



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**UNAM
CUAUTILÁN**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**Inducción de Aductos DNA-Citoqueratina 18 por los Ácidos
Monometilarsonoso (MMA) y Dimetilarsinoso (DMA) en Cultivo
Organotípico de Hígado de Ratón.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
NYDIA BERENICE GONZÁLEZ ANGELES**

ASESORA:

DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, 2007



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.

Nada es veneno, todo es veneno.

La diferencia está en la dosis

Paracelso

.... And in the end,

The love you take

Is equal to the love you make

John Lennon/ Paul McCartney

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS...

Por dejarme llegar hasta este momento, por darme la fuerza de voluntad para no desistir de mi objetivo, por no soltarme ni dejarme caer.

A MIS PADRES JOSÉ LUIS Y MÓNICA...

Gracias por el apoyo, por la confianza y la fe que siempre me han tenido. Gracias por su amor y su comprensión, gracias por dejarme volar con mis propias alas. Gracias por ser el sostén de mi vida, el pilar desde donde parte mi presente y mi futuro. Lo que soy ahora, se los debo a ustedes.

A MIS HERMANOS CÉSAR Y DAMIÁN...

Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, por apoyarme y animarme, aún en los momentos más difíciles.

Gracias por esta familia que no la derriba nada.

A MI ASESORA DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA...

Gracias por dejarme ser parte de su equipo, por la paciencia que me tuvo, por la fe que nunca perdió. Gracias por el apoyo en todos los aspectos, gracias por la confianza que depositó en mí y por sus consejos. Sobre todo, gracias por confiar en mí cuando más lo necesitaba.

AL H. JURADO...

Por el tiempo que invirtieron en la revisión de este trabajo, por sus comentarios y sus consejos, los cuales enriquecieron este documento.

A MIS PROFESORES...

Gracias por sus conocimientos, por su trabajo, por su dedicación, lo que me ha permitido desarrollarme profesionalmente. Especialmente a: Dra. Gilda Flores, Dr. Ricardo Santiago, QFB Martha Patricia Zúñiga, QFI Leticia Zúñiga, Dra. Ma. Teresa Ramírez, QFI Andrea Becerril, Dra. Sandra

Díaz-Barriga, Fis. Jesús Fernández, Dr. Enrique Angeles, Dr. Marco A. Vega, MVZ Angel G. Martínez, QFB Ma. Eugenia Posada, Q.F.B. Ma. Esther Revuelta M. Gracias a todos ustedes por guiarme en mi formación académica.

A MIS AMIGOS...

Que han estado en todo momento conmigo, que han sido mi apoyo, mis confidentes y a veces hasta mi paño de lágrimas.

Gracias a mis compañeros de laboratorio: Sandra, Fabiola, Martha, Lillian y Ámbar, por aguantar mis arranques, por todos los momentos compartidos que hicieron felices y amenas las largas horas de trabajo.

A mis compañeros de la generación XXI de Q.F.B. que siguen estando conmigo a pesar del tiempo y la distancia: Lucía, Cristian, Ricardo, Marisela, Tecua y Víctor.

A mis amigas de toda la vida: Diana y Angélica por estar ahí siempre.

A mi "sister" María R. que desde que nos conocimos entendí que hay lazos tan fuertes como los de sangre.

Y muy especialmente, a tres personas que siempre han estado conmigo, que estuvieron en varios de los momentos más difíciles de mi vida y nunca me han dejado sola, que me han brindado siempre su apoyo y su afecto: Arlette, Octavio y Adriana; gracias por todo.

A VÍCTOR H. LEAÑOS H.

Gracias por todo lo que me has dado, gracias por tu amor, tu amistad, tu cariño y tu afecto. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ayudarme a crecer y ser mejor cada día. Te quiero.

DEDICATORIAS:

A MI PAPÁ:

Porque nunca es tarde, porque lo único que no tiene remedio en esta vida es la muerte, lo demás está en nuestras manos.

A MI MAMÁ:

Pueden pasar muchas cosas, pero siempre estás ahí luchando, tú eres el mejor ejemplo de perseverancia y dedicación que conozco.

A los dos, los amo con todo mi corazón y este logro también es suyo.

A MIS HERMANOS:

Ustedes son un ejemplo para mí, los admiro y los quiero mucho. Les dedico este logro con todo mi corazón.

A MIS ABUELOS ROSA Y JUSTINO:

Porque siempre han estado conmigo, echándome porras. Los quiero mucho y les dedico mi trabajo.

A MIS ABUELOS JOSÉ Y MERCEDES:

Quisiera que estuvieran aquí, pero donde quiera que estén, sé que me están viendo y me están cuidando, espero que algún día se sientan orgullosos de mí.

A VÍCTOR:

Te dedico el fruto de mi esfuerzo, muy pronto tú terminarás también y seguirás tu camino, espero estar presente.

ÍNDICE GENERAL.

	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS	1
ABREVIATURAS	4
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	6
1.1 GENERALIDADES DEL ARSÉNICO	6
1.2 FUENTES DE EXPOSICIÓN	9
1.2.1 FUENTES AMBIENTALES	9
1.2.1.1 Suelos	9
1.2.1.2 Agua	10
1.2.1.3 Aire	11
1.2.2 ORGANISMOS VIVIENTES	11
1.2.2.1 Plantas	11
1.2.2.2 Animales y seres humanos	11
1.2.3 FUENTES ANTROPOGÉNICAS	12
1.2.3.1 Minería	12
1.2.3.2 Insecticidas	13
1.2.3.3 Agricultura y Ganadería	13
1.2.3.4 Herbicidas y Conservadores	14
1.2.3.5 Drogas	14
1.2.3.6 Veneno	16
1.2.3.7 Usos bélicos	16
1.2.3.8 Usos diversos	17

1.3 EFECTOS TÓXICOS	17
1.3.1 EFECTOS CARDIOVASCULARES	20
1.3.2 EFECTOS GASTROINTESTINALES	20
1.3.3 EFECTOS HEMATOLÓGICOS	21
1.3.4 EFECTOS HEPÁTICOS	21
1.3.5 EFECTOS RENALES	21
1.3.6 EFECTOS DÉRMICOS	22
1.3.7 EFECTOS NEUROLÓGICOS	22
1.3.8 EFECTOS EN EL DESARROLLO	22
1.3.9 EFECTOS REPRODUCTIVOS	23
1.3.10 EFECTOS TERATOGÉNICOS	23
1.3.11 EFECTOS GENOTÓXICOS	23
1.3.12 EFECTOS MUTAGÉNICOS	24
1.3.13 EFECTOS CARCINOGENÉTICOS	24
1.3.14 DIABETES MELLITUS	26
1.3.15 EFECTOS BIOQUÍMICOS	26
CAPÍTULO II. METABOLISMO DEL ARSÉNICO	27
2.1 CINÉTICA	27
2.2 DMA Y MMA	29
2.2.1 MMA (III)	30
2.2.2 DMA (III)	30
2.2.3 TMA (III)	31

CAPÍTULO III. MECANISMOS MOLECULARES DE CARCINOGENESIS POR EL ARSÉNICO.	32
3.1 CARCINOGENESIS	32
3.2 CARCINOGENESIS POR EL ARSÉNICO	33
3.3 MODOS DE ACCIÓN	34
3.3.1 ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS	35
3.3.2 ESTRÉS OXIDATIVO	35
3.3.3 EFECTOS SOBRE FACTORES DE CRECIMIENTO	37
3.3.4 PROLIFERACIÓN CELULAR	37
3.3.5 PROGRESIÓN EN CARCINOGENESIS	38
3.3.6 REPARACIÓN ALTERADA DE DNA	38
3.3.7 SUPRESIÓN DE p53	38
3.3.8 EFECTO DEL As SOBRE LA METILACIÓN DEL DNA	39
3.4 EL ARSÉNICO COMO PROMOTOR DE CARCINOGENESIS	40
3.4.1 MODELOS ANIMALES	40
CAPÍTULO IV. BIOMARCADORES	41
4.1 ADUCTOS DNA-PROTEÍNA	42
4.4.1 CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS	44
CAPÍTULO V. CITOQUERATINAS	45
5.1 GENERALIDADES	45
5.2 DISTRIBUCIÓN EN EL HÍGADO	46
5.3 ESTRUCTURA	47
5.4 FUNCIÓN E IMPORTANCIA DE LA CITOQUERATINA 18	52

CAPÍTULO VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS E HIPÓTESIS	55
6.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	55
6.2 OBJETIVO GENERAL	56
6.3 OBJETIVOS PARTICULARES	56
6.4 HIPÓTESIS	56
CAPÍTULO VII. MATERIALES Y MÉTODOS	57
7.1 PREPARACIÓN DEL CULTIVO ORGANOTÍPICO DE HÍGADO	57
7.2 DETERMINACIÓN DE POTASIO (VIABILIDAD CELULAR)	57
7.3 PRECIPITACIÓN DE ADUCTOS DNA-PROTEÍNA	58
7.4 DETERMINACIÓN DE ADUCTOS DNA-PROTEÍNA	59
7.5 ELECTROFORESIS SDS-PAGE	59
7.6 WESTERN BLOT	60
CAPÍTULO VIII. RESULTADOS	61
CAPÍTULO IX. DISCUSIÓN	72
CAPÍTULO X. CONCLUSIONES	86
CAPÍTULO XI. PERSPECTIVAS	87
CAPÍTULO XII. REFERENCIAS	88

ÍNDICE DE FIGURAS:

- FIG. 1:** Algunos compuestos arsenicales toxicológicamente relevantes.
- FIG. 2:** Esquema simplificado del metabolismo del arsénico.
- FIG. 3:** Modelo propuesto para la inducción y vías de mediación de ROS para la genotoxicidad del arsénico.
- FIG. 4:** Estructura general de las citoqueratinas.
- FIG. 5:** Esquemas de las formas de interacción entre dímeros de citoqueratinas.
- FIG. 6:** Estructura de un tetrámero, donde se muestra el superenrollamiento de las proteínas.
- FIG. 7:** Modelos de interacciones intermoleculares en un tetrámero.
- FIG. 8:** Estructura de un filamento intermedio, donde se muestra el reordenamiento de las citoqueratinas y su acomodo en el IF.
- FIG. 9:** Funciones de las citoqueratinas.
- FIG. 10:** Patrón electroforético de proteínas hepáticas totales y de las complejadas por efecto del DMA.
- FIG. 11:** Western blot de Citoqueratina 18 en cultivo organotípico de hígado de ratón.
- FIG. 12:** Esquema de la inducción de DPC mediante especies reactivas de oxígeno.
- FIG. 13:** Vía metabólica del DMA.

FIG. 14: Radicales libres producidos por el DMA.

FIG. 15: Especies tumorigénicas derivadas del DMA.

FIG. 16: Características de los entrecruzamientos DNA-proteínas.

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1: Determinación de Viabilidad Celular (Niveles de Potasio (μ moles K/g de Tejido)) en Cultivo Organotípico de Hígado de Ratón.

TABLA 2: Porcentaje de Aductos DNA-Proteínas Inducidos por el Arsenito de Sodio, MMA y DMA *In Vitro*.

TABLA 3: Porcentaje de Aductos DNA-Proteínas Inducidos por el Arsenito de Sodio *In Vitro*.

TABLA 4: Porcentaje de Aductos DNA-Proteínas Inducidos por el MMA *In Vitro*.

TABLA 5: Porcentaje de Aductos DNA-Proteínas Inducidos por el DMA *In Vitro*.

TABLA 6: Comparación del Efecto Inductor de Aductos DNA-Proteínas Entre el Arsenito de Sodio y el MMA *In Vitro*.

TABLA 7: Comparación del Efecto Inductor de Aductos DNA-Proteínas Entre el Arsenito de Sodio y el DMA *In Vitro*.

TABLA 8: Densitometría y Porcentaje de CK18 en Aductos DNA-Proteínas de Hígado de Ratón.

TABLA 9: Proteínas identificadas en los aductos DNA-Proteínas.

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

GRÁFICA 1: Determinación de Viabilidad Celular (Niveles de Potasio) en Cultivo Organotípico de Hígado de Ratón.

GRÁFICA 2: Efecto del Arsenito de Sodio, MMA y DMA en la Inducción de Aductos DNA-Proteínas *In Vitro*.

GRÁFICA 3: Efecto del Arsenito de Sodio en la Inducción de aductos DNA-Proteínas *In Vitro*.

GRÁFICA 4: Efecto del MMA en la Inducción de Aductos DNA-Proteínas *In Vitro*.

GRÁFICA 5: Efecto del DMA en la Inducción de Aductos DNA-Proteínas *In Vitro*.

GRÁFICA 6: Comparación del Efecto Inductor de Aductos DNA-Proteínas *In Vitro* Entre el Arsenito de Sodio y el MMA.

GRÁFICA 7: Comparación del Efecto Inductor de Aductos DNA-Proteínas *In Vitro* entre el Arsenito de Sodio y el DMA.

GRÁFICA 8: Proporción de CK18 presente en los Aductos DNA-Proteína.

ABREVIATURAS:

$(\text{CH}_3)_2\text{As}^\bullet$	Radical Dimetilarsénico
$(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}^\bullet$	Radical Peroxi Dimetilarsénico
$\bullet\text{OH}$	Radical Hidroxilo
8-OHdG	8-dihidroxi desoxiguanosina
As	Arsénico (en general)
As^{III}	Arsénico trivalente
As^{V}	Arsénico pentavalente
ATP	Adenosin Trifosfato
BDF	Enfermedad del pie negro (Black Foot Disease)
Ca^{++}	Ión Calcio
CK	Citoqueratina
CK18	Citoqueratina 18
CO_2	Dióxido de Carbono
$\text{DMA}^{\text{III}}\text{GS}$	Ácido Dimetilarsinoso (conjugado con glutatión)
DMA^{V}	Ácido Dimetilarsínico
DMEM	Medio MEM modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPC	DNA-Protein Crosslinks. Aductos DNA-proteína
DSB	Rupturas de Doble Cadena de DNA (Double Strand Breaks)
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EPA	Agencia de Protección al Ambiente
Fe	Hierro
FI	Filamentos Intermedios
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias Granulocitos y Macrófagos
GSH	Glutatión
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno
HOCl	Ácido Hipocloroso
iAs	Arsénico inorgánico
iAs^{III}	Arsénico trivalente inorgánico (arsenito)

iAs^V	Arsénico pentavalente inorgánico (arsenato)
ICH	Intercambio de cromátides hermanas
IgG	Inmunoglobulina G
K⁺	Ión Potasio
KCl	Cloruro de Potasio
kDa	Kilodaltons
M	Concentración molar
MF	Microfilamentos de actina
MMA^{III}	Ácido Monometilarsonoso
MMA^V	Ácido Monometilarsónico
mRNA	RNA mensajero
MT	Microtúbulos de tubulina
Na⁺	Ión Sodio
NAC	N-acetilcisteína
NO	Óxido Nítrico (Nitric Oxide)
O₂	Oxígeno
OH	Grupo hidroxilo
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno (Reactive Nitrogen Species)
ROS	Especies reactivas de Oxígeno
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
-SH	Grupo tiol
TBS	Buffer Salino de TRIS
TGF-α	Factor de Crecimiento Transformante-alfa
TMAO	Óxido de Trimetilarsina
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral-alfa
TRIS-HCL	Hidrocloreuro de TRIS
ULF	Filamentos de Longitud Única (Unit-Length Filaments)
WHO	Organización Mundial de la Salud

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. 1 GENERALIDADES DEL ARSÉNICO.

El arsénico ocupa el lugar número 20 en abundancia en la corteza terrestre, 14 en el mar y 12 en el cuerpo humano (Mandal y Suzuki, 2002); ha sido usado desde la antigüedad en medicina, agricultura, ganado, electrónica, industria y metalurgia (Nriagu y Azcue, 1990). El nombre arsénico se deriva de la palabra griega *arsenikon*, que significa potente (Nriagu, 2002). El arsénico elemental es un semimetal sólido, de color gris acero, muy quebradizo, cristalino. El arsénico ensucia el aire y es oxidado rápidamente a óxido arsenoso (As_2O_3) cuando se calienta (Ballantyne y cols., 1999).

La abundancia terrestre es de 1.5^{-3} mg/kg, comprende el 0.00005% de la corteza terrestre. Se encuentra co-precipitado con hidróxidos de hierro y sulfatos en rocas sedimentarias. Del arsénico localizado en la corteza terrestre, el 60% son arsenatos, 20% sulfuros y sulfosales y el 20% restante incluye arsenuros, arsenitos, óxidos, silicatos y arsénico elemental (As) (Mandal y Suzuki, 2002).

Desde la historia antigua, el arsénico se ha hecho presente durante el desarrollo de la humanidad. Se ha encontrado evidencia del papel del arsénico en el desarrollo metalúrgico desde el inicio de la edad de Bronce y desde entonces, se ha conocido su poder tóxico, siendo el envenenamiento por arsénico una de las primeras enfermedades ocupacionales que afectaron a la humanidad. El arsénico fue usado por los Egipcios y los Chinos en el tercer milenio antes de Cristo para producir una superficie plateada en los espejos y estatuas.

La exposición ocupacional al arsénico en tiempos antiguos podría haberse extendido más allá de los fabricantes de bronce y sus familias. Varios minerales que contienen cobre, oro y plomo también poseen cantidades significativas de arsénico. La mayoría del arsénico se encontraba en el humo, el cual era inhalado por los artesanos y contaminaba las áreas circundantes.

Algunos compuestos de arsénico como el Orpiment (As_2S_3 , sulfuro de arsénico, arsénico amarillo) y Realgar (As_2S_2) fueron usados comúnmente por los antiguos, ellos usaron el Orpiment como pigmento. Fue encontrado en una bolsa de lino en la tumba del rey Tutankamón, en las pinturas de los muros de la necrópolis de Tebas y extensivamente de la 18ª dinastía en adelante (Nriagu, 2002).

El arsénico figuraba extensivamente en la medicina antigua. Tanto el Orpiment como el Realgar fueron mencionados en textos asirios y en papiros egipcios. Hipócrates los usaba como escoriantes. Galeno recomendaba una pasta de Orpiment para el tratamiento de las úlceras. Otras antiguas autoridades médicas notables como Aristóteles, los empleaban para varios propósitos curativos. Las antiguas culturas hindúes también utilizaron el arsénico para fines médicos durante la era de Buda, recomendaban el Orpiment para “curar las flemas, envenenamiento, exceso de aire y, curiosamente, el “miedo a los fantasmas”. Detiene la menstruación, es calmante, picante y produce un efecto de calor en el cuerpo. Incrementa el apetito y cura la lepra”. Del Realgar decían que “aumentaba la complexión, servía de laxante, producía calor al organismo, destruía grasas, curaba envenenamientos, asma y bronquitis”.

En la antigua China, era producido el Realgar en varios lugares. Se utilizaba como antipirético, profiláctico, emético, expectorante, artrítico, antihelmíntico, antidotal y antiescoriante (Nriagu, 2002). Aún actualmente, muchas medicinas tradicionales chinas contienen altos niveles de arsénico y mercurio, el arsénico permanece como un importante ingrediente de varias patentes chinas y medicinas herbales usadas en el tratamiento de la soriasis, el asma, tuberculosis, leucemia y otras enfermedades (Zhai y Zheng, 1999).

En tiempos medievales se hicieron esfuerzos para aislar y estudiar el arsénico, pero fueron tan frustrantes como la búsqueda de un antídoto para sus propiedades tóxicas. En esos tiempos, el Orpiment era utilizado como un ingrediente para la piedra filosofal. A lo largo de ese tiempo los principales usos para el arsénico eran en química (homicida y práctica), en la pintura y medicina. El Orpiment era un ingrediente regular en la mayoría de los compuestos preparados en la Edad Media para pintar y escribir con color áureo. El

envenenamiento con arsénico de los pintores de la Edad Media era muy común. La mortalidad entre los pintores y la gente que elaboraba o mezclaba los pigmentos arsénicos, debió ser alta.

En 1812, John Paris, un médico inglés describió varios casos de cáncer entre los trabajadores involucrados en la producción de estaño y cobre, y en animales de granja que pastaban en las inmediaciones de las fundidoras de cobre. Paris atribuyó todas sus enfermedades al envenenamiento por arsénico presente en los minerales de varios metales.

Alrededor de la mitad del siglo XVII los compuestos de arsénico fueron usados en la práctica médica occidental para la medicina externa (como amuleto o agente cauterizante). Paracelso, quien rompió la rígida tradición de Galeno, usó el Realgar internamente contra tumores presumiblemente cancerosos pero, más importante, dio validez a la creencia de que había una ventana terapéutica para los compuestos tóxicos en la cual podían obtenerse los beneficios clínicos sin lograr una toxicidad extrema (Nriagu, 2002).

Los organoarsenicales entraron en la farmacopea occidental a finales del siglo XIX. Paul Ehrlich fue capaz de sintetizar cientos de compuestos arsenicales orgánicos. La arsfenamina, renombrada salvarsan después, y la neoarsfenamina (neosalvarsan o preparación “909”) dominaron la terapia contra la sífilis hasta la década de los 40’s y aún después en el Lejano Oriente donde también se usaban para tratar la enfermedad conocida como yaws (infección causada por la espiroqueta *Treponema pertenue*, caracterizada por la presencia de ulceraciones crónicas en cualquier zona del cuerpo) (Jolliffe, 1993, www.ujcm.edu.pe, 2007). El uso del arsénico como retardante de combustión ha estado ligado al síndrome de muerte infantil repentina (SIDS), el resultado de la liberación de arsina de los colchones de los infantes por la presencia de orina o sudor (humedad) y por infección fúngica (Reglinski, 1998).

La fumigación con arsenato de calcio y plomo marcó el inicio de la extensa contaminación intencional del ambiente debido a la aplicación disipada de un material altamente tóxico. Las primeras preocupaciones acerca de un aumento de arsénico y plomo en los suelos

fueron rechazadas rápidamente por los granjeros quienes consideraban al arsenato de plomo como la solución universal para la agricultura americana. Con el paso de los años la fumigación de más de un billón de libras de pesticidas arsenicales en los campos de cultivo americanos ha dejado un legado de suelos y agua contaminados que permanecerán con nosotros por un largo periodo de tiempo.

Durante la segunda mitad del siglo XX, la creciente preocupación pública acerca de los efectos en la salud del arsénico presente en comida, agua y aire, ha disminuido el consumo mundial de trióxido de arsénico a menos de 20,000 toneladas por año, pero el arsénico permanece como una parte de nuestra vida diaria. Un gran número de personas está expuesta a dosis crónicas de arsénico con riesgos en la salud que incluyen: enfermedades vasculares, ictericia, hiperqueratosis y cáncer en varios órganos y tejidos (Nriagu, 2002).

1.2 FUENTES DE EXPOSICIÓN

1.2.1 FUENTES AMBIENTALES

1.2.1.1 Suelos.

Los niveles de arsénico en suelos son muy variables entre las regiones geográficas de 0.1 a 50 mg/kg. Los suelos contienen normalmente de 1-40 mg/kg de arsénico, las concentraciones más grandes son encontradas en suelos aluviales y orgánicos. La concentración de arsénico en suelo va a depender del tipo de rocas madre y las actividades humanas, como la agricultura y minería; aunque el clima, los componentes del suelo y estado del potencial redox también influyen en el nivel de arsénico en los suelos. Se encuentra principalmente en especies inorgánicas pero también puede unirse a materiales orgánicos en los suelos.

En ambientes aerobios las especies estables y predominantes son los arsenatos (iAs^V), en condiciones reductoras (anaerobiosis) las especies predominantes son los arsenitos (iAs^{III}) (Mandal y Suzuki, 2002). El tipo y cantidades de componentes, el pH y el potencial redox del suelo van a determinar las formas de arsénico presentes en éste (Fordyce y cols., 1995).

En los suelos el arsénico es biometilado a través de bacterias (*E. Coli*, *Flavobacterium sp*, *Methanobacterium sp*) y hongos (*Aspergillus Glaucus*, *Candida Humicola*) (Fergusson, 1990).

El arsénico se encuentra en el estado pentavalente como arsenato y en el estado trivalente como arsenito, ambos estados de oxidación pueden ser sometidos a reacciones de oxidación, reducción y metilación. Los hongos comunes, levaduras y bacterias pueden metilar el arsénico a sus metabolitos metilados y derivados gaseosos de arsénico y el arsénico metilado resultante es distribuido ampliamente en el suelo (Mandal y Suzuki, 2002).

1.2.1.2 Agua.

El arsénico se encuentra en bajas concentraciones en el agua natural. La máxima concentración permisible en el agua potable es de 50µg/l, el valor recomendado por la EPA y WHO es de 10µg/l (WHO, 2001; EPA, 2007). En el agua el arsénico se encuentra principalmente como arsenato (As^V), aunque se han reportado concentraciones significativas de arsenito (As^{III}) en ambientes reducidos. El agua de mar contiene habitualmente 0.001-0.008 mg/l de arsénico, principalmente como ión arsenato. Los altos niveles de arsénico se encuentran en aguas de áreas de actividad termal en Nueva Zelanda y Japón (Mandal y Suzuki, 2002).

La exposición a altos niveles de arsénico en el agua potable ha sido reconocida durante varias décadas, principalmente en China, Taiwán y en algunos países de Centro y Sur América. Recientemente se ha descubierto que varias otras regiones tienen agua potable que está altamente contaminada con arsénico. En la mayoría de estas regiones, la fuente de agua potable es subterránea, contaminada naturalmente por formaciones geológicas ricas en arsénico.

Las regiones principales donde se ha encontrado estas altas concentraciones de arsénico incluyen grandes áreas de Bangladesh, China y Bengala del Oeste (India) y pequeñas áreas de Argentina, Australia, Chile, México, Taiwán, Estados Unidos y Vietnam. En algunas

áreas de Japón, México, Tailandia y otros países, la minería, la fundición y otras actividades industriales han contribuido a elevar las concentraciones de arsénico en las fuentes locales de agua.

Los niveles de arsénico en las áreas afectadas pueden oscilar de décimas a cientos o aún miles de microgramos por litro, mientras que en las áreas no afectadas los niveles son típicamente de sólo unos cuantos microgramos por litro. Las pautas establecidas por WHO recomiendan que los niveles de arsénico en el agua potable no deban exceder los 10 microgramos por litro. El arsénico se presenta en el agua potable como arsenato (As^{V}) principalmente, aunque en ambientes reductores han sido reportadas concentraciones significativas de arsenito (As^{III}). Cantidades traza de las especies metiladas de arsénico se encuentran típicamente en el agua potable, y los niveles mayores son encontrados en sistemas biológicos. El arsénico inorgánico (arsenato más arsenito) es la forma predominante del arsénico en el agua potable (IARC, 2004)

1.2.1.3 Aire.

El arsénico existe en el aire absorbido en partículas dispersas y ésta presente como una mezcla de arsenato y arsenito. La exposición humana a través del aire generalmente es baja y las concentraciones normales en el aire varían de 0.4 a 30 ng/m^3 (WHO, 2001).

1.2.2 ORGANISMOS VIVIENTES

1.2.2.1 Plantas.

El arsénico se acumula en el tejido viviente. La cantidad de arsénico en una planta depende de la cantidad de arsénico a la que es expuesta. El daño a la planta aparece antes de que puedan aparecer concentraciones tóxicas en animales, por lo que el consumo de plantas contaminadas no puede envenenar a los animales que las consumen (Mandal y Suzuki, 2002).

1.2.2.2 Animales y seres humanos.

El arsénico es acumulado en el tejido animal, la concentración a la que se acumula es

variable debido a la variación en el arsénico ingerido. En los animales marinos se encuentra de 0.005 a 0.3 mg/kg en celenterados, moluscos y crustáceos. Algunos mariscos podrían contener más de 100 µg/g de arsénico. El contenido promedio de arsénico en pescado fresco es de 0.54 µg/g (Mandal y Suzuki, 2002).

En mamíferos el arsénico se acumula en ciertas áreas de tejido ectodérmico, sobre todo en el pelo y las uñas. Los animales domésticos y el humano contienen menos de 0.3-147 µg/g (WHO, 2001). La absorción de arsénico en el cuerpo es alta para especies solubles y aniónicas. El arsénico inorgánico tiene afinidad especial por el pelo y otros tejidos ricos en queratina. La cantidad normal en el cabello es de 0.08-0.25 µg/g, más de 1 µg/g es indicio de intoxicación (Arnold y cols., 1990). La concentración normal en uñas es de 0.34 ± 0.25 µg/g (Guha Mazumder y cols., 1988). La concentración normal de arsénico en orina varía de 5-40 µg/día. El envenenamiento agudo y subagudo producirán un exceso de 100 µg por día (Arnold y cols., 1990).

1.2.3 FUENTES ANTROPOGÉNICAS.

Estas exceden a las fuentes naturales por un rango de 3:1. El arsénico podría acumularse en el suelo a través del uso de pesticidas arsenicales, aplicación de fertilizantes, polvo de la quema de combustibles fósiles, eliminación de desechos industriales y animales (Mandal y Suzuki, 2002).

1.2.3.1 Minería.

Los principales productores de arsénico son China, Rusia, Francia, México, Alemania, Perú, Namibia, Suecia y Estados Unidos. En los 70's cerca del 80% del consumo de arsénico fue para propósitos de agricultura, actualmente el 97% del arsénico producido entra en la manufactura de productos finales en la forma de arsénico blanco y el restante 3% como un metal para aditivos metalúrgicos, en especial aleaciones de cobre y plomo (Mandal y Suzuki, 2002).

