



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup de Mutagènesi

**ESTUDI DELS POTENCIALS MECANISMES INVOLUCRATS  
EN LA CARCINOGENÈSIS DE L'ARSÈNIC**

**TESI DOCTORAL**

**Jana Peremartí Brosel**

**Febrer, 2017**





**Universitat Autònoma de Barcelona**

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup de Mutagènesi

**ESTUDI DELS POTENCIALS MECANISMES INVOLUCRATS EN LA  
CARCINOGENESI DE L'ARSÈNIC**

Memòria presentada per

**Jana Peremartí Brosel**

En el marc del programa d'estudis de doctorat en Genètica realitzat a la Universitat Autònoma de Barcelona per optar al grau de Doctora amb la Menció de Doctorat Internacional.

Treball realitzat sota la direcció de la Dra. Alba Hernández Bonilla i el Dr. Ricard Marcos Dauder

**Dra. Alba Hernández Bonilla**

**Dr. Ricard Marcos Dauder**

**Jana Peremartí Brosel**



## ABSTRACT

Inorganic arsenic is a widely spread environmental contaminant known to be cytotoxic, genotoxic and carcinogenic to humans. Epidemiological data clearly show an increase in the incidence of cancer in human populations living in arsenic-rich areas, mainly on skin, lung, bladder, liver, prostate and kidney cancers. However, the associated carcinogenic mechanisms remain incompletely characterized. Hence, the aim of this Thesis is to deeper in the mechanisms of arsenic-related effects, trying to disclose new insights.

Several studies suggest that reactive oxygen species (ROS) generated during arsenic biotransformation play an important role in arsenic-related carcinogenesis, but the lack of studies with environmentally relevant type of exposures makes this point uncertain. One of the goals of this Thesis is to assess the behavior of oxidative and genotoxic DNA damage along the acquisition of the *in vitro* cancer phenotype, and also to determine the involvement of AS3MT and MTH1 enzymes in the process. Thus, mouse embryonic fibroblast (MEF) cells previously transformed by 30 weeks of chronic arsenite exposure were monitored for oxidative DNA damage (ODD) and chromosome damage by using the comet and the micronucleus assay, at different time-of-exposure intervals for the complete duration of the exposure. Expression changes of *As3mt* and *Mth1*, both related to oxidative damage, were also evaluated by real time RT-PCR, as well as, epigenetic consequences. Results indicate that the oxidative and genotoxic damage of chronically exposed MEF cells increase up to the point of transformation, but drop drastically afterwards. Interestingly, *As3mt* expression follows the same pattern than DNA damage, while *Mth1* increases its expression after the point of transformation, rather being the responsible of the observed DNA damage decrease. In addition, a global DNA hypomethylation was observed during the complete duration of the exposure.

On the other hand, chronic arsenic exposure interferences with NER and BER pathways are well documented, presumably due to the arsenic ability of interacting and inhibiting proteins, but interactions with other DNA repair pathways are poorly explored. So, another point of interest of this Thesis is to scope whether arsenic disrupts the normal function of FA/BRCA pathway. For this, cells were exposed for two weeks to subtoxic concentrations of two trivalent arsenic compounds, ATO and MMA<sup>III</sup>, and, after that, the

cellular response to different inducers of the studied pathway was evaluated and compared to one FA/BRCA-deficient cell line. Our results show that preexposure to the trivalent arsenic compounds sensitizes cells in front of crosslinking agents, increases accumulation of cells in G2/M phase, reduces the amount of activated FANCD2 protein and increases the micronuclei frequency. Altogether, these findings indicate that environmental relevant arsenic exposures disrupt the FA/BRCA function, displaying a novel mechanism of arsenic co- and carcinogenesis.

Our data are certainly important for the potential use of arsenicals in cancer therapy. As they sensitize cells to crosslinking agents, we suggest that combination chemotherapy of ATO and a crosslinking agent would increase the response and improve outcomes by lowering the associated toxicity side effects. To prove this hypothesis, three different bladder cancer cell lines were treated with a combination of low concentrations of ATO and cisplatin, a well-known chemotherapeutic drug. After proving the altered FA/BRCA repair capacity of the bladder cancer cells treated with ATO and cisplatin, several endpoints like toxicity and extrinsic hallmarks of cancer phenotype were assessed. Our results show that combined treatments significantly decrease the viability of exposed cells in all cases. Also, we find that the ATO/cisplatin cotreatment decreases the number of colonies able to grow in soft-agar, as well as, cell migration rate, MMP secretion, and cell invasion capacity.

Overall, our results demonstrate the implication of *Mth1* and *As3mt* in the accumulation and subsequent drop of the oxidative DNA damage during arsenic-induced transformation process, and set *Mth1* as a useful biomarker for arsenic carcinogenesis. On the other hand, our data demonstrate for the first time that environmentally relevant arsenic exposures disrupt the normal function of the FA/BRCA pathway, supporting a novel source of arsenic-related carcinogenic and co-carcinogenic effects that in turn can be used as a novel cancer therapy strategy, where a combination of ATO and cisplatin would synergistically improve the anticancer outcomes requiring lower cisplatin doses, eventually preventing from its toxic side effects and common cancer recurrence.

## RESUM

L'arsènic inorgànic és un element àmpliament distribuït en el medi ambient. Diversos estudis epidemiològics mostren un clar augment en la incidència de diferents tipus de càncer en poblacions humanes que habiten en zones amb elevats nivells d'arsènic. No obstant, encara existeixen molts dubtes sobre els mecanismes a través dels quals els compostos d'arsènic generen els seus efectes. L'objectiu d'aquesta Tesi és aprofundir en els mecanismes d'acció de l'arsènic, tractant de revelar nous coneixements.

Diversos estudis suggereixen que les espècies reactives d'oxigen (ROS) generades durant el metabolisme de l'arsènic juguen un paper principal en la carcinogènesi, però la falta d'estudis realitzats amb concentracions ambientalment rellevants posa en dubte aquest mecanisme. Per això, un dels objectius d'aquesta Tesi, serà avaluar el comportament del dany oxidatiu, mitjançant la tècnica del cometa, i del dany genotòxic, a través del test de micronuclis, en el DNA durant el procés de transformació tumoral *in vitro*. També estudiarem l'expressió dels gens *As3mt* i *Mth1*, ambdós relacionats amb el dany oxidatiu, per PCR a temps real, així com les conseqüències epigenètiques de l'exposició crònica. En aquest context, es van utilitzar fibroblasts embrionaris de ratolí (MEF) prèviament transformats durant 30 setmanes d'exposició a arsenit. Els resultats mostren que, tant el dany oxidatiu com el genotòxic augmenten fins als voltants del punt de transformació, i després disminueixen dràsticament. Curiosament, l'expressió de *As3mt* segueix el mateix patró de comportament que el dany en el DNA, mentre que l'expressió de *Mth1* augmenta després del punt de transformació, sent el responsable de la disminució del dany observat, i establint-se així com un biomarcador útil en la carcinogènesi associada a l'arsènic. A més, es va observar una hipometilació global del DNA durant totes les setmanes d'exposició.

D'altra banda, s'ha vist que l'exposició crònica a l'arsènic interfereix amb el funcionament de les rutes de reparació BER i NER, possiblement a causa d'inhibir la funció de determinades proteïnes. En canvi, la interacció de l'arsènic amb altres rutes de reparació no s'ha estudiat mai. Per tant, un altre punt d'interès d'aquesta tesi, serà determinar si l'arsènic es capaç d'alterar la funció de la ruta FA/BRCA. Per això, es van exposar cèl·lules a baixes concentracions de dos compostos trivalents d'arsènic, l'ATO i el MMA<sup>III</sup>, durant dos setmanes, i després es va avaluar la resposta cel·lular enfront a



diferents agents inductors d'enllaços creuats en el DNA (ICLs). Els nostres resultats indiquen que, la preexposició als compostos d'arsènic sensibilitza les cèl·lules enfront d'agents inductors d'ICLs, augmenta l'acumulació de cèl·lules en fase G2/M, redueix la quantitat de proteïna FANCD2 activa i augmenta la freqüència de micronuclis. En global, aquests resultats indiquen que exposicions ambientalment rellevants d'arsènic interfereixen en la funció normal de la ruta FA/BRCA, presentant-se per primer cop com un nou mecanisme de co- i carcinogènesi.

Aquestes dades són importants per a l'ús de l'arsènic en la teràpia contra el càncer. Com que l'arsènic es capaç de sensibilitzar les cèl·lules enfront agents inductors d'ICLs, es suggereix que una combinació d'ATO i un agent inductor d'ICLs, augmentaria la resposta i milloraria els resultats, reduint els efectes secundaris associats. Per provar aquesta hipòtesi, es van tractar tres línies cel·lulars de càncer de bufeta amb una combinació d'ATO i cisplatí, un fàrmac àmpliament utilitzat. Primer es va demostrar que la teràpia combinada, era capaç d'alterar la funció de la ruta FA/BRCA en les cèl·lules de bufeta, i després es van avaluar altres punts, com la toxicitat i característiques extrínseques del fenotip tumoral. Els nostres resultats mostren que, en tots els casos, la teràpia combinada disminueix significativament la viabilitat de les cèl·lules exposades, disminueix el nombre de colònies capaces de créixer en agar tou, la velocitat de migració, la secreció de MMP, i la capacitat d'invasió de cèl·lules. De manera que, es planteja aquesta estratègia com una nova teràpia contra el càncer de bufeta on s'utilitzen concentracions de cisplatí més baixes, prevenint els seus efectes secundaris tòxics i evitant la recurrència del càncer.

En conclusió, els nostres resultats mostren la implicació de la *Mth1* i l'*As3mt* en l'acumulació i posterior caiguda del dany oxidatiu en el DNA durant el procés de transformació *in vitro* induïda per l'arsènic. D'altra banda, les nostres dades demostren, per primera vegada, que exposicions ambientalment rellevants d'arsènic són capaces d'alterar la funció normal de la ruta FA/BRCA, desvelant una nova font d'efectes carcinogènics i co-carcinogènics relacionats amb l'arsènic, que al seu torn poden ser utilitzats com una nova estratègia de teràpia contra el càncer. Proposem que la combinació d'ATO i cisplatí podria millorar significativament els efectes antitumorals del cisplatí en solitari, requerint menors dosis de cisplatí, disminuint així els seus efectes secundaris tòxics i la recurrència del càncer.

## ABREVIATURES

<b>8-OH-dG</b>	8-hidroxi-deoxiguanosina
<b>APL</b>	<i>Acute promyelocytic leukemia</i> ; Leucèmia promielocítica aguda
<b>As</b>	<i>Arsenic</i> ; Arsènic
<b>AS3MT</b>	<i>Arsenite methyltransferase</i> ; Arsènic-3-metiltransferasa
<b>As<sup>III</sup></b>	<i>Arsenite</i> ; Arsenit
<b>As<sup>V</sup></b>	<i>Arsenate</i> ; Arsenat
<b>ATO</b>	<i>Arsenic trioxide</i> ; Triòxid d'arsènic
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i> ; Trifosfat d'adenosina
<b>BaP</b>	<i>Benzo(α) pyrene</i> ; Benzo(α)pirè
<b>BER</b>	<i>Base excision repair</i> ; Reparació per escissió de bases
<b>BFD</b>	<i>Blackfoot disease</i>
<b>BRCA</b>	<i>Breast cancer</i> ; Càncer de mama
<b>CA</b>	<i>Chromosomal aberrations</i> ; Aberracions cromosòmiques
<b>CDDP</b>	cis-diaminodicloroplatino(II); Cisplatí
<b>CSC</b>	<i>Cancer stem cells</i> ; Cèl·lules mare tumorals
<b>DEB</b>	<i>Diepoxybutane</i> ; Diepoxibutà
<b>dGTP</b>	<i>Deoxyguanosine triphosphate</i> ; Trifosfat de desoxiguanosina
<b>DMA<sup>III</sup></b>	<i>Dimethylarsinous acid</i> ; Àcid dimetilarsina
<b>DMA<sup>V</sup></b>	<i>Dimethylarsinic acid</i> ; Àcid dimetilarsínic
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Àcid desoxiribonucleic
<b>DSB</b>	<i>Double strand break</i> ; Trencament de doble cadena
<b>ECM</b>	<i>Extracellular matrix</i> ; Matriu extracel·lular
<b>EMA</b>	<i>Ethidium monoazide</i> ; Bromur d'etidi monoazida
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i> ; Agència de Protecció Ambiental
<b>ERCC1</b>	<i>Excision repair cross-complementing 1</i>
<b>FA/BRCA</b>	<i>Fanconi Anaemia/BRCA pathway</i> ; Ruta de l'anèmia de Fanconi/BRCA

<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> ; Administració pel control de la qualitat de productes alimentaris i medicaments
<b>FPG</b>	<i>Formamidopyrimidine DNA glycosylase</i> ; Formamidopirimidina DNA glicosilasa
<b>Hb</b>	<i>Hemoglobin</i> ; Hemoglobina
<b>HO-1</b>	<i>Heme oxygenase 1</i> ; Hemo oxigenasa
<b>HPRT</b>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>
<b>HR</b>	<i>Homologous recombination</i> ; Recombinació homòloga
<b>HU</b>	<i>Hydroxyurea</i> ; Hidroxiurea
<b>IARC</b>	<i>International agency for research on cancer</i> ; Agència Internacional de Recerca en Càncer
<b>ICL</b>	<i>Interstrand crosslink</i> ; Enllaç creuat entre cadenes
<b>IF</b>	<i>Immunofluorescence</i> ; Immunofluorescència
<b>MEF</b>	<i>Mouse embryonic fibroblast</i> , Fibroblasts embrionaris de ratolí
<b>MMA<sup>III</sup></b>	<i>Monomethylarsonous Acid</i> ; Àcid monometilarsènic
<b>MMA<sup>V</sup></b>	<i>Monomethylarsonate</i> ; Àcid monometilarsínic
<b>MMC</b>	<i>Mitomycin C</i> ; Mitomicina C
<b>MMP</b>	<i>Matrix metalloproteinase</i> ; Metal·lo proteïnasa de matriu
<b>MMR</b>	<i>Mismatch repair</i> ; Ruta de reparació per aparellaments incorrectes
<b>MN</b>	<i>Micronucleus</i> ; Micronucli
<b>MNU</b>	<i>N-Methyl-N-nitrosourea</i> ; N-metil-N-nitrosourea
<b>MTH1</b>	<i>Human Mut T Homolog 1</i>
<b>NEIL1</b>	<i>Nei Like DNA Glycosylase 1</i>
<b>NER</b>	<i>Nucleotide excision repair</i> ; Reparació per escissió de nucleòtids
<b>NHEJ</b>	<i>Non-homologous end joining</i> ; Recombinació no homòloga
<b>NRF2</b>	<i>Nuclear factor erythroid-derived 2</i>
<b>ODD</b>	<i>Oxidative DNA damage</i> ; Dany oxidatiu en el DNA
<b>OGG1</b>	<i>8-Oxoguanine glycosylase</i> ; 8-oxoguanina DNA glicosilasa
<b>PARP-1</b>	<i>Poly ADP-ribose polymerase 1</i> ; Poli ADP-ribosa polimerasa-1

<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid; Àcid ribonucleic</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species, Espècies reactives de l'oxigen</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<b>SAM</b>	<i>S-Adenosyl methionine; S-adenosilmetionina</i>
<b>SCE</b>	<i>Sister chromatid exchange; Intercanvi entre cromàtides germanes</i>
<b>SOD</b>	<i>Superoxide dismutase; Superòxid dismutasa</i>
<b>TLS</b>	<i>Translesion synthesis; Síntesis per translesió</i>
<b>TMAO<sup>III</sup></b>	<i>Trimethylarsine; Àcid trimetilarsènic</i>
<b>TMAO<sup>V</sup></b>	<i>Trimethylarsenic oxide; Òxid trimetilarsènic</i>
<b>UNICEF</b>	<i>United Nations International Children's Emergency Fund; Fons de les Nacions Unides per a la Infància</i>
<b>UV</b>	<i>Ultraviolet; Llum ultraviolada</i>
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization; Organització Mundial per a la Salut</i>
<b>XP</b>	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
<b>XRCC1</b>	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>



# ÍNDIX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	1
1.1. L'ARSÈNIC .....	1
1.1.1. Descripció i aplicacions .....	1
1.1.2. Efectes de l'arsènic en la salut .....	3
1.1.3. Metabolisme de l'arsènic.....	4
1.1.4. Efectes adversos de l'exposició a l'arsènic .....	6
1.1.4.1. Principals biomarcadors utilitzats en l'estudi de l'arsènic.....	10
1.1.4.1.1. Biomarcadors d'exposició .....	10
1.1.4.1.2. Biomarcadors d'efecte .....	11
1.2. MECANISMES D'ACCIÓ DE L'ARSÈNIC .....	14
1.2.1. Generació de ROS i dany oxidatiu .....	17
1.2.2. Oxidació de nucleòtids i paper del gen <i>Mth1</i> .....	21
1.2.3. Interacció amb proteïnes i conseqüències en la reparació del DNA .....	23
1.2.3.1. La ruta FA/BRCA .....	27
1.2.3.1.1. Activació i funcionament de la ruta FA/BRCA.....	28
1.2.3.1.2. Detecció de l'alteració de la ruta FA/BRCA.....	30
<b>2. OBJECTIUS</b> .....	35
<b>3. RESULTATS</b> .....	39
3.1. RESUM DEL PRIMER ESTUDI .....	43
3.2. RESUM DEL SEGON ESTUDI .....	69
3.3. RESUM DEL TERCER ESTUDI .....	85
<b>4. DISCUSSIÓ</b> .....	119
4.1. DANY OXIDATIU I GENOTÒXIC DURANT EL PROCÉS DE TRANSFORMACIÓ CARCINOGENÈICA <i>IN VITRO</i> INDUÏT PER L'ARSÈNIC. PAPER DELS ENZIMS AS3MT I MTH1. ....	119
4.1.1. Evolució del dany oxidatiu i genotòxic durant el procés de transformació <i>in vitro</i> induït per l'arsènic.....	121

4.1.2. Paper del gen <i>Mth1</i> durant el procés de transformació <i>in vitro</i> induït per l'arsènic.....	128
4.1.3. Paper del gen <i>As3mt</i> durant el procés de transformació <i>in vitro</i> induït per l'arsènic.....	129
4.1.4. Evolució de l'estat de metilació global del DNA durant el procés de transformació <i>in vitro</i> induït per l'arsènic .....	130
4.2. L'EXPOSICIÓ A L'ARSÈNIC AFECTA EL FUNCIONAMENT NORMAL DE LA RUTA DE REPARACIÓ FA/BRCA .....	133
4.2.1. Selecció dels compostos d'arsènic rellevants en la interacció amb la ruta FA/BRCA.....	135
4.2.2. Els compostos trivalents d'arsènic MMA <sup>III</sup> i ATO interfereixen en la funció de la ruta FA/BRCA .....	137
4.2.3. Conseqüències de l'alteració de la funció de la ruta FA/BRCA: Inestabilitat genòmica.....	139
4.3. APLICACIONS DE L'ALTERACIÓ DE LA FUNCIÓ DE LA RUTA FA/BRCA: TERÀPIA ANTITUMORAL .....	141
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>155</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>161</b>

## **1. INTRODUCCIÓ**





# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. L'ARSÈNIC

### 1.1.1. Descripció i aplicacions

L'arsènic (As) és un dels elements més abundants de l'escorça terrestre. És l'element 33 de la taula periòdica i encara que químicament es classifica com a metal·loide, ja que presenta característiques intermèdies entre els metalls i els no-metalls, en toxicologia normalment s'engloba dins del grup dels metalls pesants degut a l'alta toxicitat que provoca en humans l'exposició a baixes concentracions d'aquest element (Mandal i Suzuki, 2002; Jomova et al., 2011).

