren en este órgano, nos interesa conocer si el arsénico induce entrecruzamientos ADN-proteínas *in vitro* en rebanadas de hígado de ratones BALB/C después de una exposición aguda.

Así mismo es de nuestro interés saber si la exposición a arsénico induce la síntesis de glutatión el cual esta considerado como el principal reductor celular de naturaleza no proteica que protege a la célula de radicales libres, especies de oxígeno reactivas y de otras sustancias o agentes tóxicos.

Cabe mencionar que el uso de cortes o rebanadas de órganos en el estudio de la toxicidad temprana ejercida por agentes xenobióticos, representa un sistema versátil y novedoso, el cual permite la interacción célula-célula y la interacción célula-matriz, así como la preservación de cuatro importantes rutas en el metabolismo de agentes químicos (oxidación, glucuronidación, N-acetilación, y sulfatación) (Jayanthika, B. Et al. 2001; Kanter, R. Et al. 1998; Barr, J. Et al 1991).

Este sistema de prueba permite reducir la variabilidad interindividual ya que las rebanadas del tejido de un animal en particular, pueden utilizarse para un solo experimento.

4.2 HIPOTESIS

El arsénico es capaz de inducir aductos ADN-proteínas en rebanadas de hígado de ratón después de una exposición aguda.

4.3 OBJETIVOS

- 1)** Determinar la capacidad del arsenito de sodio de inducir aductos ADN-proteínas en cultivo de rebanadas de hígado de ratón después de una exposición aguda.
- 2)** Implementar el modelo de cultivo de rebanadas de hígado de ratón como sistema de evaluación del daño tóxico temprano inducido por el arsénico.
- 3)** Establecer si el arsenito de sodio a través de una exposición aguda induce un incremento en la concentración de GSH intracelular en las rebanadas de hígado de ratón.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Preparación y cultivos de rebanadas de hígado.

Los hígados de ratón se obtuvieron de ratones machos BALB/c sacrificados por dislocación cervical. Los hígados se extrajeron rápidamente en condiciones estériles y se colocaron en una caja petri conteniendo medio de cultivo DMEM suplementado con Suero fetal bovino al 12% y con 1% de aminoácidos esenciales. Las rebanadas se obtuvieron manualmente con un grosor entre 5-6 mm y se transfirieron a placas de cultivo. Los cultivos se incubaron a 37°C, 95% O₂ / 5% CO₂ durante 2 horas para normalizar las condiciones de cultivo. Transcurrido este período, las rebanadas se trataron con arsenito de sodio en el rango de concentraciones 5 X 10⁻⁵, 5 X10⁻⁷, 5 X10⁻⁹ M teniendo como control negativo rebanas de hígado sin tratamiento y como control positivo a las rebanadas tratadas con etanol a 10⁻⁴ M. Todos los tratamientos se administraron durante 3 horas, después de este tiempo se homogenizaron con 1.5 ml de PBS pH 7.2 con inhibidores de proteasas.

4.4.2 VIABILIDAD CELULAR

4.4.2.1 DETERMINACIÓN DE POTASIO

La viabilidad celular se determinó por medio de la cuantificación del índice de K⁺ intracelular/g de tejido. A 350 µl del homogenado se le adicionaron 700 µl de ácido sulfosalicílico 2%, se centrifugó 10 min. a 3000 rpm., se obtuvo el sobrenadante, el cual se sometió a sonicación para romper las células 1 min. por triplicado. Posteriormente se realizó una dilución tomando 250 µl de la muestra y se aforó a 25 ml con agua destilada. Se realizó una curva estándar

con concentraciones de 0.5, 2.5, 5.0, 7.5, y 10 ppm de potasio. La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro Varian GTA-100 spectrA-A.800 (Dogterom 1993).

4.4.3 DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO

Se determinó la concentración de glutatión reducido (GSH) como medida de la respuesta del sistema al metal. A 350 μ l del homogenado se le adicionaron 700 μ l de ácido sulfosalicílico para precipitar las proteínas presentes, se centrifugó 10 min. a 3000 rpm., se obtuvo el sobrenadante, posteriormente se rompieron las células por sonicación 3 veces durante 1 min. A 200 μ l de la muestra se le adicionaron 1.7 ml de buffer de fosfatos/ EDTA pH 8.0, más 100 μ l de o-ftaldialdehido (OPT) (Sigma) 0.1%, se incubaron 10 min. en la oscuridad a temperatura ambiente. La concentración de glutatión reducido se obtuvo por interpolación en una curva estándar de 10, 25, 50, y 100 ng de GSH construida a partir del estándar de GSH de 1 μ g/ml. La cuantificación se realizó por fluorescencia por el método descrito Hissin y Hilf 1976.

CURVA ESTANDAR PARA DETERMINACIÓN DE GSH

CONCENTRACIÓN (ng)	UNIDADES DE FLUORESCENCIA
10	10
25	30
50	60
100	104

$$r^2 = 0.99$$

4.4.4 PRECIPITACIÓN DE LOS COMPLEJOS ADN-PROTEÍNA

Los entrecruzamientos ADN-proteína se aislaron siguiendo el método descrito por Zhitkovich et al. 1992. A 800 μ l del homogenado se le adicionó 800 l de solución de lisis (SDS 2%, Tris-HCl 20 mM ,PMSF 1mM), se pasó la solución cuatro veces a través de una jeringa con aguja calibre 21. Una vez lisadas las células se incubaron 10 min. a 65 °C, después se colocaron en hielo durante 5 min., se centrifugaron 10 min. a 3000 rpm., se decantó el sobrenadante, y al precipitado se le agregó 1 ml de solución C (KCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM) repitiéndose este procedimiento 3 veces, después de la última centrifugación el precipitado se resuspende en 400 μ l de solución D (KCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 10 mM), se agregaron 30 μ l de proteinasa (0.2 mg/ml), se incubó 3 hr. a 50 °C, se adicionaron 40 μ l de albúmina (0.5 mg/ml) y se colocó en hielo por 5 min., se centrifugo 10 min. a 3000 rpm, obteniéndose el sobrenadante. A 150 μ l de la muestra se le adicionaron 12.5 μ l de solución de Hoechst 33258 (250 ng), más 890 μ l de solución D. Se incubaron 10 min. en la oscuridad. La cuantificación del ADN total y unido a proteínas se realizó por fluorescencia, utilizando un fluorometro TURNER 450.

CURVA ESTANDAR PARA DETERMINACIÓN DE ADN

	Concentración ng / ml	Y 1	Y 2	Y 3	Y 4
1	100	10	3	14	21
2	200	21	14	29	36
3	500	91	70	70	80
4	1000	142	148	146	148
5	2000	300	318	317	310
6	5000	721	810	746	664

$$r^2 = 0.99$$

4.5 RESULTADOS

En este trabajo, se estudió la inducción de complejos ADN-proteínas (DPC) en rebanadas de hígado de ratón BALB/c tratadas durante 3 horas con arsenito de sodio en dosis única en el rango de concentraciones de 5×10^{-9} , 5×10^{-7} y 5×10^{-5} M (Tabla 1 y Gráfica 1).