Los minerales que contienen arsénico son comunes en las rocas que contienen oro y las minas de oro han estado asociadas por largo tiempo a la liberación de altos niveles de arsénico en el ambiente. La mayoría de los buscadores de oro quedaban envenenados por arsénico (Nriagu y Wong, 1997).

1.2.3.2 Insecticidas.

La eficacia del arsénico como insecticida fue descubierta casualmente cuando un agricultor exasperado arrojó algo de pintura verde París (arsenato de cobre) sobre plantas de papa infectadas de escarabajos y volvió unas horas después para encontrar que todos los bichos habían muerto. La amplia comercialización del verde París como insecticida inició alrededor de 1867, a pesar de las advertencias contra su uso fue recibido con entusiasmo por los granjeros americanos. En 1872, fue desplazado como el pesticida líder por el púrpura Londres (mezcla de arsenato de calcio, arsenito y materia orgánica). Con el desarrollo del arsenato cálcico para tratar las plagas del algodón en el sur de Estados Unidos, en 1906 el arsénico se convirtió indudablemente en el protector de los cultivos americanos hasta la introducción de los insecticidas orgánicos sintéticos durante la Segunda Guerra Mundial (Nriagu, 2002).

El arsénico fue usado ampliamente para la preparación de insecticidas y pesticidas, tales como el arsenato de plomo, Ca_3AsO_4 , acetoarsenito de cobre (Verde París), H_3AsO_4 , MSMA (metanoarsonato monosódico), DSMA (metanoarsonato disódico) y el ácido cacodílico (Mandal y Suzuki, 2002).

1.2.3.3 Agricultura y Ganadería.

Uno de los principales usos para los compuestos de arsénico era en las granjas, para limpiar heridas y remover insectos en vacas y caballos como shampoo desinfectante. Durante los primeros años del siglo XX, los arsenicales orgánicos se añadían a las comidas de los animales (especialmente pollo, pavo y puerco) para promover el crecimiento y el control de enfermedades.

La comercialización de organoarsenicales para propósitos agrícolas se desarrolló después de la Segunda Guerra Mundial. Durante las décadas de 1970 y 1980 los compuestos de arsénico Metanoarsonato monosódico (MSMA), metanoarsonato disódico (DSMA), ácido dimetilarsénico (DMSA) y el ácido arsónico se convirtieron en los herbicidas más usados. Aunque su toxicidad es baja, son biodegradados a formas inorgánicas más tóxicas, las cuales se añaden a la carga normal de arsénico en la cadena alimenticia (Nriagu, 2002).

1.2.3.4 Herbicidas y Conservadores.

El principal herbicida arsenical es el arsenito de sodio, usado como asesino de hierba mala (EPA, 2007). El ácido de arsénico es usado ampliamente como un desecador de algodón. Compuestos tales como el H_3AsO_4 , el ácido 3-nitro-4-hidroxifenarsónico y el ácido 4-nitrofenilarsónico son usados como aditivos para comida.

1.2.3.5 Drogas.

Las virtudes medicinales del arsénico fueron aclamadas por cerca de 2,500 años, los campesinos en Austria consumían una gran cantidad de arsénico para la suavidad y la limpieza de la piel, para dar delgadez a la figura, belleza y frescura a la complexión y también para mejorar los problemas respiratorios (Mandal y Suzuki, 2002).

El periodo de 1850 a 1950 puede denominarse como la edad dorada del envenenamiento por arsénico, cuando los seres humanos fueron expuestos a niveles sin precedente de arsénico en la medicina, comida, aire, agua y en el trabajo o accidentalmente. La introducción de la solución de Fowler (solución alcalina de arsenito potásico) en 1670, inició el ascenso del arsénico en la farmacopea occidental. Al final del siglo XIX, casi todas las enfermedades graves conocidas eran sometidas a arsenoterapia:

- Enfermedades de la piel tratadas con arsenoterapia: soriasis, eczema, verrugas, lupus, epiteloma, herpes recurrente, erupciones vesiculares o bulbosas en los niños, úlceras, gangrena del pene, diferentes tipos de cáncer externo, inflamación de la piel, formas pustulares y comunes de acné, lepra, impétigo, etc.
- Enfermedades sanguíneas: anemia, leucemia y enfermedad de Hodgkin.
- Condiciones nerviosas y reumáticas: espasmos (convulsiones), neuralgia, epilepsia,

artritis, tétanos y angina de pecho.

- Malaria: por años las preparaciones a partir de arsénico fueron la primera línea de defensa contra la malaria y en algunos casos, reforzaba el tratamiento de quinina.
- Otras enfermedades: diabetes, fiebre escarlatina, difteria, influenza, tuberculosis pulmonar, enfermedades cardiacas (palpitación, edema, pulso intermitente), desórdenes de la respiración, asma, fiebre del heno, bronquitis, neumonía, malestares matutinos durante el embarazo, diarrea, gastritis crónica, reumatismo crónico, inflamación ocular, escrófula, leucemia, cáncer de seno y otros tipos de cáncer, presión sanguínea alta, mordeduras de serpientes y animales rabiosos, edema, como abortivo, etc...

Los efectos tóxicos de la arsenoterapia eran tratados muchas veces con más arsénico, especialmente si había un cambio en el médico. La conclusión parece ineludible, más gente fue dañada o asesinada que curada por el arsénico, “la cura es peor que la enfermedad” (Nriagu, 2002).

Algunas preparaciones incluyen la solución de Fowler (arsenito de potasio), de Donovan (yoduros de arsénico y mercurio), píldoras asiáticas (trióxido de arsénico y pimienta negra), solución de Valagin's (licor de cloruro de arsénico), cacodilato de sodio, arsfenamina (Salvarsan), neorsfenamina, hidrocloreuro de oxofenarsina (Mafarsen), arstinol (Balarsen), acetarsona, triparsamida y carbasona (Mandal y Suzuki, 2002).

Algunas mujeres hindúes tomaban pociones arsenicales en las primeras semanas de embarazo para incrementar las posibilidades de tener al niño. Se ha documentado la ingestión de preparaciones con arsénico para incrementar el apetito sexual masculino o como un afrodisiaco en varias culturas asiáticas y europeas. Sin embargo el uso más común para el arsénico era como abortivo.

Después de la segunda guerra mundial fueron desarrolladas varias terapias con organoarsenicales. Algunas de éstas permanecen como la última línea de defensa (el último recurso del tratamiento) contra varias enfermedades comunes humanas y veterinarias (Nriagu, 2002)

1.2.3.6 Veneno.

El arsénico y sus compuestos han sido usados desde la antigüedad como venenos muy potentes. A principios del siglo XIX el arsénico se volvió sinónimo de veneno, ya que en esta época el arte del envenenamiento se volvió parte de la vida social y política. El óxido de arsénico, fue un veneno suicida y homicida ideal para ese tiempo. Era insípido, inodoro, barato, polvo blanco; de ahí que pudiera ser administrado con azúcar, no disminuye el apetito, es fatal en pequeñas dosis y los síntomas del envenenamiento crónico y agudo imitan a los de enfermedades naturales, encubriendo la verdadera causa de muerte. Sus efectos tienen a ser acumulativos, permitiendo al envenenador debilitar a la víctima con pequeñas dosis por un periodo de tiempo antes de administrar la dosis fatal. Para los ricos y famosos y los hombres con esposas infelices, el polvo de arsénico continuó siendo un riesgo para la vida y las propiedades hasta que James Marsh publicó un método para detectar bajos niveles de arsénico en 1836. Desde entonces el uso del arsénico cambió de un veneno homicida a un uso suicida (Nriagu, 2002).

1.2.3.7 Usos bélicos.

El papel de arsénico en las antiguas guerras era ingenioso. Fue citado como un ingrediente del material incendiario usado por Marco Gracco para incendiar la flota naval romana. Los primeros textos alquímicos Chinos recomendaban los sulfuros de arsénico para fabricar bombas de humo tóxicas para el envenenamiento masivo de soldados –una de las primeras referencias a la guerra química-. Las lámparas de la muerte en las cuales aceite y cera impregnados con arsénico y quemadas para envenenar a las víctimas lentamente, deben sus raíces a estas bombas (Nriagu y Azcue, 1994; Nriagu, 2002).

El gas bélico lewisite causa lesiones dérmicas difíciles de curar y fue altamente efectivo como un agente asesino durante la 1ª Guerra Mundial. Otros arsenicales tienen propiedades igualmente deseables para la guerra química, los detalles acerca de su producción y uso están clasificados y no disponibles al público (Bunnet y Mikolajczk, 1998). Los compuestos de arsénico que son menos tóxicos que el lewisite pero altamente irritantes para la piel, los ojos y el tracto respiratorio y pueden causar daño en la piel, lagrimeo, estornudos y vómitos, están disponibles para su uso como agentes para control de plagas.

El ácido cacodílico está registrado como un silvicida (pesticida del bosque) y puede defoliar y secar a un amplio rango de especies vegetales y fue empleado en Vietnam del Sur con el nombre de Azul Naranja (Nriagu, 2002).

Mención especial recibe la terrible política Harmony (“regalos” o comida con arsénico) en Australia, fue usada por los colonos británicos en 1840 para exterminar un gran porcentaje de la población aborigen hambrienta (Marr, 1995). Desde la guerra civil americana, los soldados muertos eran embalsamados con arsénico, aún a principios del siglo XX el arsénico permanecía como el principal ingrediente en los fluidos para embalsamar (Bunnet y Mikolajczk, 1998).

1.2.3.8 Usos diversos.

Los pigmentos que contenían arsénico eran empleados en numerosos productos de consumo, incluyendo papeles de colores y de fantasía en libros y revistas para niños, hojas para carpetas de cartón, etiquetas de todo tipo, tarjetas de publicidad, envolturas de dulces, repostería, naipes, pantallas de lámparas, papel tapiz, flores y hojas artificiales, coronas artificiales, adornos de cera, juguetes, las fábricas de tejido e impresión intentaron usarlo en la ropa, cortinas, cubiertas de adorno, muñecas de goma, persianas, ropa de cuero, alfombras, pisos de linoleum, pintura, cajas de colores, jabones medicinales, soluciones embalsamadoras, adhesivo de envolturas, vidrio, veneno para ratas, etc (Nriagu, 2002).

La contaminación del ambiente con arsénico de forma tanto antropogénica como natural ocurre en muchas partes del mundo y es un problema global (Thornton, 1999). En varias áreas, los niveles de arsénico en el ambiente han excedido el umbral de seguridad y varios estudios epidemiológicos han documentado varios efectos adversos en la población.

1.3 EFECTOS TÓXICOS

La toxicidad del arsénico depende mucho de las formas químicas y los estados de oxidación presentes, también de otros factores como el estado físico, gas, solución o tamaño de

partícula en polvo, velocidad de absorción, velocidad de eliminación y naturaleza de los sustituyentes químicos (Mandal y Suzuki, 2002).

Recientemente se reportó el orden de toxicidad de los arsenicales como $iAs^{III} > \text{óxido de monometilarsina (MMAO}^{III}) > DMA^{III}GS > DMA^V > MMA^V > iAs^V$. (Vega y cols., 2001). Aunque se había aceptado a la metilación como la vía principal de detoxificación, se ha sugerido que los metabolitos metilados podrían ser parcialmente responsables de los efectos adversos asociados a la exposición al arsénico (Yamanaka y cols., 2004)

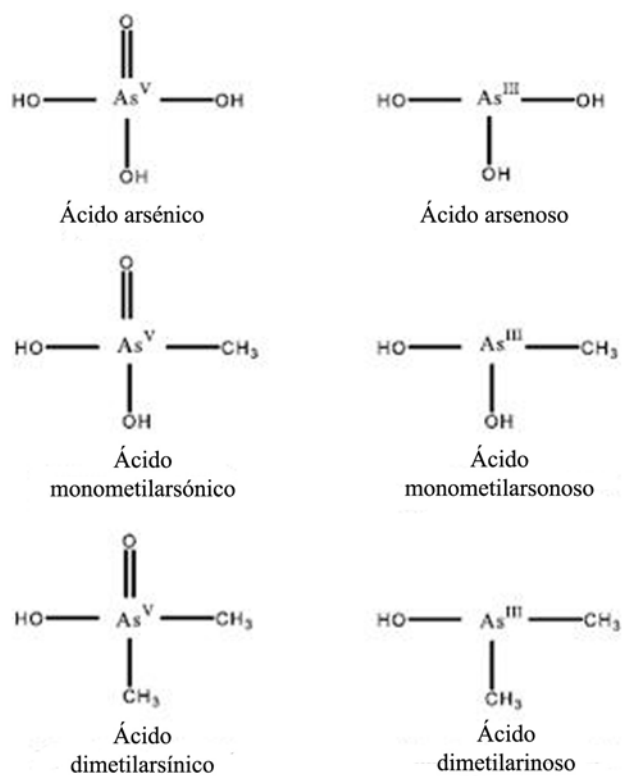


Figura 1. Algunos compuestos arsenicales toxicológicamente relevantes (Modificado de Hughes, 2002).

Los arsenicales inorgánicos solubles son más tóxicos que los orgánicos, y el iAs^{III} es más tóxico que el iAs^V (Maeda, 1994; United Nations, 2001). La exposición crónica al iAs resulta en una exposición crónica a sus metabolitos metilados.

El MMA^{III} es más de 26 veces más tóxico que el arsénico inorgánico en hepatocitos (Petrick y cols., 2000) y 100 veces más poderoso que el arsénico inorgánico como un inhibidor in vitro para la enzima tioredoxina reductasa. El MMA^{III} y el DMA^{III} pueden formar complejos con GSH y son tan tóxicos como el iAs^{III}. El MMA^{III} es más citotóxico para las células humanas (Stybło y cols., 1997; Stybło y cols., 2000). El iAs^V no reacciona directamente con los sitios activos de las enzimas, primero debe reducirse a iAs^{III} para ejercer su efecto tóxico (Mandal y Suzuki, 2002).

El arsénico trivalente interfiere con varias enzimas mediante su unión a los grupos –SH y OH, especialmente cuando hay dos grupos –SH adyacentes en la enzima. Las enzimas que generan energía en el ciclo del ácido cítrico se ven afectadas, la acción inhibitoria está basada en la inactivación de la piruvato deshidrogenasa por la complejación con iAs^{III}, por lo cual se evita la generación de ATP.

El arsénico sustituye los dos átomos de hidrógeno de los grupos tiol y se une con una molécula de azufre, formando un complejo dihidrolipoilarsenito, el cual evita la re-oxidación del grupo dihidrolipoil que es necesario para la actividad enzimática continua, y este paso enzimático fundamental se bloquea, provocando que la cantidad de piruvato en la sangre se incremente, reduciendo la producción de energía y finalmente la célula se daña lentamente (Mandal y Suzuki, 2002).

El arsénico inhibe enzimas, como piruvato oxigenasa, S-aminoácido oxidasa, colina oxidasa y transaminasa. El iAs^V como arsenato puede ser perjudicial por competición con el fosfato. El arsenato desacopla la fosforilación oxidativa, por lo que el metabolismo energético es inhibido y es producida la glucosa-6-arsenato. El arsenato también podría reemplazar al fósforo en el DNA (Elder y Davies, 1993) e inhibir mecanismos de reparación. El arsénico inhibe la acción del selenio, el cual causa la deficiencia aparente del sistema glutatión peroxidasa –una enzima dependiente de selenio-, por el contrario, el arsénico induce el incremento en los niveles de metalotioneína (Kenyon y cols., 1997).

La fuerte unión entre el iAs^{III} y el azufre podría ser la razón por la cual el arsénico se acumula en los tejidos ricos en queratina como el cabello y las uñas. El arsénico trivalente forma una estructura anillada estable con tioles vecinales de queratina en el cabello.

La exposición crónica al arsénico inorgánico podría ocasionar varios efectos de salud, incluyendo efectos en el tracto gastrointestinal, tracto respiratorio, piel, hígado, sistema cardiovascular, sistema hematopoyético, sistema nervioso, etc (Mandal y Suzuki, 2002). Los síntomas generales de la intoxicación por arsénico incluyen náusea, dolor de cabeza y dolores abdominales severos debido al daño de las mucosas gastrointestinales, vómito y diarrea violentos causados por la parálisis del control capilar en el tracto gastrointestinal. Eventualmente, el epitelio gastrointestinal podría ser descamado, seguido de un descenso en el volumen sanguíneo, descenso de la presión sanguínea, alteraciones cardíacas, falla de las funciones vitales cardiovascular y cerebral y muerte (Ballantyne y cols., 1999).

1.3.1 Efectos cardiovasculares.

Tanto el corazón como el árbol arterial periférico manifiestan comúnmente los efectos de la toxicidad del arsénico tales como anomalías cardiovasculares, enfermedad de Raynaud, infarto al miocardio, despolarización miocárdica, arritmias cardíacas, aumento de la densidad y oclusión de los vasos sanguíneos y enfermedad del pie negro (BFD). La exposición al arsénico está asociada con BFD, relacionando tanto el nivel de exposición como la duración a los efectos observados, caracterizados por la pérdida progresiva de la circulación en las manos y los pies, la cual conduce en última instancia a la formación de gangrena severa y dolorosa en las extremidades (particularmente el pie) (WHO, 2001). Se sugiere que la exposición al arsénico a largo plazo podría inducir hipertensión en humanos (Chen y cols., 1995).

1.3.2 Efectos gastrointestinales.

Son comunes y son las características principales de la intoxicación por arsénico debido a la ingestión de altas dosis. La intoxicación sub-aguda manifiesta efectos tales como: boca y garganta secas, ardor de estómago, náusea, dolores y calambres abdominales, y diarrea moderada. La ingestión crónica de arsénico en bajas dosis produce inflamación leve del

esófago leve, gastritis o colitis (Nagvi y cols., 1994). Podrían presentarse anorexia, malabsorción y pérdida de peso (Goebel y cols., 1990).

1.3.3 Efectos hematológicos.

Efectos comunes de la intoxicación por arsénico son la anemia (normocrómica normocítica, aplásica y megaloblástica) y leucopenia (granulocitopenia, trombocitopenia, displasia mieloide), las cuales se reportan como consecuencia de exposiciones agudas, intermedias y crónicas. Estas se deben a efectos citotóxicos o hemolíticos directos en las células sanguíneas y a una supresión de la eritropoyesis. Está reportado que dosis altas de arsénico causan depresión de la médula ósea en el humano, los eritrocitos humanos son al menos 1000 veces más sensibles al arsenato que al arsenito (Winski y Carter, 1998; Mandal y Suzuki, 2002; EPA, 2007).

El mecanismo de hemólisis involucra el descenso de GSH intracelular, resultando en la oxidación de los grupos sulfhidrilo en la hemocianina. La hemoglobina se combina con el arsénico el cual reduce el consumo de oxígeno por las células (Saha y cols, 1999). El conteo de linfocitos de sangre periférica de sujetos expuestos a arsénico está ligeramente incrementado con relación al control (Gonsebatt y cols, 1994).

1.3.4 Efectos hepáticos.

El hígado tiende a acumular arsénico (Winski y Carter, 1998). Los cambios hepáticos crónicos incluyen cirrosis, hipertensión portal sin cirrosis, degeneración lipídica y neoplasia hepática primaria. Otros efectos son la aparición de várices esofágicas sangrantes, ascitis, ictericia, hígado alargado y sensible, daño mitocondrial, funciones mitocondriales y metabolismo de porfirinas alterados (Nagvi y cols., 1994; Santra y cols., 1999; Santra y cols., 2000; Guha Mazumder, 2001) congestión, infiltración de lípidos, colangitis, colecistitis y atrofia amarilla agudo. El perfil hepático indica niveles elevados de enzimas hepáticas, infiltración de lípidos y cirrosis del hígado (Mandal y Suzuki, 2002).

1.3.5 Efectos renales.

El riñón acumulará arsénico inorgánico en presencia de exposiciones repetidas. El riñón es

la principal ruta para la excreción de arsénico y el principal sitio de conversión del arsénico pentavalente. Los efectos en el sistema renal humano no han sido reportados. Los sitios de daño en el riñón incluyen capilares, túbulos y glomérulos, los cuales provocan hematuria y proteinuria (Clarkson, 1991), oliguria, shock y deshidratación con un riesgo real de falla renal, necrosis cortical y cáncer (Hopenhayn-Rich y cols., 1998).

1.3.6 Efectos dérmicos.

Las exposiciones crónicas producirán melanosis difusa, leucomelanosis, queratosis, hiperqueratosis, enfermedad de Bowen y cáncer en piel. Puede encontrarse hiperpigmentación, el rubor eritematoso inicial del arsénico podría convertirse en una queratosis actínica, una hiperqueratosis de las palmas de las manos y plantas del pie, papilomatosis, episodios de urticaria prurítica o pruritis generalizada, carcinoma de células basales o carcinoma de células escamosas y las uñas de los pies y manos presentan unas depresiones o rugosidades blancas transversas llamadas líneas “Mees” o “Aldrich-Mees” (Adams, 1990).

1.3.7 Efectos neurológicos.

Una exposición aguda alta causa a menudo encefalopatía con síntomas como dolor de cabeza, letargia, confusión mental, alucinación, ataques y coma. Exposiciones intermedias y crónicas causan neuropatía simétrica periférica iniciando como un entumecimiento en las manos y pies, pero podría desarrollarse en una sensación dolorosa de “alfileres y agujas”, ruptura de tobillo o muñeca, asimetría bilateral del nervio diafragmal (Bansal y cols., 1991) y neuropatía periférica de neuronas motoras y sensoras causando entumecimiento, pérdida de reflejos y debilidad muscular (Mandal y Suzuki, 2002). Las exposiciones crónica y subcrónica al arsénico han sido asociadas con una reducción en la velocidad de conducción neuronal (Lagerkvist y Zetterlund, 1994).

1.3.8 Efectos en el desarrollo.

No están bien establecidos, se ha notado cierta asociación con la constricción de la aorta, y los bebés expuestos al arsénico durante el embarazo presentan una mayor incidencia a malformaciones congénitas y menor promedio de peso al nacer (Mandal y Suzuki, 2002).

1.3.9 Efectos reproductivos.

El arsénico inorgánico cruza fácilmente la barrera placentaria y afecta el desarrollo fetal, hay inducción de malformaciones y un incremento de la mortalidad fetal, neonatal y postnatal, y alta intendencia de recién nacidos con bajo peso, abortos espontáneos, niños nacidos muertos, preclampsia y malformaciones congénitas. Los arsenicales orgánicos no parecen cruzar la placenta tan rápidamente y son almacenados (Mandal y Suzuki, 2002).

1.3.10 Efectos teratogénicos.

El arsenito y arsenato de sodio tienen efectos letales en los embriones y un potencial teratogénico en varias especies de mamíferos. Pueden inducirse varias malformaciones. En experimentos con animales se ha mostrado que el arsénico puede provocar malformaciones en el cerebro, órganos urogenitales, esqueleto y ojos (Golub, 1994). Cuando es suministrado oralmente, se necesitan dosis altas para inducir anomalías.

1.3.11 Efectos genotóxicos.

La inhibición de la reparación podría ser el mecanismo clave para la comutagenicidad y por consiguiente, para la cocarcinogenicidad del arsénico. Las formas trivalentes son más potentes y genotóxicas que las pentavalentes (Mandal y Suzuki, 2002), mientras que el DMA es genotóxico (Endo y cols., 1992; Eguchi y cols., 1997; Moore y cols., 1997) y el MMA es menos potente y el TMAO es más potente para inducir arresto mitótico y tetraploides (Eguchi y cols., 1997). La mayor toxicidad mitótica es una función de sus grandes efectos perjudiciales en la organización microtubular de la célula (Bernstam y Nriagu, 2000).

La genotoxicidad del arsénico es ocasionada en gran medida por los arsenicales trivalentes. En humanos, el arsénico es un mutágeno de cromosomas (induce mutaciones que involucran más de un gen, generalmente son grandes deleciones o rearrreglos). El arsénico parece tener una habilidad limitada para inducir mutaciones puntuales. Se detectaron un aumento en la frecuencia de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y aneuploidía en linfocitos periféricos o células uroteliales de gente expuesta a niveles elevados de arsénico.

In vitro, el arsénico no es un mutágeno puntual en bacterias. En células de mamíferos, el arsénico causó varios tipos de mutaciones cromosómicas y aneuploidía. En combinación con varios agentes genotóxicos, incluyendo luz U.V., el arsénico fue un comutágeno sinérgico. In vitro, el arsenito fue genotóxico a concentraciones micromolares. El arsenato fue menos tóxico en aproximadamente una orden de magnitud que el arsenito. El DMA y el MMA indujeron genotoxicidad a concentraciones milimolares.

El arsénico trivalente no induce mutaciones letales en ratones, pero produce un pequeño incremento en la incidencia de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en células de médula ósea de ratones tratados *in vivo*. También indujo aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátides hermanas en células humanas y de roedores *in vitro*. No induce mutaciones en células de roedores *in vitro* (IARC, 2004).

1.3.12 Efectos mutagénicos.

Es la inducción de daño al DNA y una amplia variedad de alteraciones genéticas, que pueden variar de simples mutaciones de genes (par de bases del DNA cambiadas a cambios extremadamente visibles en la estructura del cromosoma o el número de clastogénesis) (Mandal y Suzuki, 2002).

El arsénico promueve el daño genético en gran parte por la inhibición de la reparación del DNA. Enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa que buscan radicales libres de oxígeno parecen proporcionar protección contra el daño al DNA inducido por arsénico, indicando una posible base para el efecto genotóxico del arsénico (Nordenson y Beckman, 1991).

1.3.13 Efectos carcinogénicos.

Exposiciones crónicas a arsenicales provocan un incremento en la incidencia a carcinomas de la piel, tanto de células basales y escamosas. Hay reportes de elevados riesgos de cáncer en múltiples sitios (pulmón, piel, vejiga, riñón e hígado principalmente) (Hopenhayn-Rich y cols., 1996; Chiou y cols., 1997; Morales y cols., 2000; WHO, 2001).

La evidencia reportada previamente acerca de la carcinogenicidad en humanos mediante la exposición al arsénico, fue evaluada como suficiente para colocar al arsénico como un carcinógeno. Los estudios epidemiológicos informativos acerca del cáncer en relación al arsénico en el agua potable incluyen estudios ecológicos y algunos estudios de caso-control y estudios de cohorte. Para la mayoría de los carcinógenos humanos conocidos, la mayor fuente de evidencia causal deriva de los estudios de caso-control y de cohorte, con poca evidencia de estudios ecológicos. En contraste, para el arsénico en el agua potable, los estudios ecológicos proveen importante información para la deducción causal (IARC, 2004).

Hay bastante evidencia de los elevados riesgos de cáncer en la vejiga urinaria y en pulmón asociados al arsénico en agua potable, existen evidencias que demuestran relaciones dosis-respuesta con los niveles de arsénico en el agua. En la piel, se ha demostrado que el arsénico es potencialmente carcinogénico después de ingestión de arsénico medicinal, residuos de pesticidas arsenicales y agua potable contaminada con arsénico. El cáncer en la piel es una malignidad comúnmente relacionada a la contaminación de agua potable con arsénico (IARC, 2004)

Se ha observado y confirmado una asociación entre la exposición al arsénico mediante el agua potable y el cáncer en la piel; también se han descrito dos casos de cáncer en vejiga, con periodos de latencia de 8 a 20 años. Los periodos de latencia para los dos casos de cáncer en la piel relacionado al arsénico en el agua potable fueron 20 y 23 años, y las concentraciones o consumo de arsénico se reportaron como 1.2 y 1 mg por día, respectivamente, con una ingesta total estimada de cerca de 8g (IARC, 2004).

Se han descrito varias formas de cáncer en piel relacionadas al arsénico, incluyendo carcinomas de células basales y carcinomas de células escamosas. Los primeros usualmente son invasivos localmente, mientras que los últimos podrían llegar a metástasis. El cáncer ocurre generalmente en áreas de la piel expuestas a la luz solar (Ballantyne y cols., 1999).

Ahora el arsénico parece ser un promotor del cáncer más que un iniciador, el riesgo de cáncer parece ser dosis-dependiente. El arsenato es incorporado en el DNA en lugar del

fosfato. Esto explica también porqué el arsénico es clastogénico, ya que la unión arsenato-fosfato será más débil que el enlace fosfodiéster normal (Mandal y Suzuki, 2002).

1.3.14 Diabetes mellitus.

A la diabetes mellitus se le ha relacionado con la exposición a agua potable con arsénico. Estudios encontraron que, residentes de áreas endémicas tienen un incremento en dos veces de la prevalencia de diabetes mellitus cuando se comparan con residentes de áreas no endémicas. (Lai y cols., 1994).

1.3.15 Efectos bioquímicos.

Los compuestos de arsénico inhiben más de 200 enzimas en humanos (Abernathy y cols., 1999). Hay una inhibición del 70-80% de glutamilpiruvato transaminasa y glutatión peroxidasa. Las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa sérica y colinesterasa son inhibidas completamente. El arsenito de sodio causa un marcado incremento en la actividad celular de la enzima hemo-oxigenasa e inhibe la oxidación de piruvato o α -cetoglutarato ligada a NAD (Mandal y Suzuki, 2002). Se han observado cambios en el patrón de excreción urinario de porfirinas en poblaciones expuestas a altos niveles de arsénico (García-Vargas y cols., 1994).