Depenent de les condicions ambientals, l'arsènic pot trobar-se en la natura tant en formes químiques orgàniques, quan es troba unit a carboni o hidrogen, com en inorgàniques, combinat amb oxigen, clor, sofre o altres elements, així com en diferents estats d'oxidació: trivalents (-3, +3), pentavalents (+5) o arsènic elemental (0).

Els derivats inorgànics de l'arsènic estan presents principalment en l'aigua i en els sòls, i l'estabilitat de cada compost dependrà de la seva valència i de la naturalesa del medi on es trobin. Així, en ambients oxigenats i sota condicions oxidants s'afavoreix la formació de formes pentavalents o arsenats ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), mentre que en ambients reductors i condicions anaeròbiques les formes més estables, i per tant les més abundants, són les formes trivalents o arsenits ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) (Basu et al., 2001; Jones, 2007). Pel que fa a les formes orgàniques, s'ha vist que l'arsènic és un element amb gran tendència a acumular-se en els teixits d'animals i plantes, encara que amb una gran variabilitat entre espècies. Els organismes marins com alguns peixos, mol·luscs, gambes o algues, són els que presenten una major quantitat d'arsènic orgànic, com l'arsenobetaina, l'arsenocolina, els arsenosucres i els arsenolípid, tot i que generalment aquests compostos no es consideren tòxics per al consum humà (Hughes et al., 2011; Watanabe i Hirano, 2013). No obstant, les formes orgàniques més importants des d'un punt de vista toxicològic són aquelles produïdes durant la metabolització de l'arsènic inorgànic per part de microorganismes del sòl, animals i humans, com poden ser l'àcid monometilarsènic (MMA), l'àcid dimetilarsènic (DMA) i l'òxid trimetilarsènic (TMAO).

Molt abans de que les activitats de l'home tinguessin cap efecte sobre l'equilibri de la natura, l'arsènic es trobava àmpliament distribuït en el medi ambient de manera natural, formant part del sòl, de sediments o de roques i minerals de l'escorça terrestre, com l'arsenopirita. També es presentava en baixes concentracions en el mar o en els oceans, en aigües subterrànies o aigües properes a zones amb activitats geotèrmiques. En menor mesura també es trobava en l'aire procedent de l'activitat volcànica o dels incendis forestals, o bé acumulat en teixits d'organismes vius com plantes o animals.

L'home amb l'explotació dels recursos naturals ha provocat un alliberament extra d'arsènic en l'aire, aigua i sòl. Aquestes quantitats poden superar les fonts naturals d'arsènic en el medi ambient per una ràtio de 3:1. Algunes de les activitats relacionades amb l'increment d'arsènic al medi són la mineria amb l'extracció dels minerals que es troben acoblats a l'arsènic, la crema de combustibles fòssils, l'agricultura amb l'ús de l'arsènic com a insecticida, pesticida o herbicida, l'aplicació de l'arsènic com a preservant de la fusta, com a pigment utilitzat en cosmètica, com a dessecant del cotó o com a additiu alimentari, entre d'altres activitats (Mandal i Suzuki, 2002; Jones, 2007; Hughes et al., 2011).

Una altra de les aplicacions per la qual l'arsènic s'ha conegut al llarg dels temps és per la seva utilització com a verí. De fet sovint es coneix com el rei del verins o el verí dels reis, per la seva implicació en diversos assassinats i suïcidis (Cullen, 2008). D'altra banda, malgrat la seva toxicitat, o potser a causa d'això, l'arsènic també s'ha estat utilitzat de manera efectiva en el tractament de varies malalties des de fa molts anys. Existeixen casos documentats de l'època dels grecs i romans on s'evidencia el seu ús en el tractament d'úlceres i abscessos. Anys més tard, ja al 1786, Thomas Fowler va desenvolupar una solució de triòxid d'arsènic coneguda com la *Fowler's Solution* utilitzada per al tractament de varies malalties com l'asma, la psoriasi, la malària o les úlceres (Waxman i Anderson, 2001). A principis de la dècada de 1910 es va popularitzar l'ús d'un altre fàrmac, el *Salvarsan*, desenvolupat per Paul Ehrlich per al tractament de la sífilis, que es va utilitzar eficaçment fins que va ser substituït per la penicil·lina (Riethmiller, 2005; Kritharis et al., 2013). Més recentment, el paper de l'arsènic com a teràpia ha ressorgit i la seva eficàcia s'ha demostrat en diversos casos de leucèmia promielocítica aguda (APL) on els pacients aconsegueixen una remissió completa de la

malaltia (Lengfelder et al., 2012). Després de diversos assajos, al Setembre del 2000, el triòxid d'arsènic (ATO) va ser aprovat per la *Food and Drug Administration* (FDA) dels Estats Units. Aquest èxit, va donar lloc a diversos assajos clínics centrats en avaluar l'eficàcia de l'ATO en el tractament de tumors sòlids. Alguns estudis on s'utilitzava l'ATO com agent únic no van donar una resposta clínica beneficiosa i la majoria dels pacients van tenir efectes secundaris severos a causa de la seva toxicitat. No obstant, quan l'ATO es va utilitzar en teràpia combinada amb altres agents quimioterapèutics els resultats van ser prometedors, ja que nombrosos pacients van mostrar una resposta parcial o completa amb efectes secundaris lleus, tal com es recull en l'article de Subbarayan i Ardalan (2014).

### **1.1.2. Efectes de l'arsènic en la salut**

Les principals vies d'exposició a l'arsènic són a través de la ingestió d'aigua de consum contaminada o d'aliments cultivats en zones en que les quantitats d'arsènic són anormalment elevades, o bé a través de la inhalació de partícules d'arsènic alliberades i dissoltes en l'aire derivades d'activitats industrials, com la mineria o l'agricultura. L'absorció dèrmica generalment es considera negligible exceptuant alguns casos d'accidents laborals (Pimparkar i Bhave, 2010).

Com que la majoria dels compostos d'arsènic no tenen ni color, ni olor, ni gust, la presència d'arsènic en aliments, aigua o aire no és fàcil de reconèixer, esdevenint així un greu perill per a la salut humana a causa de la naturalesa tòxica d'aquest element.

Malgrat les diferents vies d'exposició possibles, s'ha determinat que la principal font d'entrada en l'espècie humana és el consum d'aigua contaminada amb concentracions elevades d'arsènic. S'ha estimat que al món hi ha més de 200 milions de persones exposades a arsènic en països tan diversos com Bangladesh, Taiwan, Xina, Índia, Pakistan, Argentina, Mèxic, Xile o Estats Units (IARC, 2012). El pitjor dels casos d'exposició, però, va ser descrit l'any 1960 a Bangladesh. Històricament, les fonts d'aigua superficials estaven contaminades amb microorganismes patògens causants de la còlera o la disenteria, entre altres malalties gastrointestinals, que provocaven un elevada taxa de mortalitat infantil. En conseqüència, el Fons de les Nacions Unides per a la Infància (UNICEF) va treballar amb el Departament d'Enginyeria de Salut Pública per a instal·lar

pous subterranis i proporcionar el que presumiblement era una font segura d'aigua potable per a la població, i la taxa de mortalitat va disminuir considerablement de 247 morts a 112 per cada 1000 naixements. En el moment en què es van instal·lar els pous, l'arsènic no era reconegut com un problema en el subministrament d'aigua, i els procediments estàndards d'anàlisi d'aigua no incloïen proves per detectar-lo. Malauradament, anys més tard, diversos estudis van demostrar que més de la meitat de les mostres d'aigua assajades contenien nivells d'arsènic superiors als 50 µg/L, un nivell força superior als 10 µg/L establerts per l'Organització Mundial de la Salut (WHO); (Smith et al., 2000; Jones, 2007; Loewenberg, 2016). Anualment moren més de 10.000 persones a Bangladesh com a resultat de l'enverinament per arsènic, i s'estima que més de 50 milions de persones estan en risc de sofrir conseqüències greus per a la seva salut. La WHO ha qualificat aquest succés com l'enverinament massiu més gran de la història (IARC, 2012).

Per tal de protegir la salut pública de la població, l'Agència de Protecció Ambiental (EPA) dels Estats Units va establir l'any 2001 que els nivells màxims d'arsènic en l'aigua de consum no havien de superar els 10 µg/L, reduint el valor de referència que fins el moment era de 50 µg/L. Aquesta proposta va ser acceptada per la WHO, i de manera immediata molts altres països van adoptar aquest mateix límit.

Basant-se en l'anàlisi de dades epidemiològiques d'exposició a arsènic, s'ha pogut relacionar el consum crònic d'arsènic inorgànic en l'aigua amb un increment en la incidència de càncers de pell, bufeta, ronyons, fetge, pròstata i pulmons. De manera que l'Agència Internacional de Recerca en Càncer (IARC) ha classificat l'arsènic com a carcinogen en humans del grup 1 (IARC, 2012).

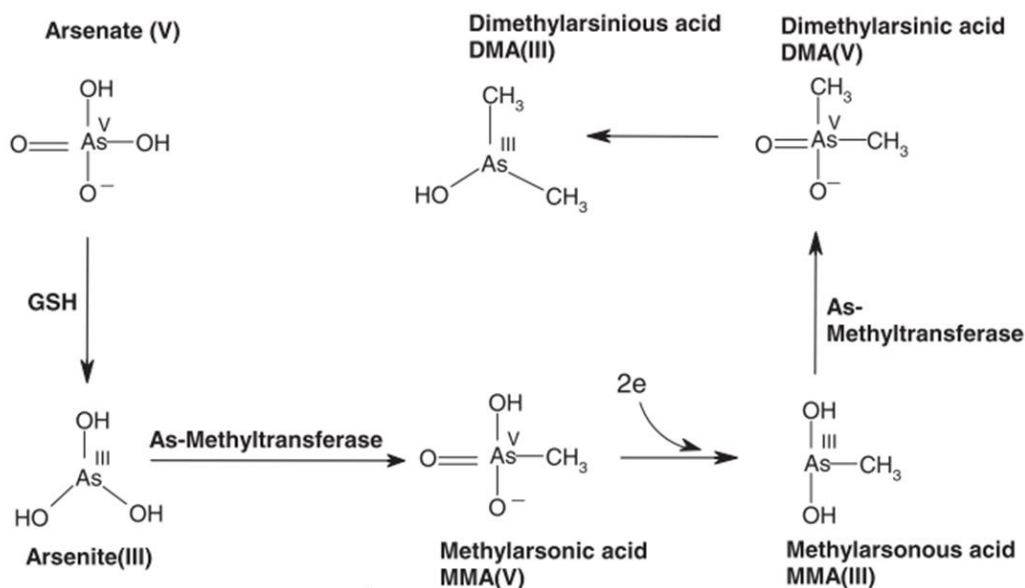
### **1.1.3. Metabolisme de l'arsènic**

En quant als mecanismes involucrats en la capacitat carcinògena i genotòxica de l'arsènic encara queden molts dubtes per aclarir, però una cosa és certa, que està directament relacionada amb el metabolisme de l'arsènic.

En humans exposats a arsènic s'ha vist que entre el 40 i el 70% es absorbit, metabolitzat i excretat en l'orina durant les primeres 48 hores, però una fracció pot quedar acumulada en estructures riques en queratina com les ungles o el cabell.

Després d'ingerir aliments o aigua contaminada amb arsènic inorgànic, aquest es absorbit pel tracte intestinal i alliberat al torrent sanguini (Sattar et al., 2016). En mamífers, les formes pentavalents ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) s'internalitzen a les cèl·lules a través de transportadors de membrana, com ara els transportadors de fosfats, mentre que les formes trivalents ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) entren a través de canals formats per acuagliceroporines (Yang et al., 2012). Un cop internalitzat, abans dels processos de metilació té lloc una primera reducció de  $\text{As}^{\text{V}}$  a  $\text{As}^{\text{III}}$  per una arsenat reductasa. La metilació de l'arsènic té lloc principalment al fetge, tot i que també pot produir-se en altres òrgans com els ronyons o els pulmons. S'han proposat diverses vies que intenten descriure la metilació de l'arsènic abans de ser excretat (Cullen i Reimer, 1989; Hayakawa et al., 2005; Naranmandura et al., 2006). No obstant, la més acceptada fins al moment és la proposada per Challenger l'any 1945 i posteriorment corroborada per Cullen i Reimer l'any 1989, tot i que també ha estat modificada al llarg dels anys. En aquest model, els compostos trivalents experimenten varis cicles de metilacions oxidatives, és a dir, l'addició d'un grup metil ( $-\text{CH}_3$ ) i la subsegüent conversió a compostos pentavalents, que de nou seran reduïts i metilats. Així les diferents espècies que es formen durant aquest procés són:  $\text{MMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MMA}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$  i  $\text{DMA}^{\text{III}}$ , i en alguns casos s'ha trobat la formació de compostos trimetilats, com l'òxid trimetilarsènic ( $\text{TMAO}^{\text{V}}$ ) o l'àcid trimetilarsènic ( $\text{TMAO}^{\text{III}}$ ). Aquest procés es catalitza per l'arsènic-3-metiltransferasa (AS3MT) que utilitza la S-adenosilmetionina (SAM) com a donadora de grups metils (Thomas et al., 2007).

L'arsènic s'elimina principalment en l'orina, amb una vida mitja d'uns 4 dies en humans. Les espècies metilades d'arsènic, i més concretament les pentavalents, s'excreten més ràpidament que les inorgàniques i les trivalents, de manera que el principal compost present en l'orina és el  $\text{DMA}^{\text{V}}$ , mentre que el  $\text{MMA}^{\text{III}}$  i el  $\text{DMA}^{\text{III}}$  es troben en menor mesura.



**Figura1.** Esquema del metabolisme de l'arsènic (Extret de Jomova et al., 2011).

Des d'un bon principi es va considerar que el procés de metilació era una via de desintoxicació de l'arsènic, ja que les espècies  $\text{MMA}^{\text{V}}$  i  $\text{DMA}^{\text{V}}$  són menys tòxiques que l'arsenit o l'arsenat. No obstant, actualment aquesta idea ha hagut de canviar-se, ja que s'ha vist que els compostos trivalents generats en aquest procés, com el  $\text{MMA}^{\text{III}}$  i el  $\text{DMA}^{\text{III}}$ , són molt més tòxics que els seus precursors inorgànics ja que són més reactius (Tokar et al., 2014).

#### **1.1.4. Efectes adversos de l'exposició a l'arsènic**

Un cop absorbit, l'arsènic es pot emmagatzemar al fetge, als ronyons, al cor o als pulmons, i en quantitats menors als músculs o als teixits neuronals. De dos a quatre setmanes després de la ingestió, s'incorpora a les ungles, al cabell i a la pell mitjançant la unió a grups sulfhidril presents en la queratina.

El primer signe d'enverinament, que pot sorgir fins a 10 anys després de que l'individu comenci a beure aigua contaminada amb arsènic, és el que s'anomena melanosí, és a dir, l'aparició de punts negres en els braços, en la part superior del pit o en l'esquena. Els palmells de les mans i les plantes dels peus s'engrosseixen i perden sensibilitat (queratosis). Alguns individus també poden sofrir conjuntivitis, bronquitis, arítmies cardíques, diarrea i dolor abdominal. En la segona etapa, apareixen taques blanques

que es barregen amb les negres, les cames s'inflen i les palmes i plantes dels peus es poden esquerdar i algunes vegades fins i tot sagnar. A més a més, poden començar a aparèixer problemes neuronals en els braços i les cames, i els ronyons i el fetge comencen a funcionar malament. En el tercer estadi, les nafres es tornen gangrenoses, i els ronyons i el fetge poden deixar de funcionar. Aproximadament 20 anys després de l'exposició poden començar a aparèixer signes tumorals, principalment en pell, bufeta i pulmons (Flora et al., 2007). Una altra característica a llarg termini de l'exposició a l'arsènic és el que es coneix com *Blackfoot disease (BFD)*, una malaltia cardiovascular endèmica confinada a la costa sud-oest de Taiwan. Es tracta d'una obstrucció arterial progressiva de les extremitats inferiors, i en alguns casos estranys també en extremitats superiors, que provoca entumiment i fredor dels membres, ulceració i decoloració negrosa progressiva de la pell que s'estén des dels dits dels peus fins als turmells, claudicació intermitent i finalment gangrena. Les lesions poden progressar a l'amputació espontània dels membres o en alguns casos es requereix l'amputació quirúrgica per salvar la vida del pacient (Tseng, 2005).

També s'ha vist que l'exposició a l'arsènic té efectes nocius sobre els òrgans sexuals causant infertilitat tant en mascles com en femelles (Dávila-Esqueda et al., 2012).

Durant l'època de l'embaràs, tant la mare com el fetus són especialment vulnerables a sofrir els efectes tòxics de l'arsènic. Aquest pot travessar la placenta, donant lloc a uns nivells d'exposició fetal equivalents als de la mare. Molts estudis demostren que l'exposició en l'úter pot provocar risc d'avortament espontani, increment en la mortalitat fetal i neonatal, l'aparició de malformacions i disminució significativa del pes dels nounats, que al seu torn pot derivar en malalties cròniques com hipertensió, diabetis o altres malalties metabòliques, cardiopaties i inclús l'aparició de càncer en la descendència (Tokar et al., 2011a; Farzan et al., 2013).