El incremento en la formación de DPC fue significativo en todas las concentraciones de As (ANOVA $F= 2.71$, $p < 0.05$). La proporción de DPC máxima observada se presentó en las concentraciones de 5×10^{-9} y 5×10^{-7} (tabla 1). La viabilidad de las rebanadas de hígado siempre fue superior al 80% (tabla 2).

Tabla 1. Entrecruzamientos ADN-proteínas inducidos por arsenito de sodio en rebanadas de hígado de ratón tratadas durante 3 hrs.

ARSENITO DE SODIO (M)	PROMEDIO	+/- ERROR ESTÁNDAR
0	7.16	3.81
5×10^{-9}	12.1	3.46
5×10^{-7}	11.90	3.6
5×10^{-5}	7.48	3.17
Etanol 1×10^{-4}	9.53	4.88

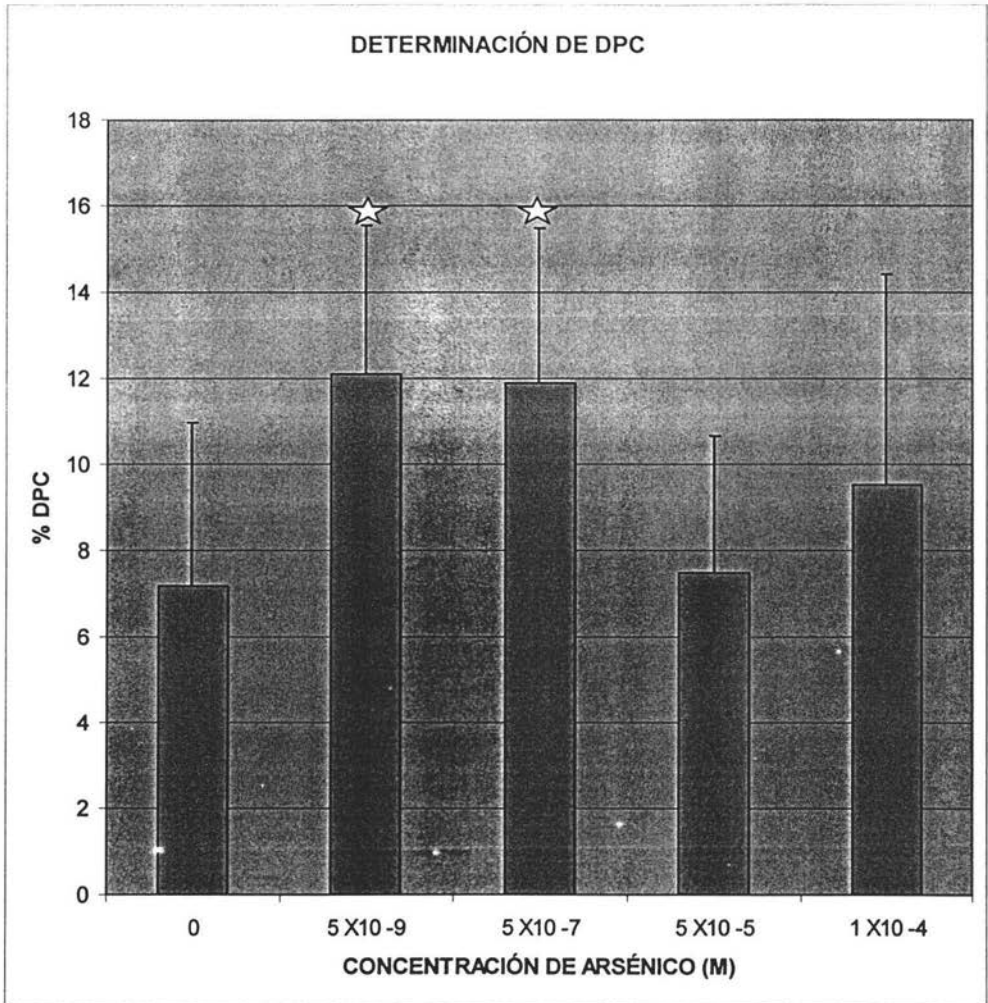


Figura1. Inducción de DPC en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito durante 3hrs. ANOVA, $F = 2.71$; $p < 0.05$). Promedio de 4 experimentos por duplicado +/- error estándar. ☆ resultados estadísticamente diferentes con respecto al control negativo.

Por otra parte como medida de la respuesta del sistema al estrés oxidativo del metal se determinó la concentración intracelular de glutatión reducido (GSH). Observándose un incremento en la concentración de 5×10^{-9} M.

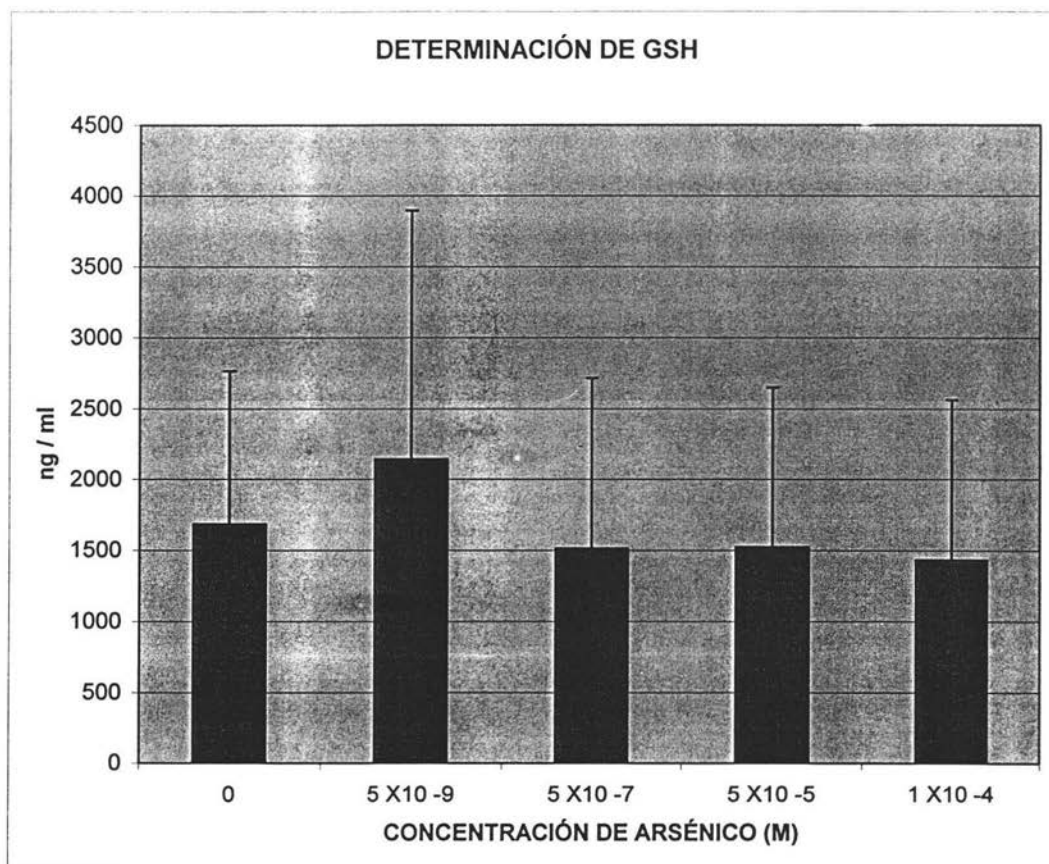


Figura 2. Determinación de glutatión reducido (GSH) en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito de sodio por 3 hrs (ANOVA H=577; $p < 0.05$)

Para establecer la viabilidad de las rebanadas de hígado de ratón se determinó la concentración de potasio intracelular. Se puede observar que tanto en las rebanadas inducidas como en los controles la concentración de potasio es mayor hasta 50 veces a $40 \mu\text{moles} / \text{g}$ de tejido, siendo esta la cantidad mínima para considerar las células viables (Fisher et al 1995).