Las especies trivalentes de arsénico, como el arsenito, pueden unirse fuertemente a ditioles así como a grupos sulfhidrilo libres. Tales uniones a proteínas pueden inducir la inhibición de la reparación del DNA, mutación en sitios genéticos claves o un incremento en la proliferación celular (Dixon, 1997).

CAPÍTULO II. METABOLISMO DEL ARSÉNICO

Cada forma del arsénico tiene diferentes propiedades fisicoquímicas y biodisponibilidad, por lo que el estudio de la cinética y metabolismo de los arsenicales en animales y humanos es complejo.

Las rutas de entrada son principalmente la vía respiratoria (humo y polvo) y oral (arsénico en agua, bebidas, suelo y comida). No se ha dilucidado mucho acerca de la absorción dérmica pero los datos disponibles indican que los rangos de absorción son bajos (WHO, 2001).

El iAs^{III} y el iAs^V cruzan la placenta (Bollinger y cols., 1992; WHO, 2001), el DMA es capaz de cruzar la placenta en ratas y la Roxarsona se acumula en los huevos de gallina (Chiou y cols., 1997)

2.1 Cinética.

Las formas solubles del arsénico son absorbidas eficientemente en el tracto gastrointestinal (70-90%) y distribuido a otros órganos. La absorción pulmonar de las formas solubles del arsénico es rápida, mientras que las formas menos solubles podrían residir en las vías aéreas bajas y ser absorbido durante un prolongado periodo de tiempo (Ballantyne y cols., 1999).

La biodisponibilidad del arsénico inorgánico variará dependiendo de la matriz en la cual es ingerido, la solubilidad del compuesto y la presencia de otros constituyentes de la comida y nutrientes.

La distribución en tejidos depende de la perfusión en sangre, volumen de tejidos, coeficientes de difusión, características de la membrana y afinidades del tejido. El destino del arsénico ingerido in vivo depende de:

- 1) Las reacciones de oxidación y reducción del As en el plasma
- 2) Las reacciones de metilación consecutivas en el hígado.

Los arsenicales inorgánicos solubles son más tóxicos que los orgánicos, y el iAs^{III} , son más tóxicos que el iAs^V . A niveles de exposición bajos a moderados, la distribución del arsénico a largo plazo es muy independiente de la forma de exposición.

El arsenato es reducido rápidamente al arsenito, el cual es metilado parcialmente. El principal sitio de la metilación parece ser el hígado, donde las arsénico-metiltransferasas metilan al arsénico con S-adenosil-metionina como el donador del grupo metilo y el glutatión (GSH) como un cofactor esencial. El arsénico se acumula en los tejidos con la edad (Mandal y Suzuki, 2002)

Hay diferencias principales entre especies en la metilación del arsénico. Mientras que la mayoría de los roedores parecen ser altamente eficientes en la metilación del arsénico, esta metilación no es detectada en algunas especies de primates (Vahter y cols., 1995).

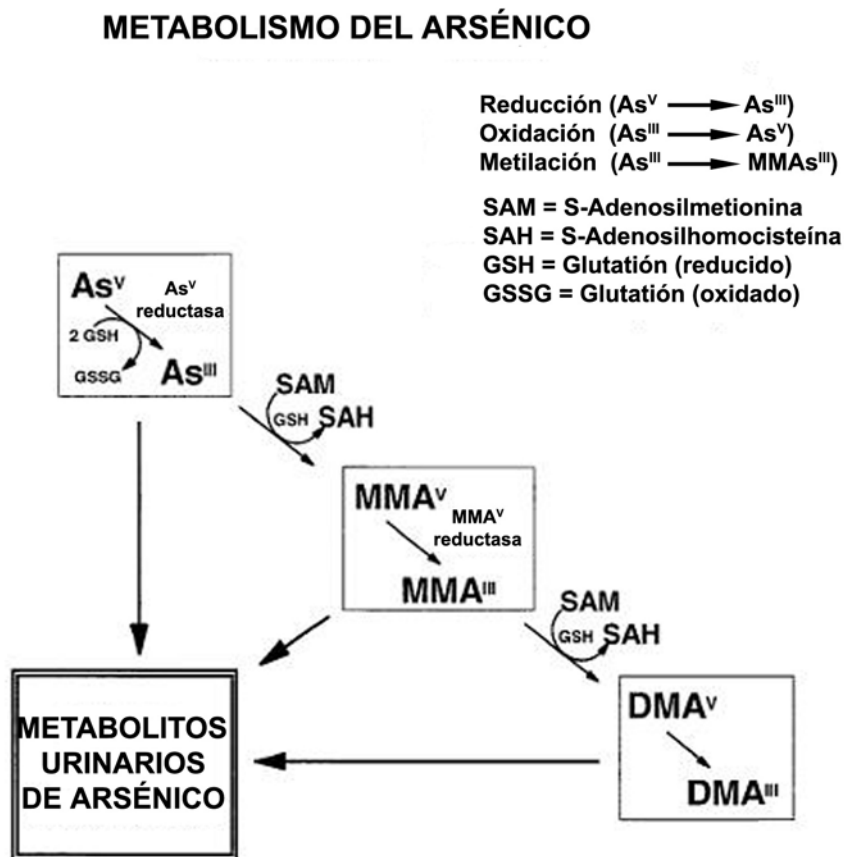


Figura 2. Esquema simplificado del metabolismo del arsénico (Modificado de Kitchin, 2001)

La excreción humana de arsénico está formada por un 20% de arsénico inorgánico, 20% de MMA y 60% de DMA. El arsénico inorgánico se metila a MMA y DMA in vivo y, durante la circulación en el plasma el MMA es parcialmente absorbido y este MMA absorbido es posteriormente metilado a DMA, el DMA se excreta prácticamente sin cambio (Mandal y Suzuki, 2002).

El MMA^V y DMA^V se reducen a sus análogos trivalentes y son excretados por la orina (Le y cols., 2000). Estudios de marcaje revelan el 38% de la dosis de arsénico ingerida es excretada en la orina dentro de 48 h y el 45% dentro de 4 días. Cerca del 60 al 70% del arsénico inorgánico ingerido diariamente es excretado en la orina. Cerca del 76% del arsénico inorgánico es excretado en la orina dentro de 8 días (Mandal y cols., 2001).

Las vidas medias biológicas (Yamauchi y cols., 1990) son:

- MMA 7.4 hrs
- DMA 5.6 hrs
- TMAO 5.3 hrs
- TMA 3.7 hrs
- Arsenobetaína 6.1 hrs

La principal ruta de excreción para el arsénico es la orina aunque tiene otras rutas de excreción que son menores (heces, sudor). Ya que el arsénico se acumula en tejidos con queratina como piel, cabello y uñas, éstos también pueden ser considerados como rutas de excreción menores, el arsénico también puede ser excretado en leche a niveles bajos (Grandjean y cols., 1995; Concha y cols., 1998).

2.2 DMA y MMA.

Como se ha mencionado anteriormente, la metilación del arsénico fue considerada por mucho tiempo una vía de detoxificación, pero la visión actual es que muchas de las formas posibles del arsénico se asocian con la transformación celular y carcinogénesis inducida

considerándose por varios autores a la metilación como una ruta de toxificación. En la mayoría de los estudios animales el DMA es el metabolito principal. Entre los animales que metilan arsénico, los humanos son excepcionales porque excretan una cantidad relativamente grande de MMA. Los tejidos humanos pueden estar expuestos a concentraciones mucho más altas de MMA penta o trivalente que los ratones, ratas, perros, hámster o conejos (Vahter, 1994).

La farmacocinética del DMA pentavalente sugiere:

- a) La unión sustancial de DMA a la hemoglobina que secuestra al DMA e incrementa su tiempo de vida biológico pero no necesariamente su acceso a blancos necesariamente carcinogénicos.
- b) Una fracción apreciable podría encontrarse en estado pentavalente.
- c) La rápida excreción del DMA no unido y
- d) Las formas carcinogénicas activas del DMA administrado podrían ser probablemente el DMA (V), DMA (III), TMAO o TMA (III) (Kitchin, 2001).

2.2.1 MMA (III).

Ha sido encontrado en orina de humanos expuestos al arsénico (Aposhian y cols., 2000; Aposhian y cols., 2000a), los humanos excretan mucho más MMA que cualquier otra especie, proporcionando de esta manera una razón del porqué se ha encontrado una sensibilidad al cáncer de vejiga inducido por arsénico. Algunas de las actividades del MMA son: inhibición enzimática, toxicidad celular y genotoxicidad (Styblo y cols., 1997; Lin y cols., 1999; Petrick y cols., 2000; Mass y cols., 2001).

2.2.2 DMA (III).

También se encuentra en orina humana de personas expuestas a arsénico (Le y cols., 2000). Después de que los arsenicales metilados pentavalentes han generado una cierta cantidad de metilados trivalentes por procesos reductivos, la unión de proteínas a los arsenicales metilados trivalentes por grupos sulfhidrilo no críticos podría proteger al organismo de la unión de los arsenicales metilados trivalentes a sitios críticos que pueden causar toxicidad o carcinogenicidad, por lo que los arsenicales trivalentes biológicamente activos podrían

producir la muerte a dosis orales bajas. Se sabe que el DMA (III) posee actividades biológicas las cuales incluyen: inhibición enzimática, toxicidad celular, genotoxicidad y clastogenicidad (Styblo y cols., 1997, Lin y cols., 1999; Petrick y cols., 2000; Mass y cols., 2001). El DMA pentavalente no se ha asociado con efectos tóxicos. El DMA actúa como un carcinógeno en la vejiga y como un potente promotor del cáncer. El DMA es el principal metabolito excretado al ingerir arsénico, la mayoría del DMA ingerido como tal es excretado sin cambio alguno en la orina (Wang y cols., 2002).

2.2.3 TMA (III).

El TMA (III) podría ser producido a partir del TMAO por reducción. Sólo las ratas podrían tener niveles altos de TMAO en orina. Una molécula de TMA (III) no posee grupos hidroxilo ionizables para limitar la habilidad de esta especie de arsénico trivalente para interaccionar con el DNA (Kitchin, 2001).

CAPÍTULO III. MECANISMOS MOLECULARES DE CARCINOGENESIS POR EL ARSÉNICO

3.1 CARCINOGENESIS.

La neoplasia resulta de alteraciones en el crecimiento tisular y en los mecanismos de control de la división celular y produce una proliferación anormal y crecimiento, está considerada como el principal efecto en exposiciones repetidas a xenobióticos. Los términos tumorigénesis y carcinogénesis son palabras usadas generalmente para describir el desarrollo de neoplasias, sin embargo, este uso debe estar restringido a lo siguiente:

Carcinogénesis: Término restringido específicamente a tumores malignos. Oncogénesis: Se utiliza en situaciones epidemiológicas y experimentales para definir un incremento en el número total de neoplasias, un incremento en un tipo específico, la presencia de neoplasias raras o únicas (Ballantyne y cols., 1999).

La carcinogénesis química es un proceso de múltiples fases. La primera fase, es crítica, la cual consiste en un evento genotóxico seguido por otros procesos los cuales llevan a la expresión patológica, funcional y clínica de la neoplasia. Un modelo multifase que ha llamado mucho la atención es el de promotor-iniciador.

La primera fase, de iniciación, necesita una breve exposición al material genotóxicamente activo, lo cual resultará en la unión del iniciador, o el metabolito reactivo, al DNA celular; puede haber un bajo umbral de iniciación o no ser necesario. La segunda fase, la de promoción, permite la expresión del potencial carcinogénico de la célula iniciada.

Los agentes promotores tienen las siguientes características:

- No necesitan ser genotóxicos
- Necesita una exposición repetida después de la iniciación
- Hay evidencia de reversibilidad
- Podrían tener umbral de actividad promotora

Los iniciadores genotóxicos también podrían actuar de una forma promocional después de la iniciación. Las sustancias que causan o aumentan un proceso carcinogénico podrían ser descritas como carcinógenos genotóxicos y epigenéticos; los primeros son capaces de causar daño al DNA y el último ejerce efectos oncogénicos por otros mecanismos. Los materiales que actúan directamente con el DNA son denominados como carcinógenos primarios; aquellos que requieren ser activados metabólicamente son procarcinógenos, siendo el carcinógeno final el metabolito electrófilo activo.

Los carcinógenos epigenéticos incluyen las diferentes clases funcionales: promotores, cocarcinógenos, hormonas, inmunosupresores, etc. Los cocarcinógenos aumentan el efecto oncogénico (Ballantyne y cols., 1999).

Los sellos distintivos del cáncer pueden ser los siguientes (Kitchin, 2001):

- Autosuficiencia en señales de crecimiento
- Insensibilidad a señales de no-crecimiento
- Evasión de la apoptosis
- Alto potencial de replicación
- Angiogénesis
- Invasión del tejido
- Metástasis

3.2 CARCINOGENESIS POR EL ARSÉNICO

Una de las consecuencias más preocupantes de la intoxicación crónica por arsénico es el efecto carcinogénico en los humanos. El arsénico está clasificado como un carcinógeno del grupo 1 para los humanos (Wang y cols., 2002; IARC, 2004). Hay cinco órganos en los cuales los humanos desarrollan cáncer después de la exposición al arsénico inorgánico (piel, pulmón, vejiga, riñón e hígado). La carcinogénesis completa por el DMA ha sido conseguida en vejiga de rata y pulmón de ratón (Kitchin, 2001; Wang y cols., 2002).

- Los pulmones humanos podrían ser un órgano sensible para la carcinogénesis del arsénico por la alta presión parcial de oxígeno y el hecho de que la dimetilarsina, es excretada vía pulmonar.
- La vejiga también es un órgano sensible a la carcinogénesis, descrito como el principal órgano carcinogénico del arsénico debido a la alta concentración de DMA y MMA que es almacenada en el lumen y la cantidad de DMA, dimetilarsina o MMA que podría ser generada en procesos reductivos (Mandal y Suzuki, 2002). La vejiga es el modelo experimental más estudiado y mejor entendido. Es sensible a la carcinogénesis inducida por DMA, encontrando en algunos estudios que es un carcinogénico completo (Wei y cols., 1999). Los metabolitos son mantenidos en vejiga por periodos relativamente largos con exposición continua al endotelio (Yamamoto y cols., 1995; Yamamoto y cols., 1997). Existe evidencia de que el DMA puede actuar como un carcinógeno completo (Hayashi y cols., 1998).
- La piel localiza y almacena arsénico por su alto contenido de queratina. Los estudios actuales en humanos indican consistentemente una relación causal entre el cáncer de piel y una gran exposición al arsénico inorgánico (IARC, 2004).
- Dos órganos que responden a rangos bajos de arsénico son el hígado y el riñón. El DMA es producido en el hígado vía metilación oxidativa y el riñón está expuesto a altas concentraciones de DMA (Mandal y Suzuki, 2002). El riñón es la ruta principal de eliminación del arsénico, contando con alta concentración de metabolitos metilados (DMA principalmente), lo que ocasiona cáncer en el riñón (Yamamoto y cols., 1995).

En estos 5 órganos sensibles a carcinogénesis por arsénico se han encontrado indicios de que éste o sus metabolitos actúan principalmente como promotores (Yamamoto y cols., 1995; Wanibuchi y cols., 1996; Yamanaka y cols., 1996; Wanibuchi y cols., 1997; Wanibuchi y cols., 2000; Yamanaka y cols., 2000).

3.3 MODOS DE ACCIÓN.

Se han asociado diversos efectos celulares con diferentes mecanismos de acción para el arsénico, basado en estudios in vitro:

3.3.1 Anormalidades Cromosómicas

Se ha encontrado que los arsenicales son efectivos para la clastogenicidad y poco efectivos para la mutación puntual. Existen reportes de la inducción de aberraciones cromosómicas por arsénico entre las cuales se incluyen los micronúcleos y el intercambio de cromátides hermanas (Wang y cols., 2002).

El DMA causa varios efectos genotóxicos o clastogénicos, incluyendo ruptura de hebras, formación de sitios apurínicos/apirimídnicos, daño de bases y daño oxidativo, entrecruzamientos DNA-proteína, aberraciones cromosómicas y aneuploidía. La clastogenicidad se ha relacionado a la alta afinidad del arsénico por residuos sulfhidrilo. Las interacciones del arsénico con la proteína tubulina y con la formación y función de husos se han considerado como posibles modos de acción (Kitchin, 2001).

3.3.2 Estrés Oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) participan en la inducción del estrés oxidativo. Los arsenicales (arsenito, arsenato y DMA) pueden producir ROS, tanto in vitro como in vivo (Nordenson y Beckman, 1991; Yamanaka y cols., 1991; Gurr y cols., 1998; Hei y cols., 1998; Liu y cols., 2001; Wang y cols., 2001). De acuerdo con Yamanaka y cols. (1990, 1994), la dimetilarsina (metabolito del As) produce varias especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar directa o indirectamente al DNA y a las proteínas. El radical hidroxilo generalmente es la especie reactiva crítica que ataca directamente al DNA, y se ha observado que el arsénico produce varios radicales libres, entre ellos el radical hidroxilo. Se sugiere que algunos efectos clastogénicos del arsénico (ICH, micronúcleos, producción de 8-OHdG) están mediados vía radicales libres. (Kitchin, 2001).

Los radicales libres generados como consecuencia de la exposición al arsénico se encuentran ligados a señalización celular, apoptosis y mutagénesis. Existe evidencia de que células expuestas al arsenito de sodio muestran un incremento dosis-dependiente en sus niveles intracelulares de oxidantes minutos después del tratamiento con arsenito, también se ha encontrado que el arsenito incrementa los niveles de radicales hidroxilo inducidos por superóxido (Liu y cols., 2001).

El mecanismo y la vía mediante las cuales son generados estos ROS permanecen desconocidas. Describiremos un modelo basado en las investigaciones publicadas (Figura 3):

- I. El arsénico induce la lipoperoxidación de las membranas y la formación de los respectivos peróxidos (Maiti y Chatterjee, 2000; Ramanathan y cols., 2003). Esta peroxidación incrementa el estrés oxidativo intracelular y promueve el daño oxidativo.
- II. El arsenito incrementa la producción de radical hidroxilo mediante un proceso inducido por superóxido y mediado por peróxido de hidrógeno (Liu y cols, 2001), activa la proteína RacI unida a GTP y facilita el ensamblaje del complejo RacI/NADPH oxidasa que resulta en un aumento en los niveles de superóxido y peróxido de hidrógeno intracelular (Smith y cols., 2001).
- III. El arsénico induce apoptosis por su efecto directo en el potencial transmembranal de la mitocondria. Debido a que ésta se encuentra íntimamente involucrada en la producción de ROS y, a la vez, las estructuras mitocondriales son muy susceptibles al daño oxidativo provocando lipoperoxidación, oxidación de proteínas y daño al DNA mitocondrial (Shen y cols., 2000; Miller y cols., 2002; Hei y Filipic, 2004).
- IV. El daño a la membrana mitocondrial podría resultar en un incremento en los niveles de superóxido intracelulares. Hay evidencia de que el arsénico regula positivamente la concentración de óxido nítrico (NO), por lo que una consecuencia del daño mitocondrial sería la producción secundaria de peroxinitritos, un potente oxidante que tiene una vida media mayor comparada con los radicales hidroxilo y puede difundir a través de las membranas fácilmente (Kao y cols., 2003; Radi y cols., 2001; Yuan y cols., 2003)
- V. Existe evidencia de que la ferritina puede contribuir al estrés oxidativo inducido por arsénico. Tanto el DMA^V como el DMA^{III} induce la liberación de hierro seguida por la formación de ROS mediante una reacción tipo Fenton. Además, la liberación de hierro es más pronunciada bajo condiciones anaerobias. Queda por determinar el papel específico de la ferritina en la formación de ROS (Ahmad y cols., 2000).

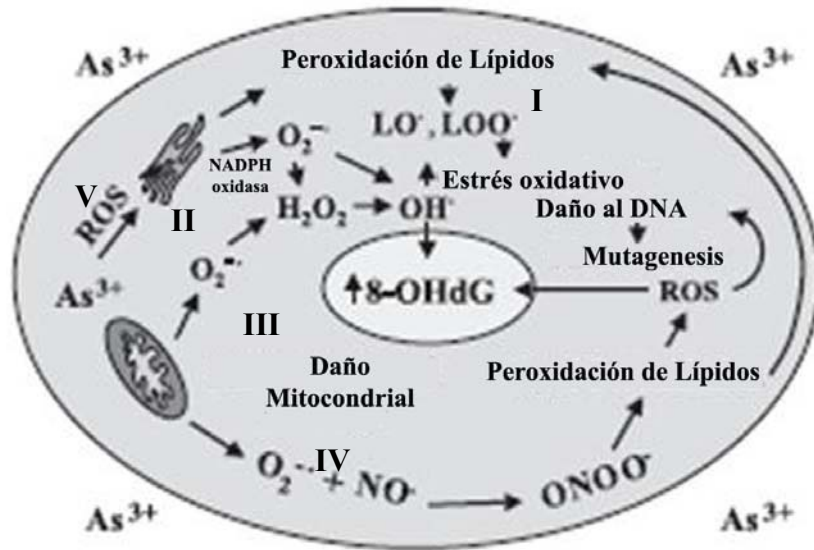


Figura 3. Modelo propuesto para la inducción y vías de mediación de ROS para la genotoxicidad del arsénico (Modificado de Hei y Filipic, 2004).

3.3.3 Efectos sobre Factores de Crecimiento.

Se ha observado que la exposición al arsenito incrementa el mRNA y la secreción de TGF- α , GM-CSF y TNF- α , los cuales son factores estimuladores del crecimiento celular (Germolec y cols., 1997); también se ha demostrado que los arsenicales trivalentes (arsenito, MMA y DMA) incrementan la secreción de GM-CSF, TNF- α e Interleucina-6. La exposición al arsénico podría incrementar la producción de ROS, la activación de factores de transcripción, la secreción aumentada de citocinas proinflamatorias y promotoras del crecimiento dando por resultado un incremento de la proliferación celular y, por último carcinogénesis (Vega y cols., 2001).

3.3.4 Proliferación Celular

Dos causas comunes de la proliferación celular son: la estimulación mitogénica y la toxicidad celular y muerte seguida por regeneración compensatoria. Los errores de replicación provocados por DNA dañado (no reparado) presente en la replicación, pueden provocar una mutación del material general (Kitchin, 2001). El arsénico podría actuar también en las vías de señalización para regular la proliferación celular (Cavigelli y cols.,

1996; Liu y cols., 1996; Simenova y cols., 2000), indicando la posibilidad de que el arsénico induzca cáncer mediante un mecanismo epigenético.

3.3.5 Progresión en Carcinogénesis.

Hay evidencia positiva de que el DMA estimula la carcinogénesis en piel, pulmón, vejiga, riñón, hígado y tiroides (Yamamoto y cols., 1995; Yamanaka y cols., 1996, Yamanaka y cols., 2000) debido a un incremento en los ritmos de proliferación celular. Esta proliferación es un factor determinante en la progresión del cáncer.

3.3.6 Reparación alterada de DNA.

El arsenito inhibe más de 200 enzimas (Abernathy y cols., 1999), de las cien mil posibles enzimas celulares, casi todas tienen enlaces disulfuro covalentes (cisteína), mientras que un número menor de proteínas tienen una o más mitades (residuos) libres de cisteína a lo largo de la cadena polipeptídica (Wang y cols., 2002).

El arsenito tiene muchas oportunidades para la unión a proteínas, alterando conformacionalmente la estructura proteica y provocando alteraciones en su función enzimática. Las DNA ligasas I y II fueron inhibidas por el arsenito (Lee-Chen y cols., 1993; Hu y cols., 1998) y la actividad de la poli (ADP-ribosa) polimerasa humana también es inhibida por el arsenito (Yager y Wiencke, 1997).

El arsénico trivalente puede unirse preferentemente y con una actividad de enlace mayor a dos grupos sulfhidrilo próximos. Estos ditioles son bastante comunes entre ciertas proteínas de unión al DNA, factores de transcripción y proteínas de reparación del DNA. La alteración en la reparación del DNA como causa de la carcinogénesis del arsénico resulta una opción particularmente atractiva debido a la inhibición de las enzimas de reparación, provocando mutación sitios genéticos claves o provocando que se aumente la proliferación celular (Kitchin, 2001).

3.3.7 Supresión de p53.

La proteína p53 es una proteína guardián del genoma, el arsénico ocasiona un descenso en

los niveles de p53, lo cual podría ocasionar mutaciones que, al acumularse, conducen eventualmente a la carcinogénesis (Hamadeh y cols., 1999). Se ha reportado hipermetilación de una región promotora del gen p53 (Mass y Wang, 1997; Zhao y cols., 1997).

3.3.8 Efecto del As sobre la metilación de DNA.

La mayoría de los mamíferos biometilan al arsénico como parte de su metabolismo. El DNA también es metilado, lo cual es importante ya que los patrones de metilación permiten discernir qué genes van a expresarse o no. Se sugiere que la hipometilación del DNA podría comprometer a las células hacia una vía carcinogénica. El cambio de estado de metilación lleva a una expresión génica alterada y, probablemente a la carcinogénesis. Lo que está por comprobarse es la influencia del arsénico en este patrón de metilación (Zhao y cols., 1997).

En síntesis, existe evidencia positiva en sistemas experimentales que tres de los modos de acción aquí descritos (anormalidades cromosómicas, estrés oxidativo y factores de crecimiento alterados) pueden llevar a la carcinogénesis:

Las anormalidades cromosómicas son causadas fácilmente debido a la tendencia del arsénico trivalente a interactuar e interrumpir el funcionamiento normal de la tubulina y el huso acromático. El estrés oxidativo es un modo de acción carcinogénico que ha sido bien probado en pulmón y vejiga. La teoría del estrés oxidativo depende parcialmente de la habilidad de los metabolitos del arsénico para formar radicales libres. Las formas inorgánicas podrían generar radicales libres directamente (Kitchin, 2001). Se ha observado que el proceso de carcinogénesis ocasionado por el arsénico es un mecanismo complejo, el cual podría involucrar más de un modo de acción. Existe una teoría combinada de factores de crecimiento alterados, proliferación celular y promoción de la carcinogénesis que ha resultado una buena elección para un modo de acción carcinogénico del arsénico. El aumento de las concentraciones de factores de crecimiento promueve la proliferación celular y, finalmente, la promoción de la carcinogénesis. Asimismo, la muerte celular provocada por el arsénico (sobre todo las especies trivalentes) puede llevar a una regeneración celular compensatoria y quizá a la carcinogénesis (Kitchin, 2001).

3.4 EL ARSÉNICO COMO PROMOTOR DE CARCINOGENESIS.

Mucha de la evidencia hallada en estudios animales sobre el arsénico sugiere que el arsénico es un promotor del cáncer, más que un carcinógeno. Se acepta generalmente que los carcinógenos tienen ambas actividades: promotoras e iniciadoras y que los promotores sólo poseen la actividad promotora.

3.4.1 Modelos Animales.

A causa de los intentos fallidos para demostrar clara y exitosamente los efectos carcinogénicos de los arsenicales en modelos animales, no se han dilucidado los mecanismos de la carcinogénesis por arsénico permanecen confusos, esto se debe a la falta de un modelo animal confiable (Wang y cols., 2002). Solo se ha reconocido al arsénico como un carcinógeno en humanos, este efecto no ha sido corroborado en animales experimentales (Vahter y cols., 1995; Rudel y cols., 1996, Hartwig y cols., 1997; Goering y cols., 1999; Vahter, M., 1999).

CAPÍTULO IV. BIOMARCADORES

Los tres biomarcadores más empleados en la exposición al arsénico, son la cuantificación total de arsénico en cabello o uñas, arsénico en sangre y metabolitos totales o en especie en orina. Como el arsénico se acumula en tejidos ricos en queratina, los niveles de arsénico en el cabello y uñas son usados como indicadores de exposición al arsénico.

El arsénico es desalojado muy rápidamente de la sangre humana, por lo que el arsénico en sangre es usado sólo como un indicador en exposiciones recientes y/o altas (Ellenhorn, 1997). Los niveles de arsénico en orina proporcionan una medida de la dosis total absorbida (ATSDR, 1993). Sin embargo, los niveles de arsénico en orina son los más apropiados para indicar la exposición reciente. El arsénico total, arsénico inorgánico y la suma de los metabolitos en orina son usados como biomarcadores para exposición reciente al arsénico (Mandal y Suzuki, 2002).

Algunos mariscos y pescados contienen MMA y DMA, particularmente DMA, en cantidades ligeramente elevadas. Los arsenoazúcares presentes en algas marinas y algunos moluscos son metabolizados a DMA, el cual es excretado en orina, por lo cual el estudio del arsénico en orina debe llevar un historial cuidadoso de dieta (sobre todo del consumo de comida del mar) (Le y cols., 1994; Ma y Le, 1998; WHO, 2001).

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. 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.

Por ejemplo, la 8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es uno de los principales productos de daño al DNA inducido por ROS y es usado como un biomarcador de estrés oxidativo (Yamanaka y cols., 2001).

Un aumento en la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) puede interpretarse como un biomarcador de proliferación celular y la exposición al arsénico incrementa la actividad de esta enzima (Yamamoto y cols., 1995; Brown y Kitchin, 1996; Wanibuchi y cols., 1997). Los DPC (Aductos DNA-proteína) son un tipo de daño al DNA que puede usarse como un biomarcador de la exposición al arsénico relacionado a las lesiones primarias o tempranas del proceso carcinogénico.