Com s'ha comentat, a llarg termini, s'ha vist que un dels problemes més greus de l'exposició a l'arsènic és la seva implicació en la carcinogènesi. No va ser fins als anys 80 que la IARC va reunir dades suficients per classificar-lo en el grup dels carcinògens en humans (grup 1) promovent l'aparició de càncer en pell, bufeta i pulmó (IARC, 1980), i com a possible (grup 2) en fetge, pròstata i ronyó (IARC, 2012). Els mètodes normalment utilitzats per detectar la incidència del càncer són epidemiològics. Aquests estudis són



complexos a causa de la quantitat de variables que poden influir en els resultats i que s'han de tenir en compte. Exemples clàssics d'estudis d'aquest tipus els trobem en regions com la Xina, Bangladesh, Índia, Argentina o Xile, on s'ha registrat una gran proporció de la població que ha estat consumint aigües contaminades amb arsènic durant molts anys. En aquestes poblacions s'ha detectat una associació entre l'exposició i l'adquisició de càncer, havent-se trobat augments significatius en la incidència de càncers tals com el de pell, pulmó, bufeta, fetge o ronyó, tal com recullen els estudis publicats en les revisions de Mandal i Suzuki (2002) o Cohen et al. (2013).

Un cas molt significatiu va tenir lloc l'any 1958 al nord de Xile, quan les aigües de consum municipal es van barrejar amb aigües de rius que contenien nivells extremadament elevats d'arsènic inorgànic (Tokar et al., 2011a). Com a conseqüència, les aigües municipals, que ja de per si contenien uns nivells d'arsènic més elevats que els recomanats, uns 90 µg/L (respecte els 50 µg/L o 10 µg/L recomanats), van passar a contenir al voltant de 870 µg/L d'arsènic. Aquests nivells desmesurats es van mantenir durant el període del 1958 al 1971. A partir de llavors es va instal·lar una planta de tractament que va aconseguir disminuir els nivells fins a tornar al voltant de 90 µg/L. Aquest ascens sobtat i posterior caiguda de les concentracions d'arsènic en l'aigua, tan ben delimitat i caracteritzat, va suposar una oportunitat única per a investigar els efectes carcinogènics de l'arsènic sobre poblacions humanes. Un altre punt important d'aquest cas era que es tractava d'una de les regions més seques del planeta, i per tant hi havia poques fonts d'aigua potable disponibles. De manera que la major part de la població que habitava aquesta regió es proveïa d'aigua del mateix origen. A més, hi havia quantitat de dades disponibles dels valors històrics de concentracions d'arsènic per cada una de les fonts d'aigua, amb dades enregistrades fa 40 anys o més. Aquesta combinació de factors fa que aquest cas sigui excepcional, i els resultats obtinguts tinguin una alta rellevància (Steinmaus et al., 2013).

Amb aquest valuós material es van realitzar diversos estudis longitudinals que associaven l'exposició a l'arsènic durant els primers anys de vida (nens nascuts en el període d'alta exposició) amb el desenvolupament de diferents tipus de càncers en l'edat adulta, incloent càncer de pulmó (Smith et al., 2006; Marshall et al., 2007), de fetge (Liaw et al., 2008), de ronyons (Yuan et al., 2010) i de bufeta (Marshall et al., 2007; Steinmaus et al., 2013). A més, actualment, Steinmaus et al. (2013) han demostrat que

hi ha una clara evidència de que l'augment del risc de càncer derivat de l'exposició a l'arsènic es manté gairebé 40 anys després del cessament de l'exposició.

Totes aquestes dades, han posar de manifest l'evidència de que les exposicions a l'arsènic inorgànic ocorregudes durant l'embaràs o les primeres etapes de la vida, estan significativament relacionades amb l'aparició de diferents tipus de càncer durant l'edat adulta, i que l'exposició durant aquestes etapes pot ser molt rellevant degut als elevats índex de tumors quantificats.

Malgrat totes aquestes evidències en humans, les dades obtingudes inicialment en animals d'experimentació no van proporcionar una informació massa rellevant, ja sigui pels resultats negatius o per la falta de coherència en la metodologia. Diversos estudis van mostrar que els humans són més susceptibles que els rosegadors als efectes carcinògens de l'arsènic, probablement a causa de diferències en la cinètica i l'eficiència de la metabolització entre humans i rosegadors (Cohen et al., 2013). De fet, els primers estudis amb arsènic inorgànic en concentracions d'exposició rellevants van mostrar que no induïa la formació de tumors en animals després de l'exposició (Huff et al., 2000; Waalkes et al., 2000). Més tard, però, es va provar per primer cop que el DMA<sup>V</sup> era capaç d'induir tumors de bufeta, encara que únicament en rates i després d'una exposició durant dos anys a concentracions tan elevades que no són rellevants en comparació amb els nivells d'exposició de l'ésser humà (Wei et al., 2002; Arnold et al., 2006). Després de varis anys, s'han aconseguit trobar nous models animals per demostrar la carcinogenicitat de l'arsènic *in vivo*, tot i que les dosis necessàries per obtenir resultats positius són força més altes que les que trobem ambientalment (Tokar et al., 2010; Hughes et al., 2011; Cohen et al., 2013).

Com en humans, diversos estudis en animals de laboratori han demostrat que l'exposició a arsènic inorgànic durant les primeres etapes de la vida està relacionada amb un augment de la susceptibilitat de patir càncer en l'edat adulta (Waalkes et al., 2007; Garry et al., 2015). Per ser més exactes i mimetitzar les condicions en que les poblacions humanes estan exposades a l'arsènic durant tota la seva vida, Tokar et al. (2011) van dissenyar un estudi amb concentracions relativament baixes d'arsènic i van començar el tractament abans de la cria (en els pares), durant l'embaràs de la femella i després del naixement de les cries fins als dos anys d'edat. Els resultats van mostrar que els teixits on van aparèixer els tumors eren els mateixos que en les exposicions

realitzades sol durant l'embaràs; el pulmó, el fetge i els ronyons, però les concentracions en què van aparèixer eren significativament inferiors i els tumors eren més freqüents i agressius (Tokar et al., 2011b).

A més a més, actualment hi ha molts estudis en que es demostra el potencial de l'arsènic com a promotor de tumors en combinació amb altres agents. Així, Rossman i altres investigadors van combinar l'exposició a l'arsènic amb l'exposició a raigs UV i van observar un augment significatiu en el nombre de tumors de cèl·lules escamoses d'aquests animals en comparació amb els animals tractats únicament amb raigs UV (Burns et al., 2004). En un altre estudi van veure que l'arsènic inhibia l'apoptosi i disminuïa la capacitat de reparar els danys causats pels raigs UV en els animals cotractats (Wu et al., 2005), posant així de manifest la interacció de l'arsènic amb els mecanismes de reparació del dany al DNA.

Tot i les evidències de què l'arsènic és un potent carcinogen en poblacions humanes exposades, encara queden força dubtes sobre quins són els mecanismes a través dels quals actua. Tot i que en els últims anys han aparegut grups d'investigació centrats en mimetitzar les condicions reals d'exposició, la falta de rellevància dels models animals desenvolupats fins al moment posa de manifest la necessitat de trobar nous mètodes que representin fidelment les condicions a les quals estan exposades els individus afectats, amb l'objectiu de poder respondre els dubtes al voltant dels modes d'acció de l'arsènic.

#### 1.1.4.1. Principals biomarcadors utilitzats en l'estudi de l'arsènic

En els estudis epidemiològics ha estat molt útil l'ús de diferents biomarcadors per avaluar l'exposició, els efectes o la susceptibilitat dels animals i humans enfront la contaminació amb arsènic. Hi ha molts estudis en que es recullen totes aquestes dades, i que han servit per elaborar pautes de control enfront la toxicitat causada per l'arsènic (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009; Marchiset-Ferlay et al., 2012; Bustaffa et al., 2014).

##### 1.1.4.1.1. Biomarcadors d'exposició

- **Arsènic en sang:** Com que l'arsènic es metabolitza en poques hores, aquest biomarcador no és un bon indicador d'una exposició a llarg termini, en canvi pot

ser més útil en certs tipus d'estudis on es volen analitzar exposicions agudes o cròniques en curs. Treballar amb mostres de sang és més difícil que treballar amb orina, i a més l'obtenció de mostra és un procés més invasiu. Per tot això, aquest no es considera una biomarcador ideal, i hi ha pocs estudis publicats en què s'utilitzi (Hall et al., 2006).

- **Arsènic en orina:** Aquest ha estat el biomarcador més utilitzat, ja que l'orina és la via d'excreció de la majoria d'espècies d'arsènic. S'han analitzat els nivells d'arsènic totals o bé els de determinades espècies, de manera que també ha servit com a indicador de la capacitat de metabolització dels individus. Ara bé, a l'hora d'interpretar els resultats s'han de tenir en compte diversos factors de confusió que poden influir, com la edat, el sexe, la dieta, el consum de tabac, la deficiència de folat, etc. (Valenzuela et al., 2005; Sun et al., 2007).
- **Arsènic en ungles i cabells:** Aquests biomarcadors són força utilitzats degut a la facilitat d'obtenció, preparació, transport i conservació de les mostres. No obstant, poden introduir alteracions ja que és difícil determinar si la presència d'arsènic es degut a contaminació interna (del menjar o de l'aigua ingerida) o externa (per contacte amb el pols, aigua, xampús, etc.). Per aquest motiu, les mostres més utilitzades són les procedents de les ungles dels peus, ja que queden més resguardades de factors externs. L'avantatge més important d'aquest biomarcador és que ens dona informació de l'exposició a llarg termini (Michaud et al., 2004; Spallholz et al., 2005; Adair et al., 2006).

#### 1.1.4.1.2. Biomarcadors d'efecte

S'ha vist que l'arsènic no és mutagènic però sí genotòxic, de manera que genera diversos efectes relacionats amb la inestabilitat genòmica que poden ser analitzats. Són biomarcadors de dany al DNA i poden ser mesurats en diversos tipus cel·lulars com limfòcits, cèl·lules de descamació bucal o cèl·lules de descamació urinària.

- **Aberracions cromosòmiques (CA):** Diversos estudis mostren un augment significatiu en la formació de CA en poblacions exposades crònicament a l'arsènic (Chakraborty et al., 2006; Ghosh et al., 2006). Com a exemple, en un estudi

realitzat a Bengala Occidental on es volia comparar el dany genotòxic en individus exposats a l'arsènic, amb i sense lesions en la pell, es va veure que el grup amb hiperqueratosis era el que presentava nivells més elevats de CA. A més, aquests individus també tenien alterada la capacitat de reparar el dany al DNA, de manera que van proposar que aquesta diferència en la capacitat de reparació pot ser els feia més susceptibles a la toxicitat de l'arsènic i al seu potencial carcinogènic (Banerjee et al., 2008).

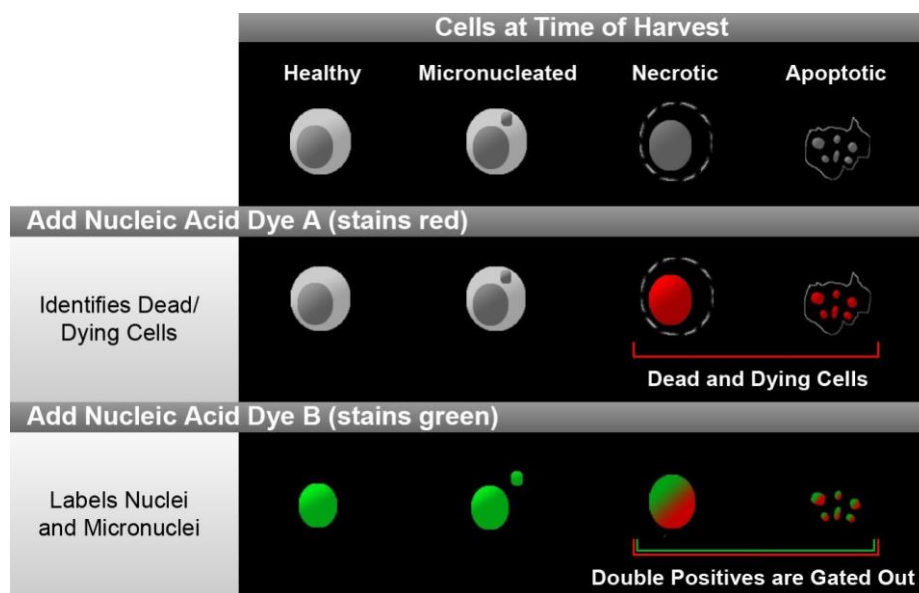
- **Intercanvi entre cromàtides germanes (SCE):** Els resultats obtinguts amb aquest biomarcador solen ser contradictoris, per això fan falta més estudis per establir una relació entre el nombre de SCE i l'exposició a l'arsènic. Com a exemple, un estudi realitzat al sud de Taiwan on la població presentava una elevada incidència de *Blackfoot Disease* va determinar que la freqüència de SCE era major al grup d'individus amb càncer en comparació amb els controls, tot i que aquestes diferències no van resultar ser significatives (Liou et al., 2002).
- **Micronuclis (MN):** És el biomarcador més sensible per estudiar el dany genètic i la inestabilitat genòmica en poblacions exposades a tòxics. Molts estudis han demostrat que les poblacions exposades a l'arsènic mostren un augment significatiu en la freqüència de MN, en comparació amb les poblacions control (Tian et al., 2001; Basu et al., 2002). De fet, aquest marcador ha estat àmpliament utilitzat en el nostre grup d'investigació per mesurar el dany genètic de diversos compostos des de fa molt temps (Pastor et al., 2001; Martínez et al., 2004; Paiva et al., 2008; García-Quispes et al., 2013; Hernández et al., 2014; Annangi et al., 2016; Rodríguez-Ribera et al., 2016).

Els micronuclis (MN) són petits nuclis de cromatina envoltats de membrana nuclear que es troben prop del nucli principal de la cèl·lula. Es poden formar durant la divisió mitòtica, a partir de material cromosòmic que no es desplaça cap a cap dels pols anafàsics i per tant no s'integra en cap dels dos nuclis que formaran les cèl·lules filles. Normalment, els MN estan formats per fragments de cromosomes acèntrics (produïts per trencaments cromosòmics) o cromosomes sencers que no han migrat cap al fus mitòtic. Els MN es poden produir tant de manera espontània, o com a conseqüència de l'exposició a agents genotòxics

(químics o físics) que produeixen trencaments en el DNA o aneuploïdies, i per tant ens donaran informació sobre la capacitat genotòxica d'aquest agent (Fenech, 2007).

La tècnica tradicional per quantificar aquestes formacions és mitjançant el comptatge en el microscopi òptic. Breument, les cèl·lules en cultiu són tractades amb citocalassina B, que inhibeix la polimerització de l'actina i per tant bloqueja la citoquinesi, de manera que les cèl·lules es divideixen però no es poden separar, donant lloc a cèl·lules binucleades. Després es fa un xoc hipotònic de manera que els citoplasmes s'inflen per osmosis, es fixen les cèl·lules amb una solució de metanol i àcid acètic i finalment es tenyeixen amb Giemsa per ser visualitzades sota el microscopi òptic. El recompte de MN es fa en les cèl·lules binucleades i seguint uns criteris de selecció força estandarditzats (Fenech, 2007).

Amb els anys, aquest assaig s'ha convertit en una tècnica de rutina en el camp de la toxicologia ambiental, de manera que degut a les seves limitacions i a la necessitat de ser utilitzat a gran escala, s'ha adaptat per a ser implementat amb la tècnica de citometria de flux (Avlasevich et al., 2011). Després de varies modificacions del protocol inicial s'ha convertit en una tècnica relativament senzilla i ràpida per quantificar el dany genotòxic en les cèl·lules. Breument, després de recol·lectar les cèl·lules s'incuben amb una tinció fluorescent, el bromur d'etidi monoazida (EMA), que és capaç de travessar únicament les membranes de les cèl·lules necròtiques i apoptòtiques. Després d'una etapa de fotoactivació s'uneix covalentment al DNA, i les cèl·lules queden marcades. A continuació es fa una lisi, seguit d'una incubació amb una altra tinció, el SYTOX<sup>®</sup>, que marca amb fluorescència tot el DNA. D'aquesta manera s'aconsegueix una tinció diferencial entre les cèl·lules sanes (EMA<sup>-</sup>/SYTOX<sup>+</sup>) i les cèl·lules mortes o necròtiques (EMA<sup>+</sup>/SYTOX<sup>+</sup>), i els MN poden ser quantificats de manera més acurada (Avlasevich et al., 2006; Bryce et al., 2007).



**Figura 2.** Esquema representatiu de la tinció de les cèl·lules en l'assaig de MN mitjançant citometria de flux. La tinció EMA en vermell, i la tinció SYTOX® en verd (Extret de Litron Laboratories, NY, USA).

## 1.2. MECANISMES D'ACCIÓ DE L'ARSÈNIC

Alguns derivats de l'arsènic són altament tòxics i, com hem vist, poden causar diverses malalties a les poblacions exposades. No obstant, encara hi ha molts dubtes sobre els mecanismes a través dels quals actuen aquests compostos. El fet que l'arsènic i els seus derivats puguin presentar diferents estats d'oxidació, i que a més tinguin la capacitat de passar d'un estat a l'altre, fa que l'arsènic pugui participar en un gran nombre de reaccions biològiques. La complexitat i la interacció entre aquestes diferents reaccions dificulta el poder definir un mecanisme d'acció concret per a aquest compost. A més, hem de sumar el paper del metabolisme, que és diferent entre espècies i inclús entre individus de la mateixa espècie, donant lloc a una gran variabilitat de respostes enfront a l'exposició a aquest element. També cal tenir en compte altres factors de susceptibilitat individual a l'arsènic, com els polimorfismes genètics. Hi ha un gran nombre d'enzims implicats en la toxicitat de l'arsènic, com les glutatió transferases, l'arsènic metiltransferasa, enzims del metabolisme del folat, enzims de rutes de reparació, etc., de manera que variacions individuals en aquests gens poden desencadenar diferents respostes en cada individu (Applebaum et al., 2007; Hernández i Marcos, 2008).

Tot i les dificultats, s'han proposat diversos modes d'acció, com per exemple el dany oxidatiu, la inhibició de rutes de reparació del DNA, la inducció d'aberracions cromosòmiques, l'alteració de patrons de metilació del DNA o l'alteració de rutes de senyalització, entre d'altres. Tots aquests mecanismes no tenen per que ser excloents, podent actuar varis d'ells al mateix temps o de forma seqüencial (Rossman, 2003; Bustaffa et al., 2014).