Tabla 2. Concentración de potasio en rebanadas de hígado de ratón inducidas por arsenito de sodio tratadas durante 3 hrs.

ARSENITO DE SODIO (M)	PROMEDIO	+/- ERROR ESTÁNDAR
0	401.24	110.14
5×10^{-9}	273.43	144.62
5×10^{-7}	355.95	191.48
5×10^{-5}	259.12	66.68
Etolol 1×10^{-4}	255.30	80.58

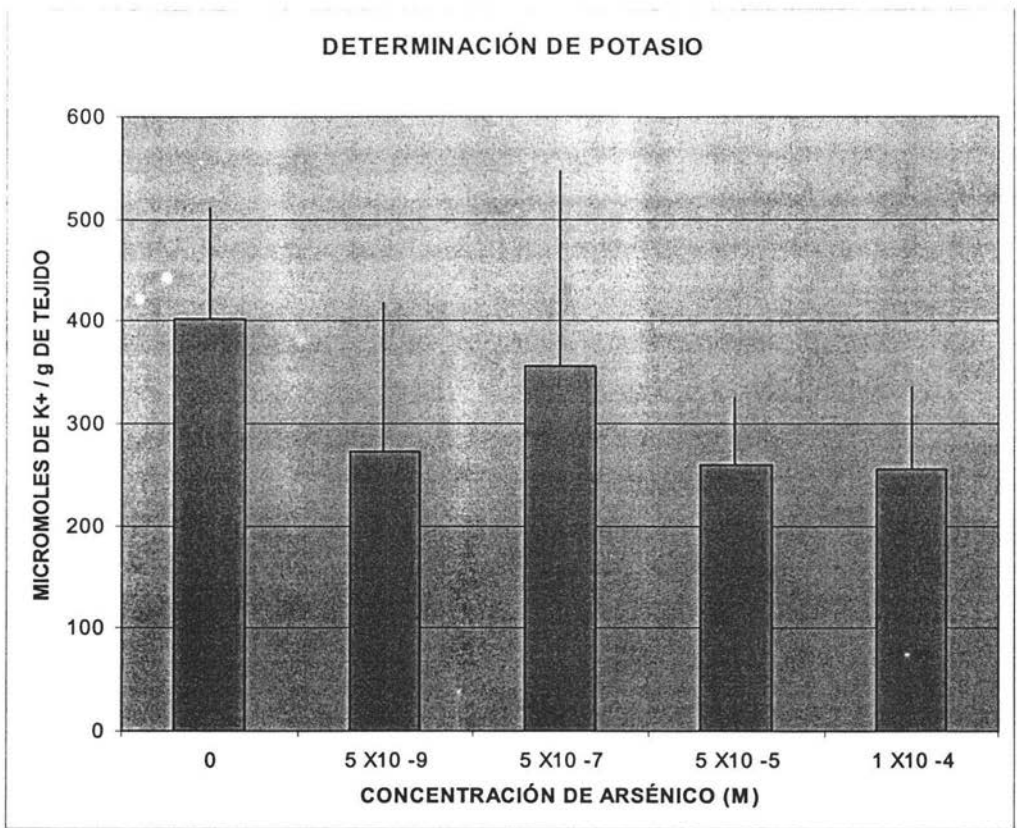


Figura 3. Concentración de potasio en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito de sodio durante 3hrs.

ANOVA H = 204.10 ; p > 0.05

Considerando que existen reportados modelos experimentales como el cultivo de linfocitos y las células WRL-68 sensibles a las concentraciones evaluadas y en los que la viabilidad está por abajo del 70%, decidimos probar la respuesta del cultivo de rebanadas de hígado en un rango de dosis menor para conocer los efectos ejercidos por el arsénico en relación a la capacidad de inducir complejos ADN-proteínas en rebanadas viables. Con el fin de diferenciar el efecto del arsenito a una concentración menor, se determinó la proporción de entrecruzamientos ADN-proteínas en las rebanadas de hígado de ratón. Encontrándose la mayor cantidad de DPC a la concentración de 1×10^{-9} M.

Tabla 3. Entrecruzamientos ADN-proteínas inducidos por arsenito de sodio en rebanadas de hígado de ratón durante 3 hrs.

ARSENITO DE SODIO (M)	PROMEDIO	+/- ERROR ESTÁNDAR
0	7.16	3.81
1×10^{-9}	12.91	3.7
1×10^{-7}	9.21	4.68
1×10^{-5}	10.91	0.19
1×10^{-4}	9.53	4.88

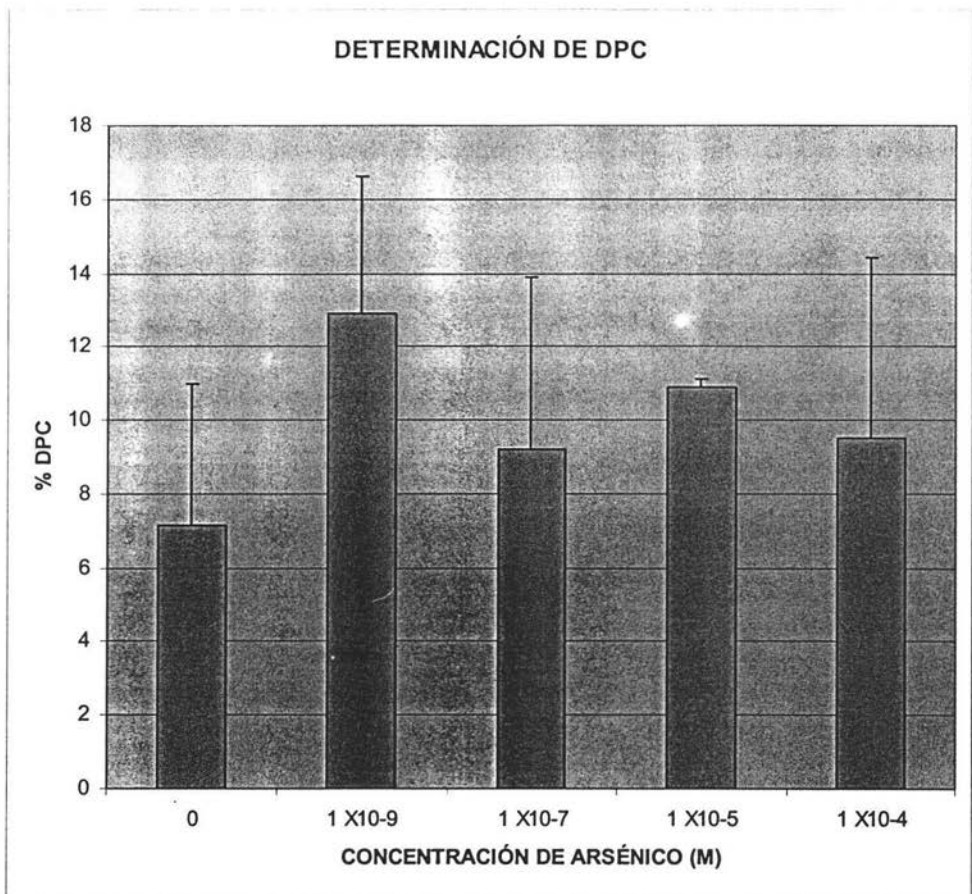


Figura 4. Inducción de DPC en rebanadas de hígado de ratón BALB/c tratadas con arsenito de sodio durante 3 hrs. 1 experimento por duplicado +/- error estándar.