4.1 Aductos DNA-proteína.

Un entrecruzamiento DNA-proteína (DNA-protein crosslinks (DPC)) es creado cuando una proteína se enlaza covalentemente al DNA. Tales eventos ocurren después de la exposición de las células a una diversidad de agentes citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, incluyendo luz ultravioleta y radiación ionizante, metales y metaloides como el cromo, níquel y arsénico, varios aldehídos y algunas drogas quimioterapéuticas. Los humanos están continuamente expuestos a agentes inductores de DPC presentes en contaminantes ambientales (Barker y cols., 2005).

Las interacciones DNA-proteína han sido implicadas en casi todos los aspectos de la expresión génica y la herencia. La ruptura de la fina sincronía en las interacciones de las proteínas de la cromatina juntas y con el DNA puede tener serias consecuencias genéticas. Las proteínas, ya sean solas o unidas con otras proteínas, interactúan con secuencias específicas de DNA para encender o apagar genes. Estas interacciones son reversibles y no covalentes. Al mismo tiempo, el DNA contiene varias proteínas y péptidos que están anclados covalentemente. Estas proteínas son muy importantes en la estructura de la cromatina y representan también enzimas importantes tales como las topoisomerasas.

Lo que podría suceder si un agente químico ocasiona que las proteínas reguladoras que normalmente no están unidas covalentemente al DNA se entrecrucen covalentemente con el DNA o que, proteínas estructurales tales como la actina, las cuales no funcionan como proteínas de unión al DNA, se entrecrucen con éste en sitios donde interactúan las proteínas

normales de matriz estructural (Costa y cols., 1993).

La inducción de DPC ha sido propuesta como un indicador temprano de efectos biológicos debido al hecho de que, carcinógenos conocidos o sustancias que se sospecha son carcinógenos tales como: el formaldehído, la β -propiolactona y la luz U.V., agentes quimioterapéuticos como el cisplatino y la mitomicina C y algunos compuestos metálicos como el sulfato de níquel, el óxido de arsénico y el dicromato de potasio, entre otros, inducen la formación de entrecruzamientos entre las proteínas y el DNA (Ramírez y cols., 2000). Diferentes agentes inducen DPCs por diferentes mecanismos. Las proteínas pueden entrecruzarse al DNA directamente a través de mecanismos oxidativo de radicales libres o indirectamente a través de un químico o droga enlazadora o a través de la coordinación con un átomo de metal. Un subtipo de estos mecanismos de entrecruzamiento involucra un enlace sulfhidrilo al aminoácido. Esto resulta en varios tipos de DPCs que son químicamente distintos y cuya formación está influenciada por factores como el metabolismo celular, fase del ciclo celular y la temperatura (Barker y cols., 2005).

Los DPC inducidos por arsenito podrían alterar la replicación de DNA, dejando regiones sin replicar que podrían provocar aberraciones cromosómicas, de cromátides y células aneuploides a través de la ruptura de proteínas del citoesqueleto (Ramírez y cols., 2000).

La relación entre una lesión genética y un tumor es difícil de establecer. Sin embargo, en vista del hecho de que la pérdida de DNA se transforma en una consecuencia genética, esta pérdida de información, podría llevar a la activación de oncogenes o a la pérdida de genes que codifiquen para proteínas reguladoras, importante en varios tipos de tumores y la comprensión de que genes supresores de tumores, tales como el gen RB, p53 y otros genes mantienen la normalidad de las células y que su inactivación puede venir como resultado de deleciones en las secuencias, o por otros mecanismos como las mutaciones puntuales.

La presencia de una proteína unida covalentemente al DNA es, ciertamente, un impedimento para la replicación del DNA. Se ha reportado la interacción de actina con el DNA después del tratamiento de células con cromato. Este entrecruzamiento involucra la

unión del cromo trivalente a la columna de fosfato del DNA y ligados a proteínas, como la actina a través de grupos reactivos en los aminoácidos tales como el nitrógeno del imidazol en la histidina o el grupo hidroxilo de la tirosina.

El níquel también produce DPC, pero difiere del cromo en que la función del níquel es más catalítica en la formación de entrecruzamientos que participar directamente en ellos. Ya que varias proteínas de unión al DNA requieren del ión Magnesio (Mn^{2+}), iones como el níquel antagonizan la función del magnesio; la unión a proteínas de iones como el níquel a los sitios de unión del magnesio podría afectar la unión DNA-proteína normal, ocasionando un entrecruzamiento de éstas proteínas con el DNA. La formación de estos entrecruzamientos covalentes inapropiados rompe la expresión génica y la estructura de la cromatina (Costa y cols., 1993).

4.1.1 Consecuencias biológicas.

El entrecruzamiento covalente de proteínas al DNA se espera que interrumpa los procesos metabólicos del DNA tales como replicación, reparación, recombinación, transcripción, remodelación de cromatina, etc. Se espera que los DPCs actúen como aductos voluminosos que distorsionan la α -hélice y por tanto, podría ser posible que los complejos bloquearan físicamente la progresión de la replicación o transcripción y/o previnieran el acceso de proteínas necesarias para la síntesis a lo largo de la cadena molde, para la transcripción o el reconocimiento de la reparación y/o incisión. También podrían afectar todos estos procesos anclando la cromatina y previniendo su remodelación (Barker y cols, 2005).

Así, todos los agentes inductores de DPC conocidos generan otras formas de daño al DNA además de los DPCs, y atribuirle directamente a los DPCs cualquier efecto observado como mutagénesis o carcinogénesis es desconcertante debido al impacto concomitante de otras lesiones. No obstante, varios estudios han reportado que la inducción de DPCs se correlaciona con el daño genético (intercambio de cromátides hermanas, transformación y citotoxicidad) (Merk y Speit, 1998). Así los DPCs podrían contribuir a los efectos genotóxicos de varios agentes que causan daño al DNA.

CAPÍTULO V. CITOQUERATINAS.

5.1 Generalidades.

Existen tres filamentos proteicos de las redes del citoesqueleto que mantienen la estructura celular: los microfilamentos de actina (MFs), los microtúbulos de tubulina (MTs) y los filamentos intermedios (IF) las funciones de estos filamentos incluyen: división celular, motilidad, plasticidad, mantenimiento de la integridad mecánica, respuestas al estrés y transporte de vesículas (Ku y cols., 1999). Los filamentos intermedios son las proteínas menos comprendidas de las 3 familias, son proteínas tejido-específicas asociadas con una extensa variedad de enfermedades humanas que reflejan su diversidad. El nombre de filamentos intermedios viene de su diámetro (10-12nm) a comparación de los diámetros de los microfilamentos de actina (25nm) y los microtúbulos de tubulina (7-10nm). Los IF funcionan en cercana interacción con componentes asociados al citoesqueleto como proteínas motoras y proteínas de unión cruzada (Herrmann y Aebi, 2000; Yoon y cols., 2001).

Existen desórdenes relacionados con los IF como enfermedades abrasadoras de la piel, cardiomiopatías, distrofia corneal, leucoqueratosis oral, laminopatías (enfermedades relacionadas con la proteína Lamin A), del hígado y un subconjunto de esclerosis (Irving y McLean, 1999; Al-Chalabi y Leigh, 2000; Carlsson y Thornell, 2001; Hutchison y cols., 2001).

Las proteínas conocidas como filamentos intermedios están divididas en cinco grupos principales, basados en sus características estructurales. Los subgrupos más grandes son las queratinas de tipo I y II, que incluyen las queratinas del pelo y las queratinas epiteliales célula-específicas (Citoqueratinas). Las queratinas son heteropolímeros obligados asociados no covalentemente y todas las células epiteliales expresan al menos una queratina de tipo I y una de tipo II. Las citoqueratinas, al ser tejido-específicas, constituyen un marcador muy útil de diferenciación epitelial, la expresión ya sea de una o varias citoqueratinas en combinación es típica de un tejido en específico (Omary y cols., 2002).

En el área del cáncer, recientemente se le ha dado importancia a las citoqueratinas como marcadores de tumores; durante la transformación maligna de células epiteliales normales los patrones de citoqueratinas se mantienen iguales, y las citoqueratinas más abundantes en los carcinomas (CK 7, 8, 18, 19) también se encuentran en los epitelios simples, pueden encontrarse intratumoralmente o circular en la sangre como complejos parcialmente degradados. Los depósitos de citoqueratinas presentes en los tumores se convierten en blancos potenciales para radioinmunodetección y radioinmunoterapia, mientras que los fragmentos de citoqueratinas pueden medirse en el suero y en otros fluidos biológicos (Sundstrom y Stigbrand, 1994; Buccheri y Ferrigno, 2001). Las citoqueratinas pueden verse aumentadas en casos de tumores y liberadas en sangre debido a la lisis celular y necrosis tumoral.

5.2 Distribución en el Hígado.

Los hepatocitos adultos son algo único entre los epitelios de tipo simple, expresan sólo citoqueratina 8 (CK8) y citoqueratina 18 (CK18), mientras que otras células epiteliales expresan 2 o más queratinas de tipo I o tipo II. En los hepatocitos las citoqueratinas están distribuidas en proporciones equimolares como una red de filamentos citoplásmicos y como una banda justo debajo de los microfilamentos rodeando la membrana plasmática (Omary y cols., 2002). Bajo ciertas condiciones, los hepatocitos pueden expresar otras queratinas además de CK8 y CK18, en ciertas enfermedades como colestasis y enfermedad alcohólica del hígado, algunos hepatocitos expresan CK7 (Van Eyken y cols., 1988; Van Eyken y cols., 1988a; Van Eyken y cols., 1989; Roskams y cols., 2003)

El hígado también incluye colangiocitos, células de Kupffer, células estelares, células endoteliales, células ovales y células Pit, cada una con su complemento único de filamentos intermedios. Los estudios animales señalan al hígado e intestino como objetivos potenciales de enfermedades por mutaciones de queratina, predisponiendo a estos órganos a diversas enfermedades (Omary y cols., 2002).

5.3 Estructura.

La unidad elemental de los IF es un dímero muy largo y delgado parecido a una barra. Los ejes de los dímeros están alineados paralelamente al eje del filamento, el ancho del filamento es controlado por una asociación específica de dímeros. Los MF y los MT son polares, al contrario de los IF ensamblados que no tienen polaridad. Los IF parecen ser los filamentos más dinámicos, ya que pueden ocurrir asociaciones-disociaciones a lo largo de los filamentos y no sólo en las orillas, como ocurre en los MT y MF (Strelkov y cols., 2003).

Las proteínas IF son expresadas diferencialmente en la mayoría de los tejidos y tipos celulares. Se han identificado y secuenciado 65 genes de IF humanos, así como sus genes ortólogos en otras numerosas especies (Conway y Parry, 1988; Herrmann y Aebi, 1998; Hesse y cols., 2001). Todas las proteínas IF comparten una estructura tripartita característica: un dominio central α -hélice superenrollado, la “barra” central y los dominios no-helicoides de la cabeza y la cola situados en los extremos del dominio central (barra). Las IF citoplásmicas pueden clasificarse en cuatro tipos principales de acuerdo a la similitud de su secuencia, mientras que el tipo cinco representa a las láminas nucleares.

La estructura central en barra presenta una periodicidad de residuos (7) en su distribución. Esta repetición es una característica de la estructura conocida como coiled-coil (estructura superenrollada). Una coiled-coil está formada por 2 o más α -hélices enrolladas unas con otras en una “superhélice”, y constituye un diseño estructural generalizado en las proteínas (Lupas, 1996; Burkhard y cols., 2001). La estructura superenrollada define la forma del dímero. La periodicidad del septeto de residuos dentro del dominio en barra se interrumpe en varios lugares lo que genera 4 segmentos consecutivos α -helicoidales: 1A y 1B, que juntos forman la espiral 1, y 2A y 2B, que forman la espiral 2. Estos segmentos están interconectados por estructuras de unión linkers (L1, L12 y L2). Se encuentran dos regiones altamente conservadas en las proteínas IF localizadas en los extremos de la barra (Figura 4). Estas regiones conservadas están involucradas en interacciones específicas dímero-dímero, que son críticas para el ensamblaje correcto de los IF (Strelkov y cols., 2003).

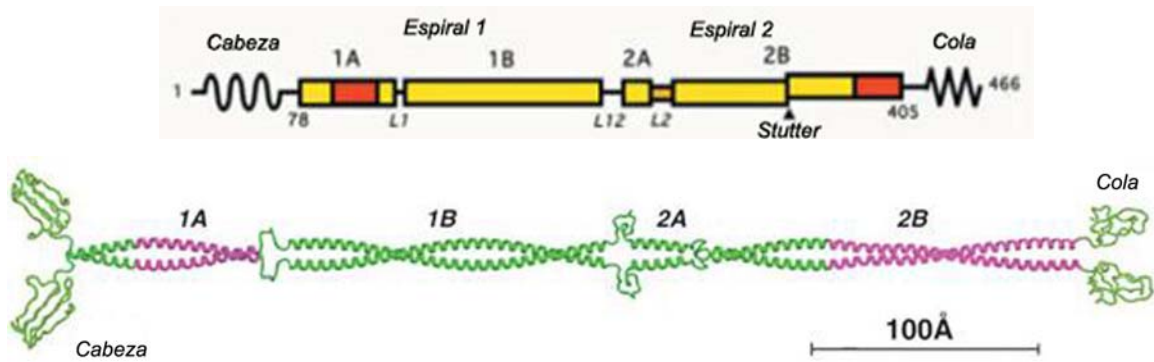


Figura 4. Estructura general de las citoqueratinas. (Modificado de Strelkov y cols., 2003)

Finalmente, los dominios de la cabeza y cola varían considerablemente tanto en secuencia como en longitud, entre los diferentes IF. Es debido a la variabilidad de los dominios terminales que los IF muestran un amplio rango de tamaños (Heins y Aebi, 1994; Herrmann y cols., 1996).

La mayoría de las proteínas IF se ensamblan en homodímeros, pero las queratinas son heterodímeros obligados formados por una cadena ácida (como la citoqueratina 18) y una cadena básica o neutra (como la citoqueratina 8), los pasos de ensamblaje varían entre los diferentes tipos de IF y entre los diferentes IF. La asociación lateral de los dímeros se describe mediante tres formas de interacción, llamadas A_{11} , A_{22} y A_{12} (Figura 5).

- La forma A_{11} corresponde a una asociación antiparalela, escalonada a la mitad, de dos dímeros con sus segmentos 1B alineados
- La forma A_{22} corresponde a una asociación parecida a la anterior, pero los segmentos alineados en este caso, son los segmentos 2B
- La forma A_{12} se ha establecido como una asociación antiparalela solamente

Se ha encontrado en la mayoría de los IF maduros un solapamiento entre las partes amino y carboxilo terminal de los dímeros alineados longitudinalmente, denotados como la forma A_{CN} (Geisler y cols., 1992; Steinert y cols., 1993; Herrmann y Aebi, 1998a).

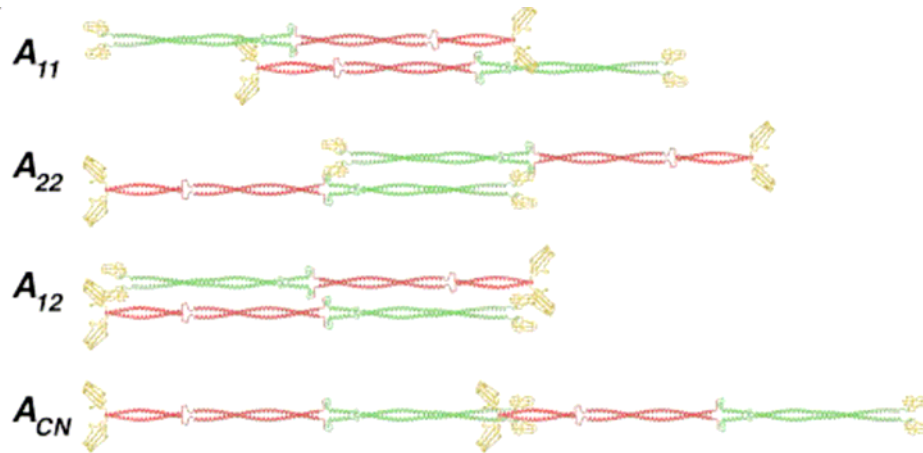


Figura 5. Esquemas de las formas de interacción entre dímeros de citoqueratinas (Modificado de Strelkov y cols., 2003)

La formación de tetrámeros es el primer paso de ensamblaje más allá de los dímeros, los tetrámeros son los oligómeros solubles más pequeños detectables in vivo. Los tetrámeros se convierten en unas estructuras llamadas filamentos de longitud única (ULF), resultado de una asociación lateral de dímeros (Herrmann y cols., 1996). Una vez formados, los ULF comienzan a alinearse longitudinalmente en filamentos de gran extensión. Posteriormente, los filamentos sufren algún rearrreglo interno de sus subunidades llevándolas a una compactación radial (Herrmann y Aebi, 1999). Una formación lineal de tetrámeros dentro de un IF maduro corresponde a un protofilamento, es decir, una estructura que contiene dos dímeros por sección transversal.

El empaquetamiento de dímeros individuales dentro de un filamento maduro es muy denso, por lo que podría esperarse que las barras superenrolladas realicen amplias interacciones dentro de la región de traslape de los 3 tipos de interacción de dímeros (A_{11} , A_{22} y A_{12}). Se ha establecido la hipótesis de que dos superenrollamientos hacia la izquierda, orientados al contrario están sucesivamente entrelazadas una con otra en una “superhélice” enrollada hacia la izquierda (Figura 6).

La inclinación de esta superhélice es muy cercana a la inclinación del superenrollamiento. Las interacciones intermoleculares dentro del tetrámero pueden presentarse de dos formas como se observa en la Figura 7: por un lado, es factible que los núcleos hidrofóbicos de los

dímeros se encuentren preservados, mientras que las interacciones entre los dímeros estén mediadas por los grupos polares localizados principalmente en el “exterior” del superenrollamiento. La otra opción posible es que la asociación de los dímeros podría resultar, al menos en algunas regiones, en la formación de un superenrollamiento de cuatro hebras antiparalelas, esta opción requeriría rearrreglos significativos dentro de las estructuras de los dímeros, creando un núcleo hidrofóbico (Strelkov y cols., 2003).

Hasta ahora no se ha obtenido una explicación definitiva de cómo se acomodan los dímeros dentro de un filamento. Estudios en queratina y otros IF han arrojado estructuras de ~10nm de diámetro la cual parece contener un núcleo de baja densidad con un diámetro de ~3nm (Briki y cols., 1998; Parry y Steinert, 1999)

Se podría sugerir que los ULF formados por los IF representen ensamblajes circulares (los cilindros) de dímeros interactuando lateralmente (Herrmann y cols., 1998). Una vez que estos ULF se encuentran alineados en el filamento, éste se compacta, lo que demanda ciertos rearrreglos en el empaquetamiento lateral de los dímeros. Los dímeros se rearrreglan formando protofibrillas (Aebi y cols., 1983; Parry y cols., 2002). La estructura de los filamentos maduros involucra protofibrillas octaméricas al compactarse (Figura 8).

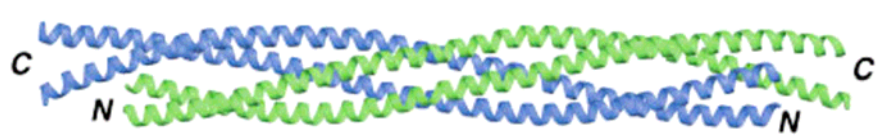


Figura 6. Estructura de un tetrámero, donde se muestra el superenrollamiento de las proteínas (Modificado de Strelkov y cols., 2003)

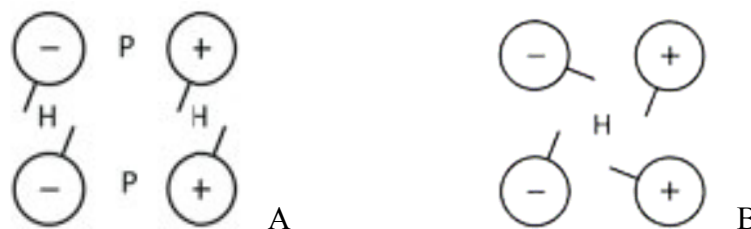


Figura 7. Modelos de interacciones intermoleculares en un tetrámero (Modificado de Strelkov y cols., 2003)

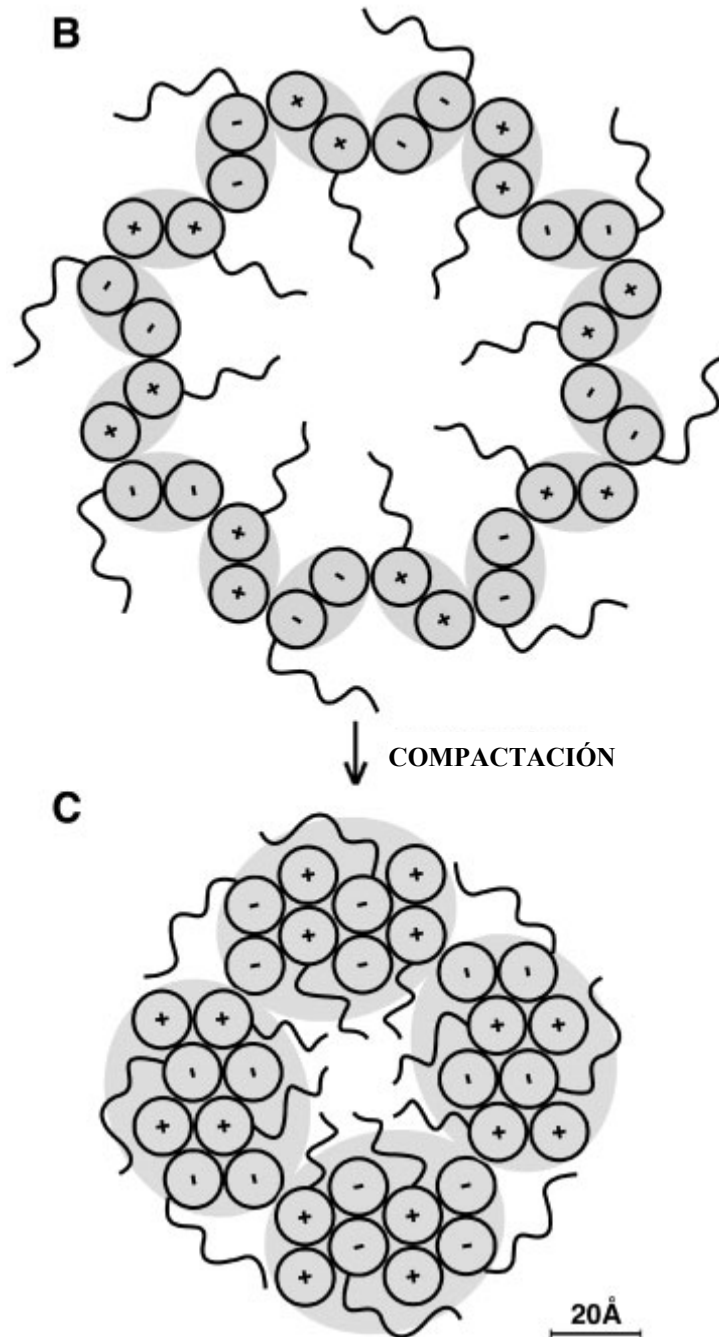


Figura 8. Estructura de un filamento intermedio, donde se muestra el reordenamiento de las citoqueratinas y su acomodo en el IF. (Modificado de Strelkov y cols., 2003)

5.4 Función e Importancia de la Citoqueratina 18.

Las funciones de las queratinas pueden dividirse en dos categorías: mecánicas y no-mecánicas (Figura 9). La naturaleza mecánica del estrés que los hepatocitos podrían experimentar se relaciona principalmente a cambios hemodinámicos que ocurren en asociación al daño hepático (Makin y cols., 1997). La alteración del filamento de queratina o su ausencia predispone al hígado al daño. La estabilidad mecánica que es impartida por las queratinas está relacionada probablemente a su interacción con desmosomas, hemidesmosomas y con otros elementos del citoesqueleto (Omary y cols., 2002).

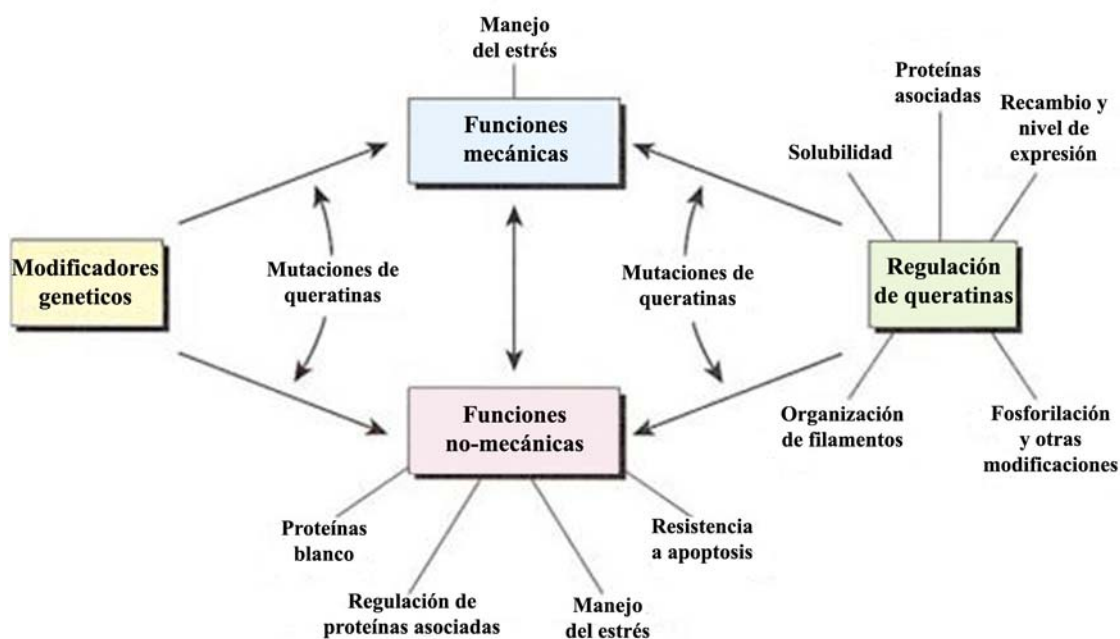


Figura 9. Funciones de las citoqueratinas (Modificado de Omary y cols., 2002)

El mecanismo de citoprotección que es impartido por las queratinas hepáticas queda por definirse pero probablemente la fosforilación sitio-específica de queratina sea una contribución importante (Omary y cols., 2002); la hiperfosforilación de queratina es una asociación común en todas las formas de daño probadas hasta ahora (Omary y cols., 1998; Stumptner y cols., 2000).

Otras funciones de las queratinas en el hígado incluyen:

- Su papel en protección de la apoptosis, regulación de proteínas y un posible papel de señalización en los cuales las queratinas participan y pueden actuar como moduladores. Las queratinas actúan como sustrato de varias cinasas implicadas en mitosis, apoptosis y estrés (Omary y cols., 1998).
- Probablemente jueguen otros papeles moduladores, debido a su interacción con otras proteínas asociadas. CK8/CK18 se asocian con proteínas de choque térmico y con proteínas de la familia 14-3-3.
- Las queratinas tienen varios sitios de fosforilación, algunos de esos sitios influyen en el montaje/desmontaje de la red de citoqueratinas así como la interacción de éstas con otras proteínas involucradas en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis (Stumtner y cols., 2000; Toivola y cols., 2001; Ku y cols., 2002).
- También son capaces de modular la señalización del TNF y la ejecución de la apoptosis, el mecanismo de la resistencia a apoptosis mediado por queratina podría relacionarse a diferencias en la densidad del receptor de superficie Fas, también han sido reportadas posibles interacciones de K8/K18 con el receptor tipo II del TNF o podría involucrar la pérdida de señalización de marcadores en enterocitos y hepatocitos (Caulin y cols., 2000).

En estados patológicos hepáticos, como Esteatohepatitis alcohólica y no-alcohólica (Hígado Graso), el efecto de algunos metales (Cobre) y Colestasis (obstrucción del flujo biliar) se presenta una pérdida de la red citoplásmica de queratina y se observa la presencia de inclusiones citoplásmicas, principalmente los llamados Cuerpos de Mallory (Mallory Bodies, MB) los cuales se encuentran conformados por agregados de queratinas alteradas o con cambios estructurales y/o modificaciones químicas, y otras proteínas (proteínas de stress, ubiquitina) (Denk y cols., 2000). Los MB son considerados como el producto de la respuesta a un daño celular, en todas las condiciones patológicas en las cuales los MB son encontrados, la principal y común característica es un estrés oxidativo crónico (Angulo, 2002; Stumtner y cols., 2002; Fickert y cols., 2003).

En carcinomas hepáticos, se ha observado la expresión aumentada de CK8 y CK18, pero en algunas situaciones no se ha detectado su presencia; su expresión desequilibrada podría explicar porque no hay IF estables en estos tumores y porqué en otros se encuentran Cuerpos de Mallory (Zatloukal y cols., 2004).

Basados en la limitada información disponible las mutaciones en las citoqueratinas parecen causar enfermedad hepática mediante la interferencia con la organización normal de los filamentos y las funciones relacionadas que ocurren en los hepatocitos bajo múltiples estímulos fisiológicos y no fisiológicos. En este contexto, la reorganización de los filamentos de citoqueratina podrían afectar otras modalidades reguladoras que impactan colectivamente en las funciones conocidas de las citoqueratinas y las quedan por definirse (Omary y cols., 2002).