En general, s'accepta que els compostos inorgànics són més tòxics que els orgànics, i que les formes trivalents ho són més que les pentavalents, ja que poden unir-se directament al centre actiu de diversos enzims i inhibir-los. S'ha vist que els trivalents són altament reactius amb els grups tiol (-SH) que contenen moltes molècules com el glutatió, les cisteïnes i l'àcid lipoic, entre altres, i per tant tenen la capacitat d'alterar la funció de moltes rutes metabòliques, compromentent així la viabilitat cel·lular. Per exemple, s'ha descrit que l'As<sup>III</sup> pot unir-se amb el grup tiol de l'àcid lipoic que actua com a cofactor de la piruvat deshidrogenasa, inhibint així la seva funció, el que comporta una disminució de la producció d'ATP afectant l'obtenció d'energia cel·lular (Mandal i Suzuki, 2002; Bergquist et al., 2009). D'altra banda, l'arsenat (As<sup>V</sup>) també és capaç d'alterar rutes metabòliques, ja que pot reemplaçar els grups fosfat degut a la seva estructura anàloga. Com el fosfat, l'arsenat pot formar enllaços amb els grups hidroxils, no obstant aquests enllaços són menys estables i es dissocien ràpidament. En el cas de la glucòlisi, l'arsènic pot reaccionar amb la glucosa donant lloc a nous compostos que s'assimilen a la glucosa-6-fosfat i al 6-fosfogluconat, però que són menys estables i s'hidrolitzen amb facilitat, un procés que s'anomena arsenolisi. D'aquesta manera, interfereix en la progressió normal de la glucòlisi, disminuint així la síntesi final d'ATP en les cèl·lules (Hughes et al., 2011; Jomova et al., 2011).

Des de sempre hi ha hagut molta controvèrsia en determinar si l'arsènic és capaç o no d'unir-se directament al DNA i causar mutacions puntuals. Finalment, sembla que l'opció més acceptada és la que descarta aquesta unió directa, ja que la interacció necessària electròfils reactius i en alguns casos radicals lliures que no es troben presents en els compostos d'arsènic (Nesnow et al., 2002; Kligerman et al., 2003; Kitchin i Wallace, 2008). A més, en diversos estudis s'ha avaluat aquesta capacitat mutagènica obtenint



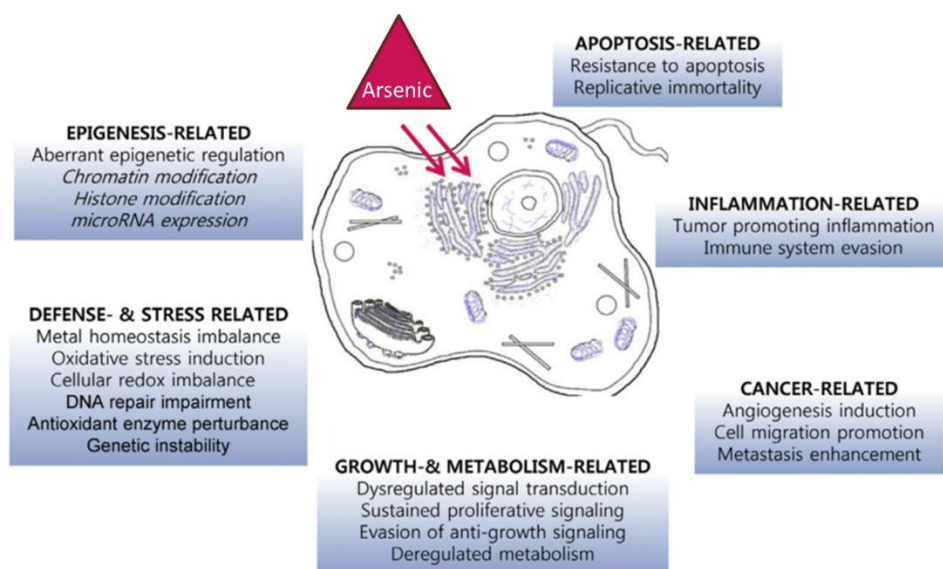
resultats poc rellevants en assajos tan significatius com en el test d'Ames o en el de mutació gènica en el gen *HPRT* (Klein et al., 2007).

Encara que l'arsènic no sigui directament mutagènic, el seu paper com a agent clastogènic està ben documentat, com hem vist en l'apartat anterior. Es creu que aquest dany genotòxic derivat de les exposicions cròniques a l'arsènic és un mecanisme indirecte, resultat de la inducció de ROS en les cèl·lules. Aquestes espècies tan reactives són les responsables de generar trencaments en el DNA, enllaços creuats entre les cadenes del DNA, aberracions cromosòmiques, micronuclis i aneuploidia, lesions lligades a la inestabilitat cromosòmica (Bhattacharjee et al., 2013), i que poden influir en l'adquisició del fenotip tumoral de les cèl·lules.

Un altre dels mecanismes descrits a través dels quals l'arsènic pot actuar és l'alteració de diferents rutes de reparació, principalment les rutes BER i NER encarregades de reparar els trencaments en el DNA. Com hem descrit anteriorment, els derivats trivalents d'arsènic tenen alta afinitat pels grups tiol, i per tant s'ha vist que els enzims d'aquestes rutes també es poden veure afectats per l'exposició a aquests compostos (Ebert et al., 2011). A més, l'arsènic també és capaç d'actuar a nivell transcripcional, disminuint l'expressió de gens que codifiquen per enzims de la ruta BER o NER.

Un altre dels principals mecanismes atribuïts a l'arsènic és l'alteració dels mecanismes epigenètics. Aquests col·laboren en la regulació de l'expressió gènica en les cèl·lules i s'ha vist que certes modificacions també poden desencadenar processos carcinogènics. Les cèl·lules canceroses es caracteritzen per una marcada hipometilació global del DNA (entre un 20 i un 60% menys de 5-metilcitosines), i també s'observa amb freqüència l'adquisició de patrons específics d'hipermetilació a les illes CpG de certs promotors (Portela i Esteller, 2010). L'hipometilació del DNA pot afavorir la recombinació mitòtica, el que comporta la inducció de delecions i translocacions, i també pot promoure reordenacions cromosòmiques, elevant els nivells de dany genètic en les cèl·lules (Esteller, 2008). Tot i que els efectes de l'arsènic sobre l'epigenoma no estan del tot clars, els mecanismes més estudiats són els canvis en els patrons de metilació. En molts casos s'ha vist que es produeix una hipometilació global del DNA que es pot atribuir a diversos factors, com la inhibició de les DNA metiltransferases per part de l'arsènic, o bé una disminució de la disponibilitat del SAM, el donador de grups metils utilitzat tant en

les reaccions de metilació de l'arsènic com en els processos de metilació del DNA. També s'ha trobat que l'arsènic produeix hipermetilació dels promotors de determinats gens, com poden ser els supressors tumorals *p53* o *p16*. No obstant, contràriament a l'efecte sobre la metilació global que en la majoria dels casos és una hipometilació, l'efecte específic sobre els promotors de gens no mostra un patró determinat (Reichard et al., 2007; Franco et al., 2008; Reichard i Puga, 2010).



**Figura 3.** Esquema dels possibles mecanismes d'acció associats a la carcinogènesi de l'arsènic (Adaptat de Koedrith et al., 2013).

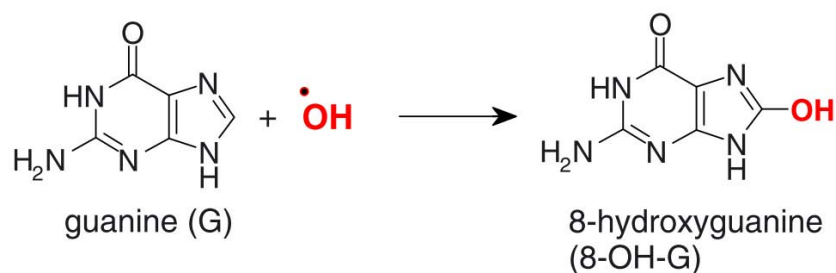
### 1.2.1. Generació de ROS i dany oxidatiu

Com s'ha comentat amb anterioritat, un dels mecanismes principals associats amb la toxicitat de l'arsènic és la generació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS). Aquestes molècules contenen un o més electrons desaparellats en els seus òrbites, el que els confereix una alta reactivitat amb multitud de molècules, incloent els àcids nucleics. Les principals espècies de ROS relacionades amb l'exposició a l'arsènic són l'anió superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ), l'oxigen singlet ( $^1O_2$ ) i els radicals peroxils ( $ROO\cdot$ ).

Els mecanismes exactes de formació dels ROS induïts per una exposició a l'arsènic no estan clars, però s'han proposat diverses possibilitats. S'ha vist que l'arsènic induïx una

disminució ràpida del potencial de membrana mitocondrial alterant així l'activitat dels enzims mitocondrials i promovent canvis morfològics dràstics com la pèrdua de l'organització interna mitocondrial, provocant una alliberació massiva de ROS provinents de la cadena respiratòria. Un altre mecanisme és la generació d' $\text{H}_2\text{O}_2$  durant l'oxidació de l'arsenit ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) a arsenat ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), i durant les successives oxidacions metilants i les posteriors reduccions del metabolisme de l'arsènic. A més a més, l'exposició a l'arsènic promou l'alliberament de ferro de la ferritina, facilitant així la reacció de Fenton, que dona lloc a la formació final del radical  $\cdot\text{OH}$ . També s'ha vist que l'arsènic incrementa el consum d'oxigen en la cèl·lula, augmentant la producció de ROS i l'estrès oxidatiu. Per altra banda, també s'ha demostrat que és capaç d'unir-se i inhibir la funció de diversos enzims antioxidants, com la catalasa o la superòxid dismutasa, promovent l'acumulació de ROS (Flora et al., 2007; De Vizcaya-Ruiz et al., 2009).

La principal lesió causada per les ROS és la transformació de les bases normals en bases modificades, un tipus de lesió que si no es reparada pot donar lloc a mutacions puntuals en el genoma. S'han identificat més de vint productes resultants de les lesions causades pels radicals d'oxigen, entre ells podem destacar la 8-oxoadenina, la 8-oxoguanina, la 4,6-diamino-5-formamidopirimidina, la 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina, la 5-hidroxicitosina, el 5-hidroxiuracil o la timina glicol. Entre totes aquestes lesions, la més important des del punt de vista biològic i per tant la més estudiada, és la 8-oxoguanina, més popularment coneguda com a 8-OH-dG. La introducció de l'àtom d'oxigen en la posició 8 de la guanina, altera les seves propietats electròniques i fa que pugui aparellar-se amb altres bases a més de la citosina. De fet, el perill d'aquesta lesió és la seva capacitat de produir transversions GC:TA, un tipus de mutació puntual altament associada als genotips tumorals (Hirano, 2008).



**Figura 4.** Reacció de la guanina (G) amb el radical hidroxil formant la 8-OH-dG (Extret de Jomova et al., 2011).

S'ha vist que aquesta lesió es pot reparar a través del sistema de reparació per excisió de bases (BER). La 8-oxoguanina DNA glicosilasa (OGG1) és el principal enzim responsable de la reparació d'aquesta lesió que dona, com a compost final, l'adducte 8-OH-dG, excretat en l'orina i fàcilment detectable, cosa que ha fet que sigui un biomarcador de dany oxidatiu en el DNA molt utilitzat (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009).

En la literatura existeixen un gran nombre d'estudis en els quals s'ha analitzat la presència de 8-OH-dG en sang o en orina, per determinar l'associació entre l'arsènic en l'aigua de consum i la inducció d'estrès oxidatiu. No obstant, els resultats són discordants. Alguns estudis mostren un clar augment dels nivells de 8-OH-dG en sang o orina en relació amb el nivells d'arsènic presents en l'aigua contaminada (Wong et al., 2005; Kubota et al., 2006; Chou et al., 2014), mentre que altres estudis constaten que no hi ha una associació significativa (Burgess et al., 2007; Pei et al., 2013). Aquesta variabilitat en els resultats segurament és deguda a les diferents condicions en què s'han realitzats aquests estudis. Tot i que sembla ser que la quantificació de les 8-OH-dG és un bon biomarcador d'estrès oxidatiu, sol ens dona informació rellevant en situacions on els nivells d'arsènic presents en l'ambient són considerablement elevats.

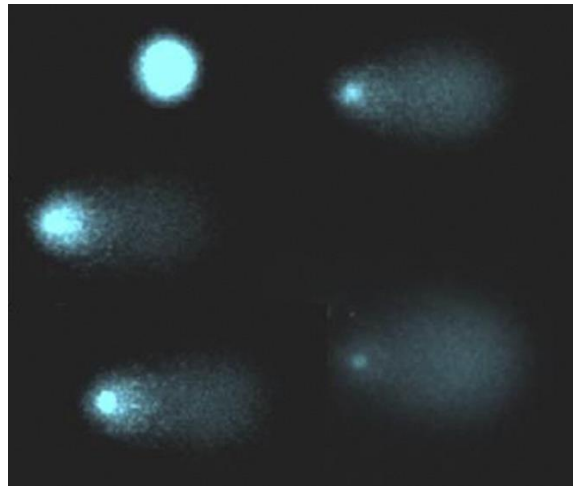
Les alteracions relacionades amb la inducció d'estrès oxidatiu, definit com el desequilibri entre la producció de ROS i les defenses antioxidants, es troben estretament relacionades amb l'aparició de càncer. Els principals efectes de les ROS induïdes per l'arsènic són: dany en el DNA, hipometilació global del DNA, hipermetilació de determinats promotors, i alteracions en els mecanismes de regulació de la proliferació cel·lular, l'apoptosi i la necrosi (Flora, 2011), tot un seguit d'alteracions que poden desencadenar l'inici d'un procés tumoral. De fet, hi ha diversos estudis epidemiològics que relacionen el perfil de les espècies d'arsènic en l'orina, els nivells urinaris de 8-OH-dG i la presència de carcinomes, principalment de ronyons o bufeta. Aquests estudis demostren que la concentració d'arsènic total en l'orina de pacients amb càncer és major que la concentració en pacients sans, i que els nivells de 8-OH-dG es correlacionen amb la concentració d'arsènic total en l'orina (Chung et al., 2008; Huang et al., 2012).

Com hem vist, l'arsènic és un dels pocs agents carcinògens en humans que no indueix tumors en animals de laboratori, excepte a concentracions extremadament altes que no representen les condicions d'exposició humana. Per tant, definir els mecanismes

implicats en la carcinogènesi induïda per l'arsènic ha estat un repte. Diversos grups d'investigació, entre els quals el nostre, han volgut generar models de laboratori que mimetitzin les condicions d'exposició reals, per demostrar la implicació del dany oxidatiu en l'adquisició del fenotip tumoral *in vitro*. Així doncs, autors com Kojima et al. (2009), Tokar et al. (2014), Bach et al. (2016) i Singh et al. (2016), han demostrat com l'acumulació de dany oxidatiu al llarg del temps és capaç d'induir una transformació maligna en diverses línies tumorals.

Degut a la transcendència de les lesions oxidatives en el DNA i a la seva relació amb els efectes associats a l'exposició a l'arsènic, diversos autors han proposat diferents tècniques per a detectar-les. Entre aquestes, la que ens interessa en el transcurs d'aquesta Tesis és l'assaig d'electroforesi en microgel de cèl·lules aïllades, més conegut com l'assaig del cometa. Aquesta és una tècnica ràpida, senzilla i econòmica que ens permet mesurar i analitzar el dany en el DNA de cèl·lules individualitzades. A més, algunes modificacions en el protocol estàndard, com una digestió del DNA amb una endonucleasa específica de lesió, ens permet detectar la presència de bases oxidades (Collins, 2014).

Breument, en el protocol estàndard les cèl·lules són fixades en agarosa i dipositades en forma de gota sobre un suport plàstic flexible amb una cara hidrofílica (*Gelbond*<sup>®</sup>). Després es sotmeten a una lisi alcalina per tal de desnaturalitzar el DNA, degradant també el RNA. En aquest punt, es quan s'introdueix la variació del protocol original i es fa una digestió del DNA amb un enzim específic, en aquest cas la formamidopirimidina DNA glicosilasa (FPG) que reconeix les purines oxidades, sobretot la 8-oxoguanina, i realitza un tall de cadena simple. Finalment es fa una electroforesi de manera que el DNA carregat negativament es desplaçarà cap al pol positiu, si ha perdut el seu superenrollament degut als trencaments en les cadenes del DNA. Després d'una tinció fluorescent, les cèl·lules danyades mostraran l'aspecte d'un cometa, amb el cap brillant i la cua amb una intensitat i longitud determinada depenent del nombre de trencaments que presentin.