Se determinó la concentración de glutati6n reducido (GSH) en las rebanadas de h6gado de rat6n a concentraciones inferiores de arsenito. Observ6ndose un comportamiento lineal.

Tabla 4. Inducci6n de GSH en rebanadas de h6gado de rat6n tratadas con arsenito de sodio durante 3 hrs.

ASENITO DE SODIO	PROMEDIO	+/- ERROR EST6NDAR
0	1689.15	1081.54
1 x10-9	2337.46	275.98
1 x10-7	2186.5	60.81
1 X10-5	1753.07	398.63
1 x10-4	1432.32	1131.49

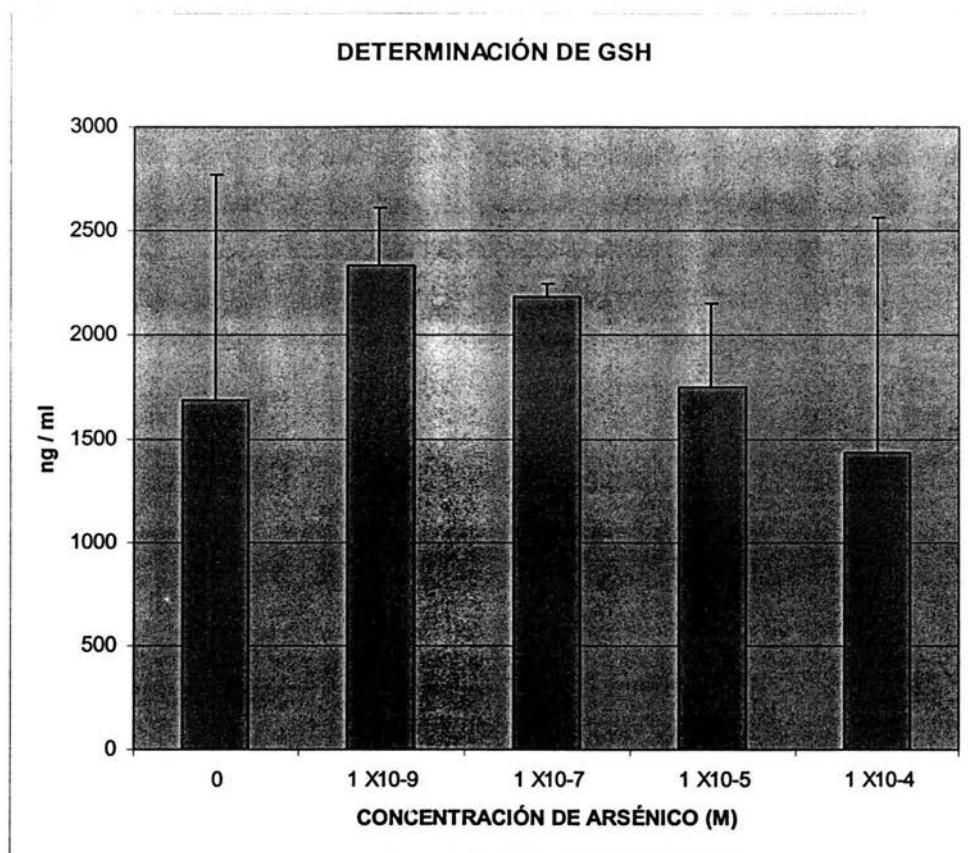


Figura 5. Inducción de GSH en rebanadas de hígado de ratón tratadas con arsenito de sodio durante 3 hrs. Promedio de 1 experimento por duplicado +/- error estándar.

4.6 DISCUSIÓN

Los entrecruzamientos ADN-proteínas (DPC) se encuentran en sistemas biológicos como resultado de la exposición a una variedad de agentes químicos y físicos, muchos de los cuales son carcinógenos conocidos o sospechosos (Minko et al. 2002). Consecuentemente los DPC representan un tipo de daño genético cuyo significado biológico es aún escaso, sin embargo han sido propuestos como biomarcadores, debido a la capacidad de detectarse a bajos niveles de exposición a xenobióticos (Fang-Yang et al. 2002)

El estudio de las características de los DPC con el fin de dilucidar el significado biológico de esta lesión al ADN en términos de carcinogenicidad, mutagenicidad o citotoxicidad está poco estudiado a pesar de que son numerosos los agentes inductores, siendo muchos de estos agentes químicos industriales y/o contaminantes ambientales. Teniendo este conocimiento como antecedente resulta relevante el estudio de estas lesiones, además de que si agentes carcinógenos como el arsénico inducen DPC, la determinación de sus características ayudará a conocer aspectos acerca de los mecanismos de acción.

En este trabajo, se demostró que el arsenito de sodio induce la formación de entrecruzamientos ADN-proteínas *in vitro* en las rebanadas de hígado de ratón de la cepa BALB/c. La formación de los DPC se vio incrementada en las concentraciones de 5×10^{-9} y 5×10^{-7} , siendo mínima la diferencia entre ambas (tabla 1), observándose un comportamiento sublineal con la dosis. Con estos resultados se puede afirmar que el arsenito de sodio induce entrecruzamientos ADN-proteínas en hepatocitos de ratón y que la vinculación del ADN con proteínas que normalmente no se encuentran asociadas a él, se propicia por

la presencia del arsenito de sodio, además de que estas células fueron capaces de formar DPC en un tiempo corto de exposición (3 hrs.). Este efecto puede atribuirse a la presencia del Asi, debido a que en estudios toxicocinéticos de exposición a dosis únicas de Asi (30 μM), la presencia de compuestos arsenicales en el hígado de ratones es de 58% como Asi, 8% como MMA y de 34% como DMA (Kenyon et al. 1999), además de que se tiene conocimiento de que en dosis elevadas, la metilación del arsénico se inhibe o puede saturarse aumentando la cantidad de la especie inorgánica en el tejido (Stybło et al. 1999). El hecho de que en la concentración intermedia y menor de arsenito se encuentren la mayor cantidad de DPC, concuerda con resultados reportados previamente en fibroblastos de pulmón fetales (Dong et al. 1994; 1993) donde la concentración intermedia es la principal inductora de DPC, este efecto puede atribuirse a la puesta en marcha de los mecanismos de reparación, ya que basándose en estudios realizados por Dong et al. se propone que el arsénico no inhibe los pasos de escisión y polimerización en la reparación del ADN, sugiriendo que el arsénico puede incrementar la mutagenicidad de otros compuestos por inducción de entrecruzamientos ADN-proteínas más que por inhibición de la reparación, desempeñando estas interacciones ADN-proteínas una función principal en la carcinogenicidad del arsénico, además de que la inducción de rompimientos de las cadenas del ADN asociadas a proteínas puede proveer una explicación para las aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátides hermanas inducidas por arsénico *in vivo* e *in vitro* (Dong et al. 1993)

Comparando los resultados obtenidos a concentraciones elevadas de arsénico (5×10^{-9} a 5×10^{-5} M) con los obtenidos a concentraciones inferiores (1×10^{-9} a 1×10^{-5} M), se observa que el comportamiento es similar, pues la cantidad mayor de DPC se da en la concentración menor (1×10^{-9} M) de

arsénico. Algo que resulta relevante es el hecho de que la cantidad de DPC obtenidos es similar a ambas concentraciones, sugiriendo que esta tiene un grado máximo de inducción independientemente de la dosis.