CAPÍTULO VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

6.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Existen varios agentes ambientales capaces de inducir la formación de aductos DNA-proteína, los cuales han sido propuestos como una herramienta para la detección temprana de daño genotóxico (Costa y cols., 1993; Ramírez y cols., 2000; Arteaga, 2003; Castro, 2003; López, 2004). El arsenito de sodio forma parte de este grupo de agentes ambientales capaces de inducir aductos DNA-proteína en la célula, sin embargo no existen reportes acerca de la capacidad de sus metabolitos para inducir este tipo de daño.

La metilación del arsénico inorgánico fue considerada durante mucho tiempo como un sistema de detoxificación que facilita la excreción del arsénico presente en el organismo; sin embargo, varios estudios (Ahmad y cols., 2000; Kitchin, 2001; Yamanaka y cols., 2004) han demostrado que la conversión del arsénico inorgánico a sus metabolitos metilados (MMA y DMA) aumenta la capacidad del arsénico a provocar daño celular, por lo que es de nuestro interés conocer si la presencia de estos metabolitos tendrá influencia en la inducción de aductos DNA-proteína, marcadores de daño citotóxico y genotóxico temprano. Considerando que los procesos de detoxificación y de bioactivación del arsénico se llevan a cabo en el hígado, evaluaremos la inducción de los aductos en cultivos organotípicos de hígado de ratón que ha demostrado ser un buen sistema para la evaluación de toxicidad temprana provocada por xenobióticos (Dogterom, 1993; Lerche-Langrand y Herve, 2000; Ramírez y cols., 2000).

Es de nuestro interés en particular conocer el efecto que tienen los metabolitos metilados del arsénico (MMA y DMA) en la inducción de aductos DNA-citoqueratina 18 en cultivos organotípicos de hígado de ratón, dada la importancia de las citoqueratinas en diversos procesos celulares. La función de los filamentos intermedios es amplia y en entre ellos se encuentra la citoqueratina 18 que destaca como proteína específica en el hígado cuyas

funciones se asocian con el mantenimiento de la integridad mecánica de los hepatocitos, además participan en procesos celulares importantes como la división celular y apoptosis (Omary y cols., 2002). Las alteraciones celulares asociadas con esta proteína ponen en riesgo su función, expresión, estructura y síntesis en el hígado comprometiendo de manera indirecta la integridad hepática.

6.2 OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto de los metabolitos metilados del arsénico (MMA y DMA) en la formación de aductos DNA-proteínas, mediante la cuantificación de los aductos en rebanadas de hígado de ratón expuestas a los metabolitos, para evaluar el daño temprano que provocan los metilados en las células hepáticas.

6.3 OBJETIVOS PARTICULARES:

- ❖ Evaluar la capacidad inductora de los metabolitos metilados del arsénico (MMA y DMA) a diferentes concentraciones para producir aductos DNA-proteínas, mediante la exposición de estos metabolitos en rebanadas de hígado de ratón, para medir el daño que estos aductos provocan en el cultivo organotípico.
- ❖ Identificar la presencia de citoqueratina 18 como parte del aducto, mediante la separación e identificación de esta proteína por Western Blot, para conocer si la unión de esta citoqueratina al DNA es inducida por la acción del MMA y DMA en las células hepáticas.

6.4 HIPÓTESIS.

Los metabolitos metilados del arsénico (MMA y DMA) son capaces de inducir significativamente la presencia de aductos ADN-proteínas en el cultivo organotípico de hígado de ratones BALB/c.

CAPÍTULO VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados son de Sigma Aldrich

7.1 PREPARACIÓN DEL CULTIVO ORGANOTÍPICO DE HÍGADO.

Se obtuvo el hígado de un ratón macho BALB/c por dislocación cervical, en condiciones estériles, obtuvimos cortes delgados (5-6 mm), se pesó cada rebanada y se transfirieron a placas de cultivo que contenían 5ml de medio (medio DMEM suplementado SFB 12% y antibiótico/antimicótico 1%).

Los cultivos se incubaron durante 2 hrs. (37°C, 95% O₂, 5% CO₂) para adaptarlos al medio y posteriormente se trataron las rebanadas con Arsenito de Sodio, MMA o DMA, según fuera el caso; las concentraciones se encontraban en el rango de 1x10⁻⁵ a 1x10⁻¹¹ M. Al mismo tiempo se trabajó un control negativo (sin tratamiento). Los cultivos organotípicos se incubaron nuevamente, ahora por 3hrs a las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de incubación, se separaron las rebanadas del medio de cultivo y se homogenizaron en un homogenizador Potter con 1ml de PBS (pH 7.2) con inhibidor de proteasas.

7.2 DETERMINACIÓN DE POTASIO (VIABILIDAD CELULAR)

Se tomaron 500µl del homogenado obtenido del cultivo y se sonicaron por 3 min. Después de la sonicación, se agregaron 700µl de ácido sulfosalicílico y se centrifugaron los homogenados a 3000 r.p.m. por 10 min. Se tomaron 250µl de esta solución y se les agregó Cloruro de Cesio, diluyendo la muestra a 25 ml. Posteriormente se realizó la cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica, utilizando como blanco 250µl de ácido sulfosalicílico, 2.5 ml de Cesio (10µg/ml) aforados a 25 ml. Se obtuvo la concentración de Potasio en cada muestra (en ppm) mediante la interpolación del resultado en una curva estándar.

7.3 PRECIPITACIÓN DE ADUCTOS ADN-PROTEÍNA.

Se realizó la precipitación de los aductos ADN- proteína siguiendo el Zhitkovich y Costa, (1992). Brevemente, se mezclaron 500µl del homogenado con 500µl de solución de lisis (SDS 2%, TRIS-HCl 20mM PMSF 1mM, pH 7.5). Se tomó una alícuota de 10-20µl para la determinación de DNA total, congelándose ambas muestras a -4°C; la muestra para precipitación se deja 12hrs mínimo en congelación para provocar la lisis de las células. Transcurridas las 12 hrs., se descongelaron los lisados a 37°C, posteriormente se pasan 3 veces por una jeringa para provocar la ruptura celular. Se agregaron 500µl de solución B (KCl 200mM, TRIS-HCl 20mM, pH 7.5) y las muestras se incubaron 10 min. a 65°C. A continuación los tubos se invirtieron 3 veces y se colocan 5 min. en hielo para que precipiten los complejos, transcurrido el tiempo, los precipitados se centrifugan 5min a 6,000g a 4°C, se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de solución C (KCl 100mM, TRIS-HCl 20mM, pH 7.5), agitando hasta disolver la pastilla. Se incubó nuevamente la muestra por 10 min. a 65°C y se invierten los tubos colocándolos en hielo por 5 min., centrifugando nuevamente a 5 min. en hielo. Se removió el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de solución C, repitiendo el lavado 2 veces más.

Se remueve el último sobrenadante, agregando 250µl de solución D (KCl 100mM, TRIS-HCl 20mM, EDTA 10mM, pH 7.5). Se tomó una alícuota de 50µl y se congeló la muestra para utilizarla posteriormente en la electroforesis. Los 200µl restantes se incubaron con Proteinasa K (concentración final 0.2mg/ml de PK) por 3 hrs. a 50°C, posteriormente se le agregó albúmina a cada tubo (concentración final 100mcg de albúmina/tubo), se incubó 10min en hielo y los tubos se centrifugan a 10,000g/10min a 4°C. Se recupera el sobrenadante (DNA que estuvo complejo) y se congela

7.4 DETERMINACIÓN DE ADUCTOS DNA-PROTEÍNA.

Para determinar el porcentaje de aductos DNA-proteína, primero se midió la cantidad de DNA total presente en la muestra y, a su vez, cuánto de éste DNA se encontró complejo con las proteínas.

Para la determinación de **DNA total** se tomaron 10µl de la muestra congelada previamente (ver Precipitación de aductos) y se agregaron 12.5µl de solución de Hoechst y 980µl de solución D. Las muestras se dejaron reposar 10min en la oscuridad y se midieron en un fluorómetro. Para el **DNA complejo** se tomaron a 100µl de la muestra obtenida al final de la precipitación de complejos y se le agregaron 12.5µl de solución de Hoechst y 890µl de solución D. Las muestras se dejaron reposar 10 min. en la oscuridad y se midieron en el fluorómetro. Se calcularon las concentraciones de cada muestra por interpolación en una curva estándar de los datos obtenidos en el fluorómetro.

7.5 ELECTROFORESIS SDS-PAGE.

Se determinaron las proteínas mediante el Método de Bradford (1976), midiendo la absorbancia a 595 nm, interpolando el resultado en una curva patrón; con este resultado se calculó la cantidad de muestra necesaria para tener una concentración final de 40-60µg de proteína en cada carril. Se le agregaron 10µl de DNAsa a cada muestra y se incubaron durante 1 hr a 37°C. Transcurrido el tiempo, se colocaron en un gel de Acrilamida al 10%, se colocó una muestra de albúmina como control. Se corrió la electroforesis a 60 V por un tiempo promedio de 3 hrs. Terminado el corrimiento se tiñó uno de los geles con Azul de Coomassie al 0.05% y el otro gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 80-100V, 350 mA durante una 1 hr.

7.6 WESTERN BLOT

La membrana obtenida en la transferencia se sumergió en solución bloqueadora durante 12 hrs. en refrigeración y en constante agitación, a continuación, se lavó la membrana varias veces con TBS-Tween y se lavó por último con TBS, posteriormente, se agregó el anticuerpo primario (anti-CK18) incubando la membrana durante 11/2 hr en agitación suave. Al terminar el tiempo de incubación, se recuperó el anticuerpo y se volvió a lavar la membrana varias veces con TBS-Tween terminando con un lavado de TBS. Se agregó una solución de Diaminobencidina (1% en PBS pH 7.2) y peróxido de hidrógeno para revelar la membrana, se incubó durante 20 min. en oscuridad y una vez que se observan las bandas reveladas se lavó perfectamente la membrana, se secó y se guardó en mica o plástico protegiéndola de la luz.

CAPÍTULO VIII. RESULTADOS

Con objeto de conocer la capacidad de los metabolitos trivalentes del arsenito de sodio por inducir DPC en el hígado de ratones de la cepa BALB/c se expusieron durante 3 horas los cultivos organotípicos de hígado a concentraciones variables de los agentes en estudio. Nuestros resultados corroboran la capacidad inductora de DPC por arsenito de sodio previamente estudiada por nuestro grupo de trabajo (Arteaga, 2003; Macay, 2004) (Gráfica 3) y demuestran que los metabolitos metilados (DMA y MMA) inducen con mayor capacidad este tipo de daño genético en cultivo organotípico de hígado viable, como lo muestran los resultados de Potasio (Tabla 1, Gráfica 1). Aunque todos los compuestos evaluados indujeron un aumento superior al control negativo en todas las dosis empleadas, se observó la mayor inducción significativa de DPC con DMA en su dosis intermedia ($1 \times 10^{-7} M$). Las tres concentraciones evaluadas de DMA y la concentración intermedia de MMA muestran diferencias estadísticamente significativas después del análisis de comparación múltiple de medias “Tukey” (Tabla 2, Gráfica 2).

TABLA 1. Determinación de Viabilidad Celular (Niveles de Potasio (μ moles K/g de Tejido)) en Cultivo Organotípico de Hígado de Ratón

TRATAMIENTO	μ moles K/g de tejido	DESVIACIÓN ESTANDAR
CONTROL	71.12	7.89
10^{-9} As	60.29	7.26
10^{-7} As	69.64	8.67
10^{-5} As	45.60	8.62
10^{-9} MMA	48.65	3.64
10^{-7} MMA	56.66	8.93
10^{-5} MMA	39.30	9.199
10^{-9} DMA	66.52	5.42
10^{-7} DMA	52.15	9.96
10^{-5} DMA	43.23	7.85

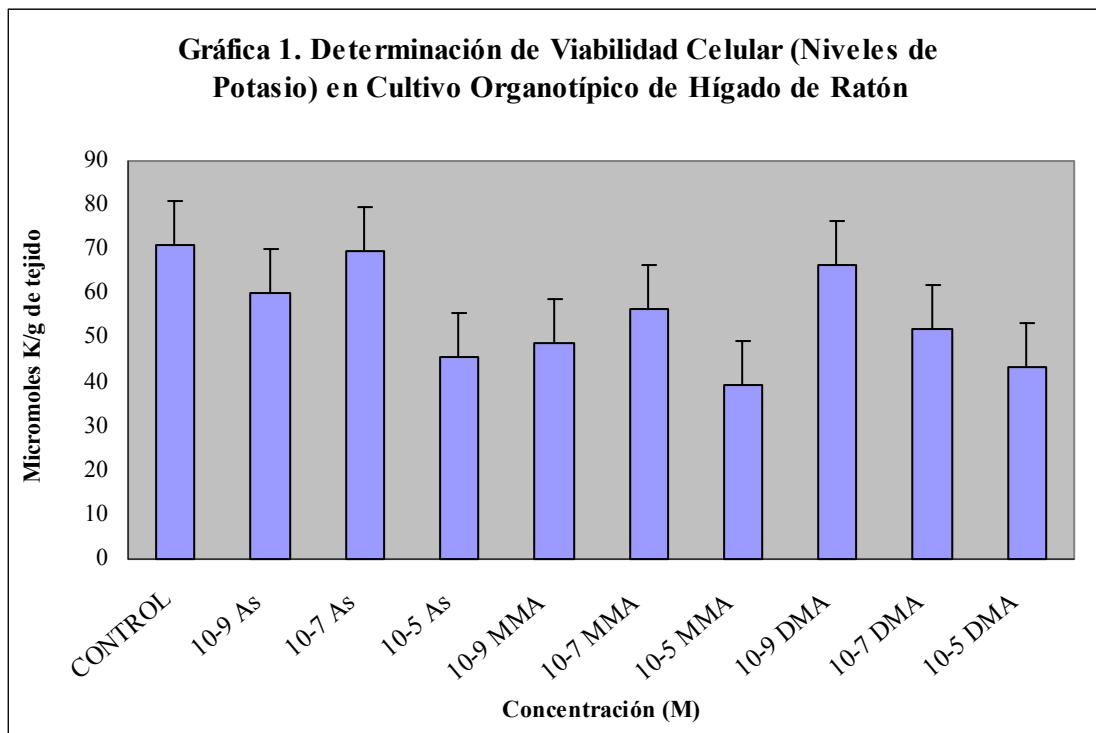
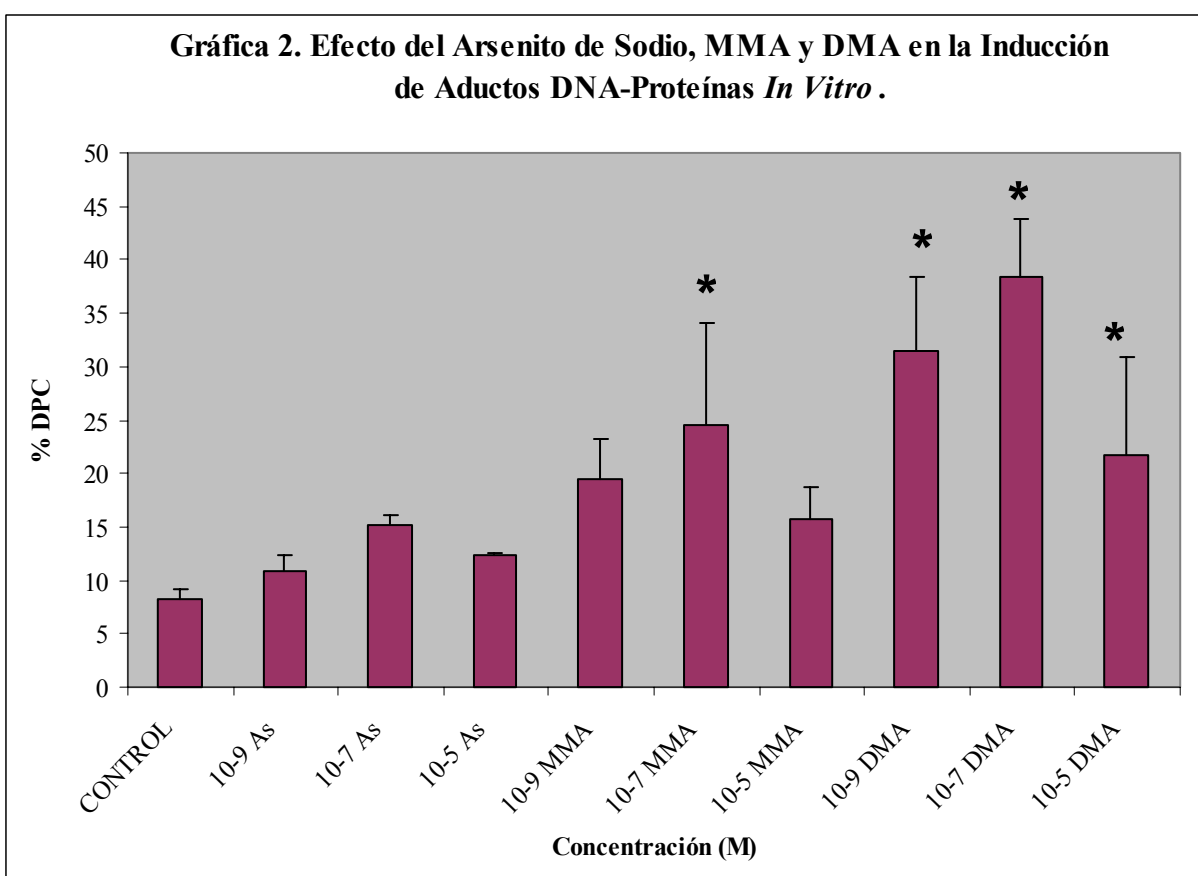


TABLA 2. Porcentaje de Aductos DNA-Proteínas Inducidos por el Arsenito de Sodio, MMA y DMA *In Vitro*

TRATAMIENTO	% DPC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
CONTROL	8.23	1.04
10 ⁻⁹ As	10.86	1.498
10 ⁻⁷ As	15.13	1.01
10 ⁻⁵ As	12.40	0.21
10 ⁻⁹ MMA	19.43	3.70
10 ⁻⁷ MMA	24.61*	9.49
10 ⁻⁵ MMA	15.81	2.92
10 ⁻⁹ DMA	31.44*	6.97
10 ⁻⁷ DMA	38.31*	5.47
10 ⁻⁵ DMA	21.76*	9.05

ANOVA F= 12.1868; p<0.05 * Diferencia estadísticamente significativa

Al comparar el control con cada especie arsenical por separado, encontramos que las tres concentraciones de arsenito de sodio y de DMA aumentaron significativamente la inducción de DPC (Tablas 3 y 5, Gráficas 3 y 5), el MMA por otro lado, indujo un aumento en la inducción de DPC pero sólo la concentración media presentó un aumento significativo (Tabla 4, Gráfica 4).

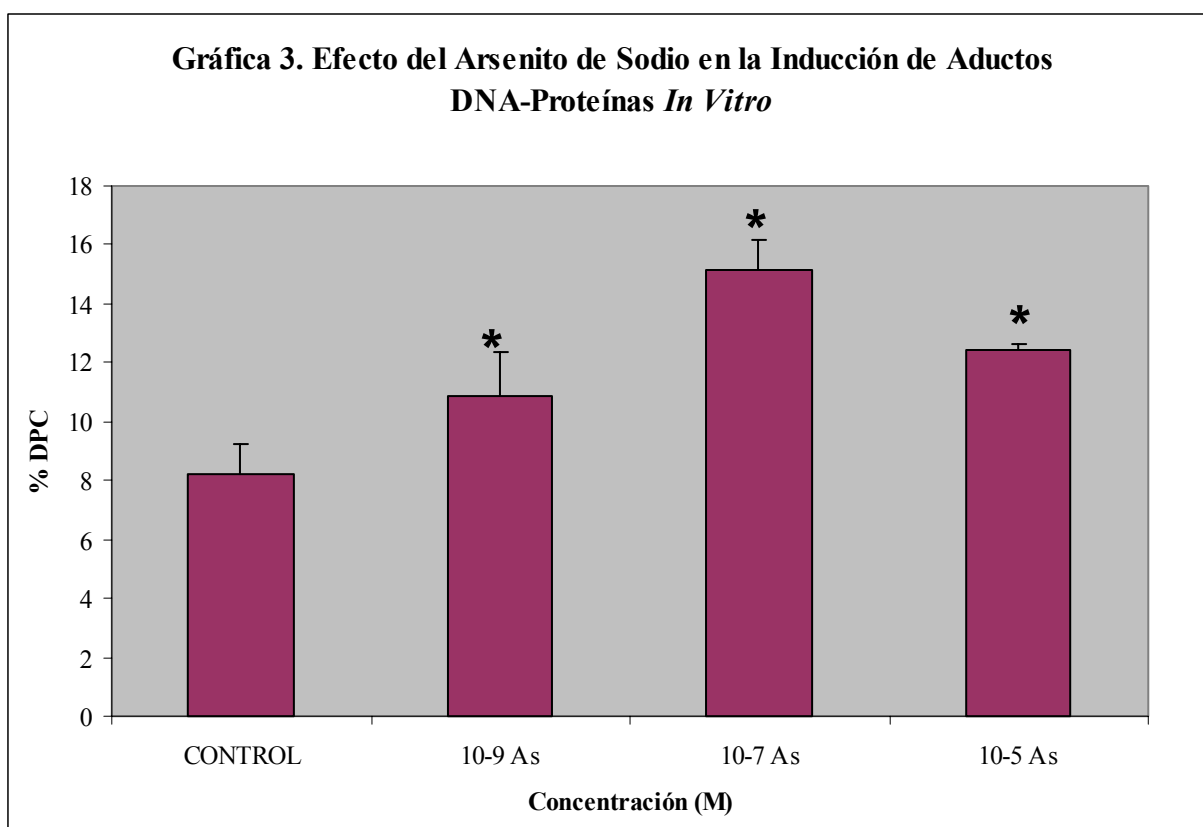


ANOVA F= 12.1868; p<0.05 * Diferencia estadísticamente significativa

TABLA 3. Porcentaje de Aductos DNA-Proteínas Inducidos por el MMA *In Vitro*

TRATAMIENTO	% DPC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
CONTROL	8.23	1.04
10 ⁻⁹ As	10.86*	1.498
10 ⁻⁷ As	15.13*	1.01
10 ⁻⁵ As	12.40*	0.21

ANOVA F= 36.6607; p<0.05 * Diferencia estadísticamente significativa

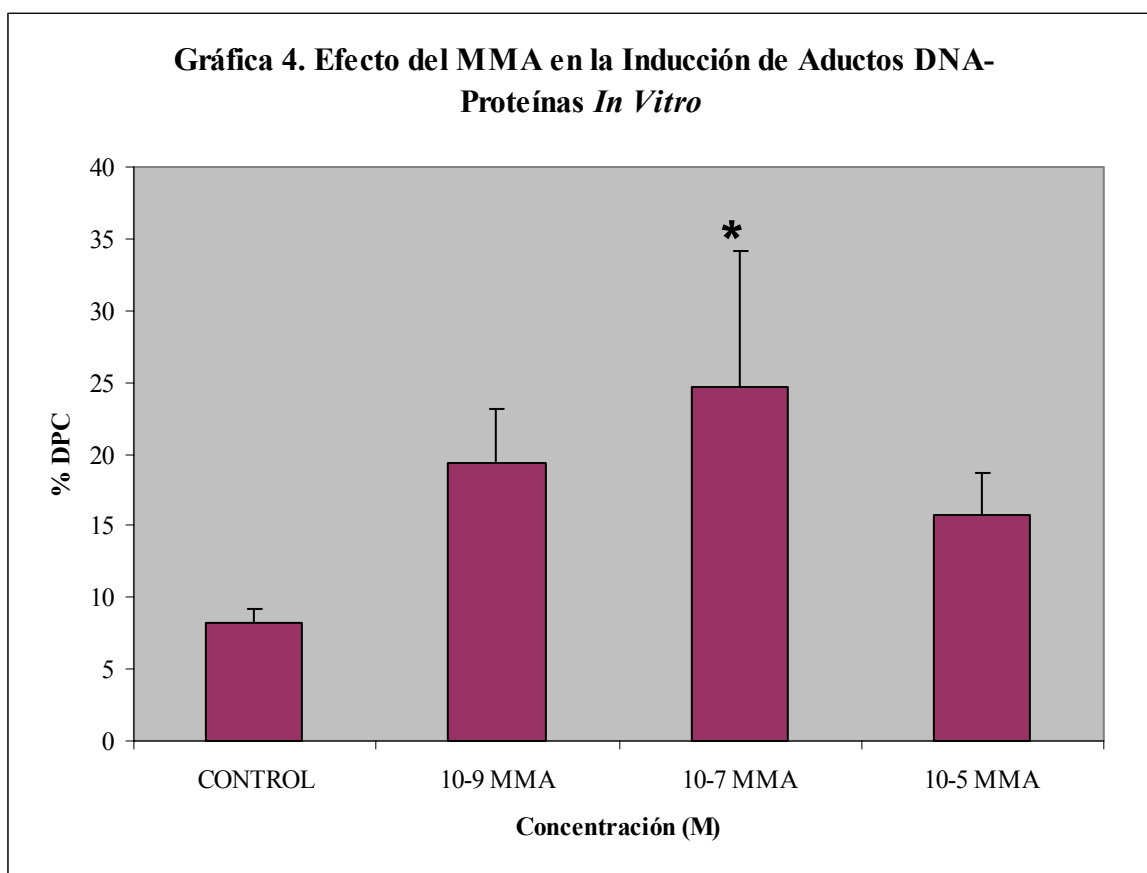


ANOVA F= 36.6607; p<0.05 * Diferencia estadísticamente significativa

TABLA 4. Porcentaje de Aductos DNA-Proteínas Inducidos por el MMA *In Vitro*

TRATAMIENTO	% DPC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
CONTROL	8.23	1.04
10 ⁻⁹ MMA	19.43	3.70
10 ⁻⁷ MMA	24.61*	9.49
10 ⁻⁵ MMA	15.81	2.92

ANOVA F= 8.0449; p<0.05 * Diferencia estadísticamente significativa

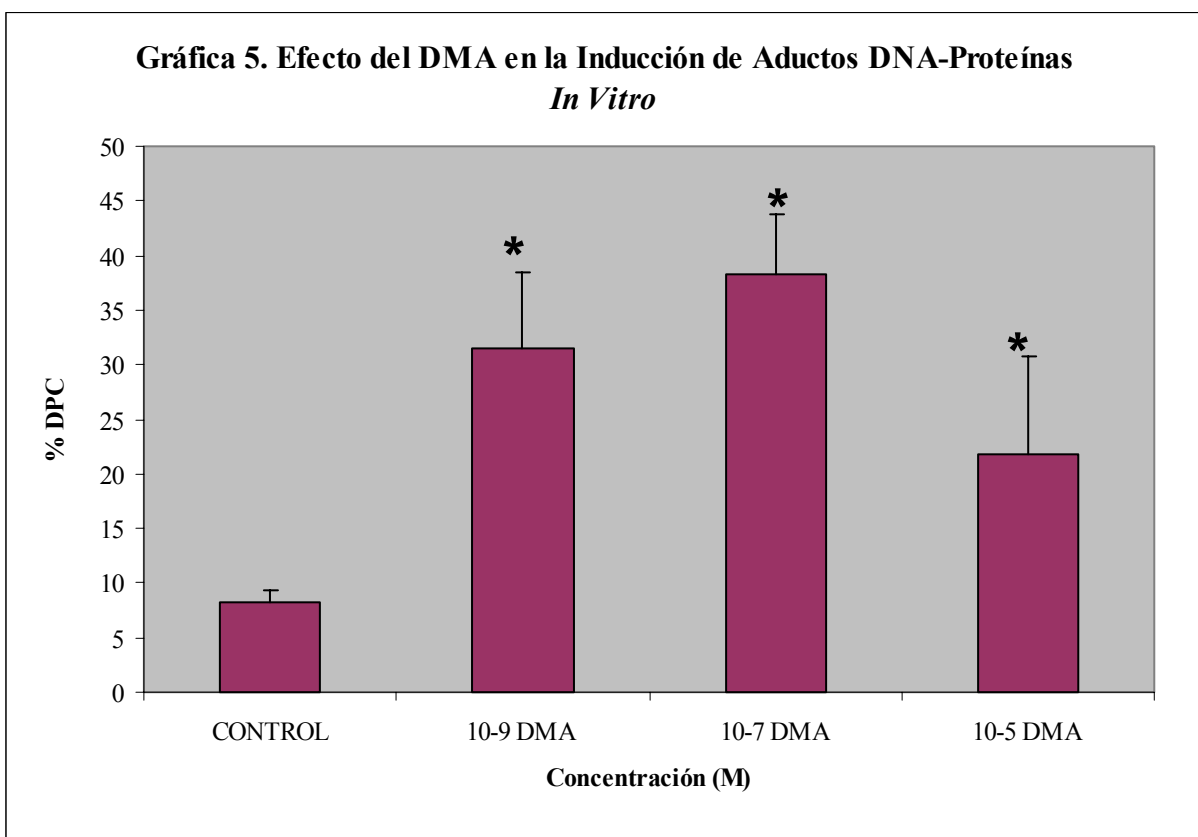


ANOVA F= 8.0449; p<0.05 * Diferencia estadísticamente significativa

TABLA 5. Porcentaje de Aductos DNA-Proteínas Inducidos por el DMA *In Vitro*

TRATAMIENTO	% DPC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
CONTROL	8.23	1.04
10 ⁻⁹ DMA	31.44*	6.97
10 ⁻⁷ DMA	38.31*	5.47
10 ⁻⁵ DMA	21.76*	9.05

ANOVA F= 20.6038; p<0.05 *Diferencia estadísticamente significativa



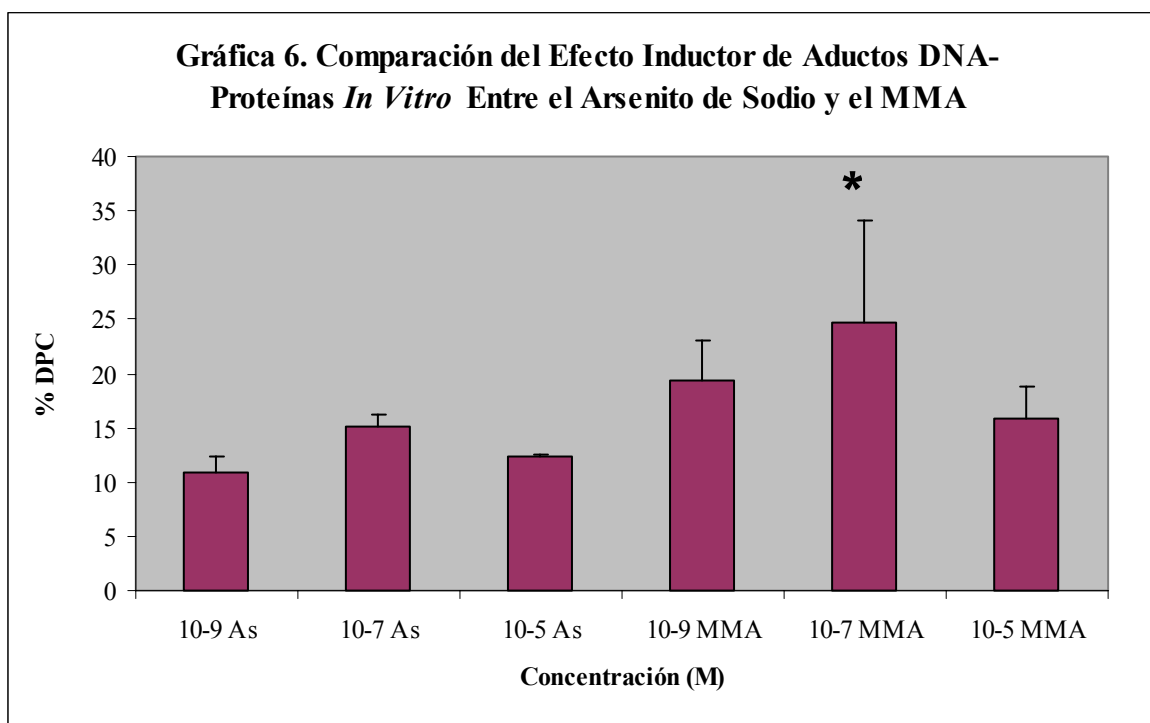
ANOVA F= 20.6038; p<0.05 *Diferencia estadísticamente significativa

Nuestros resultados muestran que los metabolitos metilados del arsénico (DMA y MMA) aumentan el efecto inductor de DPC (Tablas 6 y 7, Gráficas 6 y 7), en comparación con el efecto provocado por el arsenito. Este aumento es significativo para el MMA en su dosis media, y para el DMA, en las dosis de 1×10^{-9} y 1×10^{-7} M.