**Figura 5.** Imatges obtingudes en l'assaig del cometa  
(Extretes de Collins, 2014).

### **1.2.2. Oxidació de nucleòtids i paper del gen *Mth1***

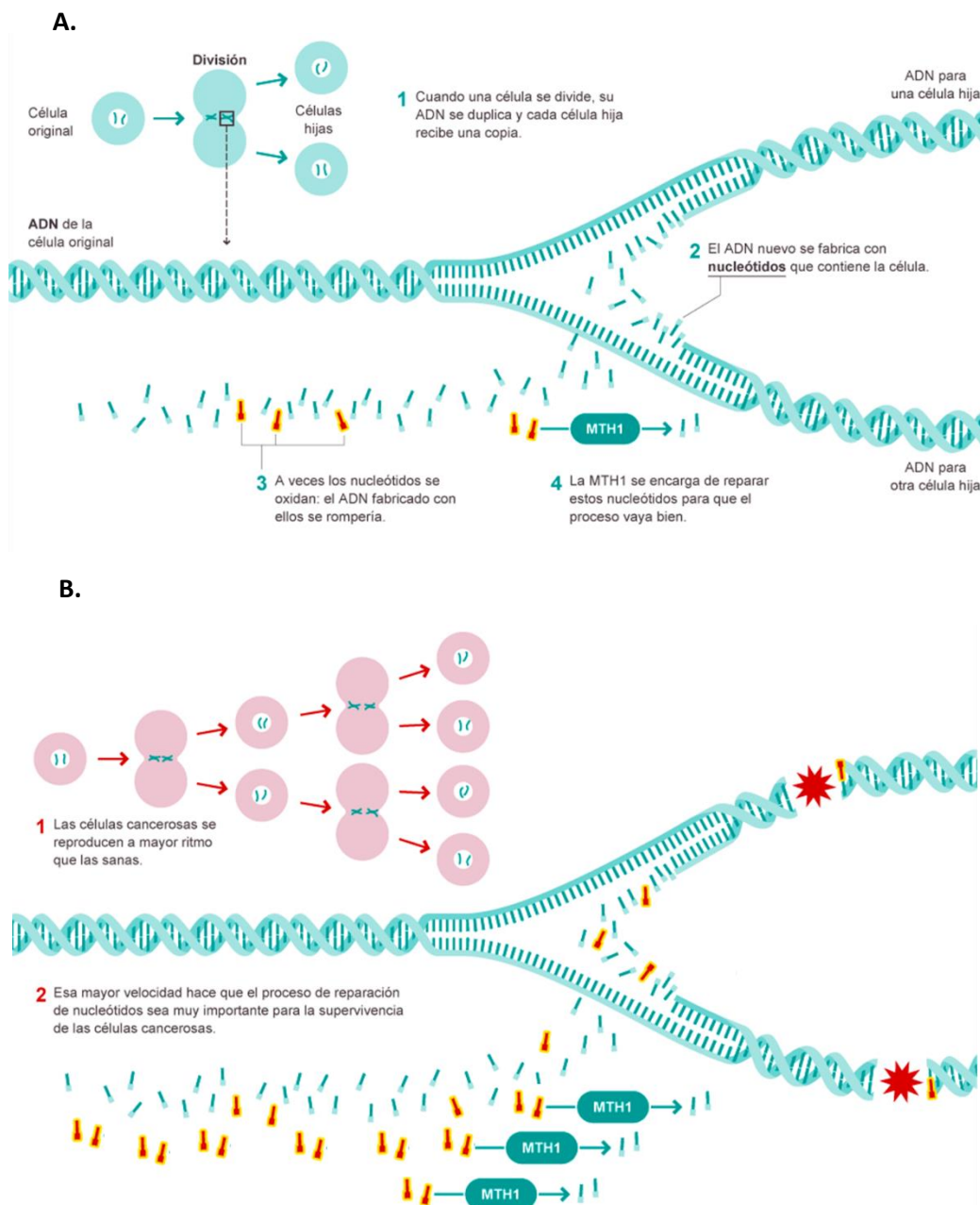
Com acabem de veure, la guanina és la base més susceptible a ser oxidada per les ROS. Concretament, el trifosfat de desoxiguanosina (dGTP), present en el conjunt de nucleòtids no incorporats al DNA, és encara més susceptible a l'oxidació que la guanina present en el DNA. Això ens aporta un nou enfoc del dany oxidatiu, ja que aquest a més d'afectar les molècules de DNA també pot afectar al conjunt de nucleòtids que es troben lliurement en les cèl·lules.

En mamífers, l'enzim MTH1, que es troba principalment en el citoplasma però també en petites fraccions en el nucli i els mitocondris, és l'encarregat de transformar els nucleòtids oxidats en altres derivats, per evitar així la seva incorporació en les molècules de DNA que podrien donar lloc a mutacions puntuals. Així la 8-oxo-dGTP es hidrolitzada a 8-oxo-dGMP i pirofosfat, de manera que la DNA polimerasa ja no pot utilitzar aquesta molècula com a substrat. A més, aquest 8-oxo-dGMP recent format no podrà tornar a ser utilitzat, ja que tampoc podrà ser fosforilat de nou per la guanilat quinasa (Nakabeppu et al., 2016).

Es coneix que els teixits tumorals estan exposats a nivells més elevats de dany oxidatiu, segurament degut a la hipòxia, canvis metabòlics, increment en l'angiogènesi o respostes inflamatòries que experimenten les cèl·lules tumorals. Tot això fa augmentar els nivells de ROS, cosa que provoca una acumulació de 8-OH-dG en els seus genomes.

S'ha vist que l'expressió de *Mth1* en teixits tumorals es troba significativament augmentada i és essencial per a la seva supervivència, mentre que en teixits normals no. De fet, s'està estudiant el paper de diversos inhibidors de MTH1 com a possible teràpia antitumoral (Gad et al., 2014).

És interessant destacar, que tot i la relació d'aquest gen amb el dany oxidatiu, el paper d'aquest tipus de lesió i la implicació de l'enzim MTH1 en l'exposició a l'arsènic no ha estat mai determinat, pel que és un camp d'estudi d'aquesta Tesi.



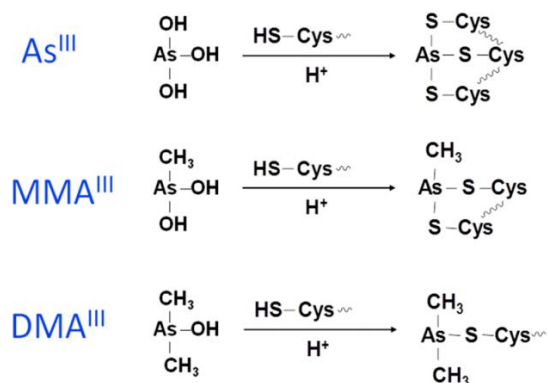
**Figura 6.** Representació del paper de MTH1 en cèl·lules normals (A) i en cèl·lules tumorals (B) (Adaptat de Longás, 2014).

### 1.2.3. Interacció amb proteïnes i conseqüències en la reparació del DNA

Un altre dels principals mecanismes d'acció de l'arsènic és la seva interacció amb proteïnes. Com hem vist, aquesta característica és principalment atribuïble als compostos trivalents, que tenen la capacitat d'unir-se de forma covalent als grups sulfhidrils alterant així la conformació de les proteïnes, i modificant la seva funció, mobilització i interacció amb altres pèptids o el DNA.

Es coneix que l'arsènic pot interaccionar i inactivar més de 200 enzims, entre els quals hi ha la glutatió S-transferasa, la glutatió peroxidasa, la piruvat quinasa, la piruvat deshidrogenasa, la tioredoxina, la PARP-1, i la XPA. A més, també s'han descrit interaccions amb altres proteïnes com l'hemoglobina, la tubulina, l'actina, el receptor d'estrògens  $\alpha$ , i la Keap1 (Kitchin i Wallace, 2008b; Shen et al., 2013a).

Diversos estudis posen de manifest que els dominis dits de zinc d'algunes proteïnes podrien actuar com a dianes moleculars de l'arsènic, ja que aquestes estructures estan formades per diversos residus de cisteïnes, i que per tant contenen grups sulfhidrils disponibles.



**Figura 7.** Interacció de les diferents espècies d'arsènic amb els residus de cisteïna  
(Extret de Shen et al., 2013a).

Per exemple, en diferents estudis s'ha vist que hi ha diferències en la vida mitjana de l'arsènic en sang entre espècies; així, mentre que en humans pot ser eliminat en gairebé una hora, en rates l'arsènic es retingut durant molt més temps. Lu i col·laboradors van proposar un possible mecanisme per aquest fet, postulant que l'arsènic es quedava retingut durant molt més temps en les molècules d'hemoglobina (Hb) de les rates ja que



aquestes presentaven un major nombre de cisteïnes. Mentre que l'Hb de les rates té tres cisteïnes en cada cadena  $\alpha$  i dues cisteïnes en cada cadena  $\beta$ , l'Hb humana sol té una cisteïna en les cadenes  $\alpha$  i dues cisteïnes en cada cadena  $\beta$ . Per tant, van proposar que la principal raó per a que l'arsènic quedés més temps retingut en la sang de les rates era que tenia més afinitat amb l'Hb, en haver-hi un major nombre de grups sulfhidrils disponibles (Lu et al., 2004).

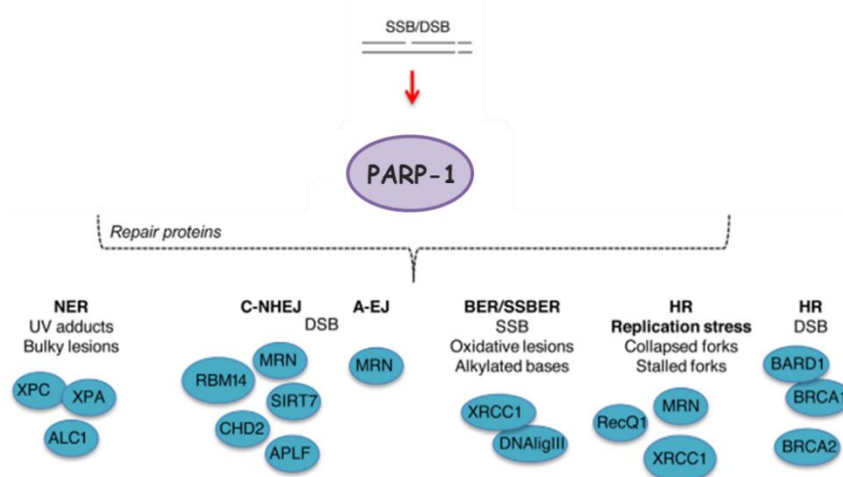
De tots els enzims citats anteriorment, a continuació, ens centrarem en la interacció de l'arsènic amb els enzims involucrats en les rutes de reparació del DNA, que afectarà l'eficiència dels sistemes de reparació cel·lulars donant lloc a lesions greus que poden comprometre la viabilitat cel·lular.

Zhou i col·laboradors han proposat en diversos estudis un possible mecanisme pel qual l'arsènic és capaç d'unir-se selectivament a proteïnes de reparació com la PARP-1 (poli ADP-ribosa polimerasa-1) o la XPA (*xeroderma pigmentosum* grup A). Van descriure que l'arsènic interacciona selectivament amb els dominis dits de zinc que contenen configuracions amb 3 cisteïnes (C3H1), com en el cas de la PARP-1, o bé 4 cisteïnes (C4), com en XPA. D'altra banda, encara que l'arsènic sigui capaç d'unir-se a configuracions amb dues cisteïnes (C2H2), sembla ser que el producte final no és prou estable i, per tant, no tindria un gran impacte biològic en la inhibició d'aquest tipus d'enzims (Zhou et al., 2011). Anant una mica més enllà, en un altre estudi els mateixos autors han proposat que la selectivitat de les espècies trivalents pot variar entre compostos. Mentre que l'arsenit i l'ATO poden formar un enllaç estable amb les configuracions C3H1 i C4, però no amb la C2H2, el MMA<sup>III</sup> gràcies a la presència del grup metil en la seva estructura és capaç d'unir-se a les tres configuracions (C2H2, C3H1 i C4). El fet de que la majoria de les proteïnes amb dits de zinc de l'organisme humà siguin de la varietat C2H2, i que per tant únicament el MMA<sup>III</sup> pugui interaccionar-hi, podria ser una explicació a la major toxicitat detectada en aquest compost (Zhou et al., 2014).

Hem vist com l'arsènic pot interaccionar directament amb la proteïna PARP-1, de manera que n'altera el seu correcte funcionament. No obstant això, no es poden excloure altres mecanismes que també condueixen a nivells reduïts de l'activitat de PARP-1, com poden ser la interferència amb l'expressió del gen, l'alteració de la síntesi de PARP-1 o la degradació de la proteïna. El resultat de totes aquestes interaccions és

molt important ja que com a conseqüència es veurà afectada l'activació de moltes rutes de reparació del DNA.

PARP-1 és una proteïna que funciona com a sensor de dany, quan detecta un trencament de cadena s'uneix al DNA i comença a formar cadenes de poli (A-ribosa) que serveixen com a plataforma d'acoblament per altres factors de reparació. En funció del tipus de lesió detectat s'activarà un o altre mecanisme de reparació com la ruta NER, la ruta BER, la recombinació no homòloga (NHEJ) o la recombinació homòloga (HR) (Martin-Hernandez et al., 2016; Wei i Yu, 2016). Si l'exposició a l'arsènic inhibeix la funció de PARP-1, aquestes vies no podran actuar de manera que es produirà una acumulació de dany que pot ser fatal per a la viabilitat cel·lular (Hartwig et al., 2003; Gurung et al., 2010).



**Figura 8.** Rutes de reparació regulades per PARP-1 en resposta al dany al DNA (Adaptat de Martin-Hernandez et al., 2016).

Independentment o no de la interacció de l'arsènic amb les proteïnes, al llarg dels anys s'han descrit diverses interaccions amb diferents mecanismes de reparació, principalment BER i NER. Ebert et al. (2011) van descriure que els compostos d'arsènic podien afectar la ruta BER de moltes maneres. Van veure que el MMA<sup>III</sup> no afectava l'activitat de l'enzim hOGG1, mentre que amb l'exposició a arsenit i DMA<sup>V</sup> l'activitat de hOGG1 es veia reduïda, fins i tot a concentracions no tòxiques. Aquesta disminució de l'activitat era deguda a una disminució de l'expressió del gen *hOgg1*, ja que no van veure que cap dels dos compostos interaccionés directament amb la proteïna. D'altra banda,

també es va veure que l'arsenit disminuïa l'expressió del gen *XRCC1*, mentre que el MMA<sup>V</sup> reduïa la quantitat d'enzim DNA lligasa III i també de *XRCC1* (Ebert et al., 2011). El fet que el complex DNA lligasa III - *XRCC1* sigui també un component clau de la ruta NER, indica que l'arsènic també és capaç d'alterar el funcionament d'aquesta ruta. De fet varis autors han proposat alteracions, tot i que en certs punts contradictòries. En una revisió feta per Shen et al. (2013b) on es recullen varis estudis, es mostra que per una part una exposició de 3 hores a l'arsènic incrementa l'expressió gènica d'*ERCC1* i de les *DNA lligases I i III*, mentre que els nivells de proteïna de les lligasses es veu disminuït. D'altra banda, individus crònicament exposats a alts nivells d'arsènic mostren una reducció de l'expressió d'*ERCC1*, *XPF* i *XPB*. Altres estudis d'exposició a l'arsenit durant 72 hores també mostren una reducció de l'expressió d'*ERCC1*. L'exposició a MMA<sup>III</sup> sembla que també té un efecte repressor sobre l'expressió d'alguns gens de la ruta NER com *XPC*, *XPE*, en canvi augmenta l'expressió de *p53*.

En resum, tant els resultats de Shen et al., (2013b) com els d'altres estudis sobre la ruta NER (Nollen et al., 2009) conclouen que els resultats són incerts.

Una altra vegada, és molt important tenir en compte certs factors que poden influenciar els resultats obtinguts, com per exemple les concentracions utilitzades en aquests estudis. S'ha vist que l'activitat de les proteïnes DNA polimerasa III o de les DNA lligases I i III purificades no es veu reduïda en menys de 5 mM d'As<sup>III</sup> o 30 mM d'As<sup>V</sup>, respectivament. També s'ha vist que l'activitat de XPA es veu inhibida per 2.5 µM d'arsenit en fibroblasts humans, mentre que quan la proteïna és purificada, no mostra inhibició. En canvi, s'ha comprovat que concentracions molt baixes d'arsenit, del rang nanomolar, poden disminuir significativament l'activitat de la PARP-1 en cèl·lules de mamífer (Hartwig et al., 2003).

Així doncs, és possible que l'arsènic disminueixi l'expressió d'alguns gens de les rutes BER i NER després d'una exposició crònica, però es necessiten més estudis per obtenir un resultat clar i ambientalment rellevant, ja que com s'ha vist, la resposta es pot veure afectada per varis factors com la línia cel·lular utilitzada, els temps d'exposició o les concentracions emprades.

Tot i les incerteses, és clar que l'arsènic és capaç d'alterar el correcte funcionament de moltes proteïnes involucrades en les rutes BER i NER. No obstant, existeix poca

informació sobre proteïnes susceptibles a ser inhibides per l'arsènic que participin en altres vies de reparació.

En aquesta Tesi ens centrarem en els efectes de la interacció de concentracions ambientalment rellevants d'arsènic amb una altra ruta, la ruta FA/BRCA, que està estretament relacionada amb l'aparició d'instabilitat genòmica i fenotips tumorals en la població humana. És important destacar que moltes de les proteïnes que formen part d'aquesta ruta són dianes potencials de l'arsènic, ja que en la seva estructura contenen dominis dits de zinc amb tres o més residus de cisteïnes disponibles (Hofmann, 2009; Hodson et al., 2011).

#### 1.2.3.1. La ruta FA/BRCA

La ruta FA/BRCA, denominada així per la seva relació amb les proteïnes causants del càncer de mama (BRCA1 i BRCA2), és considerada el conjunt format per proteïnes de l'anèmia de Fanconi (FA) i altres proteïnes accessòries que actuen conjuntament en la reparació de dany en el DNA. Sembla ser que la principal funció de la ruta és eliminar els enllaços creuats entre cadenes (ICLs) a través de la coordinació amb altres rutes clàssiques de reparació, com la reparació per excisió de nucleòtids (NER), la síntesi per translesió (TLS) o la recombinació homòloga (HR). Els ICLs es consideren lesions molt tòxiques ja que afecten les dues cadenes del DNA bloquejant així processos essencials com la replicació, la transcripció o la recombinació, que requereixen la translocació de certes proteïnes al llarg del DNA. Si aquestes lesions no es reparen abans de la replicació del DNA es poden produir trencaments en les cadenes, reordenacions cromosòmiques i inclús mort cel·lular (Dong et al., 2015; Lopez-Martinez et al., 2016; Mamrak et al., 2016).