El principal sitio de detoxificación del arsénico es el hígado, en el cual se encuentran las enzimas responsables de su biotransformación, en reportes previos se ha encontrado que a dosis altas de arsénico, este disminuye su proceso de metilación, debido probablemente a la inhibición de la actividad de las metiltransferasas, y/o por disminución en el consumo del donador de grupos metil S-adenosilmetionina (Zakharyan et al. 1999); esta inhibición causa la disminución de la formación de DMA en el citosol de hígado de rata, en hepatocitos humanos y de ratón, así como en rebanadas de hígado de ratón (Styblo et al. 1996, 1999; Georis et al. 1990; Buchet et al. 1985), acumulándose el As^{III} en el órgano. El As^{III} es transportado a la bilis de una forma dependiente de GSH, considerando la elevada afinidad del arsénico por residuos sulfhidrilo, es importante mencionar que el GSH por sus propiedades químicas (tripéptido : γ -Glu-Cys-Gly) puede unirse al As³⁺, formando un complejo triglutatión-As^{III}, reduciendo la probabilidad de interacción entre el arsenito y los grupos sulfhidrilo de enzimas o proteínas susceptibles a constituir los DPC (Thompson et al. 1993). El arsénico a altas dosis, se une a proteínas, siendo esta una posible causa de que a dosis mayores no se vio un incremento en la formación de DPC, pues el arsénico puede estar formando complejos por interacción directa con las proteínas, como las citoqueratinas (grupo de proteínas ricas en grupos sulfhidrilo) las cuales se unen al ADN formando los DPC (Ramírez et al. 2000). La disminución de GSH dependiente de la dosis puede ser un mecanismo oculto, debido a que la disminución de GSH podría permitir una mayor interacción del As^{III} con los tioles de proteínas y/o enzimas causando disminución de ATP y desorden energético, resultando con esto que el As^{III} a una dosis aguda alta, es la principal especie tóxica,

debido a su incompleta eliminación y por lo tanto acumulación en el órgano (Csanaky et al. 2003) Aunque, por otra parte, si consideramos que el aumento en la cantidad de GSH observado estuvo en relación con la concentración que indujo la mayor cantidad de DPC, se podría sugerir que este efecto es ocasionado posiblemente por la puesta en marcha de los mecanismos protectores de detoxificación por parte de las células, así como se observa un incremento en la concentración de GSH, a las concentraciones menores de arsénico 1×10^{-9} , 1×10^{-7} , 1×10^{-5} M y esta va disminuyendo conforme aumenta la dosis de As^{III} , debido probablemente a la formación de complejos glutatión-As. Sin embargo resulta importante resaltar que esto ocurrió a las menores concentraciones de tratamiento con arsénico, siendo posible que el arsénico a concentraciones mayores si induzca una disminución en la cantidad de GSH intracelular, debido posiblemente a que el arsénico inhibe a ciertas concentraciones la glutatión reductasa, aumentando con esto la presencia de GSSG (glutatión oxidado) disminuyendo por tanto el reducido. Otro mecanismo que pudiera estar relacionado con esta reducción de GSH a elevadas concentraciones de arsénico, es el efecto inhibitorio en la biosíntesis de novo de glutatión, debido a una disminución en la cantidad de sustratos precursores (ej. cisteína, glicina) por unión directa del As^{3+} a estos aminoácidos. También se propone una inhibición directa ejercida por el metaloide sobre la expresión del RNAm para gama glutamil cisteína sintetasa o por disminución en la su actividad catalítica (Gallagher et al., 2000).

Por otra parte considerando la variabilidad con la que se han encontrado los estudios de toxicidad de xenobióticos, es importante resaltar que el modelo de estudio de rebanadas de órganos, utilizado en este proyecto, es una *sistema in vitro* versátil, económico y confiable, debido a que preservó la arquitectura estructural del hígado, así como las interacciones célula-célula y las interacciones matriz-célula, asimismo ha demostrado ser un método

sensible, pues como nos muestra la tabla 2 ocurre una disminución en la concentración de potasio en las rebanadas inducidas (aunque se mantienen viables por arriba del 80%), en comparación con el grupo control. Otra ventaja que presenta es que las rebanadas de hígado de un animal pueden ser usadas para un experimento, tanto para el grupo control como el tratado, reduciendo de esta manera la variabilidad, de igual manera podemos decir que a pesar de que los cortes fueron realizados de forma manual estas siempre se mantuvieron con un grosor entre 5 y 6 mm, siendo el reportado de 8 mm (Kanter et al 1998; Olinga et al. 1997; Dogterom, 1993), ayudando con esto a una mejor oxigenación del tejido y absorción de los nutrientes del medio; sin olvidar que son de fácil manejo y bajo costo de mantenimiento.

Finalmente, podemos decir que el estudio del arsénico resulta relevante, debido a la gran cantidad de personas expuestas a este agente en diversos países, siendo de nuestro particular interés México, en donde es necesario fomentar el conocimiento sobre las causas y riesgos de la exposición, pero sobre todo desarrollar formas de prevención, siendo para esto necesario la comprensión acerca de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la toxicidad. Con este trabajo se pretende hacer una aportación en este conocimiento demostrando que el arsénico induce entrecruzamientos ADN-proteínas, los cuales podrían utilizarse como un tipo de biomarcador a una exposición aguda a este metaloide, además de que se pueden llevar a cabo estudios de toxicidad confiables en modelos experimentales sencillos y eficientes.

4.7 CONCLUSIONES

1. El arsenito de sodio induce entrecruzamientos ADN-proteínas en el cultivo de rebanadas de hígado de ratón BALB/c, después de una exposición aguda.
2. El arsenito de sodio a dosis de 5×10^{-9} aumenta la concentración de glutatión reducido (GSH) intracelular.
3. La concentración de glutatión reducido (GSH) en el cultivo de rebanadas de hígado de ratones BALB/c es mayor cuando el tejido se expone a dosis de 1×10^{-9} , 1×10^{-7} y 1×10^{-5} M que a dosis de 5×10^{-5} , 5×10^{-7} , 5×10^{-9} M.
4. El modelo de rebanadas de hígado de ratón es un sistema útil en el estudio de la toxicidad temprana inducida por arsénico.