TABLA 6. Comparación del Efecto Inductor de Aductos DNA-Proteínas Entre el Arsenito de Sodio y el MMA *In Vitro*

TRATAMIENTO	% DPC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
10^{-9} As	10.86	1.498
10^{-7} As	15.13	1.01
10^{-5} As	12.40	0.21
10^{-9} MMA	19.43	3.70
10^{-7} MMA	24.61*	9.49
10^{-5} MMA	15.81	2.92

ANOVA F= 5.7527; p<0.05 *Diferencia estadísticamente significativa

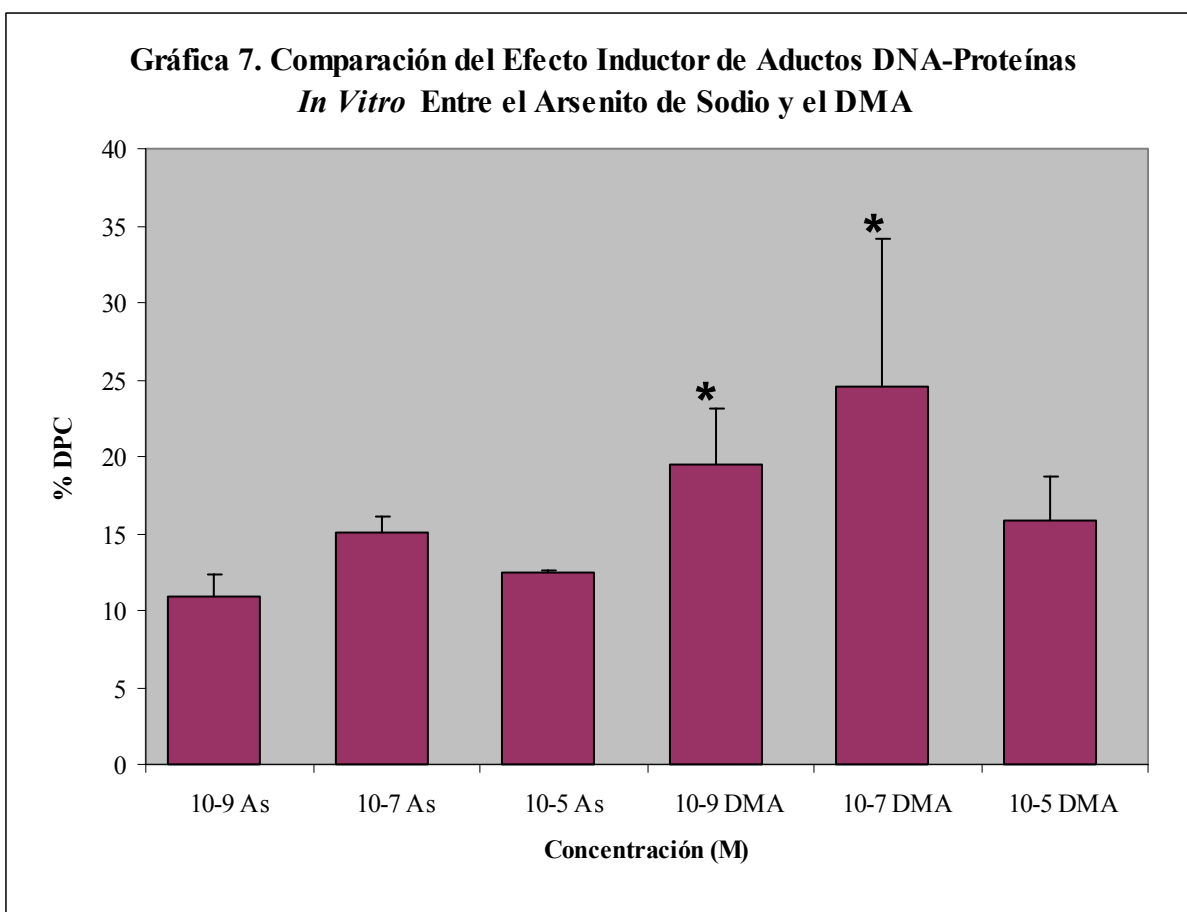


ANOVA F= 5.7527; p<0.05 *Diferencia estadísticamente significativa

TABLA 7. Comparación del Efecto Inductor de Aductos DNA-Proteínas Entre el Arsenito de Sodio y el DMA *In Vitro*

TRATAMIENTO	% DPC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
10 ⁻⁹ As	10.86	1.498
10 ⁻⁷ As	15.13	1.01
10 ⁻⁵ As	12.40	0.21
10 ⁻⁹ DMA	31.44*	6.97
10 ⁻⁷ DMA	38.31*	5.47
10 ⁻⁵ DMA	21.76	9.05

ANOVA F=18.7210; p<0.05 * Diferencia estadísticamente significativa



ANOVA F=18.7210; p<0.05 * Diferencia estadísticamente significativa

Estudios previos han demostrado que una de las proteínas involucradas en los DPC inducidos por arsenito de sodio es la citoqueratina 18 (Ramírez y cols., 2002), sin embargo no existía evidencia suficiente que asociara la unión de esta proteína al DNA en exposiciones a metabolitos del arsénico; considerando lo anterior, en este trabajo de investigación nos interesó conocer si esta proteína era capaz de formar parte de los DPC inducidos por estos metabolitos.

Para detectar la presencia de Citoqueratina 18 en los DPC inducidos por DMA, considerando que fue el principal metabolito inductor de DPC, además de que es uno de los principales inductores de ROS que se ha visto asociado a los efectos tóxicos del arsénico (Yamanaka y cols., 2004) realizamos la detección de CK18 en los cultivos expuestos al DMA, mediante la técnica de Western Blot, separando las proteínas presentes en los DPC mediante una electroforesis y detectando la presencia de CK18 mediante anticuerpos.

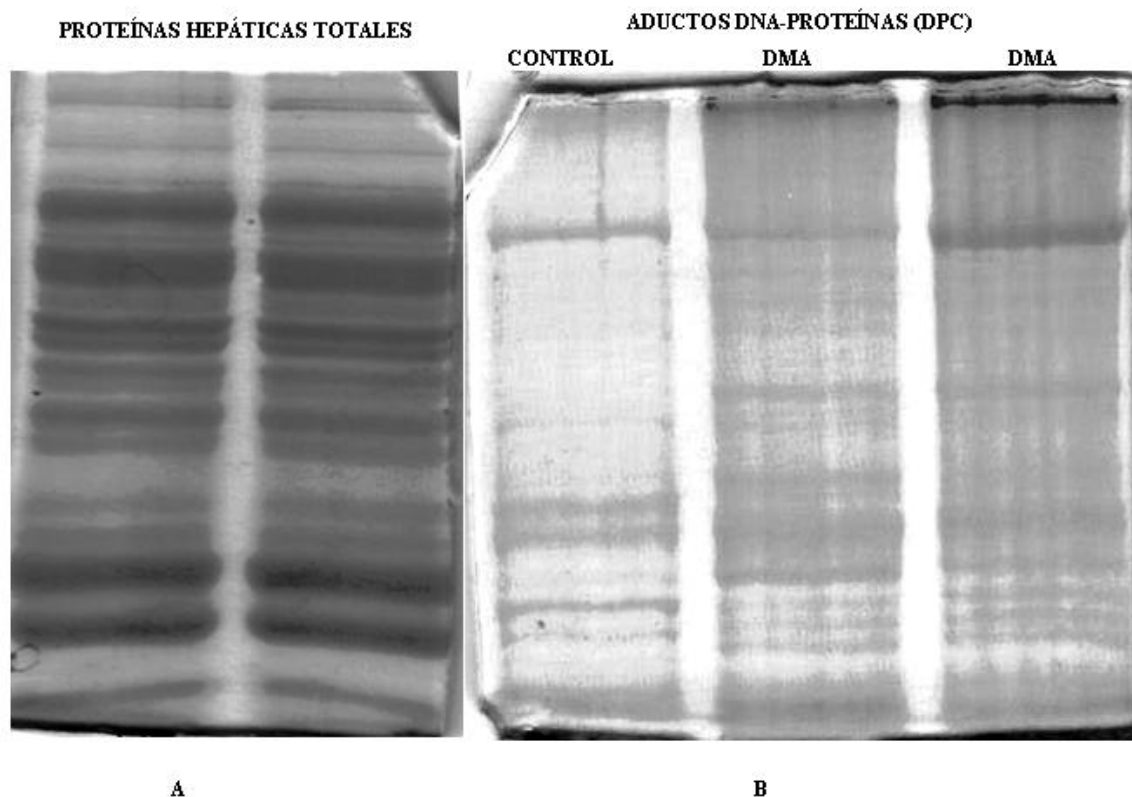


Figura 10. A. Patrón electroforético de proteínas hepáticas totales B. Patrón electroforético de proteínas complejadas por efecto del DMA, donde se muestra la gran variedad de proteínas contenidas en los DPC, aunque en menor concentración que en el hígado completo. Tinción: Azul Coomassie.

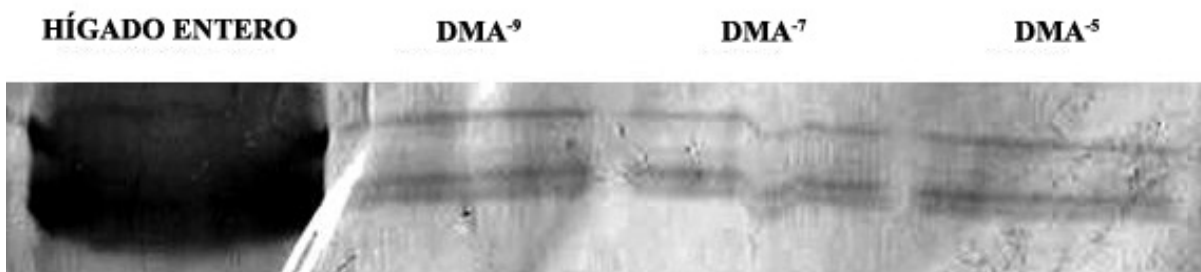


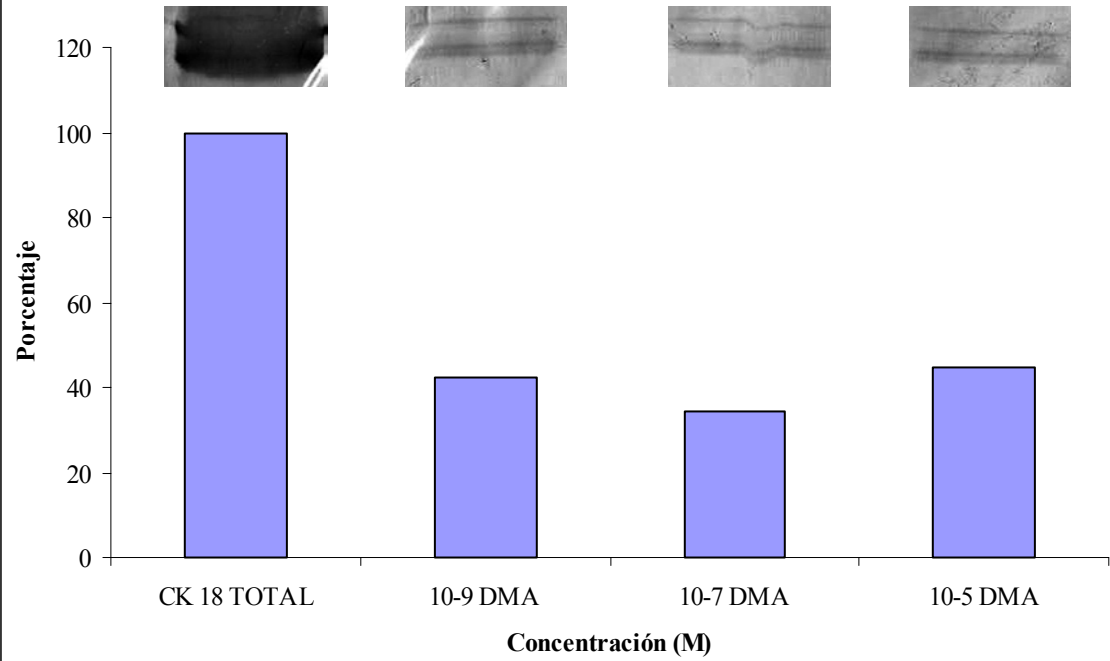
Figura 10. Western blot de Citoqueratina 18 en cultivo organotípico de hígado de ratón.

Al realizar la densitometría del Western Blot obtenido, tenemos los resultados expresado en la Tabla 8, con ellos se calculó el porcentaje de CK18 presente en los DPC tomando la muestra de hígado entero como 100%, la concentración media de DMA ($1 \times 10^{-7} M$) contiene un porcentaje menor de citoqueratina 18 en comparación con las demás concentraciones (Tabla 8, Gráfica 8).

TABLA 8. Densitometría y Porcentaje de CK18 en DPC de Hígado de Ratón

TRATAMIENTO	UNIDADES ARBITRARIAS DE DENSIDAD	% DE CK18 PRESENTE
HÍGADO ENTERO	216.30	100
10^{-9} DMA	91.58	42.34
10^{-7} DMA	73.98	34.2
10^{-5} DMA	96.31	44.53
10^{-9} MMA	43.80	20.25

Gráfica 8. Proporción de CK18 Presente en los Aduetos DNA-Proteína



■ Proteína total por carril: 40 microgramos

CAPÍTULO IX. DISCUSIÓN

El mecanismo de biotransformación tiene por objetivo producir una transformación química sobre una sustancia para facilitar su eliminación, estos procesos se llevan a cabo principalmente en el hígado; generalmente la biotransformación también sirve para disminuir el efecto tóxico del xenobiótico, produciendo metabolitos inactivos y más polares que faciliten su eliminación.

Inicialmente, se tenía la visión de que la biotransformación del arsénico cumplía con lo dicho anteriormente y la metilación del arsénico era considerada como un mecanismo de detoxificación, pero recientemente se ha demostrado que la metilación del arsénico potencia el efecto tóxico de éste. El arsénico está considerado como un agente cancerígeno (IARC, 2004), aunque no se ha establecido claramente su modo de acción, se sabe que uno de los factores determinantes en la carcinogénesis es la alteración del DNA, ya sea químicamente o uniéndose a otras moléculas, como las proteínas. Por lo cual, quisimos conocer el efecto que tienen los metabolitos del arsénico en la formación de Aductos DNA-Proteína (DPC), los cuales ya se han establecido como biomarcadores de efecto temprano en xenobióticos.

En base a nuestros resultados podemos observar que los metabolitos metilados del arsénico (MMA y DMA) aumentan la inducción de DPC, en comparación con el control y en comparación con el Arsenito de Sodio (iAs) a las concentraciones trabajadas (1×10^{-9} , 1×10^{-7} y 1×10^{-5} M), siendo la diferencia estadísticamente significativa sobre todo en el caso del DMA (Tabla 2), lo cual concuerda con lo descrito en otros trabajos previos (Yamanaka y cols., 2004) que indican que la especie más tóxica es el DMA.

Estadísticamente hablando, se ve aumentada la inducción de DPC por efecto de las tres especies de arsénico (arsenito de sodio, MMA y DMA) en comparación con el control, el cual se encuentra dentro de los valores reportados como normales ($< 10\%$). Si comparamos el control con cada especie de arsénico, tenemos que cada especie aumenta significativamente la inducción de DPC por encima del valor del control (8.22%) hasta

alcanzar un valor máximo con el DMA en su concentración media (1×10^{-7} M) donde se obtuvo un valor de hasta 38.31% del DNA formando aductos con proteínas (Tablas 3, 4, y 5). Con estos resultados demostramos que los metabolitos del arsénico son capaces de inducir significativamente la formación de los aductos en cultivos organotípicos expuestos a corto plazo. En comparación con el control, el DMA en las tres concentraciones trabajadas (1×10^{-9} , 1×10^{-7} y 1×10^{-5} M) son las que presentan un aumento estadísticamente significativo en la formación de DPC's.

Para determinar si los metabolitos del arsénico podían ser más tóxicos que el arsenito, analizamos estadísticamente los resultados del arsénico y del MMA, y por otro lado, del arsénico y el DMA, confrontando los datos de cada especie y obtuvimos que existe un aumento en la inducción de DPC por ambos metabolitos, pero el único que presenta un aumento estadísticamente significativo en comparación con el arsenito de sodio es el DMA (Tablas 6 y 7).

En los resultados obtenidos en el experimento, se observa una característica interesante: las dosis medias (1×10^{-7} M) de los arsenicales probados, presentan una mayor inducción a comparación de la dosis mayor (1×10^{-5} M). Estos resultados no permiten establecer una relación dosis-respuesta de tipo lineal; lo cual no indica un error en los resultados obtenidos. Este tipo de respuesta en forma de U, obedece a un efecto conocido como Hormesis, en el cual no se establecen relaciones lineales (Calabrese y Baldwin, 2001).

Este tipo de relación dosis-respuesta ha sido reconocida en exposiciones a agentes tóxicos, no sólo son reales en casos específicos, también son generalizables. Una proporción del 1-2% de los estudios toxicológicos realizados los últimos 30 años satisfacen el criterio de una relación dosis-respuesta de tipo lineal (Calabrese y Baldwin, 2001). La respuesta de tipo hormético se presenta a dosis bajas, como en nuestro caso; la amplitud de esta respuesta es modesta, a veces no excede un factor de dos veces mayor al control, pero usualmente no es mayor que el 130-160% en comparación al control, en el caso de los DPC's producidos por efecto de los arsenicales, se observa un aumento de 8 veces más en el caso del DMA 1×10^{-7} que, en nuestro caso es la concentración a la que se observa el efecto mayor.

Existe evidencia que soporta la presencia del efecto de hormesis en el caso del arsénico (Morales y cols., 2000), sin embargo, las causas por las que se presenta el fenómeno de hormesis no pueden generalizarse y requieren del análisis caso por caso. En cuanto a nuestros resultados, las posibles causas de la disminución en la inducción de los DPC en las dosis más altas de cada especie arsenical pueden deberse a:

- 1) La puesta en marcha de mecanismos de reparación, que ocasionan la disminución del daño al DNA (los aductos DNA-proteínas en nuestro caso)
- 2) La respuesta al estrés oxidativo, lo cual disminuye los radicales libres presentes en la célula y, por lo tanto, la inducción de DPC. El arsenito activa del factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$, el cual regula los genes de respuesta intrínsecos al estrés oxidativo
- 3) Se ha demostrado que bajas concentraciones de arsenito incrementan los niveles celulares de glutatión. La regulación positiva parece ser una respuesta “secundaria” al stress regulada directamente por la reactividad del arsénico a los grupos tiol, esta regulación disminuiría el efecto tóxico del arsénico (Hei y Filipic, 2004).
- 4) Podría justificarse el efecto de hormesis argumentando una posible citotoxicidad en las muestras, pero esta justificación no tiene validez al analizar los resultados de viabilidad (Tabla 1)

El DMA está considerado como el metabolito del arsénico que produce un daño tumorigénico, existen trabajos que lo catalogan como un carcinógeno completo (Wei y cols., 2002) y un promotor de tumores en los órganos blanco para la carcinogénesis por arsénico (Yamanaka y cols., 2000; Yamanaka y cols., 2001a).

La formación de DPCs provocada por el arsénico y sus metabolitos parece involucrar especies reactivas de oxígeno o radicales libres, producto de su metabolismo, para provocar el daño al DNA y la formación del aducto, aunque este mecanismo no está dilucidado completamente, se ha demostrado que el estrés oxidativo provocado por el arsénico y sus metabolitos influye directamente en la formación de los entrecruzamientos.

El estrés oxidativo se ha postulado como uno de los mecanismos posibles de la carcinogénesis mediada por el arsénico. Todas las especies de arsénico pueden producir especies reactivas de oxígeno. Debido a que los aductos oxidativos son predominantes en términos de cantidad y prevalencia en diferentes tipos celulares, se dice que el daño oxidativo al DNA es el tipo predominante de daño en las células tratadas con arsenito. El tratamiento con arsenito incrementa la producción de RNS (especies reactivas de Nitrógeno), mientras que el tratamiento con cadmio incrementa los niveles celulares de peróxido de hidrógeno (Liu y Jan, 2000).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y el radical hidroxilo pueden dañar al DNA directa o indirectamente. El radical hidroxilo es presumiblemente, la especie más reactiva atacando directamente al DNA. Para que este radical se involucre en la carcinogénesis del arsénico se necesita un metal de transición libre (como el Fe) y se ha demostrado que los arsenicales tienen la habilidad de liberar el Fe de la ferritina *in vitro*; los metabolitos metilados del arsénico provocan más liberación de Fe que las especies inorgánicas y, nuevamente las especies trivalentes son más activas, siendo el DMA (III) la especie que más Fe libera. (Ahmad y cols., 2000; Ahamad y cols., 2002)

Las rupturas de doble cadena (DSB) inducidas por arsenito disminuyen cuando se agregan inhibidores de NO sintetasa, moléculas que eliminen los superóxidos y peroxinitritos (scavengers). Por el contrario aumentan si se agregan generadores de superóxido o de NO. El arsenito puede provocar DSB ya sea por vía NO o ROS; como se ha demostrado que los DPC pueden pasar a DSB, podemos decir que la formación de los aductos DNA proteína se debe a vías oxidativas (Wang y cols., 2001; Bau y cols., 2002). Debido a todo esto, se propone que el mecanismo de formación de DPC por tratamiento con arsenito depende de una vía oxidativa (Figura 12).

El tratamiento con arsenito puede producir daño al DNA mediante la producción de HOCl, ya que se ha comprobado la activación de NADH oxidasa y un incremento en la producción de superóxido en células tratadas con arsenito (Lynn y cols., 2000). Esto puede provocar el

daño al DNA debido a que el superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno, mediante la superóxido dismutasa y el peróxido resultante puede reaccionar con los iones cloruro para formar el HOCl y producir $\cdot\text{OH}$ (Whiteman y Halliwell, 1999; Whiteman y cols., 1999a; Lynn y cols., 2000)

El estrés oxidativo parece ser el responsable principal de la formación de aductos DNA-proteínas ocasionados por la exposición a arsénico, involucrando varias especies reactivas de oxígeno, como lo propone el siguiente diagrama:

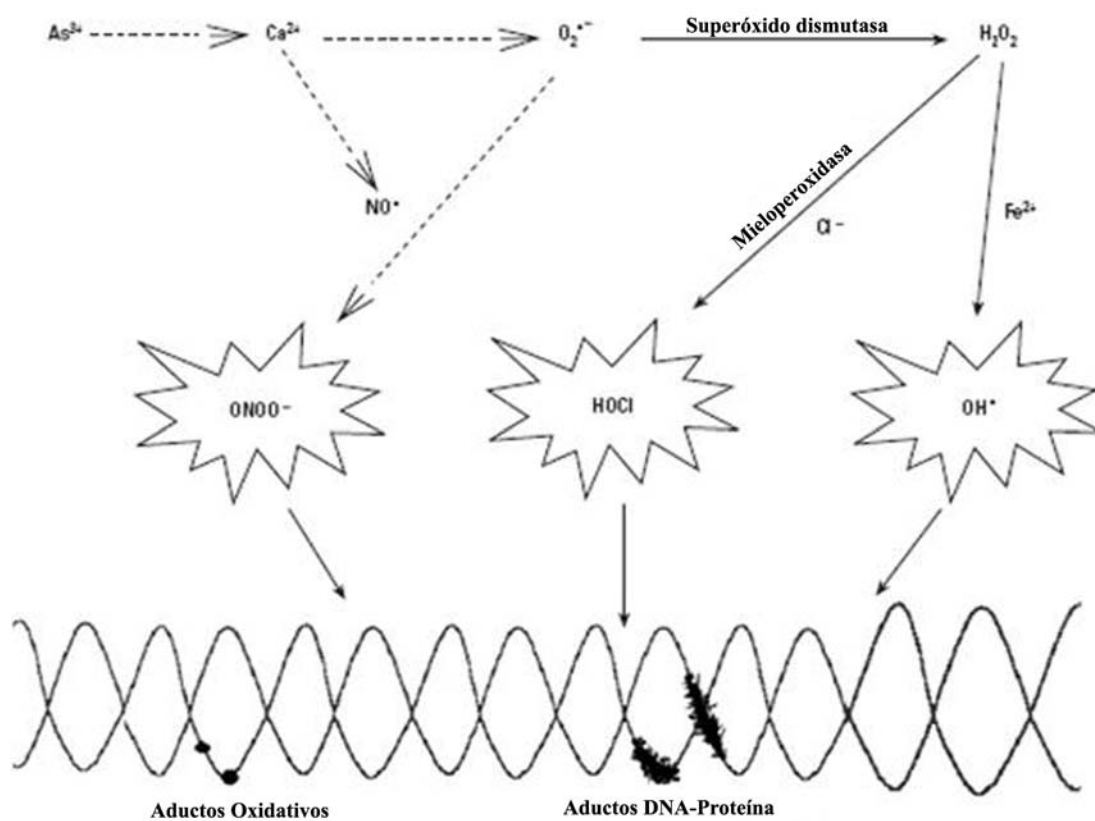


Figura 12. Esquema de la inducción de DPC mediante especies reactivas de oxígeno (Modificado de Bau y cols., 2002)

Analizando la información reportada anteriormente y, de acuerdo con nuestros resultados, se refuerza la hipótesis de que el estrés oxidativo es el principal mecanismo de acción para la formación de DPC ya que la especie más activa en cuanto a la producción de ROS es el DMA y, podemos observar en nuestros resultados que es la especie que más DPC produce

y la que presenta una diferencia estadísticamente significativa en todos los casos. Además de un aumento en la producción de ROS y el estrés oxidativo, el DMA aumenta la inducción de DPC debido a las siguientes características:

1. Las especies de arsénico trivalente son capaces de interactuar electrónicamente con otras moléculas mediante los pares de electrones 4s no compartidos. Las especies pentavalentes carecen de esta reactividad química debido a este par de electrones. Las especies trivalentes metiladas no sólo poseen el par de electrones reactivos no compartidos sino que también contienen uno, dos o tres sustituyentes metilo que toman el lugar de grupos hidroxilo. Estos grupos metilo podrían cambiar enormemente las propiedades del arsénico, incrementando la hidrofobicidad y disminuyendo la ionizabilidad y las cargas negativas debidas a los grupos hidroxilo (Kitchin, 2001). De esta manera, los candidatos probables para las especies causales de la carcinogénesis del arsénico podrían incluir al MMA (III) en humanos y al DMA (III) en ratas.
2. A pH fisiológico, el DNA está cargado negativamente en sus grupos fosfato. Las bases tienen un número importante de átomos electronegativos, tales como el oxígeno y el nitrógeno, los cuales son complejados por químicos. Varias formas químicas del arsénico tienen una carga negativa sustancial a pH fisiológico, así que estas formas de arsénico cargadas negativamente no podrían esperarse que interactuaran fácilmente con el DNA debido a la repulsión electrostática. Cuando el arsénico es metilado exitosamente, los grupos hidroxilo ionizables son reemplazados por grupos metilo no cargados. De esta manera, una molécula de DMA (III) podría ser capaz de interactuar directamente con el DNA mucho más fácil que el arsenito trivalente.
3. Existe evidencia que tanto el MMA^{III} como el DMA^{III} realizan sus efectos dañinos en el DNA mediante un intermediario que involucra la producción de ROS (Nesnow y cols., 2002). La dimetilarsina (una forma de arsénico trivalente y metabolito menor del DMA^V in vivo) puede reaccionar con el oxígeno molecular formando un radical $(\text{CH}_3)_2\text{As}^\bullet$ y un anión superóxido. Este radical $(\text{CH}_3)_2\text{As}^\bullet$ puede añadir otra

molécula de oxígeno molecular y formar el radical $(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}^\bullet$ (radical peroxi dimetilarsénico) y el anión superóxido (Figura 13). De la exposición a estos radicales libres, pueden ocurrir daños al DNA tales como ruptura de hebras (Yamanaka y Okada, 1994), y la formación de DPC (Bau y cols., 2002), además del daño provocado por la producción de otros radicales libres, éstos radicales son producidos por el DMA solamente, lo que explica que la inducción de DPC en las rebanadas de hígado sea mayor que otras especies de As, como se observa en nuestros resultados.