Fins al moment s'ha confirmat que aquesta via està formada per 21 proteïnes FANC. Tot i que aquest número va en augment ja que solament en els últims dos anys s'han descobert 5 proteïnes noves, signe d'avanç i recerca constant en aquest camp. Les proteïnes Fanconi implicades en la ruta es poden dividir en tres fases d'actuació segons el moment en el que intervenen:

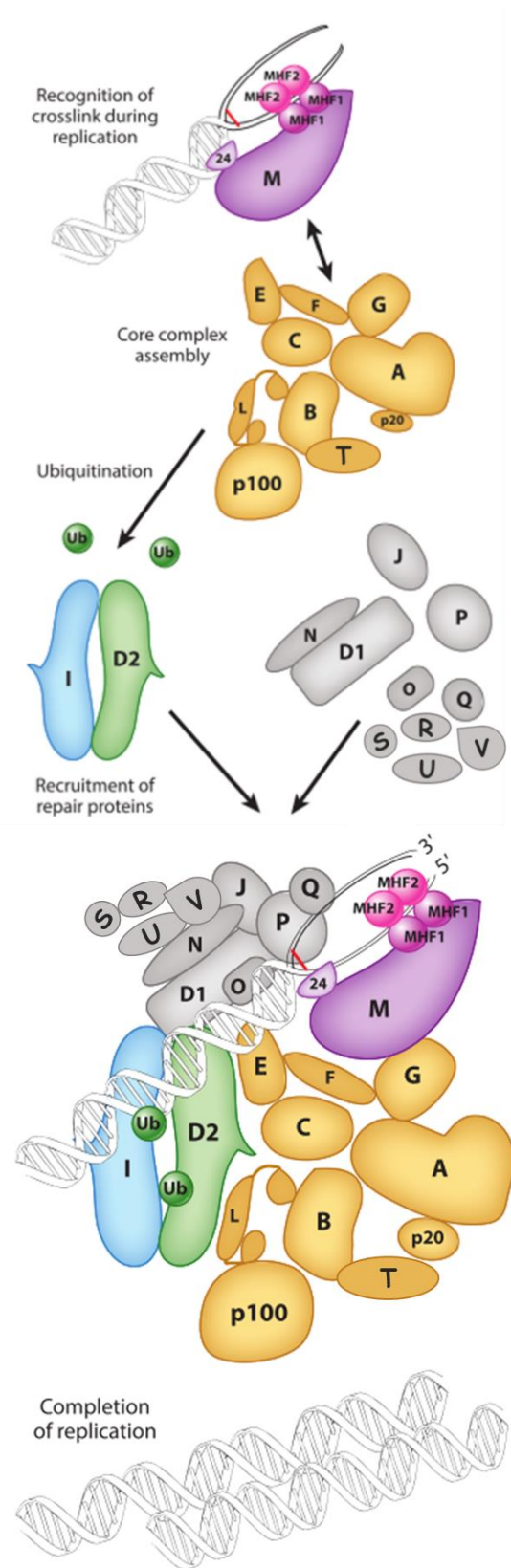
- Proteïnes "Upstream": On intervenen el complex FA (format per les proteïnes FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG i FANCL), altres proteïnes Fanconi

com FANCM i FANCT (UBE2T), i altres proteïnes accessòries. En conjunt, tenen la funció de detectar i senyalitzar el dany en el DNA.

- El complex FANCD2/FANCI (ID2): és el punt central de la ruta. Després de ser monoubiquitinat, aquest complex actua com a transductor de senyal i activa la resta de proteïnes efectores que acabaran reparant la lesió.
- Les proteïnes efectores: FANCD1 (BRCA2), FANCI (BRIP1), FANCN (PALB2), FANCO (RAD51C), FANCP (SLX4), FANCO (ERCC4), FANCR (RAD51), FANCS (BRCA1), FANCU (XRCC2) i FANCV (MAD2L2/REV7) són les encarregades de reparar els danys. És important senyalar que moltes d'aquestes proteïnes tenen el seu principal paper en altres rutes de reparació.

#### 1.2.3.1.1. Activació i funcionament de la ruta FA/BRCA

De manera general, durant la fase S del cicle cel·lular quan es produeix un ICL o un trencament en una regió del DNA, les dues forquilles de replicació que el rodegen es paren a uns 20-40 nucleòtids de distància. En aquest punt s'activa FANCM, que reconeix el dany generat i recluta les proteïnes que formaran el complex FA. Aquestes proteïnes conjuntament amb FANCT(UBE2T) constitueixen un complex enzimàtic d'ubiquitinació E2/E3, on FANCL té l'activitat ubiquitin-lligasa mentre que FANCT actua com a enzim de conjugació d'ubiquitina. Aquest complex catalitza la segona fase de la ruta, el que es considera el pas clau, la monoubiquitinació del complex FANCD2-FANCI (ID2), que es troba en les regions de cromatina i es desplaça al lloc del dany reclutant altres proteïnes de reparació. Les endonucleases SLX4 (FANCP) i ERCC4 (FANCO) produeixen un tall en els dos costats de la lesió, alliberant l'ICL i permetent actuar la síntesis de DNA a través de la lesió (TLS) que efectua la polimerasa Pol $\zeta$ , una subunitat de la qual és FANCV (REV7), reparant una de les cadenes afectades. Durant la fase final de reparació, l'altra cadena pot copiar-se gràcies al procés de recombinació homòloga on hi participen proteïnes FANCD1 (BRCA2), FANCI (BRIP1), FANCN (PALB2), FANCO (RAD51C), FANCR (RAD51), FANCS (BRCA1) i FANCU (XRCC2) (Mamrak et al., 2016).

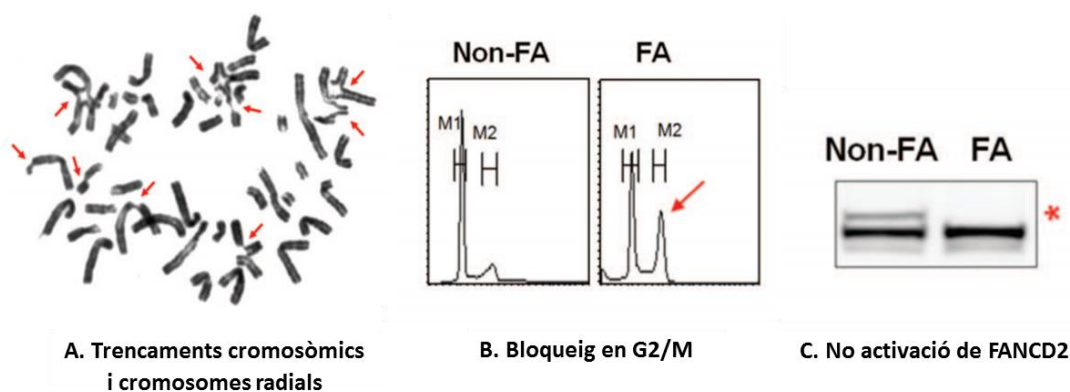


**Figura 9.** Esquema de la ruta FA/BRCA. En marró les proteïnes *upstream*, en blau i verd el complex ID2 i en gris les proteïnes efectores (Adaptat de Walden i Deans, 2014).

### 1.2.3.1.2. Detecció de l'alteració de la ruta FA/BRCA

Tots els coneixements i els estudis sobre la ruta FA/BRCA han augmentat des de que es va aprendre a cultivar cèl·lules de pacients afectats per la malaltia. Una cèl·lula Fanconi és aquella deficient en algun dels gens FA i que per tant és incapaç de reparar els ICLs del DNA. Una de les característiques de les cèl·lules FA es que presenten fragilitat cromosòmica en presència d'agents inductors d'ICLs com el diepoxibutà (DEB) o la mitomicina C (MMC).

Com es veu en la figura 10A, aquestes cèl·lules mostren un augment significatiu del nombre d'aberracions cromosòmiques, entre elles trencaments cromosòmics o intercanvis cromosòmics, mostrant així una important disminució de la seva viabilitat. Una altra característica d'aquestes cèl·lules és el bloqueig del cicle cel·lular, on la fase G2 de les cèl·lules FA tractades amb inductors d'ICLs s'allarga més de lo normal com a resultat de l'acumulació de danys i de la incapacitat per reparar-los, de manera que s'activa el punt de control G2/M, tal i com s'observa en la figura 10B. Finalment, una altre tret característic es troba en l'anàlisi de l'activació de la ruta Fanconi. L'activació de la proteïna FANCD2 per monoubiquitinització es produeix en les cèl·lules d'un individu sa després de ser tractades amb agents inductors d'ICLs. Aquesta activació pot ser analitzada fàcilment mitjançant tècniques de *Western Blot* (WB), tal i com es veu en la figura 10C, o d'immunofluorescència (IF). En el cas de cèl·lules deficientes en la ruta FA/BRCA aquesta activació no es podrà observar (Soulier, 2011).



**Figura 10.** Característiques de les cèl·lules Fanconi (Adaptat de Soulier, 2011).

Com a resum general d'aquesta Introducció, podem dir que l'arsènic es considera un greu problema de salut mundial ja que són moltes les persones exposades i molts variats els efectes nocius que comporta sobre la salut humana. Al llarg dels anys s'ha pogut relacionar l'exposició a l'arsènic amb moltes malalties, entre elles algunes de tan importants com el càncer de pell, de pulmó, de fetge, de bufeta i de ronyó. No obstant, encara existeixen molts dubtes sobre els efectes genotòxics/carcinògens que és capaç d'ocasionar, així com dels mecanismes a través dels quals pot actuar.

Per una part, s'ha vist que el paper de l'estrès oxidatiu derivat de l'exposició a l'arsènic pot ser un dels principals mecanismes que participen en l'adquisició del fenotip tumoral. No obstant, encara es necessiten més estudis per tal de determinar el seu paper en exposicions ambientalment rellevants, ja que la majoria de dades provenen d'exposicions a elevades concentracions d'arsènic.

D'altra banda, s'ha vist que l'arsènic és capaç d'interferir en el correcte funcionament de varies rutes de reparació del DNA, com BER i NER, però no s'ha estudiat mai el seu possible efecte sobre altres mecanismes de reparació i utilitzant concentracions rellevants per a l'exposició humana. Tenint en compte que aquests són indispensables per mantenir l'estabilitat genòmica i garantir la supervivència de les cèl·lules, el seu estudi s'hauria de garantir.





## **2. OBJECTIUS**



## 2. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta Tesi és aprofundir en el coneixement dels mecanismes involucrats en la carcinogènesi de l'arsènic, sempre tenint en compte condicions d'exposició ambientalment rellevants.

Els objectius específics plantejats són els següents:

**1r. Objectiu:** Determinar el comportament del dany oxidatiu i genotòxic durant el procés de transformació carcinogènica induïda per l'arsènic *in vitro*. Determinar el paper dels enzims AS3MT i MTH1 en la generació de dany oxidatiu durant aquest procés (1r estudi).

**2n. Objectiu:** Avaluat si l'exposició a baixes concentracions d'arsènic és capaç de modificar la funció de la ruta FA/BRCA, alterant la capacitat de les cèl·lules exposades de reparar correctament certes lesions, generant així inestabilitat genòmica (2n estudi).

De l'estudi d'aquest segon objectiu, ha sorgit un nou propòsit en el qual es vol mirar d'aplicar els conceptes descrits. Així doncs:

**3r. Objectiu:** Avaluat si l'ús del triòxid d'arsènic, en combinació amb agents antitumorals inductors d'enllaços creuats entre cadenes, és beneficiós en el tractament de certs tipus de càncers degut al seu efecte sobre la ruta FA/BRCA (3r estudi).



### **3. RESULTATS**



### 3. RESULTATS

Part dels resultats generats durant el desenvolupament d'aquesta Tesi han estat ja publicats (2n estudi) mentre que la resta dels resultats estan en format de manuscrits pendents de publicació (1r i 3r estudis). Per aquest motiu, l'estructura d'aquesta secció està dividida en tres estudis, i dins de cada un d'ells es troba el resum i l'article o manuscrit corresponent. Degut a aquesta estructura, la secció de *Materials i Mètodes*, està continguda en cada un dels articles o manuscrits d'aquesta secció.

Els tres articles o manuscrits, d'acord amb els objectius de la Tesi, són els següents:

- 1r. Estudi:** *“Oxidative and genotoxic damage drop after arsenic-induced oncogenic transformation. Involvement of As3mt and Mth1.”*
- 2n. Estudi:** *“Arsenic exposure disrupts the normal function of the FA/BRCA repair pathway.”*
- 3r. Estudi:** *“Arsenic trioxide enhances the antitumor activity of cisplatin in bladder tumor cell line models via inhibition of FA/BRCA repair pathway.”*





1r Estudi

***Oxidative and genotoxic damage drop after arsenic-induced oncogenic transformation. Involvement of As3mt and Mth1.***

Manuscrit pendent de publicació



### 3.1. RESUM DEL PRIMER ESTUDI

#### **Oxidative and genotoxic damage drop after arsenic-induced oncogenic transformation. Involvement of *As3mt* and *Mth1*.**

Aquest primer estudi va sorgir com a continuació d'un projecte anteriorment desenvolupat al nostre Grup, on es va demostrar que l'exposició crònica a concentracions ambientalment rellevants d'arsènic genera quantitats suficientment importants d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) com per induir l'adquisició del fenotip tumoral *in vitro*. En aquest estudi, fibroblasts embrionaris de ratolí (MEF *Ogg1*<sup>+/+</sup>), i la seva corresponent línia isogènica deficient pel gen *Ogg1* (MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup>), van ser tractats durant 50 setmanes a diferents concentracions subtòxiques d'arsenit (As<sup>III</sup>): 0, 0,5, 1 i 2 µM. Al cap d'unes 30 setmanes es va veure com únicament les cèl·lules deficientes en la reparació del dany oxidatiu variaven alguns trets del seu fenotip, mostrant característiques típiques de les cèl·lules tumorals, demostrant així que el dany oxidatiu juga un paper important en la carcinogènesi de l'arsènic.

En aquest context, l'objectiu del primer article d'aquesta Tesi ha estat mesurar el dany oxidatiu i genotòxic al llarg del procés de carcinogènesi per caracteritzar el seu comportament, així com avaluar l'estat global de metilació del DNA de les cèl·lules exposades, i determinar el paper dels enzims AS3MT i MTH1 en aquests paràmetres.

Els nostres resultats en la línia MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup> mostren que tant els nivells de dany oxidatiu, mesurats mitjançant la tècnica del cometa, com els de dany genotòxic fixat, mesurats mitjançant l'assaig de micronuclis, van augmentant significativament fins al punt d'inici de la transformació, al voltant de la setmana 30 i, sorprenentment, després disminueixen fins a nivells propers als basals. Per mirar de definir un possible mecanisme associat a aquest fet, vam proposar la intervenció del gen *MTH1*, que es l' encarregat de sanejar el conjunt de nucleòtids lliures en les cèl·lules. L'anàlisi de l'expressió d'aquest gen confirma la nostra hipòtesi, ja que fins la setmana 30 els nivells de *MTH1* són similars als nivells basals observats en les cèl·lules sense exposar a l'arsènic, mentre que després del punt de transformació, a les setmanes 40-50, es produeix un augment significatiu de l'expressió, de manera que aquest enzim estaria eliminant bases lliures oxidades, contribuint així en la disminució dels nivells de dany oxidatiu en les cèl·lules.

D'altra banda, també es va voler estudiar per primer cop l'evolució de l'expressió de l'enzim AS3MT, clau en el metabolisme de l'arsènic, durant el procés de transformació cel·lular *in vitro*. En els nostres resultats, s'ha vist que durant les etapes inicials de l'exposició a l'arsènic les cèl·lules incrementen l'expressió d'aquest enzim, possiblement per afavorir l'eliminació de l'arsènic, però a l'hora contribuint en l'augment del dany oxidatiu a través de la generació de ROS. Després del punt de transformació cel·lular, en disminuir el nivells de dany cel·lular, els nivells d'AS3MT també es redueixen fins a nivells basals.

Finalment, s'han estudiat també les conseqüències epigenètiques d'aquest procés, observant una hipometilació global del DNA durant les setmanes prèvies a la transformació, segurament deguda a l'increment del consum de grups metils durant la metilació de l'arsènic. Posteriorment al punt de transformació, les cèl·lules no recuperen els nivells normals de metilació del DNA, mostrant una hipometilació global del DNA, que és també un tret característic de les cèl·lules tumorals.

Amb tot això, en aquest treball hem demostrat l'acumulació del dany oxidatiu i genotòxic en el DNA durant l'adquisició del fenotip tumoral induït per l'arsènic, així com la participació de l'enzim AS3MT durant aquest procés carcinogènic. Els nostres resultats mostren per primer cop l'adquisició d'un fenotip resistent a dany en el DNA a través de la inducció de l'expressió de *MTH1*, un fet que ens fa proposar aquest gen com a un biomarcador útil en els processos de carcinogènesis associats a l'arsènic.

## Oxidative and genotoxic damage drop after arsenic-induced oncogenic transformation. Involvement of *As3mt* and *Mth1*

Jana Peremartí<sup>1,\*</sup>, Jordi Bach<sup>1,\*</sup>, Ricard Marcos<sup>1,2,§</sup>, Alba Hernández<sup>1,2,§</sup>

\*Both authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>*Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain;* <sup>2</sup>*CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Spain.*

§Corresponding authors at: Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona), Spain.

E-mail: alba.hernandez@uab.es (A. Hernández)

ricard.marcos@uab.es (R. Marcos)

**Running title:** *Mth1*, *As3mt* and genotoxic damage in arsenic-transformed cells.

**Acknowledgments:** We wish to thank Mr. C. Valiente for his technical assistance. This work was supported by the *Generalitat de Catalunya* [2009SGR-725], *Universitat Autònoma de Barcelona* [PIF-UAB to J.P. and J.B.] and the Spanish Ministry of Education and Science [SAF2008-02933 and SAF2011-23146].

**ABSTRACT**

Oxidative DNA damage (ODD) plays a crucial role in the carcinogenesis of the human carcinogen arsenic. The key arsenic biotransformation enzyme AS3MT is known to participate in the generation of ROS after a given arsenic exposure, whereas MTH1 sanitizes oxidized dNTP pools to prevent incorporation of damaged bases into DNA. In this work we sought to assess the role of AS3MT and MTH1 in the DNA damage generated throughout the arsenic-related transformation process. Thus, MEF cells previously transformed by 30 weeks of chronic arsenite exposure were monitored for ODD and DNA damage by the comet assay and the micronucleus assay, respectively, at different time-of-exposure intervals. Expression changes of *As3mt* and *Mth1* were evaluated by real time RT-PCR. Epigenetic consequences were also analyzed. Results indicate that the oxidative and genotoxic damage of chronically exposed MEF cells increased time-dependently up to the point of transformation but dropped drastically afterwards. *Mth1* was responsible for the DNA damage decrease, as mRNA levels increased from basal to 13-33 -fold at the relapse time-point. Conversely, *As3mt* expression followed a pattern similar to that of DNA damage. Global DNA hypomethylation was observed during the complete duration of the exposure. In conclusion, *As3mt* and *Mth1* have differential roles in the accumulation of DNA damage linked to the transformation process. While *As3mt* acts as a sensor of damage contributing to the genotoxic effects before transformation, *Mth1* prevents the DNA damage fixation after the acquisition of the transformed phenotype. *Mth1* is proposed here as a new biomarker of arsenic-induced transformation.

**Key words:** arsenic *in vitro* chronic exposure, cell transformation, *Mth1*, *As3mt*, ODD, genotoxic damage, DNA methylation.