4.8 PERSPECTIVAS

Considerando los hallazgos obtenidos acerca de la capacidad inductora de entrecruzamientos ADN-proteínas (DPC) por arsénico *in vitro*, así como de la escasa información acerca de su significado biológico y de las consecuencias de su formación, es importante continuar con el estudio de los mecanismos involucrados en su formación.

Para considerar a los DPC como biomarcadores de efecto, es necesario el estudio de más agentes potencialmente inductores de DPC tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* en exposiciones crónicas y agudas, para esclarecer el mecanismo de inducción, así como la correlación de efectos observados como consecuencia de la exposición.

Sería importante conocer algunas de las proteínas asociadas con este tipo de daño genético, así como determinar el tipo de enlace que se está dando entre el ADN y algunas proteínas. Y si el daño a ambas biomoléculas compromete su funcionalidad y estructura.

De igual forma resulta notable conocer la cinética de formación de este tipo de lesión y determinar si el daño celular observado se repara y mediante que mecanismo (s) se lleva a cabo. Todo esto debido a que los DPC representan un tipo de daño genético poco entendido y sus repercusiones a nivel celular y/o tisular requieren de estudio para apoyar la posibilidad de considerarse lesiones genéticas tempranas en el proceso carcinogénico asociado a exposiciones arsenicales.

4.9 REFERENCIAS

Alatorre, L.A. (1997) Introducción a la Toxicología Ambiental. Organización Panamericana de Salud (OPS) y Gobierno del Estado de México, Secretaría de Ecología.

Aposhian, H.V.; Zheng, B.; Aposhian, M.M.; Le, X.C.; Cebrian, M.E.; Cullen, W.; Zakharyan, R.A.; Ma, M.; Dart, R.C.; Cheng, Z. DMPS-arsenic challenge test II. Modulation of arsenic species, including monomethylarsonous acid (MMA III), excreted in human urine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166 (2000) 74-83.

Armstrong, C.W.; Stroube, R.B.; Rubio, T.; Beckett, W.S. *Arch. Environ. Health* 39 (1984) p.274.

Barr, J.; Weir, K; Brendel, I. Liver slices in dynamic organ culture. An alternative in vitro technique for the study of rat hepatic drug metabolism. *Xenobiotica* 21 (1991) 331-339.

Base, D.; Das Gupta, J. Mukherjee, D.N. Guha Mazumder, J. *ANEI* (1996) p. 45

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

Benko, V.; Wagner, V.; Wagnerova, M.; Batora, J.; Hyg, J. *Epidemol. Microbiol. Immunol.* 32 (1988) p. 137.

Borgono, J.M.; Vincent, P.; Venturino, H. *Environ. Health Perspect.* 19 (1977) p.103.

Bowen H.J.M., Trace Elements in Biochemistry, Academic Press, London and New York, (1966) p. 16, 19, 31, 39, 75, 174, 175.

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

Bradley, M.O., Hsu, I.C. Relationships between sister chromaid exchange and mutagenicity, toxicity and DNA damage, Nature 282 (1979) 318-320.

Buchet, J.P.; Lauwerys, R.; Roels, H. Comparision of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsonate in man. Int. Arch. Occup. Environ. Health 48 (1981) 71-79.

Casanova, M.; Morgan, K.T. Steinhagen, W.H. Covalent binding of inhaled formaldehyde o DNA in the respiratory tract of Rhesus monkey: Pharmakocinetics rat-to- monkey interspecies sealing and extrapolation to man, Fund. Appl. Tox. 17 (1991) 409-428.

Casanova, M.; Morgan, K.T.; Steinhagen, W.H.; Everitt, J.I. Fundam. Appl. Toxicol. 17 (1991) 409-428.

Cebrian, M.E.; Albores, A.; Aguilar, M.; Blakely, E. Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. Hum. Toxicol. 2 (1983) 121-133.

Chakraborty, A.K.; Saha, K.C.; Indian J. Med. Res. 85 (1987) p. 326.

Chattopadhyay, S.; Bhaumik, S.; Nag Chaudhuri, A.; Das Gupta, S. Arsenic induced changes in growth development and apoptosis in neonatal and adult brain cells in vivo and in tissue culture. *Toxicol. Lett.* 128 (2002) 73-84.

Chattopadhyay, S.; Bhaumik, S.; Purkayastha, M.; Basu, S.; Chaudhuri, A.N. y Das Gupta, S. Apoptosis and necrosis in developing brain cells due to arsenic toxicity and protection with antioxidants. *Toxicology Letters* 136 (2002) 65-76.

Chen, C.J.; Hsueh, Y.M.; Lai, M.S.; Shyu, M.P.; Chen, S.Y., Wu, M.M.; Kuo, T. L. *Hypertension* 25 (1995) p.53.

Clarkson, T.W. Inorganic and organometal pesticides, in: W.J. Hayes Jr. (Ed.), *Handbook of pesticide toxicology*, Academic Press, San Diego (1991) 545-552.

Costa, M; Zhitkovich, A.; Garjas, M., Paustenbach, D.; Finley, B.; Kuykendall, J. ; Billings, R. ; Carlson, T.J.; Wetterhahn, K; Xu, J.; Patierno, S y Bogdanffy, M., Interlaboratory validation of new assay for DNA-protein crosslinks. *Mut. Res.* 369 (1996) 13-21.

Costa, M; Zhitkovich, A.; Harris, M.; Paustenbach, D.; Garjas, M. DNA protein crosslinks produced by various chemicals in cultured human lymphoma cells. *J. of Toxicol. Env. Health* 50 (1997) 433-449.

Csanaky I.; Baláz, N. ; Zoltán, G. Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats not S-adenosylmethionine depletion impairs arsenic methylation at high dose. *Toxicology* 183 (2003) 77-91.

Cullen, W.R.; McBride, B.C.; Manji, H.; Pickett, A.W.; Reglinski, J. The metabolism of methylarsine oxide and sulfide. *Appl. Organomet. Chem.* 3 (1989) 71-78.

Das, D.; Chatterjee, B.K.; Mandal, G.; Samanta, Q.; Chakraborti, D. Arsenic in

groundwater in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. *Analyst* 120 (1995) 917-924.

Davidson, C.I.; Goold W.D.; Mathison, T.P.; Wiersma, K.W.; Reilly, M.T. *Environ. Sci. Technol.* 19 (1985) 27.

Del Razo, L.M.; Styblo, M. ; Cullen, W.R.; Thomas, D.J. Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 174 (2001) 282-293.

Ding, G. et al. *J. China Med. Univ.* 16 (1987) p. 368.

Distel, L.; Distel, B.; Schussler, H. Formation of DNA double-strand and DNA-protein crosslinks by irradiation of DNA in the presence of a protein. *Radiation Physics and Chemistry* 65 (2002) 141-149.

Dixon, H.B.F., *Adv. Inorg. Chem.* 44 (1997) p. 191.

Dogterom, P. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices.

Dong Jin-Tang; Luo Xian-Mao. Arsenic-induced DNA-strand breaks associated with DNA--protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. *Mutation research* 302 (1993) 97-102.

Dong Jin-Tang; Luo Xian-Mao; Effects of arsenic on DNA damage and repair in human fetal lung fibroblasts, *Mutation research* 315 (1994) 11-15.