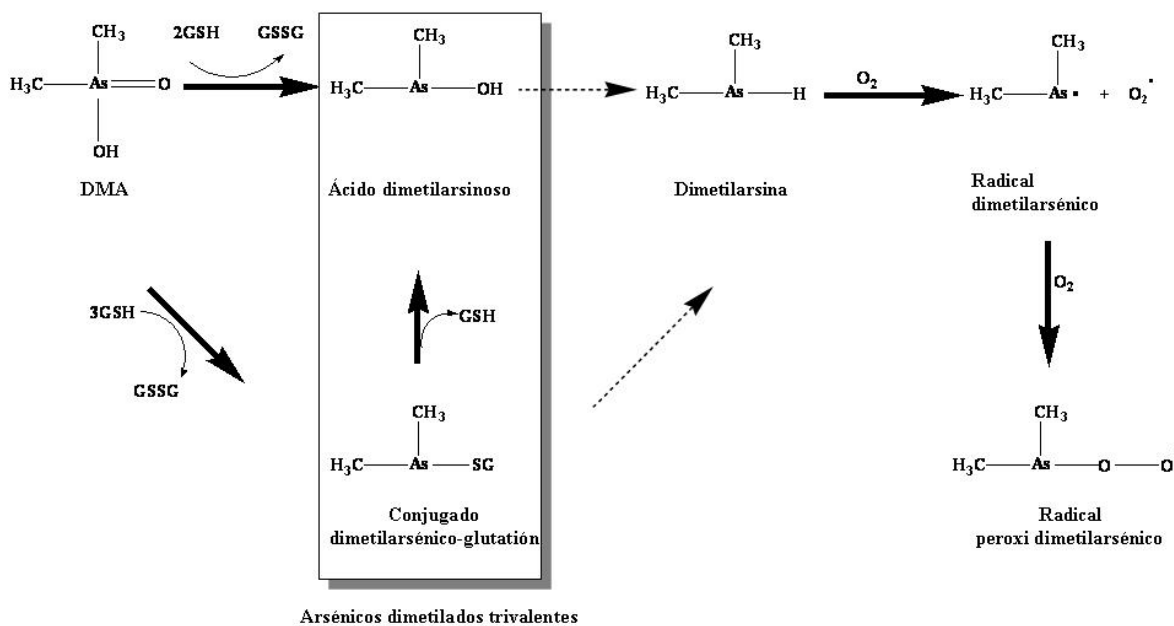


Figura 13. Vía metabólica del DMA (Modificado de Yamanaka y cols., 2004)

La dimetilarsina se produce por reducción de dos electrones del arsénico dimetilado trivalente. Varios estudios (Yamanaka y cols., 2004) han demostrado que la dimetilarsina, más que el DMA, es el principal responsable del daño al DNA. Las especies activas de arsénico tales como el radical arsénico y el radical peroxil arsénico podrían ser los principales agentes responsables para el daño al DNA (Figura 14).

RADICALES LIBRES PRODUCIDOS POR EL DMA

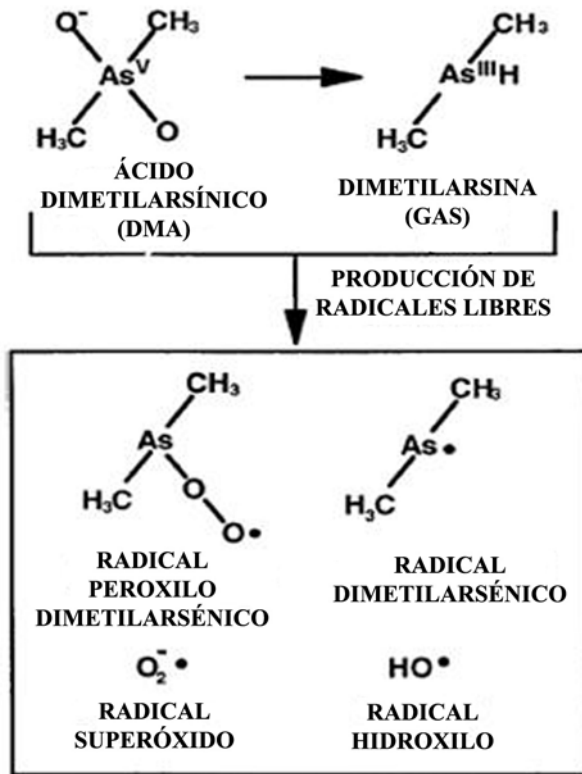


Figura 14. Radicales libres producidos por el DMA (Modificado de Kitchin, 2001)

El peróxido de dimetilarsénico podría actuar como un promotor de tumores mediante la inducción de estrés oxidativo tal como daño oxidativo al DNA. Por otro lado, el radical dimetilarsénico y el radical peroxi-dimetilarsénico pueden actuar como factores de iniciación de tumores (Figura 15). En cualquier caso, el oxígeno molecular es necesario para la acción tumorigénica y genotóxica de estas especies (Yamanaka y cols., 2004).

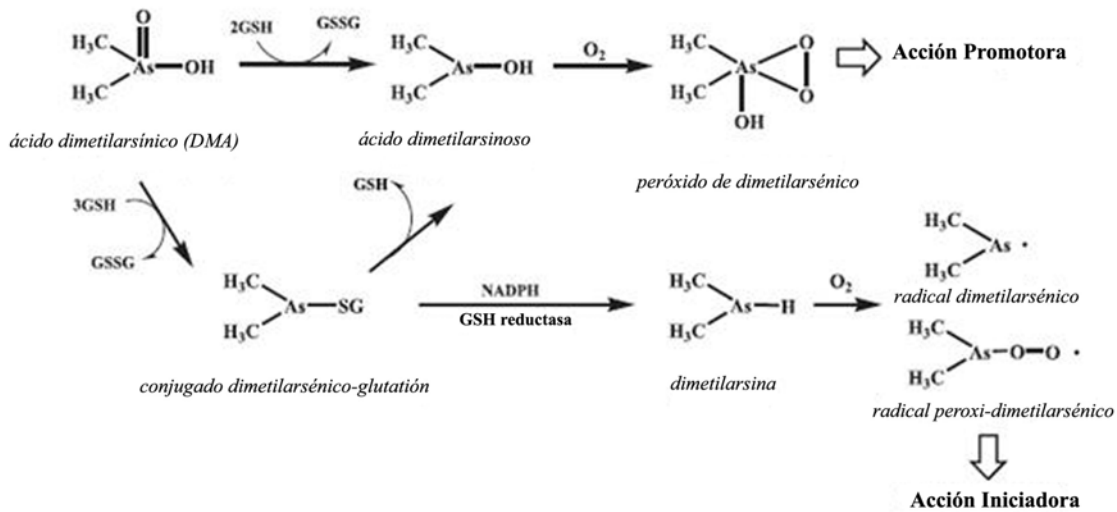


Figura 15. Especies tumorigénicas derivadas del DMA (Modificado de Yamanaka y cols., 2004).

Algunas características de la formación de DPC, además de la importancia del estrés oxidativo se han dilucidado a través de varios estudios:

- Los aminoácidos involucrados más frecuentemente en estos complejos son cisteína, histidina y ácido glutámico.
- Ningún complejo fue formado entre el DNA y el aminoácido si el DNA sólo fue incubado con el genotóxico y después reaccionado con proteína.
- Los nucleótidos podrían participar en entrecruzamientos pero los nucleósidos no, indicando que el grupo fosfato es esencial para la reacción de entrecruzamiento (Zhitkovich y cols., 1996)
- El cis-platino se une a la posición N7 de la guanina, esta posición está orientada fuera del axis de la hélice de DNA, haciendo a este sitio accesible para que los metales no rompan el apareamiento de bases (Figura 16).
- En los DPC inducidos por radiación el entrecruzamiento del DNA a una proteína fue detectado un enlace timina-tirosina (Olinski y cols., 1992; Altman y cols., 1995).
- Algunos autores han propuesto que el radical $\cdot\text{OH}$ está involucrado en la formación del aducto. El mecanismo de entrecruzamiento involucra una sustracción de un átomo de H del grupo metilo de la timina por el $\cdot\text{OH}$, adición del radical de timina resultante al

carbono 3 del anillo de tirosina, y oxidación del radical aducto resultante (Barker y cols., 2005).

- Se ha demostrado la formación de un enlace covalente entre el grupo metilo de la timina y el C3 del anillo de la tirosina y también señalaron al C2 de la tirosina como otro sitio importante de formación de enlaces (Weir Lipton y cols., 1996).
- El ataque de ROS a proteínas y aminoácidos, este mecanismo involucra un radical proteico inicial creado por sustracción de un átomo de Hidrógeno por el radical $\bullet\text{OH}$ seguido por la adición de un radical de aminoácido en la posición C6 de la timina y la oxidación del radical aducto (Barker y cols., 2005).

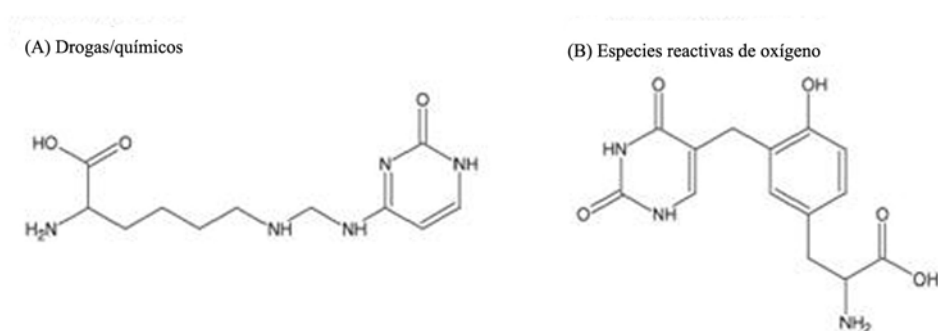


Figura 16. Características de los entrecruzamientos DNA-proteínas (Modificado de Barker y cols., 2005)

El arsénico es metabolizado en las células hepáticas a través de una serie de reacciones (reducción, metilación, principalmente) que requieren de glutatión GSH reducido, generando varias formas intermedias reactivas que podrían llevar a la formación de DPC. Además, las especies de As trivalente se piensa que se acumulan en los tejidos con alto contenido de queratina, debido a la afinidad del As por los grupos tiol. También se ha demostrado que el estrés oxidativo provocado por el As modifica la expresión y la estructura de ciertas proteínas, específicamente, las citoqueratinas (Gonsebatt y cols., 2007).

Determinar cuáles proteínas se entrelazan con el DNA y como se encuentran enlazadas podría ayudar a dilucidar las consecuencias biológicas de los DPCs así como los mecanismos de su reparación.

Algunos autores sugieren que sólo ciertas proteínas pueden unirse al DNA, mientras que otros sugieren que cualquier proteína puede entrecruzarse con el DNA. Algunas de las proteínas que se han encontrado ligadas al DNA in vivo incluyen actina, lectina, histonas, algunas proteínas de choque térmico, vimentina y algunos factores y co-factores de transcripción (Barker y cols., 2005).

Tabla 1
Proteínas identificadas en los Aduetos DNA-proteínas

Proteína	Agente
Actina	Cromo Cisplatino Mitomicina C Alcaloides de Pirrolizidina
Lectina	Cromo
Aminoglucósido nucleotidil transferasa	Cromo
Histonas H1, H2A, H2B, H4	Formaldehído
Histona H3	Formaldehído Gilvocarcina V
Proteína 78 regulada por Glucosa	Gilvocarcina V
Citoqueratinas	Arsénico
Vimentina	Formaldehído Bioproductos metabólicos
Protein-disulfuro isomerasa	Cisplatino
Receptor de estrógeno HET/SAF-B hnRNP K Histona desacetilasa 1	Cisplatino

Tabla 9. Proteínas identificadas en los DPC's. (Modificado de Barker y cols., 2005)

Se han encontrado varias proteínas que se encuentran entrecruzadas al DNA por efecto del arsénico (Tabla 9). Sin embargo estos entrecruzamientos podrían revertirse con altas concentraciones de sales, sugiriendo que no son asociaciones covalentes.

Las queratinas y las proteínas parecidas a queratinas han sido identificadas en el núcleo de células ascíticas de hepatoma de Novikoff y en células hepáticas de rata. Se han identificado mediante western blot al menos 5 citoqueratinas entre las proteínas entrecruzadas con DNA. A bajas concentraciones de arsénico se encontraron 4 citoqueratinas con masas moleculares de 46, 48, 50 y 54 kDa, a concentraciones mayores, se observó otra citoqueratina con un peso molecular de 45 kDa. Se encontró que la CK18 era una de las proteínas identificadas formando parte de los DPC. Se ha encontrado un incremento de la presencia de CK18 al aumentar la dosis de As (Ramírez y cols., 2000).

En este trabajo, se detectó la presencia de la CK18 en los DPC inducidos por DMA (Figura 11) a las tres dosis trabajadas, lo cual nos indica que no sólo el arsenito es capaz de entrecruzar a la CK18 con el DNA, también sus metabolitos (en este caso el DMA) pueden provocar que dicha citoqueratina esté presente en los aductos. Al realizar la densitometría, observamos una presencia importante de CK18 en los aductos, del 30-40% de la citoqueratina presente en el hígado se encuentra formando parte de los aductos DNA-Proteína, esto nos permite darnos cuenta del efecto tóxico del DMA y comprobar que la vía de metilación del arsénico no es una vía de detoxificación.

Es conocido que el arsénico trivalente induce la síntesis de varias proteínas de estrés y factores de crecimiento, así que la gran cantidad de CK18 puede explicarse por un efecto similar en la expresión de citoqueratinas. Al someter a los hepatocitos a daño tóxico, se ha detectado una marcada sobreexpresión de queratina, lo cual puede considerarse una respuesta del hepatocito al estrés oxidativo (Stumptner y cols., 2001). Estas observaciones coinciden con nuestros resultados, al ser el DMA el arsenical con mayor inducción de ROS, provocando estrés oxidativo se espera una presencia mayor de CK18 en los aductos inducidos por DMA. Al comparar la muestra de MMA trabajada con la muestra de DMA a la misma concentración ($1 \times 10^{-9} \text{M}$) observamos que casi el doble de la CK18 presente en los aductos inducidos por MMA, se encuentra en el DMA.

Se ha reportado un aumento en el mRNA de la CK18 en cultivos de hígado sometidos a diferentes concentraciones de arsenito de sodio, observándose también un aumento en la proteína misma. Al agregar un antioxidante como la N-acetilcisteína (NAC), el aumento del mRNA de CK18 y del CK18 en sí, se ve disminuido, demostrando de esta forma el aumento en la expresión de CK18 y su mRNA es provocado por el estrés oxidativo inducido por el arsenito (Gonsebatt y cols., 2007).

En base a todos los efectos del DMA mencionados anteriormente: el aumento en la inducción de DPC, el aumento de estrés oxidativo (inducción de especies reactivas de oxígeno) y las modificaciones en la expresión y presencia de CK18, podemos afirmar que nuestros resultados son los esperados y que el DMA tiene alta capacidad para provocar la unión DNA-CK18.

El hecho de que las proteínas ricas en grupos tiol tales como las citoqueratinas aparezcan fuertemente unidas al DNA, podría indicar que las formas trivalentes del As podrían estar involucradas directamente en la unión de las proteínas.

Finalmente, es importante analizar la importancia del cultivo organotípico de rebanadas de hígado como un buen modelo para estudios toxicológicos y de corto plazo. El cultivo organotípico de diversos tejidos se desarrolló como una nueva herramienta *in vitro*, en la búsqueda de perfiles metabólicos de drogas en varias especies animales y en humanos (Dogterom, 1993). Con esta metodología la organización hepática se preserva lo que es benéfico para el estudio de fenómenos celulares que involucran a la función hepática, el cultivo organotípico tiene varias ventajas en el estudio de efectos biológicos asociados a agentes xenobióticos, entre ellas destacan: la preservación de la estructura organizacional hepática básica y el mantenimiento de las funciones metabólicas *In Vitro* (Gonsebatt y cols., 2007). La preparación de las rebanadas de hígado es menos compleja que el aislamiento de hepatocitos. Este tipo de cultivo tiene un gran valor en estudios de metabolismo. Pueden usarse para estudiar reacciones de biotransformación tanto de la Fase I como de la Fase II (Ueda y cols., 1996). Una exposición continua del tejido hepático a la sustancia a probar no impide la liberación de metabolitos al medio. La técnica debe realizarse cuidadosamente ya que diversas variables pueden afectar los resultados (Dogterom, 1993).

De acuerdo con los resultados de potasio, demostramos que el cultivo organotípico de hígado de ratón encontraba viable durante la exposición a los arsenicales en estudio, ya que la cantidad de potasio encontrada se encuentra por encima de los límites de viabilidad reportados (10-20 $\mu\text{mol/g}$). Los cambios de las concentraciones de algunos iones (K^+ , Na^+ , Ca^{++}) en las rebanadas de hígado son usados comúnmente como índices generales de viabilidad. Como la mayoría de las células mantienen una alta proporción de K^+ intracelular a extracelular, la pérdida de K^+ puede reflejar un daño a la membrana o un descenso en la actividad de la bomba ATPasa de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. Las rebanadas frescas pierden del 50 - 80% de su K^+ durante su preparación, aunque estos niveles son restablecidos rápidamente en el cultivo (Lerche-Langrand y Herve, 2000).

Los niveles de potasio obtenidos en nuestros cultivos (39-71 $\mu\text{mol/g}$ de tejido), nos indican que las rebanadas se encontraban en condiciones óptimas para llevar a cabo sus funciones metabólicas. Es de notarse que el control es el que presenta un mayor nivel de potasio, lo

cual es lógico debido a que no se le agregó ningún arsenical y por lo tanto no presenta daño alguno.

Con respecto al aislamiento y cuantificación de DPC's el método empleado nos garantiza la precipitación de la mayor parte de los DPC's presentes sin importar su naturaleza. Existen diferentes técnicas para el aislamiento y la cuantificación de DPCs, las cuales difieren en su límite de detección/nivel de sensibilidad y problemas asociados, algunos de los métodos más empleados son los siguientes:

- Pueden medirse usando el ensayo cometa porque el entrecruzamiento de las proteínas al DNA retarda la migración de los fragmentos de DNA, resultando en una “cola” reducida (Merk y Speit, 1999; Merk y cols., 2000). Este método no permite el aislamiento.
- Los métodos de separación por gradiente separa la mayoría de los DPC del resto del DNA y de las proteínas por densidad (Cress y cols., 1989; Tolstong y cols., 2001).
- Un método por filtración empleando membranas de nitrocelulosa es útil para obtener curvas dosis respuesta (Cress y cols., 1990).
- El ensayo de elución alcalina atrapa al DNA de alto peso molecular (junto a las proteínas unidas) en un filtro de policarbonato mientras que las proteínas unidas no-covalentemente son lavadas (Kohn, 1979; Kohn y cols., 1981). Sin embargo, la recuperación de DPCs de los filtros es difícil y pobremente reproducible.
- El método empleado en el presente trabajo es un método desarrollado por Zhitkovich y Costa (Zhitkovich y Costa, 1992; Costa y cols., 1996), que mide la inducción de DPC como el grado de DNA asociado con proteína después de que la proteína es precipitada usando dodecil sulfato de sodio/potasio (SDS/K⁺). Una propuesta alternativa para la cuantificación de DPC es aislar el DNA y medir la proteína asociada. La precipitación con SDS/K⁺ espera como consecuencia la precipitación de algunas proteínas ligadas no-covalentemente porque el SDS se une selectivamente a las proteínas y son precipitadas después (junto con el DNA unido) por el potasio.

CAPÍTULO X. CONCLUSIONES

Los metabolitos metilados del arsénico incrementan significativamente la formación de aductos DNA-proteína en el hígado de ratón, en comparación con el arsenito de sodio (Asi), provocando un daño temprano en las células hepáticas.

La capacidad del DMA para inducir aductos DNA-proteínas fue estadísticamente significativa y superior a la del arsenito y a la de su metabolito monometilado (MMA).

La mayor proporción de DPC inducidos por los metabolitos metilados del arsenito de sodio se presentó con la concentración media (1×10^{-7} M).

La citoqueratina 18 forma parte del aducto DNA-proteína inducido por el DMA de igual manera que lo hace el arsenito de sodio.

Mediante la técnica de Western Blot no logramos identificar aductos DNA-citoqueratina 18 inducidos por MMA.

CAPÍTULO XI. PERSPECTIVAS

Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo y resaltando la importancia de los metabolitos del arsénico en su efecto tóxico quedan por desarrollar algunos aspectos entre los cuales destacan:

- Profundizar en el estudio de la formación de los aductos DNA-proteína para dilucidar el mecanismo de formación mediante la inducción de estrés oxidativo provocado por los metabolitos metilados del arsénico.
- Ampliar el conocimiento del papel que juega el estrés oxidativo provocado por el arsénico y sus metabolitos sobre la estructura y función de CK 18.
- Conocer las características del aducto DNA-citoqueratina 18 y como este aducto puede modificar los patrones de síntesis y expresión de la citoqueratina en el hígado.
- Conocer los mecanismos de reparación involucrados en la remoción de los aductos, cómo y su papel en la modulación del efecto tóxico del arsénico en el hígado.
- Conocer la relación de estos aductos con los mecanismos de acción asociados a la toxicidad ejercida por el arsénico inorgánico y sus metabolitos.
- Conocer el efecto de los polimorfismos genéticos para las enzimas metabolizantes del arsénico sobre la inducción de DPC.

CAPÍTULO XII. REFERENCIAS

- Abernathy, C.O., Lui, Y.P., Longfellow, D., Aposhian, H.V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C., Waalkes, M. 1999. Arsenic: Health effects, mechanisms of actions and research issues. *Environ. Health Perspect.* 107, 593-597
- Adams, R.M. 1990. *Occupational Skin Disease*. 2nd Ed. Saunders. Philadelphia, 147
- Aebi, U., Fowler, W.E., Rew, P., Sun, T.T. 1983. The fibrillar substructure of keratin filaments unraveled. *J. Cell. Biol.* 97, 1131-1143
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry 1993. ATSDR toxicological profile for arsenic. Atlanta, Georgia, U.S. Department of Health and Human Services. TP-92/02
- Ahmad, S., Kitchin, K.T., Cullen, W.R. 2000. Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 382, 195-202
- Ahmad, S., Kitchin, K.T., Cullen, W.R. 2002. Plasmid DNA damage caused by methylated arsenicals, ascorbic acid and human liver ferritin. *Toxicol. Lett.* 133, 47-57
- Al-Chalabi, A., Leigh, P.N. 2000. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 13, 397-405
- Altman, S.A., Zastwny, T.H., Randers-Eiehorn, L., Cacciuttolo, M.A., Akman, S.A., Dizdaroglu, M., Rao, G. 1995. Formation of DNA-protein cross-link in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 897-902
- Angulo, P. 2002. Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl J. Med.* 16, 1221-1231
- Aposhian, H.V., Gurzau, E.S., Le, X.C., Gurzau, A., Healy, S.M., Lu, X., Ma, M., Yip, Li., Zakharyan, R.A., Maiorino, R.M., Dart, R.C., Tircus, M.G., González-Ramírez, D., Morgan, D.L., Avram, D., Aposhian, M.M. 2000. Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 693-697

- 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., Andrewes, P., Yip, Li., O'Malley, G.F., Maiorino, R.M., Van Voorhies, W., Healy, S.M., Titcomb, A. 2000a. DMPS-arsenic challenge test. II. Modulation of arsenic species, including monomethylarsonous acid (MMA (III)), excreted in human urine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 165, 74-83
- Arnold, H.L., Odam, R.B., James, W.D. 1990. *Disease of the skin Clinical Dermatology*. 8TH Ed. Saunders WB. Company. Philadelphia. 121
- Ballantyne, B., Marrs, T.C., Syversen, T. Editors. 1999. *General and applied toxicology*. 2a Ed. Macmillan. USA, 2050-2052
- Bansal, S.K., Haldar, N., Dhand, U.K., Chopra, J.S. 1991. Phrenic neuropathy on arsenic poisoning. *Int. J. Dermatol.* 30, 304-306
- Barker, S., Weinfeld, M., Murray, D. 2005. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutat. Res.* 589, 111-135
- Bau, D.T., Wang, T.S., Chung, C.H., Wang, A.S.S., Jan, K.Y. 2002. Oxidative DNA Adducts and DNA-Protein Cross-Links Are the Major DNA Lesions Induced by Arsenite. *Environ. Health Persp.* 110: Supplement 5, 753-756
- Bernstam, L., Nriagu, J. 2000. Molecular aspects of arsenic stress. *J. Toxicol. Environ. Health Persp.* 3, 293-322
- Bollinger, C.T., Van Zijl, P., Louw, J.A. 1992. Multiple organ failure with the adult respiratory distress syndrome in homicidal arsenic poisoning. *Respiration.* 59; 57-61
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Briki, F., Busson, B., Doucet, J. 1998 Organization of microfibrils in keratin fibers studied by X-ray scattering modeling using the paracrystal concept. *Biochim. Biophys. Acta.* 1429, 57-68
- Brown, J., Kitchin, K.T. 1996. Arsenite, but not cadmium, induces ornithine decarboxylase and heme oxygenase activity in rat liver: Relevance to arsenic carcinogenesis. *Cancer Lett.* 98, 227-231

- Buccheri, G., Ferrigno, D. 2001. Lung tumor markers of cytokeratin origin: an overview. *Lung Cancer*. 34, S65-S69
- Bunnett, J.F., Mikolajczk, M. 1998. *Arsenic and Old Mustard: Chemical Problems in the Destruction of Old Arsenical and Mustard Munitions*. Kluwer. Boston.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., Strelkov, S.V. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11, 82-88
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A. 2001. The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literatura. *Toxicol. Sci.* 62: 330-338
- Carlsson, L., Thornell, L.E. 2001. Desmin-related myopathies in mice and man. *Acta Physiol. Scand.* 171, 341-348
- Caulin, C., Ware, C.F., Magin, T.M., Oshima, R.G. 2000. Keratin-dependent epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 149, 17-22
- Cavigelli, M., Li, W.W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K., Karin, M. 1996 The tumor promoter arsenite stimulates AP-1activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J.* 15, 6269-6279
- Chen, C.J., Hsueh, Y.M., Lai, M.S., Shyu, M.P., Chen, S.Y., Wu, M.M., Kuo, T.L., Tai, T.Y. 1995. Increased Prevalence of Hypertension and Long-term Arsenic Exposure. *Hypertension*. 25; 53-60
- Chiou, P.W.S., Chen, K.L., Yu, B. 1997. Effects of Roxarsone on Performance, Toxicity, Tissue Accumulation and Residue of Eggs and Excreta in Laying Hens. *J. Sci. Food Agric.* 74:2, 229-236
- Clarkson, TW. 1991. Inorganic and organometal pesticides, in: WJ Hayes Jr. (Ed.). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press. San Diego, USA. 545-552
- Concha, G., Vogler, G., Nermell, B., Vahter, M. 1998. Low-level arsenic excretion in breast milk of native Andean women exposed to high levels of arsenic in the drinking water. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 71:1, 42-46
- Conway, J.F., Parry, D.A.D. 1988. Intermediate filament structure. 3. Analysis of sequence homologies. *Int. J. Biol. Macromol.* 10: 79-98
- Costa, M., Zhitkovich, A., Toniolo, P. 1993. DNA-Protein cross-links in welders: Molecular Implications. *Cancer Res.* 53, 460-463