## INTRODUCTION

Arsenic is a widespread and well-known human carcinogen. Chronic arsenic exposure is associated with skin, lung, bladder, liver, kidney, and prostate cancers (IARC, 2012). Even though chronic exposure to arsenic is known to be involved in carcinogenesis, the mechanism explaining the exact relationship of chronic arsenic exposure and tumor development is unclear. The oxidative DNA damage (ODD) induced by the reactive oxygen species that are generated as by-products of inorganic arsenic biotransformation has traditionally been considered a plausible mechanism of arsenic carcinogenesis (Flora, 2011; Kojima et al., 2009), since ODD lesions such as 7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) are strongly linked to the potentially carcinogenic genotoxic DNA damage found in arsenic-exposed populations (Hei and Filipic, 2004; Liu et al., 2001a). In this sense, we have recently shown a clear evidence of the involvement of ODD in arsenic-related oncogenic transformation (Bach et al., 2016).

In humans and most mammals, inorganic arsenic biotransformation involves alternating reduction and oxidation steps coupled to methylation events. The key enzyme for these multistep conversions is arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT), which generate the methylated arsenic metabolites MMA<sup>V</sup>, MMA<sup>III</sup>, DMA<sup>V</sup> and DMA<sup>III</sup> using S-adenosylmethionine (SAM) as the methyl donor (Thomas et al., 2007; Waters et al., 2004). Presumably, the consumption of –methyl groups by AS3MT reduces the availability of these molecules necessary for the maintenance of the cellular DNA methylation state. Hence, the potential epigenetic consequences of arsenic biotransformation have been explored before by several authors (Bustaffa et al., 2014). Accumulating evidence indicates that the methylation of arsenic is not a detoxifying event; trivalent methylated arsenic metabolites -specially MMA<sup>III</sup>- are more genotoxic and appear to stimulate the production of reactive oxygen species (ROS) more efficiently than inorganic arsenic compounds (Mass et al., 2001; Styblo et al., 2000; Tokar et al., 2014).

This ROS produced as a consequence of arsenic exposure can not only damage DNA directly but can oxidize free bases in the nucleotide pool that can be misincorporated into DNA. In fact, 7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG), a major oxidized base lesion formed by ROS that causes G to T transversion mutations can originate as 8-OH-



dGTP, formed in the nucleotide pool, or by direct oxidation of the DNA guanine base (Kasai and Nishimura, 1984). The MutT homolog 1 (MTH1), the major mammalian 8-oxoGTPase, is an 18kDa nudix pyrophosphorylase that effectively degrades oxidized nucleotides in order to avoid its incorporation into newly synthesized DNA, which otherwise can result in mispairing, mutations and cell death (Nakabeppu, 2014). Thus, MTH1 sanitizes 8-oxodGTP from the nucleotide pool preventing its genomic incorporation by DNA polymerases. MTH1 protein is required for efficient survival of cancer cells where it is commonly overexpressed, whereas it is non-essential in normal cells (Gad et al., 2014).

Due to the attributed role of DNA damage in arsenic-related carcinogenesis, this work aims to monitor ODD and genotoxic DNA damage before, during and after the acquisition of the transformed phenotype *in vitro*, using MEF cells previously transformed by around 30 weeks of chronic arsenic exposure (Bach et al., 2016). The role of *As3mt* and *Mth1* as cause of the observed DNA damage behavior are also evaluated here, along with the global DNA methylation status of the exposed cells. To our knowledge, this is the first study exploring fixed chromosome DNA damage behavior in arsenic carcinogenesis, and the first to show the involvement of *As3mt* and *Mth1*. Interestingly, our findings set *Mth1* as a useful biomarker of arsenic carcinogenesis.

## METHODS

### *Culture conditions and in vitro arsenic exposure*

Mouse embryonic fibroblasts (MEF) phenotypically sensitive to ODD were previously transformed by 0.5, 1 and 2  $\mu\text{M}$  of arsenic exposure in the form of sodium arsenite for 30 weeks (Bach et al., 2016). In the present work, these cells were cultured after 0, 10, 20, 30, 40 and 50 weeks of exposure to analyze different end-points during the transformation process. MEF exposed cells and passaged-matched controls were grown in DMEM:F12 medium (Life Technologies, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; PAA®, Pasching, Austria) and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  plasmocin (InvivoGen, CA, USA) in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  and 95% air at 37 °C.

### *Total RNA extraction and real-time RT-PCR*

Total RNA from MEF cells at weeks 0, 10, 20, 30, 40 and 50 of exposure was extracted using TRIzol® Reagent (Invitrogen, CA, USA) following the manufacturer's instructions. RNase-free DNase I (DNAfree™ kit; Ambion, UK) was used to remove DNA contamination. The first-strand cDNA synthesis was performed using 1 µg of total RNA and the transcriptor first-strand cDNA synthesis kit (Roche, Basel, Switzerland). The resulting cDNAs were subjected to real-time PCR analysis on a LightCycler 480 to evaluate the relative expression of the arsenite methylating enzyme *As3mt*, the mutT homolog *Mth1* and the N-glycosylase *Neil1*. The expression of *Actb* was used as the housekeeping control. Each 20 µL of reaction volume contained 5 µL of cDNA, 10 µL of 2× LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim, Germany), 3 µL of H<sub>2</sub>O and 1 µL of each primer pairs at a final concentration of 500 nM. The cycling parameters began with 95 °C for 5 min, then 45 cycles of 95 °C for 10 s, 61 °C for 15 s and 72 °C for 25 s. The primers used were: *As3mt* F (5'-GCATCGAGAAGTTGGCAGAG-3'), *As3mt* R (5'-ATCCTTCCAGTACAGAGCGC-3'), *Mth1* F (5'-GCAGGAAGGAGAGACCATTG-3'), *Mth1* R (5'-AACCAGTAGCTGTCATCCGG-3'), *Neil1* F (5'-GATGTCAGGATCCTTCCAGC-3'), *Neil1* R (5'-GTCCAACAAGGCCTCACAGA-3'), *Actb* F (5'-GGAGAAGATCTGGCACCACA-3') and *Actb* R (5'-GCTCGGTCAGGATCTTCATG-3'). Cycle time (Ct) values were calculated with the LightCycler software package and then normalized with *Actb* data.

### *Micronucleus assay*

The micronucleus assay (MN) was performed as a measure of chromosome damage in chronically arsenic exposed MEF cells and passage-matched controls throughout the exposure (weeks 10, 20, 30, 40 and 50). Cells were seeded at a 1x10<sup>6</sup> density in 60.8 cm<sup>2</sup> culture dishes, allowed to sit overnight and placed in fresh medium containing 4 µg/mL of cytochalasin B (Cyt-B, Sigma, St Louis, MO, USA) in order to arrest cytokinesis. After 24 hr, cells were harvested by trypsinization, washed and subjected to hypotonic conditions with 0.075 M KCl. Finally, cells were centrifuged and fixed three times in a methanol/acetic (3:1 v/v) solution. Two or more slides were dropped, coded and stained with 10% of Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) in phosphate buffer (pH 6.8) for 5 min. Coded slides were manually scored blindly by an expert scorer under an Olympus

BX50 microscope to determine the frequency of binucleated cells carrying MN (BNMN) in a total of 1000 binucleated cells with well- preserved cytoplasm (500 per replicate).

#### *Comet Assay*

The ODD for MEF cells at weeks 0, 10, 20, 30, 40 and 50 of exposure were evaluated by the alkaline comet assay with the use of formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) as previously described by us (Bach et al. 2014). Sheets films of the type Gelbond® (GF) to process a large number of samples (McNamee et al. 2000) were used. Briefly, cells were collected by trypsinization, centrifuged and resuspended in cold PBS at 17,500 cells/25 µL. Then cells were mixed with 0.75% LMP at 37 °C (1:10) and 7 µL of the mixture were dropped onto GF. Two identical films with the same type of samples were processed simultaneously in each experiment. Then, GF were lysed overnight by immersion in ice-cold lysis buffer at 4 °C (2.5 M NaCl, 0.1M Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1M Tris Base, 1% Triton X-100, 1% lauroyl sarcosinate, 10% DMSO), at pH 10. The GF replicates were gently washed twice (1x 5 min, 1x 50 min) in enzyme buffer at pH 8 (10 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/mL BSA) at 4 °C and then incubated for 30 min at 37 °C in only enzyme buffer (negative control) or in enzyme buffer containing FPG. The GF were then washed with electrophoresis buffer and placed into a horizontal gel electrophoresis tank where DNA was allowed to unwind for 35 min in 0.3 M NaOH and 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 13.2 before the electrophoresis, which was carried out for 20 min at 0.8 V/cm and 300 mA at 4 °C. After electrophoresis, the GF were rinsed with cold PBS for 15 min and fixed in absolute ethanol for 2 hr before air-drying overnight at room temperature. GF were stained for 20 min with SYBR Gold 1/10.000 in TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.5). Finally, gels were mounted and visualized for comets using an epifluorescent microscope at 20x magnification, and analyzed with the Komet 5.5 Image analysis system (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK). Cells were analyzed according to their percentage of DNA in tail, as an adequate measure of DNA damage. One hundred randomly selected comet images were analyzed per sample.

#### *DNA isolation and global DNA methylation quantification*

Genomic DNA was isolated from chronically arsenic exposed MEF cells and passage-matched controls throughout the exposure (weeks 0, 10, 20, 30, 40 and 50) using

DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Limburg, Netherlands) according to the manufacturer's protocol. Global DNA methylation was quantified using EpiSeeker methylated DNA Colorimetric Quantification Kit (ab117128; Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's directions. Absolute methyl-cytosine content was then calculated using the supplied formula.

### *Statistics*

Unpaired Student's *t* test or analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test was performed, as appropriate, to compare arsenic-treated cells with untreated time-matched controls at respective time points. Only in the case of *Mth1* expression analysis comparisons were performed to compare cells from week 30 with their corresponding treatments at week 40. In this case, the fold-change obtained for controls was subtracted to the fold-change obtained for the different treatments. In all cases, a two-sided  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### *Oxidative and genotoxic DNA damage drop dramatically after arsenic-induced oncogenic transformation.*

In our previous work MEF cells phenotypically sensitive to ODD were chronically exposed to 0.5, 1 and 2  $\mu\text{M}$  arsenite. These environmentally relevant concentrations induced oncogenic transformation in MEF cells after 30 weeks of exposure, as defined by the acquisition of a transformed phenotype *in vitro*, characterized by morphological changes, increased proliferation, deregulation of differentiation status, anchorage independent cell growth, and a secretome with increased levels of MMPs able to enhance tumor effects of epithelial cells such as growth and invasiveness, all at levels known to induce malignant xenograft tumors in mice (Bach et al., 2016). Of note here is the fact that MEF cells exposed to the highest concentration used -2 $\mu\text{M}$ -showed most signs of transformation around 10 weeks earlier than the lower exposed cells.

Levels of ODD were measured here in MEFs by the comet assay at exposure-time intervals covering the whole transformation process –before, during and after

transformation- (Figure 1A). Data revealed that arsenic exposure induce a significant increase in ODD in a time-dependent manner up to the point of transformation (weeks 10, 20 and 30). Thus, increase in % of DNA tail of exposed cells at week 10 when compared to passage-matched controls was 3.05, 3.36 and 2.77-fold for 0.5, 1 and 2  $\mu\text{M}$ , respectively. At week 30 % of DNA was 5.30 for 0.5  $\mu\text{M}$ , 10.81 for 1  $\mu\text{M}$  and 8.20 for 2  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$  in all cases). Interestingly, the ODD dropped rapidly after the acquisition of the transformed phenotype (weeks 40 and 50). At week 40, the % DNA in tail decreased to 1.40, 1.13 and 1.89-fold at 0.5, 1 and 2  $\mu\text{M}$ , respectively, and those close-to-basal ODD levels were maintained at week 50, none of them being statistically different from their respective passage-matched controls.

A similar pattern of damage was found when the level of MN was analyzed through the exposure as a measure of chromosome damage (Figure 1B). As shown, MN increased significantly in a time-dependent manner for all doses up to the approximate point of transformation, and then MN frequency in binucleated cells (BNMN) precipitously declined to baseline levels. As example, BNMN of 0.5  $\mu\text{M}$  arsenic-exposed MEF were 1.28-fold at week 10 -before transformation-, 2.90-fold at week 30 -point of transformation-, and 1.90-fold at week 50 -after transformation-. BNMN of 1  $\mu\text{M}$  arsenic-exposed MEFs were 1.55 and 1.23-fold before and after transformation, respectively, but peaked 2.26-fold at week 20, earlier to what happened with ODD. The same occurred for the, BNMN of 2  $\mu\text{M}$  arsenic-exposed MEFs, which peaked 1.80-fold at week 20. We could also notice some degree of damage that still persist in cells exposed to 0.5 and 1  $\mu\text{M}$  at week 40, whereas ODD was already negligible at that time point. Some differences are therefore evident between the behaviors of both types of damage during the transformation process, but a global analysis clearly indicates that cells chronically exposed to subtoxic doses of arsenic gradually accumulate ODD and chromosome damage up to the approximate point of transformation, point where the exposed cells acquired a resistant phenotype evidenced by a rapid decrease in DNA damage that reach control levels 10-20 weeks after the acquisition of the oncogenic phenotype.

*Arsenic-transformed cells up-regulate Mth1 to avoid DNA damage and cell death*

The involvement of the mutT homolog *Mth1* in the decline of ODD and DNA damage after transformation was studied by analyzing its expression through the transformation process. As *Mth1* is non-essential in normal cells, but cancer cells require *Mth1* activity to avoid incorporation of oxidized dNTPs resulting in DNA damage and cell death, a clear induction of gene expression was expected at those time-points where DNA damage relapsed. This occurs at weeks 40 and 50, after the acquisition of the *in vitro* transformed phenotype. *Mth1* transcript levels were found to be maintained close to control levels – or below- before transformation and at the point of transformation (weeks 10 and 30, see Figure 2A). Notably, an upregulation of transcription was found after transformation. Hence, *Mth1* mRNA levels were 2.67, 2.99 and 6.78-fold of control for 0.5, 1 and 2  $\mu\text{M}$  arsenic, respectively, at week 40 of exposure ( $P < 0.05$  in all cases), and similar levels were maintained at week 50 (see Figure 2A). When the induction of expression was analyzed comparing the point of maximal DNA damage -week 30- with that of DNA damage decline –week 40-, a clear and important induction of 33.7, 13.6 and 21.7-fold was observed ( $P < 0.05$  in all cases, see Figure 2B).

*Arsenic-3-methyltransferase expression follows a pattern similar to that of arsenic-induced DNA damage*

Under a chronic scenario of exposure MEF cells increase *As3mt* expression time-dependently up to the point of transformation, in parallel to what occurs with DNA damage. Thus, 0.5  $\mu\text{M}$  MEF cells at the time of transformation reached 27.5-fold expression when compared to controls, and 1 and 2  $\mu\text{M}$  reached increases of 19.2 and 6.5, respectively (Figure 3A). After, similarly to what happened with DNA damage, *As3mt* expression dropped. It is then observed that cells chronically exposed to the same arsenic concentration -arsenic doses are equal before and after transformation- show a differential *As3mt* expression through time, suggesting that its regulation is not dependent on the given arsenic dose but on the level of induced DNA damage. Accordingly, once the genotoxic damage drops after transformation, *As3mt* levels diminished close to the levels of the first weeks of exposure (see Figure 3A).

A similar pattern of expression with a peak around the transformation point was found for the N-glycosylase repair enzyme *Neil-1* (Figure 3B). In our ODD-sensitive MEF cells, this enzyme would recognize and remove the 8-OH-dG oxidized bases from DNA, and it is reasonable that cells under oxidative stress increase its gene expression in order to maximize the DNA damage repair. Interestingly, *Neil-1* mRNA dropped at week 40-50, evidencing that there is no damage to be removed at this time-points. Therefore, downregulation of *Neil-1* –and presumably other repair enzymes- showed as a consequence of the drop in DNA damage, and not a plausible cause, as in that case its expression would be maximal at those time-points with lower levels of damage. Results then support the notion that both *As3mt* and *Neil-1* act as ‘sensors’ of DNA damage that upregulate their expression in an attempt to avoid arsenic detrimental consequences. Once arsenic-induced genotoxicity decreases –by *Mth1* and possibly other not studied mechanisms- the expression of these ‘sensors’ return back to normal levels. Since accumulating evidence indicated that arsenic methylation stimulate reactive oxygen species (ROS) production, the attempt to avoid toxic consequences by increasing arsenic biotransformation would at the same time contribute to the generation of ODD.

*Global DNA methylation is decreased during chronic arsenic exposure.*

The analysis of the global DNA methylation status of MEF cells through the arsenic-related transformation process revealed a steady hypomethylation state (Figure 4). The consumption of –methyl groups for *As3mt*-dependent accelerated arsenic metabolism that takes place up to week 30 would prevent the incorporation of such –methyl groups into DNA. This DNA hypomethylation appeared irreversible as similar low levels were observed after the acquisition of the transformed phenotype.

## **DISCUSSION**

Understanding the mechanism(s) of arsenic carcinogenesis is of great relevance to protect human exposed populations. In this sense, arsenic-induced DNA damage – understood as the addition of genotoxic and oxidative DNA damage- has been proposed as major player in the carcinogenicity of arsenic compounds as it is considered to be essential for the initiation of malignancies (Kitchin and Conolly, 2010; Rossman, 2003).

Accordingly, humans exposed to inorganic arsenic via drinking water have been found to have high levels of DNA damage and increased frequencies of sister-chromatid exchanges (SCE), micronuclei (MN), chromosomal aberrations (CA) or 8-OH-dG lesions (Basu et al., 2005; Matsui et al., 1999; Sampayo-Reyes et al., 2010; Yamauchi et al., 2004). As for *in vitro* studies, compiling evidences show that arsenic increase the frequency of MN, CA, SCE and oxidant effects (Bustaffa et al., 2014; Hei and Filipic, 2004).