Eguchi, N.; Kuroda, K.; Endo, G. Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32(1997) 141-145.
Environmental Protection Agency, Ambient Water Quality Criteria for Arsenic, U.S. Environ. Prot. Agency Rep., 440/5-80-021, (1980) p. 1.

Falk, H.; Caldweel, G.G.; Ishak, K.G. Arsenic-related hepatic angiosarcoma. *Am. J. Ind. Med.* 2 (1981) 43-50.

Fang-Yang Wu, Yi-Ju Lee, Dar-Ren Chen, Association of DNA-protein crosslinks and breast cancer, *Mutation Research* 501 (2002) 69-78.

Feed Additive Compendium, vol. 13, Munneapolis, The Miller Publishing Company, (1975) p. 330.

Fisher, R. L.; Shaughnessy, R. P.; Jenkins, P.M. Austin, M.L.; Roth, G. L. Gandolfi, A.J. y Brendel, K. Dynamic organ culture is superior to multiwell plate culture for maintaining precision-cut tissue slices: optimization of tissue slice culture, part. I. *Toxicol. Methods* 5 (1995) 99-113.

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

Fornace, A.J., Detection of single-stranded breaks produced during the repair of damage by DNA-protein cross-linking agents, *Cancer Res.* 42 (1982) 145-149.

Franklin, M.; Bean, W; Harden, R.C. *Am. J. Med. Sci.* 219 (1959) p.589.

Georis, B.; Cardenas, A.; Buchet, J.P.; Lauwerys, R.R.; Inorganic arsenic methylation by rat tissue slices. *Toxicology* 63 (1990) 73-84.

Giberson, A.; Vaziri, N.D.; Mirahamadi, K.; Rosen, S.M. Arch. Intern. Med. 136 (1976) p.1303.

Goebel, H.H.; Schmidt, P.F.; Bohl, J.; Tettenborn, B.; Kramer, G.; Guttman, L. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 49 (1990) p. 137.

Gonsebatt, M.E.; Vega, L.; Montero, R.; Garcia-Vargas, G.; Del Razo, L.M.; Albores, A. Mut. Res. 313 (1994) p. 293.

Grantham, D.A.; Jones, J.F. J. Am. Water Works Assoc. 69 (1977) p. 653.

Gresser, M.J., ADP-arsenate. J. Biol. Chem. 256. (1981) 5981-2983.

Guha Mazumder D.N. J. Indian Med. Assoc. 99 (2001) p.311.

Guha Mazumder D.N.; Das Gupta J.; Santra, A.; Ghose, A.; Sarkar, S. Non-cancer effects of chronic arsenicosis with especial reference to liver damage, in: C.O. Abernathy, R.L. Calderon, W.R. Chappell (Eds.), Arsenic Exposure and Health Effects, Chapman and Hall, London (1997) p. 112.

Guidelines for drinking water quality, Recommendations, 2nd ed., vol.2, World Health Organisation, Geneva (1996).

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

Hernández-Zavala, A.; Del Razo, L.M.; Aguilar, C.; García-Vargas, G.G.; Borja, V.H.; Cebrián, E.M. Alteration in bilirubin excretion in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. Toxicology Letter 99 (1998) 79-84.

Hissin, P.J.; Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74 (1976) 214-226.

Hopenhayn-Rich, C.; Biggs, M.L.; Smith, A.H. *Int. J. Epidemiol.* 27 (1998) p. 561.

Hopenhayn-Rich, C.; Biggs, M.L.; Smith, A.H.; Kalman, D.A.; Moore, L.E. Methylation study of a population environmentally exposed to arsenic in drinking water. *Environ. Health Perspect.* 104 (6) (1996) 620-628.

<http://superfund.pharmacy.arizona.edu>.

Hughes, K; Meek, M.E. Arsenic in the Canadian general environment-evaluation of risks to health. In : Chapel MR Abbernathy , CO. Y Cothorn, C.R. (eds) *arsenic. Exposure and Health*, Science Reviews Ltd. 40 (1994) 257-268.

Hughes, M.F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters* 133 (2002) 1-16.

IARC (1982) *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, Suppl. 4, *Chemicals, Industrial Processes and industries associated with cancer in humans*, IARC Monographs Volumes 1 to 29, Lyon.

Ide, C.W.; Bullough, G.R. *J. Soc. Occup. Med.* 38 (1988) p. 85.

International Agency for Research of Cancer (1987) In *IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans* 1 to 42 (Suppl. 7), p. 100.

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

Izzotti, A.; Cartiglia, C.; Taningher, M.; De Flora, S. *Mutat. Res.* 446 (1999) 215-223.

Jayanthika, B.; Wijeweera, A.; Gandolfi, A.; Parrish A.; Lantz, C. Sodium Arsenite enhances AP-1 and NF kB DNA binding and induces stress protein expression in precision-cut rat lung slices, *Toxicological Sciences* 61 (2001) 283-294.

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

Johnson, D.L., *Nature* 240 (1972) 44.

Kanter, R.; Olinga, P.; Hof, I.; Jager, M. A rapid and simple method for cryopreservation of human liver slices, *Xenobiotica* 28 (1998) 225-234.

Kenyon, E.M., Del Razo L.M. y Hughes, M.F., Tissues distribution of arsenite (AsIII) and its methylated metabolites in mice.(2000) Presentación en 39 th Annual meeting of Society of Toxicology, Phyladelphia, Pa.

Kitchin, K. T., Recent advances in arsenic carcinogenesis: Modes of Action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172 (2001) 249-261.

Klimecki, W.T.; Borchers, A.H.; Egbert, R.E.; Nagle, R.B.; Carter, D.E.; Bowden, G.T. Effects of acute and chronic arsenic exposure of human-derived keratinocytes in and In Vitro human skin equivalent system: a novel model of human arsenicism. *Toxicology in vitro* 11 (1997) 89-98.

Kochhar, T.S.; Howard, W.; Hoffman, S.; Brammer-Carleton, L. Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chromosome alterations in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. Lett.* 84 (1996) 37-42.

Kulcharyk, P.; Heinecke, J.W. *Biochemistry* 40 (2001) 3648-3656.

Lai, M.S.; Hsueh, Y.M.; Chen, C.J.; Shyu, M.P.; Tai. *Am. J. Epidemiol.* 139 (1994) 484.

Lee, T.C.; Huang, R.Y.; Jan, K.Y. Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamsters ovary cells. *Carcinogenesis* 6 (1985) 1421-1426.

Lerman, B.B.; Ali, N; Green D. *Anal. Clin. Lab. Sci.* 10 (1980) p. 158.

Li, X.G.; *Turang Xuebao* 19 (1982) 360.

Lin, T.M.; Tsu, W.T.; Chen, C.J. Mortality of hepatoma and cirrhosis of liver in Taiwan. *Br. J. Cancer* 54 (1986) 969-976.

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

Marcelet, H., *Bull. Sci. Pharmacol.* 20 (1913) p. 271.

Mass, M.J.; Tennant, A.; Roop, B.C.; Cullen, W.R.; Styblo, M.; Thomas, D.J. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 355-361.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Mazumder, G.; Chakraborty, N. Chronic arsenic toxicity from drinking tubewell water in rural West Bengal. *Bull. WHO* 66 (1988) 499-506.