- Costa, M., Zhitkovich, A., Gargas, M., Paustenbach, D., Finley, B., Kuykendall, J., Billings, R., Carlson, T.J., Wetterhahn, K., Xu, J., Patierno, S., Bogdanffy, M. 1996. Interlaboratory validation of a new assay for DNA-protein crosslinks. *Mutat. Res.* 369, 13-21
- Cress, A.E., Kurath, K.M., Hendrix, M.J., Bowden, G.T. 1989. Nuclear protein organization and the repair of radiation damage. *Carcinogenesis.* 10, 939-943
- Cress, A.E., Kurath, K.M., Stea, B., Bowden, G.T. 1990. The crosslinking of nuclear protein to DNA using ionizing radiation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116, 324-330
- Denk, H., Stumptner, C., Zatloukal, K. 2000. Mallory body revisited. *J. Hepatology.* 2, 689-702
- Dixon, H.B.F. 1997. The biochemical action of arsenic acids especially as phosphate analogues. *Adv. Inorg. Chem.* 44, 191-227
- Dogterom, P. 1993. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metab. Disp.* 21:4, 699-704.
- Eguchi, N., Kuroda, K., Endo, G. 1997. Metabolites of Arsenic Induced Tetraploids and Mitotic Arrest in Cultured Cells. *Arch, Environ. Contam. Toxicol.* 32; 141-145
- Elder, J., Davies, T.T. 1993. Draft drinking water criteria. Document on Arsenic. Under EPA Contract No. 68-C8-0033. U.S. EPA. Washington DC, 20460, VIII-4, 1
- Ellenhorn, M.J. 1997. Arsenic, in: *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning.* 2nd Ed. Williams and Wilkins. Baltimore, 1538
- Endo, G., Kuroda, K., Okamoto, A., Horiguchi, S. 1992. Dimethylarsenic acid induces tetraploids in Chinese hamster cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48:1 131-137
- Environmental Protection Agency. 2007. www.epa.gov. Ambient Water Quality Criteria for Arsenic. U.S. Environ. Prot. A. Rep., 440/5-80-021, 1 v.i.: 12-06-07
- Fergusson, J.E. 1990. *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects.* Pergamon Press. Great Britain. 614
- Fickert, P., Trauner, M., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Zatloukal, K., Denk, H. 2003. Mallory body formation in primary biliary cirrhosis is associated with

increased amounts and hyperphosphorylation and ubiquitination of cytokeratins. *J. Hepatol.* 38, 383-394

- Fordyce, F.M., Williams, T.M., Pajitpapapon, A., Charoenchaisei, P. 1995. Arsenic contamination in surface drainage and groundwater in part of the southeast Asian tinbelt, Nakhon Si Thammarat Province, southern Thailand. *Environ. Geol.* 27:1, 16-33
- García-Vargas, G.G., Del Razo, L.M., Cebrian, M.E., Albores, A., Ostrosky-Wegman, P., Montero, R., Gonsebatt, M.E., Lim, C.K., De Matteis, F. 1994. Altered urinary porphyrin excretion in a human population chronically exposed to arsenic in Mexico. *Hum. Exp. Toxicol.* 13, 839-847.
- Geisler, N., Xhunemann, J., Weber, K. 1992. Chemical cross-linking indicates a staggered and antiparallel protofilament of desmin intermediate filaments and characterizes one higher-level complex between protofilaments. *Eur. J. Biochem.* 206, 841-852
- Germolec, D.R., Spalding, T., Boorman, G.A., Wilmer, J.L., Yoshida, T., Simeneova, P.D., Bruccoleri, A., Kayama, F., Gaido, K., Tennant, R., Burlison, F., Dong, W., Lang, R.W., Luster, M.I. 1997. Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors. *Mutat. Res.* 386, 209-218
- Goebel, H.H., Schmidt, P.F., Bohl, J., Tettenborn, B., Kramer, G., Guttman, L. 1990. Polyneuropathy due to acute arsenic intoxication: biopsy studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49:2 137-149
- Goering, P.L., Aposhian, H.V., Mass, M.J., Cebrian, M., Beck, B.D., Waalkes, M.P. 1999. The enigma of arsenic carcinogenesis: Role of metabolism. *Toxicol. Sci.* 49, 5-14
- Golub, M.S. 1994. Maternal toxicity and the identification of inorganic arsenic as a developmental toxicant. *Reprod. Toxicol.* 8, 283-295.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Montero, R., Garcia-Vargas, G., Del Razo, L.M., Albores, A., Cebrian, M.E., Ostrosky-Wegman, P. 1994. Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutat. Res.* 313:2-3, 293-299

- Gonsebatt, M.E., Del Razo, L.M., Cerbon, M.A., Zuñiga, O., Sanchez-Peña, L.C., Ramírez, P. 2007. Arsenite induced oxidative damage in mouse liver is associated with increased cytokeratin 18 expression. *Arch. Toxicol.* 81:9, 619-626
- Grandjean, P., Weihe, P., Needham, L.L., Burse, V.W., Patterson, D.G., Sampson, E.J., Jorgensen, P.J., Vather, M. 1995. Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk. *Environ. Res.* 71:1 29-38
- Guha Mazumder, D.N., Chakraborty, A.K., Ghose, A., Gupta, J.D., Chakraborty, D.P., Dey, S.B., Chattopadhyay, N. 1988. Chronic arsenic toxicity from drinking tubewell water in rural West Bengal. *Bull. World Health Organ.* 66:4, 499-506
- Guha Mazumder, D.N. 2001. Arsenic and Liver disease. *J. Indian Med. Assoc.* 99:6, 311, 314-315, 318-320
- Gurr, J.R., Liu, F., Lynn, S., Jan, K.Y. 1998. Calcium-dependent nitric oxide production is involved in arsenite-induced micronuclei. *Mutat. Res.* 416, 137-148
- Hamadeh, H.K., Vargas, M., Lee, E., Menzel, D.B. 1999. Arsenic disrupts cellular levels of p53 and mdm2: A potential mechanism of carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 446-449
- Hartwig, A., Groblinghoff, U.D., Beyersmann, D., Natarajan, A.T., Filon, R., Mullenders, L.H. 1997. Interaction of arsenic (III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis.* 18, 399-405
- Hayashi, H., Kanisawa, M., Yamanaka, K., Ito, T., Udaka, N., Ohji, H., Okudela, K., Okada, S., Kitamura, H. 1998. Dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, has tumorigenicity and progression effects in the pulmonary tumors of A/J mice. *Cancer Lett.* 125, 83-88
- Hei, T.K., Liu, S.X., Waldren, C. 1998. Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8103-8107
- Hei, T.K., Filipic, M. 2004. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Rad. Biol. Med.* 37, 574-581
- Heins, S., Aebi, U. 1994. Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 25-33

- Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Muller, S.A., Goldie, K.N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W.W., Aebi, U. 1996. Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J. Mol. Biol.* 264, 933-953
- Herrmann, H., Aebi, U. 1998. Structure, assembly and dynamics of intermediate filaments. *Subcell Biochem.* 31:319-362
- Herrmann, H., Aebi, U. 1998a. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 177-185
- Herrmann, H., Aebi, U. 1999. Intermediate filament assembly: temperature, sensitivity and polymorphism. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 1416-1431
- Herrmann, H., Aebi, U. 2000. Intermediate filaments and their associates: multitasking structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 79-90
- Hesse, M., Magin, T.M., Weber, K. 2001. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J. Cell Sci.* 114, 2569-2575
- Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Fuchs, A., Bergoglio, R., Tello, E.E., Nicolli, H., Smith, A. 1996. Bladder Cancer Mortality Associated with Arsenic in Drinking Water in Argentina. *Epidemiology.* 7:2, 117-124
- Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Smith, A.H. 1998. Lung and kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Córdoba, Argentina. *Int. J. Epidemiol.* 27:4, 561-569
- Hu, Y., Su, L., Snow, E.T. 1998. Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition on DNA repair enzymes. *Mutat. Res.* 408, 203-218
- Hutchison, C.J., Alvarez-Reyes, M., Vaughan, O.A. 2001. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J. Cell Sci.* 115, 9-19
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2004. Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, including Arsenic. IARC Monographs on the

evaluation of carcinogenic risks to humans. World Health Organization (WHO). Volume 84, 1-19

- Irvine, A.D., McLean, W.H. 1999. Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation. *Br. J. Dermatol.* 140, 815-828
- Jolliffe, D.M. 1993. A History of the Use of Arsenicals in Man. *J. Royal Soc. Med.* 86, 287-289.
- Kao, Y.H., Yu, C.L., Chang, L.W., Yu, H.S. 2003. Low concentrations of arsenic induce vascular endothelial growth factor and nitric oxide release and stimulate angiogenesis in vitro. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 460-468
- Kenyon, E.M., Hughes, M.F., Levander, O.A. 1997. Influence of Dietary Selenium on the Disposition of Arsenate in the Female B6C3F1 Mouse. *J. Toxicol. Environ. Health.* 51; 279-299
- Kitchin, K.T. 2001. Recent Advances in Arsenic Carcinogenesis: Modes of Action, Animal Model Systems, and Methylated Arsenic Metabolites. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 172, p.p. 249-261
- Kohn, K.W. 1979. DNA as target in cancer chemotherapy: measurement of macromolecular DNA damage produced in mammalian cells by anticancer agents and carcinogens in: *Methods in cancer Research.* Academic Press, New York, 291-345
- Kohn, K.W., Ewig, R.A., Brickson, L.C., Zwelling, L.A. 1981. Measurement of strand breaks and crosslinks by alkaline elution, in: Fiedberg, E.C., Hanawalt, P.C. (Eds). *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures.* Marcel Dekker. New York, 79-401
- Ku, N.O., Zhou, X., Toivola, D.M., Omary, M.B. 1999. The cytoskeleton digestive epithelia in health and disease. *Am. J. Physiol.* 277, G1108-G1137.
- Ku, N.O., Michie, S., Resurreccion, E.Z., Broome, R.L., Omary, M.B. 2002. Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratins filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4373-4378
- Lagerkvist, B., Zetterlund, B. 1994. Assessment of exposure to arsenic among smelter workers: a five-year follow-up. *Am. J. Ind. Med.*, 25, 477-488.

- Lai, M.S., Hsueh, Y.M., Chen, C.J., Shyu, M.P., Chen, S.Y., Kuo, T.L., Wu, M.M., Tai, T.Y. 1994. Ingested Inorganic Arsenic and Prevalence of Diabetes Mellitus. *Am. J. Epidemiol.* 139, 484-492
- Le, X.C., Cullen, W.R., Reimer, K.J. 1994. Human urinary arsenic excretion after one-time ingestion of seaweed, crab and shrimp. *Clin. Chem.* 40, 617-624
- Le, X.C., Lu, X., Ma, M., Cullen, W.R., Aposhian, H.V., Zheng, B. 2000. speciation of key arsenic metabolic intermediates in human urine. *Anal. Chem.* 72, 5172-5177
- Lee-Chen, S.F., Wang, M.C., Yu, C.T., Wu, D.R., Jan, K.Y. 1993. Nickel chloride inhibits the DNA repair of UV-treated but not methyl methanesulfonate-treated Chinese hamster ovary cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 37, 39-50
- Lerche-Langrand, C., Herve, J.T. 2000. Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology.* 153, 221-253
- Lin, S., Cullen, W.R., Thomas, D.J. 1999. Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 924-930
- Liu, F., Jan, K.Y. 2000. DNA damage in arsenite- and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 55-63
- Liu, S.X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C.A., Hei, T.K. 2001. Induction of oxyradicals by arsenic: implications for mechanisms of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1643-1648
- Liu, Y., Guyton, K.Z., Gorospe, M., Xu, Q., Lee, J.C., Holbrook, N.J. 1996. Differential activation of ERK JNK/SAPK and P38/CSB/RK MAP kinase family members during the cellular response to arsenite. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 771-781
- Lupas, A. 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* 21, 375-382
- Lynn, S., Gurr, J.R., Lai, H.T., Jan, K.Y. 2000. NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 86, 514-519
- Ma, M., Le, S.C. 1998. Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. *Clin. Chem.* 44, 539-550

- Maeda, S. 1994. Biotransformation of arsenic in the freshwater environment, in: Nriagu, J.O. (Ed.). Arsenic in the environment Part I. Cycling and Characterization. Wiley. New York, 155-187
- Maiti, S., Chatterjee, A.K. 2000. Differential response of cellular anti-oxidant mechanism of liver and kidney to arsenic exposure and its relation to dietary protein deficiency. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 8, 227-235
- Makin, A.J., Hughes, R.D., Williams, R. 1997. Systemic and hepatic hemodynamic changes in acute liver injury. *Am. J. Physiol.* 272, G617-G625
- Mandal, B.K., Ogra, Y., Suzuki, K.T. 2001. Identification of Dimethylarsinous and Monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chem. Res. Toxicol.* 14:4, 371-378
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T. 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta*, Vol 58, 3; 201-235
- Marr, N. 1995 Aboriginal History of the Great Lakes District. Australia. <http://www.greatlakes.nsw.gov.au/commprof/aborigin.htm>. v.i.: 13-06-07
- Mass, M.J., Wang, L. 1997. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat. Res.* 386, 263-277
- Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B., Kundu, K., Brock, K., Kligerman, A., Demarini, D., Wang, C., Cullen, W., Thomas, D., Styblo, M. 2001. Methylated arsenic (III) species react directly with DNA and are potential proximate or ultimate genotoxic forms of arsenic. *Toxicologist.* 60, 358
- Merk, O., Speit, G. 1998. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 32, 260-268
- Merk, O., Speit, G. 1999. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 167-172
- Merk, O., Reiser, L., Speit, G. 2000, Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutat. Res.* 471, 71-80
- Miller, W.H. Jr., Hyman, M.S., Lee, J.S., Singer, J., Waxman, S. 2002. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* 62, 3893-3903

- Moore, M.M., Harrington-Brock, K., Doerr, C.L. 1997. Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat. Res.* 386:3 279-290
- Morales, K.H., Ryan, L., Kuo, T.L., Wu, M.M., Chen, C.J. 2000. Risk of Internal Cancers from Arsenic in Drinking Water. *Environ. Health Perspect.* 108:7 655-661
- Nagvi, S.M., Vaishnavi, C., Singh, H. 1994. Toxicity and metabolism of arsenic in vertebrates, In: Nriagu, J.O. (Ed.). *Arsenic in the Environment. Part II: Human Health and Ecosystem Effects.* John Wiley and Sons. Inc. New York, 55-91
- Nesnow, S., Roop, B.C., Lambert, G., Kadiiska, M., Mason, R., Cullen, W.R., Mass, M.J. 2002. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals mediated by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1627-1634
- Nordenson, I., Beckman, L. 1991. Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals? *Hum. Hered.* 41, 71-73
- Nriagu, J.O., Azcue, J.M. 1990. In: Nriagu, J.O. (Ed.). *Arsenic in the Environment. Part I: Cycling and Characterization.* John Wiley and Sons, Inc. New York. 1-15
- Nriagu, J.O., Azcue, J.M. 1994. Arsenic: Historical Perspectives. In: Nriagu, J.O. (Ed.). *Arsenic in the Environment.* Wiley. New York, Vol. 1. pp 1-15.
- Nriagu, J.O., Wong, H.K.T. 1997. Gold Rushes and Metal Pollution. *Metal Ions in Biological Systems.* Dekker. 34:131-160
- Nriagu, J.O. 2002. Arsenic poisoning through the ages in: Frankenberger, William (Ed.). *Environmental chemistry of arsenic.* Marcel Dekker. USA, Capítulo 1
- Olinski, R., Nackerdien, Z., Dizdaroglu, M. 1992. DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in chromatin of gamma irradiated or H₂O₂-treated cultured human cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 139-143
- Omary, M.B., Ku, N.O., Liao, J., Price, D. 1998. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and *in vitro*. *Subcell. Biochem.* 31, 105-140
- Omary, M.B., Ku, N.O., Toivola, D.M. 2002. Keratins: Guardians of the Liver. *Hepatology.* 35:2, 251-257
- Parry, D.A., Steinert, P.M. 1999. Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q. Rev. Biophys.* 32, 99-187
- Parry, D.A., Marekov, L.N., Steinert, P.M. 2002. Subfilamentous profibril structures in fibrous proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 39253-39258

- Petrick, J.S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E., Aposhian, H.V. 2000. Monomethylarsonous acid (MMA) (III) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163, 203-207
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., Cayota, A. 2001. Unraveling peroxy-nitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 463-488
- Ramanathan, K., Shila, S., Kumaran, S., Panneerselvam, C. 2003. Ascorbic acid and alpha-tocopherol as potent modulators on arsenic induced toxicity in mitochondria. *J. Nutr. Biochem.* 14, 416-420
- Ramírez, P., Del Razo, L.M., Gutierrez-Ruiz, M.C., Gonsebatt, M.E. 2000. Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis.* 21, 701-706
- Reglinski, J. 1998. Environmental and Medicinal Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth. In: Norman, N.C. (Ed.). *Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth.* Chapman & Hall. London. pp 403-445
- Roskams, T.A., Libbrecht, L., Desmet, V.J. 2003. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin. Liver Dis.* 23, 385-396
- Rudel, R., Slayton, T.M., Beck, B.D. 1996. Implications of Arsenic Genotoxicity for Dose Response of Carcinogenic Effects. *Reg. Toxicol. Pharm.* 23:2, 87-105
- Saha, K.C., Saha, J.C., Dikshit, A.K., Bandyopadhyay. 1999. A Review of Arsenic Poisoning and its Effects on Human Health. *Environ. Sci. Technol.* 29:3, 281-313
- Santra, A., Das Gupta, J., De, B.K., Roy, B., Guha Mazumder, D.N. 1999. Hepatic Manifestations in Chronic Arsenic Toxicity. *Ind. J. Gastroenterol.* 18, 152-155
- Santra, A., Maiti, A., Das, S., Lahiri, S., Charkaborty, S.K., Guha Mazumder, D.N. 2000. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *Clin. Toxicol.* 38: 4 395-405
- Shen, Z.Y., Shen, W.Y., Chen, M.H., Shen, J., Cai, W.J., Zeng, Y. 2000. The alteration of mitochondria is an early event of arsenic trioxide induced apoptosis in esophageal carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* 9, 385-390
- Simeonova, P.P., Wang, S., Toriuma, W.W., Kommineni, V., Matheson, J., Unimye, N., Kayama, F., Harki, D., Ding, M., Vallyathan, V., Luster, M.I. 2000.

Arsenic mediates cell proliferation and gene expression in the bladder epithelium: association with activating protein-1 transactivation. *Cancer Res.* 60, 3445-3453

- Smith, K.R., Klei, L.R., Barchowsky, A. 2001. Arsenite stimulates plasma membrane NADPH oxidase in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280, 442-449
- Steinert, P.M., Marekov, L.N., Parry, D.A. 1993. Diversity of intermediate filament structure. Evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments. *J Biol. Chem.* 268, 24916-24925
- Strelkov, S.V., Herrmann, H., Aebi, U. 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *BioEssays.* 25: 243-251
- Stumptner, C., Omary, M.B., Fickert, P., Denk, H., Zatloukal, K. 2000. Hepatocyte cytokeratins are hyperphosphorylated at multiple sites in human alcoholic hepatitis and in a Mallory body mouse model. *Am. J. Pathol.* 156, 77-90
- Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Lehner, K., Zatloukal, K., Denk, H. 2001. Sequence of events in the assembly of Mallory body components in mouse liver: clues to the pathogenesis and significance of Mallory body formation. *J. Hepatol.* 34, 665-675
- Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Heid, H. Zatloukal, K., Denk, H. 2002. Mallory body –a disease associated type of sequestosome. *Hepatology.* 35, 1053-1062
- Styblo, M., Serves, S.V., Cullen, W.R., Thomas, D.J. 1997. Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 27-33
- Styblo, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R., Thomas, D.J. 2000. *Arch. Toxicol.* 74; 289
- Sundstrom, B.E., Stigbrand, T.I. 1994. Cytokeratins and tissue polypeptide antigen. *Int. J. Biol. Markers.* 9, 102-108
- Thornton, I. 1999. Arsenic in the Global Environment: Looking Towards the Millenium. In: Chappel, W.R., Abernathy, C.O., Caldron, R.L. (Eds.). *Arsenic Exposure and Health Effects.* Elsevier. Amsterdam. pp 1-7

- Toivola, D.M., Nieminen, M.I., Hesse, M. 2001. Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly-deficient keratins 8/18. *Hepatology*. 34, 1174-1183
- Tolstong, G.V., Mothes, E., Shoeman, R.L., Traub, P. 2001. Isolation of SDS-stable complexes of the intermediate filament protein vimentin with repetitive, mobile, nuclear matrix attachment regio, and mitochondrial DNA sequence elements from cultured mouse and human fibroblasts. *DNA Cell Biol.* 20, 531-554
- Ueda, S., Cook, M., Alak, A.M. 1996. In vitro metabolic studies of tacrolimus using precision-cut rat and human liver slices. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15; 349-357
- United Nations. 2001. United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water.
- Universidad José Carlos Mariátegui. 2007. Diccionario Pedagógico. Perú. <http://www.ujcm.edu.pe/diccionario/buscar.php?meta=leter&dic=medico&q=yaws> (vi: 12-06-07)
- Van Eyken, P., Sciot, R., Callea, F., Van der Steen, K., Moerman, P., Desmet, V.J. 1988. The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study. *Hepatology*. 8, 1586-1595
- Van Eyken, P., Sciot, R., Desmet, V.L. 1988a. A cytokeratin immunohistochemical study of alcoholic liver disease: evidence that hepatocytes can express “bile duct-type” cytokeratins. *Histopatology*. 13, 605-617
- Van Eyken, P., Sciot, R., Desmet, V.L. 1989. A cytokeratin immunohistochemical study of cholestatic liver disease: evidence that hepatocytes can express “bile duct-type” cytokeratins. *Histopatology*. 15, 125-135
- Vather, M. 1994. Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Appl. Organomet. Chem.* 8, 175-182
- Vather, M., Couch, R., Nermell, B., Nilsson, R. 1995. Lack of methylation of inorganic arsenic in the chimpanzee. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133:2, 262-268
- Vather, M. 1999. Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Sci. Prog.* 82, 69-88
- Vega, L., Styblo, M., Patterson, R., Cullen, W., Wang, C., Germolec, D. 2001. Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and

cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172:3, 225-232

- Wang, J.P., Qi, L., Moore, M.R., Ng, J.C. 2002. A review of animal models for the study of arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 133, 17-31
- Wang, T.S., Hsu, T.Y., Chung, C.H., Wang, A.S., Bau, D.T., Jan, K.Y. 2001. Arsenite induces oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Free Radical Biol. Med.* 1, 321-330
- Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Chen, H., Yoshida, K., Endo, G., Hori, T., Fukushima, S. 1996. Promoting effects of dimethylarsinic acid of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* 17, 2435-2439
- Wanibuchi, H., Hori, T., Meenakchi, V., Ichihara, T., Yamamoto, S., Yano, Y., Otani, S., Nakae, D., Konishi, Y., Fukushima, S. 1997. Promotion of rat hepatocarcinogenesis by dimethylarsinic acid as assessed in rat in vivo models: A review. *Mutat. Res.* 86, 353-361
- Wanibuchi, H., Wei, M., Yamamoto, S., Li, W., Fukushima, S. 2000. Carcinogenicity of an organic arsenical, dimethylarsenic acid and related arsenicals in rat urinary bladder. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 40, 2309
- Wei, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Li, W., Fukushima, S. 1999. Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats. *Carcinogenesis.* 20, 1873-1876
- Wei, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Iwai, S., Yoshida, K., Endo, G., Nakae, D., Fukushima, S. 2002. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. *Carcinogenesis.* 23, 1387-1397
- Weir Lipton, M.S., Fuciarelli, A.F., Springer, D.L., Edmons, C.G. 1996. Characterization of radiation-induced thymine-tyrosine crosslink by electrospray ionisation mass spectrometry. *Radiat. Res.* 145, 681-686
- Whiteman, M., Halliwell, B. 1999. Loss of 3-nitrotyrosine on exposure to hypochlorous acid: implications for the use of 3-nitrotyrosine as a bio-marker in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 168-172

- Whiteman, M., Jenner, A., Halliwell, B. 1999a. 8-Chloroadenine: a novel product formed from hypochlorous acid-induced damage to calf thymus DNA. *Biomarkers*. 4, 303-310
- WHO. 2001. Arsenic Compounds, Environmental Health Criteria 224. 2nd. Ed. World Health Organization. Geneva
- Winski Dean, S.L., Carter, E. 1998. Arsenate toxicity in human erythrocytes: Characterization of morphologic changes and determination of the mechanism of damage. *J. Toxicol. Environ. Health*. 53:5 345-355
- Yager, J.W., Wiencke, J.K. 1997. Inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase by arsenite. *Mutat. Res*. 386, 345-351
- Yamamoto, S., Konishi, Y., Matsuda, T., Murai, T., Shibata, M., Matsui-Yuasa, I., Otani, S., Kuroda, K., Endo, G., Fukushima, S. 1995. Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Res*. 55, 1271-1276
- Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Hori, T., Yano, Y., Matsui-Endo, G., Fukushima, S. 1997. Possible carcinogenic potential of dimethylarsenic acid as assessed in rat in vivo models: a review. *Mutat. Res*. 386, 353-361
- Yamanaka, K., Hoshino, M., Okamoto, M., Sawamura, R., Hasegawa, A., Okada, S. 1990. Induction of DNA damage by dimethylarsine, amtebolite of inorganic arsenic, is for the major part likely due to its peroxy radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 168, 58-64
- Yamanaka, K., Hasegawa, A., Sawamura, R., Okada, S. 1991. Cellular response to oxidative damage in lung induced by the administration of dimethylarsinic acid, a major metabolite of inorganic arsenics, in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 108, 205-213
- Yamanaka, K., Okada, S. 1994. Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environ. Health Perspect*. 102, 37-40
- Yamanaka, L., Ohtsubo, K., Hasegawa, A., Hayashi, H., Ohji, H., Kanisawa, M., Okada, S. 1996. Exposure to dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic

arsenics, strongly promotes tumorigenesis initiated by 4-nitroquinoline-1-oxide in the lungs of mice. *Carcinogenesis*. 17, 767-770

- Yamanaka, K., Katsumata, K., Ikuma, K., Hasegawa, A., Nakano, M., Okada, S. 2000. The role of orally administered dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in the promotion and progression of UVB-induced skin tumorigenesis in hairless mice. *Cancer Lett.* 152, 79-85
- Yamanaka, K., Mizoi, M., Kato, K., Hasegawa, A., Nakano, M., Okada, S. 2001. Oral administration of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, promotes skin tumorigenesis in mice. *Biol. Pharm. Bull. Japan.* 24, 510-514
- Yamanaka, K., Mizoi, M., Kato, K., Hasegawa, A., Nakano, M., Okada, S. 2001a. Oral administration of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenic, in mice promotes skin tumorigenesis initiated by dimethylbenz(a)anthracene with or without ultraviolet B as a promoter. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 510-514
- Yamanaka, K., Kato, K., Mizoi, M., An, Y., Takabayashi, F., Nakano, M., Hoshino, M., Okada, S. 2004. The role of active arsenic species produced by metabolic reduction of dimethylarsinic acid in genotoxicity and tumorigenesis. *Tox, Appl. Pharm.* 198, 385-393
- Yamauchi, H., Kaise, T., Takahashi, K., Yamamura, Y. 1990. Toxicity and metabolism of trimethylarsine in mice and hamsters. *Fundam. Appl. Toxicol.* 14:2, 399-407
- Yoon, K.H., Yoon, M., Moir, R.D., Khuon, S., Flitney, F.W., Goldman, R.D. 2001. Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells. *J Cell Biol.* 153: 503-516
- Yuan, S.S., Hou, M.F., Chang, H.L., Chan, T.F., Wu, Y.H., Wu, Y.C., Su, J.H. 2003. Arsenic induced nitric oxide generation is cell cycle dependent and aberrant in NBS cells. *Toxicol. In Vitro.* 17, 139-143
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Fickert, P., Lackner, C., Trauner, M., Denk, H. 2004. The keratin cytoskeleton in liver diseases. *J. Pahtol.* 204, 367-376
- Zhai, C., Zheng, B. 1999. Researches on the Health Effects of Arsenic in China. In : Centeno, JA. Collery, P. Vernet, G. Finkelman, RB. Gibb, H. Etienne, JC, eds.

Metal Ions in Biology and Medicine. John Libbey Eurotext. Rome. Vol. 6. pp 32-33.

- Zhao, C.Q., Young, M.R., Diwan, B.A., Coogan, T.P., Waalkes, M.P. 1997. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 10907-10912
- Zhitkovich, A., Costa, M. 1992. A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo. Carcinogenesis. 13, 1485-1489
- Zhitkovich, A., Voitkun, V., Costa, M. 1996. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: importance of trivalent chromium and the phosphate group. Biochemistry. 35, 7275-7282