McCabe, M.; Maguire, D.; Nowak, M. *Environ. Res.* 31 (1983) p. 323.

Miller, C.A.; Ill Cohen, M.D.; Costa, M. *Carcinogenesis* 12 (1991) 269-276.

Milton, A.H.; Hasan, Z.; Rahman, A.; Rahman, M. *J. Occup. Health* 43 (2001) p. 136.

Minko, I.; Zou, Y. Incision of DNA-protein crosslinks by UvrABC nuclease suggest a potential repair pathway involving nucleotide excision repair, *PNAS* 99 (2002) 1905-1909.

Morton, W.E.; Coron, G.A. *Coron. Am. J. Ind. Med.* 15 (1989) p.1.

Nagvi, S.M.; Vaishnavi, C.; Singh, H. Toxicity and metabolism of arsenic in vertebrates, in: J.O. Nriagu (Ed.), *arsenic in the Environment. Part. II: Human Health and Ecosystem Effects*, John Wiley and Sons, Inc., New York (1994) 55-91.

Nelson, K.W. *Environ. Health Perspect.* 19 (1977) p. 31.

Nietert, C.; Kellicutt, L.; Kubinski, H. *Cancer Res.* 34 (1974) 859-864.

Nordstrom, S.; Beckham, L.; Norderson, I. *Hereditas* 90 (1979) 297.

Oleinick, N.L.; Chiu, S.M.; Ramakrishnan, N. *Br. J. Cancer* 55 (1987) 135-140.

Oleinick, N.K., Chiu, S.M. The formation, identification and significance of DNA-protein crosslinks in mammalian cells, *Br. J. Cancer* 55 (1987) 135-140.

Olinga, P.; Groen, K.; Hof, I.; De Kanter, R.; Koster, H.J.; Winfried, R. Comparison of five systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *J. Pharmacological and Toxicological methods* 38 (1997) 59-69.

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

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

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

Piver, W.T., *Top. Environ. Health* 6 (1983) p. 1.

Pontius, F.W.; Broun, K.G.; Chen, C.J.; *J. AWWA* 86 (1994) 52.

Quievryn, G., Zhitcovich, A. (2000) *Mutagenesis* 15, 85-90.

Rahaman, M.; Tondel, M. *Hipertensión* 33 (1999) p. 74.

Rahman, M.; Tondel, M.; Ahmad, S.A.; Axelson, O. *Am. J. Epidemiol.* 148 (1998) p. 146.

Rahman, M.; Wingren, G., Axelson, O. Scand. J. Work Environ. Health 22 (1996) p.146.

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

Ratnam, K.V.; Espy, M.J.; Muller, S.A.; Smith, T.F. y Su, W.P. Clinicopathologic study of arsenic-induced skin lesions : No definite association with human papillomavirus. J. Am. Acad. Dermatol. 27 (1992) 120-122.

Reichert, F.; Trelles R.A. An. Asoc. Quim. Argent. 9 (1921) 89.

Rosman, T.M.; Stone, D., Molina, M.; Troll, W. Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli* and Chinese hamster cells. Environ. Mutagen. 2 (1980) 307-314.

Santra, A.; Das Gupta J. De, B.K. Ind. Soc. Gastroenterol. 18 (1999) p. 152.

Scott, N.; Hattelid, K.M.; MacKenzie, N.E.; Carter, D.E. Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. Chem. Res. Toxicol. 6 (1993). 102-106.

Shetlar, M.D., Photochem. Photobiol. Rev. 5 (1980) 105-197.

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

Smith, H., Forensic Sci. Soc. 4 (1964) 192.

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

Speit, Gunter, Schutz, P. y Merk, O. Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair deficient human cell lines, *Mutagenesis* 15 (2000) 85-90.

Squibb, K.S.; Fowler, B.A. The toxicity of arsenic and its compounds, in: B.A. Fowler (Ed.), *Biological and Environmental Effects of Arsenic*, Elsevier, New York, (1983) 233-269.

Styblo, M.; Delnomdedieu, M.; Thomas, D.J. Mono and dimethylation of arsenic in rat liver cytosol in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 99 (1996) 147-164.

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 3rd international conference on the health effects of arsenic*, In press.

Szinicz, L.; Forth, W. Effects of As_2O_3 on gluconeogenesis. *Arch. Toxicol.* 61 (1988) 444-449.

Tay, C.H. Cutaneous manifestations of arsenic poisoning due to certain Chinese herbal medicine. *Australas. J. Dermatol.* 15 (3) (1974) 121-131.

Tezuka, M.; Hanioka, K.; Yamanaka, K.; Okada, S. Gene damage induced in human alveolar type II (L-132) cells by exposure to dimethylarsinic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191 (1993) 1178-1183.

Thomas, D.J.; Styblo, M.; Lin, S. The cellular metabolism and systematic toxicity of arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176 (2001) 127-144.

Thompson, D.J., A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals, *Chem. Biol. Interact.* 88 (1993) 89-114.

Toyokuni, S.; Mori, T.; Hiai, H. *Int. J. Cancer* 62 (1995) 309-313.

Tsai, S.M.; Wang, T.N.; Ko, Y.C. *Arch. Environ. Health* 54 (1999) p.186.

U.S. Department of the Interior Bureau of Mines, in: *Minerals Yearbook*, vol. 1 (1973) p. 1360.

Vahter, M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181 (2002) 211-217.

Valle, B.L.; Ulmer, D.D.; Wacker, W.E.C., *Arch. Ind. Health* 21 (1960) p. 132.

Vather M.; Concha, G.; Nermell, B.; Nilsson, R.; Dulot, F.; Natarajan, A.T. a unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women, *Eur. J. Pharmacol.* 293 (4) (1995) 455-462.

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

Voitkun, V.; Zhitkovich, A. *Mutat. Res.* 424 (1999) 97-106.

Wagner, S.L.; Malinder, J.S.; Morton, W.E.; Braman, R.S. *Arch. Dermatol.* 115 (1979) p. 1205.

Whitacre R.W.; Pearse C.S. arsenic and the environment, Mineral Industries Bulletin, Colorado, School of mines, 1972, p.1.

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

Winski, S.L.; Carter, D.E. J. toxicol. Environ. Health 53 (1998) p.345.

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

Yeh, S.; How, S.W.; Lin, C.S.; Arsenical cancer of skin-histological study with special reference to Bowsn's disease. Cancer 21 (1968) 312-339.

Zakharyan, R. A.; Ayala-Fierro, F.; Cullen, W.R.; Carter, D. M.; Aposhian, H.V.; Enzymatic methylation of arsenic compounds. VII. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit liver and human hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 158 (1999) 9-15.

Zaldivar, R.; Prunes, L. y Ghai, G.L. Arsenic dose in patients with cutaneous carcinomata and hepatic haemangio-endothelioma after environmental and occupational exposure. Archives of Toxicology 47 (1981) 145-154.

Zhitkovich, A.; Costa, M.D. A simple sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo. Carcinogenesis 13 (1992) 1485-1489.

Zierler, S.; Theodore, M.; Cohen, A. Int. J. Epidemiol. 17 (1988) p.589.