Chronic exposure to arsenic has been involved with the *in vitro* oncogenic or malignant transformation of human bronchial epithelial cells (Xu et al., 2013), human HaCaT keratinocytes (Li et al., 2010; Pi et al., 2008), human lung epithelial BEAS-2B cells (Stueckle et al., 2012), human small airway epithelial cells (Wen et al., 2008), rat liver epithelial TRL1215 cells (Liu et al., 2006), human prostate epithelial RWPE-1 cells (Treas et al., 2013), breast epithelia (Xu et al., 2014) and mouse embryonic fibroblasts (Bach et al., 2016). It is true that most of these cellular models are epithelial since arsenic-induced tumors arise from epithelial cells, but emerging evidence shows that arsenic can affect stromal cells such as fibroblasts (Shearer et al., 2015), supporting the use of MEF cells in this type of experimental approaches. Under specific stimuli, including ROS generation, normal fibroblasts are known to acquire an activated state and give origin to the cancer-associated fibroblasts (CAFs) commonly found in the tumor microenvironment (Cirri and Chiarugi, 2012). Activated fibroblasts in a “CAF state” show a phenotype distinct from normal fibroblasts, characterized by enhanced secretion of factors and other ECM modulators that could help promote tumor growth and progression, facilitating the transformation process (Koontongkaew, 2013). Thus, the associated implications of fibroblasts being an arsenic target are certainly of interest, as not only can arsenic induce cell transformation directly, but it may also influence the organ or tumor stroma, thereby potentiating the carcinogenic effects of arsenic and/or other toxicants.

A broad number of molecular mechanisms of carcinogenesis have been explored using the above mentioned epithelial and stromal models of malignant transformation, but the behavior of DNA damage through the exposure/acquisition of the cancer phenotype has been poorly explored so far. The present work monitored ODD and genotoxic DNA



damage in MEF cells during 50 weeks of exposure to 0.5, 1 and 2  $\mu\text{M}$ . Along this exposure-period, MEF cells acquired features of a transformed oncogenic phenotype around week 30, as indicated by morphological changes, de-regulated differentiation status, increased matrix metalloproteinase secretion and invasive potential, increased proliferation and anchorage-independent cell growth, and capacity to enhance tumor growth and invasiveness (Bach et al., 2016). Results showed that DNA damage increased time-dependently up to the point of transformation and dropped radically ready after (see Figure 1). The work of Kojima et al. (2009) explored the accumulation of ODD in chronically exposed rat liver TRL1215 cells and found concordant results, but no mechanistic explanation was proposed for the obtained observations (Kojima et al., 2009). We observed that *Mth1* was involved in the DNA damage resistant phenotype observed after transformation, since the expression of *Mth1* was triggered to levels between 13 and 33-fold, depending on the concentration of arsenic used (see Figure 2). MTH1 is required for cancer cells to sanitize oxidized dNTP pools and hence prevent the incorporation of oxidized bases into DNA. Then, arsenic-transformed cells appear to require MTH1 to avoid DNA damage and cell death. On one hand this mechanism could explain the remarkable generalized apoptotic resistant phenotype found by some authors in arsenic long-exposed cells (Pi et al., 2005; Qu et al., 2002), and could also contribute to the phenomenon of self-tolerance found to occur during chronic exposure *in vitro* (Brambila et al., 2002; Liu et al., 2001b; Romach et al., 2000). Interestingly, our findings set *Mth1* as a novel biomarker of arsenic carcinogenesis as arsenic-exposed cells are expected to increase its expression once malignant transformation has occurred.

In humans, ingested inorganic arsenic is biotransformed via multiple consecutive methylation steps into the methylated metabolites monomethyl-arsenic (MMAs) and dimethyl-arsenic (DMAs), which can be found in trivalent ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ) and pentavalent ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ) oxidation states (Vahter, 2002). Originally thought to serve as a detoxifying mechanism, arsenic biotransformation is now considered a critical influencer of the adverse effects associated with arsenic exposure as trivalent intermediate metabolites are considered to be more genotoxic than pentavalent species (Styblo et al., 2000). As for its carcinogenic potential,  $\text{MMA}^{\text{III}}$  was able to induce a transformed phenotype in chronically exposed TRL1215 and prostate RWPE cells more rapidly than its inorganic

parental counterpart As<sup>III</sup>, by a mechanism involving genotoxicity, specifically the generation of ODD (Tokar et al., 2014). Notably, arsenic biotransformation appears mandatory for the generation of ODD by inorganic arsenic, but not for trivalent monomethyl-arsenic (Kojima et al., 2009; Tokar et al., 2014). Precisely due to the outstanding role of arsenic biotransformation in arsenic toxic, genotoxic and carcinogenic potential consequences, the ability of our MEF cells to biotransform inorganic arsenic was analyzed before by us by HPLC-ICP-MS, revealing that our MEF cells were able to biotransform arsenic, as indicated by the presence of all organic species resulting from inorganic arsenic metabolism in the cell lysates and in the medium after exposure to As<sup>III</sup> and MMA<sup>III</sup> for 24 and 48 h (Bach et al., 2014).

It can be assumable that changes in the metabolic capacity of cells would strongly influence the outcome of a given exposure. Such changes would fall to the enzyme AS3MT as its expression has been found to have a central role in the biotransformation, i.e., methylation of arsenic. Human liver HepG2 cells silenced for *AS3MT* gene and *As3mt* *knockout* mice drastically decreased arsenic methylation capacity (Drobna et al., 2006, 2009), and *AS3MT* expression changes or polymorphisms found in chronic arsenic-exposed individuals have been found to be associated with individual arsenic metabolic patterns (Hernandez et al. 2008a; Hernandez et al. 2008b; Engström et al., 2011). In the present work, a pattern of *As3mt* expression has been observed for the first time during arsenic-associated oncogenic transformation. Up to the point of transformation, *As3mt* increased time-dependently as occurred with ODD and genotoxic DNA damage (see Figure 1 and 3A). Presumably, the chronic stress and DNA damage accumulation induced the overexpression of *As3mt* as an attempt to enhance arsenic biotransformation and avoid cellular toxicity, which in turn aggravated the genotoxic accumulative effects by increasing ROS production and the highly-reactive intermediate metabolites. After transformation, the rapid decrease in DNA damage mediated by *Mth1* overexpression rescued cells from the chronic stress and conferred resistance, which restrained the need of biotransformation and hence of AS3MT expression, which turned back to normal levels (see Figure 3).

Consumption of SAM by AS3MT during the metabolism of arsenic is proposed as an important consequence of exposure as is also the source of -CH<sub>3</sub> of DNA methylases.

The situation worsens under a scenario of accelerated biotransformation as is the case of our chronic exposed cells before transformation. During this period, a moderate but steady global hypomethylation state was observed in exposed cells. After transformation, genomic hypomethylation continues in spite of the restored *As3mt* levels, indicating that, once produced, epigenetic changes are irreversible. *In vitro* and animal studies showed that arsenic induces global DNA hypomethylation, and results from human studies with populations exposed to >500 µg/L of inorganic arsenic showed also a reduction in genomic methylation (Bustaffa et al., 2014). Interestingly here is the fact that some authors have described DNA damage and epigenetic mechanisms as related events. For example, Sciandrello et al. (2004) observed that arsenic induced chromosomal instability as a consequence of global DNA methylation reduction (Sciandrello et al., 2004), and Ramírez et al. (2007) proposed that the ability of arsenic to induce global DNA demethylation through SAM consumption leads to defects in heterochromatin integrity resulting in aneuploidogenic events (Ramírez et al., 2007).

## CONCLUSIONS

The present work demonstrates a time-dependent accumulation of ODD and chromosome genotoxic DNA damage during the acquisition of the arsenic-associated transformed phenotype, a carcinogenic mechanism where *As3mt* overexpression is involved. Our results also demonstrate a DNA damage resistant phenotype of arsenic-transformed cells, through *Mth1* induction. This feature is proposed as a useful biomarker of arsenic carcinogenesis. The evaluation of *Mth1* after a given exposure would help to define the associated risk, and we recommend its expression analysis in cells transformed by chronic arsenic exposure, in animal models of arsenic carcinogenesis, in environmentally exposed individuals and in arsenic-induced skin lesions.

**Competing financial interests:** The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

## REFERENCES

- Bach J, Marcos R, Hernández A. 2014. *Ogg1* genetic background determines the genotoxic potential of environmentally relevant arsenic exposure. *Arch. Toxicol.* 88: 585-596.
- Bach J, Peremartí J, Annangi B, Marcos R, Hernández A. 2016. Oxidative DNA damage enhances the carcinogenic potential of in vitro chronic arsenic exposures. *Arch. Toxicol.* 90:1893-905.
- Basu A, Som A, Ghoshal S, Mondal L, Chaubey RC, Bhilwade HN, et al. 2005. Assessment of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals susceptible to arsenic induced toxicity in West Bengal, India. *Toxicol. Lett.* 159:100–12
- Brambila EM, Achanzar WE, Qu W, Webber MM, Waalkes MP. 2002. Chronic arsenic-exposed human prostate epithelial cells exhibit stable arsenic tolerance: mechanistic implications of altered cellular glutathione and glutathione S-transferase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 183: 99–107.
- Bustaffa E, Stoccoro A, Bianchi F, Migliore L. 2014. Genotoxic and epigenetic mechanisms in arsenic carcinogenicity. *Arch. Toxicol.* 88: 1043–67.
- Cirri P, Chiarugi P. 2012. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 31:195–208.
- Drobna Z, Xing W, Thomas DJ, Stýblo M. 2006. shRNA silencing of AS3MT expression minimizes arsenic methylation capacity of HepG2 cells. *Chem. Res. Toxicol.* 19:894–8.
- Drobna Z, Naranmandura H, Kubachka KM, Edwards BC, Herbin-Davis K, Styblo M, et al. 2009. Disruption of the arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase gene in the mouse alters the phenotype for methylation of arsenic and affects distribution and retention of orally administered arsenate. *Chem. Res. Toxicol.* 22:1713–20.
- Engström K, Vahter M, Mlakar SJ, Concha G, Nermell B, Raqib R, et al. 2011. Polymorphisms in arsenic (+III oxidation state) methyltransferase (AS3MT) predict gene expression of AS3MT as well as arsenic metabolism. *Environ. Health Perspect.* 119:182–8.

- Flora SJS. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic. Biol. Med.* 51:257–81.
- Gad H, Koolmeister T, Jemth A-S, Eshtad S, Jacques SA, Ström CE, et al. 2014. MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature* 508:215–21.
- Hei TK, Filipic M. 2004. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radic. Biol. Med.* 37:574–81.
- Hernández A, Xamena N, Sekaran C, Tokunaga H, Sampayo-Reyes A, Quinteros D, et al. 2008a. High arsenic metabolic efficiency in *AS3MT287Thr* allele carriers. *Pharmacogenet. Genomics* 18:349-55.
- Hernández A, Xamena N, Surrallés J, Sekaran C, Tokunaga H, Quinteros D, et al. 2008b. Role of the Met(287)Thr polymorphism in the *AS3MT* gene on the metabolic arsenic profile. *Mutat. Res.* 637:80-92.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2012. Arsenic, metals, fibres and dusts. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, 100C. International Agency for research on Cancer, Lyon, France.
- Kasai H, Nishimura S. 1984. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* 12: 2137–45.
- Kitchin KT, Conolly R. 2010. Arsenic-induced carcinogenesis--oxidative stress as a possible mode of action and future research needs for more biologically based risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* 23:327–35.
- Kojima C, Ramirez DC, Tokar EJ, Himeno S, Drobná Z, Stýblo M, et al. 2009. Requirement of arsenic biomethylation for oxidative DNA damage. *J. Natl. Cancer Inst.* 101:1670–81.
- Li Y, Ling M, Xu Y, Wang S, Li Z, Zhou J, et al. 2010. The repressive effect of NF-kappaB on p53 by mot-2 is involved in human keratinocyte transformation induced by low levels of arsenite. *Toxicol. Sci.* 116:174–82.
- Koontongkaew S. 2013. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J.*

- Cancer 4:66–83.
- Liu SX, Athar M, Lippai I, Waldren C, Hei TK. 2001a. Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:1643–8.
- Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR, et al. 2001b. Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Mol. Pharmacol.* 60: 302–9.
- Liu J, Benbrahim-Tallaa L, Qian X, Yu L, Xie Y, Boos J, et al. 2006. Further studies on aberrant gene expression associated with arsenic-induced malignant transformation in rat liver TRL1215 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216:407–15.
- Mass MJ, Tennant A, Roop BC, Cullen WR, Styblo M, Thomas DJ, et al. 2001. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 355–61.
- McNamee JP, McLean JR, Ferrarotto CL, Bellier PV. 2000. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutat. Res.* 466: 63-69.
- Matsui M, Nishigori C, Toyokuni S, Takada J, Akaboshi M, Ishikawa M, et al. 1999. The role of oxidative DNA damage in human arsenic carcinogenesis: detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in arsenic-related Bowen's disease. *J. Invest. Dermatol.* 113:26–31.
- Nakabeppu Y. 2014. Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 12543-57.
- Pi J, He Y, Bortner C, Huang J, Liu J, Zhou T, et al. 2005. Low level, long-term inorganic arsenite exposure causes generalized resistance to apoptosis in cultured human keratinocytes: potential role in skin co-carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 116:20–6.
- Pi J, Diwan BA, Sun Y, Liu J, Qu W, He Y, et al. 2008. Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes: involvement of Nrf2. *Free Radic. Biol. Med.* 45:651–8.
- Qu W, Bortner CD, Sakurai T, Hobson MJ, Waalkes MP. 2002. Acquisition of apoptotic

- resistance in arsenic-induced malignant transformation: role of the JNK signal transduction pathway. *Carcinogenesis* 23: 151–9.
- Ramírez T, Stopper H, Hock R, Herrera LA. 2007. Prevention of aneuploidy by S-adenosylmethionine in humans cells treated with sodium arsenite. *Mutat. Res.* 617(1-2):16-22.
- Romach EH, Zhao CQ, Del Razo LM, Cebrián ME, Waalkes MP. 2000. Studies on the mechanisms of arsenic-induced self tolerance developed in liver epithelial cells through continuous low-level arsenite exposure. *Toxicol. Sci.* 54: 500–8.
- Rossman TG. 2003. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat. Res.* 533: 37–65.
- Sampayo-Reyes A, Hernández A, El-Yamani N, López-Campos C, Mayet-Machado E, Rincón-Castañeda CB, et al. 2010. Arsenic induces DNA damage in environmentally exposed Mexican children and adults. Influence of GSTO1 and AS3MT polymorphisms. *Toxicol. Sci.* 117:63–71.
- Sciandrello G, Caradonna F, Mauro M, Barbata G. 2004. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis* 25:413–7.
- Shearer JJ, Wold EA, Umbaugh CS, Lichti CF, Nilsson CL, Figueiredo ML. Inorganic Arsenic Related Changes in the Stromal Tumor Microenvironment in a Prostate Cancer Cell-Conditioned Media Model. *Environ. Health Perspect.*; doi 10.1289/ehp.15100902015 [Epub ahead of print].
- Stueckle TA, Lu Y, Davis ME, Wang L, Jiang B-H, Holaskova I, et al. 2012. Chronic occupational exposure to arsenic induces carcinogenic gene signaling networks and neoplastic transformation in human lung epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 261:204–16.
- Styblo M, Del Razo LM, Vega L, Germolec DR, LeCluyse EL, Hamilton GA, et al. 2000. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch. Toxicol.* 74: 289–99.
- Thomas DJ, Li J, Waters SB, Xing W, Adair BM, Drobna Z, et al. 2007. Arsenic (+3 oxidation

- state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 232: 3–13.
- Tokar EJ, Kojima C, Waalkes MP. 2014. Methylarsonous acid causes oxidative DNA damage in cells independent of the ability to biomethylate inorganic arsenic. *Arch. Toxicol.* 88:249–61.
- Treas J, Tyagi T, Singh KP. 2013. Chronic exposure to arsenic, estrogen, and their combination causes increased growth and transformation in human prostate epithelial cells potentially by hypermethylation-mediated silencing of MLH1. *Prostate* 73:1660–72.
- Vahter M. 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181-182:211–217.
- Waters SB, Devesa V, Del Razo LM, Styblo M, Thomas DJ. 2004. Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat cyt19, an arsenic methyltransferase. *Chem. Res. Toxicol.* 17:404–9.
- Wen G, Calaf GM, Partridge MA, Echiburú-Chau C, Zhao Y, Huang S, et al. 2008. Neoplastic transformation of human small airway epithelial cells induced by arsenic. *Mol. Med.* 14:2–10.
- Xu Y, Zhao Y, Xu W, Luo F, Wang B, Li Y, et al. 2013. Involvement of HIF-2 $\alpha$ -mediated inflammation in arsenite-induced transformation of human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272:542–50.
- Xu Y, Tokar EJ, Waalkes MP. 2014. Arsenic-induced cancer cell phenotype in human breast epithelia is estrogen receptor-independent but involves aromatase activation. *Arch. Toxicol.* 88:263–74.
- Yamauchi H, Aminaka Y, Yoshida K, Sun G, Pi J, Waalkes MP. 2004. Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning: urinary 8-hydroxydeoxyguanine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198:291–6.



**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Oxidative (A) and genotoxic (B) DNA damage in MEFs cells through the transformation process. **(a)** ODD levels measured by the comet assay show an increase up to week 30, the approximate point of transformation, and then drop close to basal levels. **(b)** Genotoxic/chromosome damage measured by the frequency of MN in binucleated cells shows similar pattern of expression. Data are presented as mean values with time-matched controls set to 100% (n=3); error bars represent standard error of the mean; <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, <sup>c</sup>P < 0.001 compared with time-matched controls.

**Figure 2.** *Mth1* gene expression before, during and after the acquisition of the *in vitro* transformed phenotype. **(a)** *Mth1* increase significantly after the transformation point as showed in transcript levels. Data are presented as mean values with time-matched controls set to 100% (n=3). **(b)** A clear induction of *Mth1* gene was observed comparing the point of maximal DNA damage (week 30) with that of DNA damage decline (week 40). Data are presented as mean values with treatment-matched values at week 30 set as 100% (n=3). The fold-change found in controls were subtracted to the different treatments. Error bars represent standard error of the mean; <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, <sup>c</sup>P < 0.001.

**Figure 3.** Expression changes of *As3mt* and *Neil-1* genes observed in MEF cells during chronic arsenite exposure. Both *As3mt* **(a)** and *Neil-1* **(b)** expression is upregulated at the peak of transformation and follow a pattern similar to that of DNA damage. Data are presented as mean values with time-matched controls set to 100% (n=3); error bars represent standard error of the mean; <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, <sup>c</sup>P < 0.001 compared with time-matched controls.

**Figure 4.** Global DNA methylation is decreased during chronic arsenic exposure. Data are presented as mean values with time-matched controls set to 100% (n=3); error bars represent standard error of the mean; <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, <sup>c</sup>P < 0.001 compared with time-matched controls.

FIGURES

Figure 1.

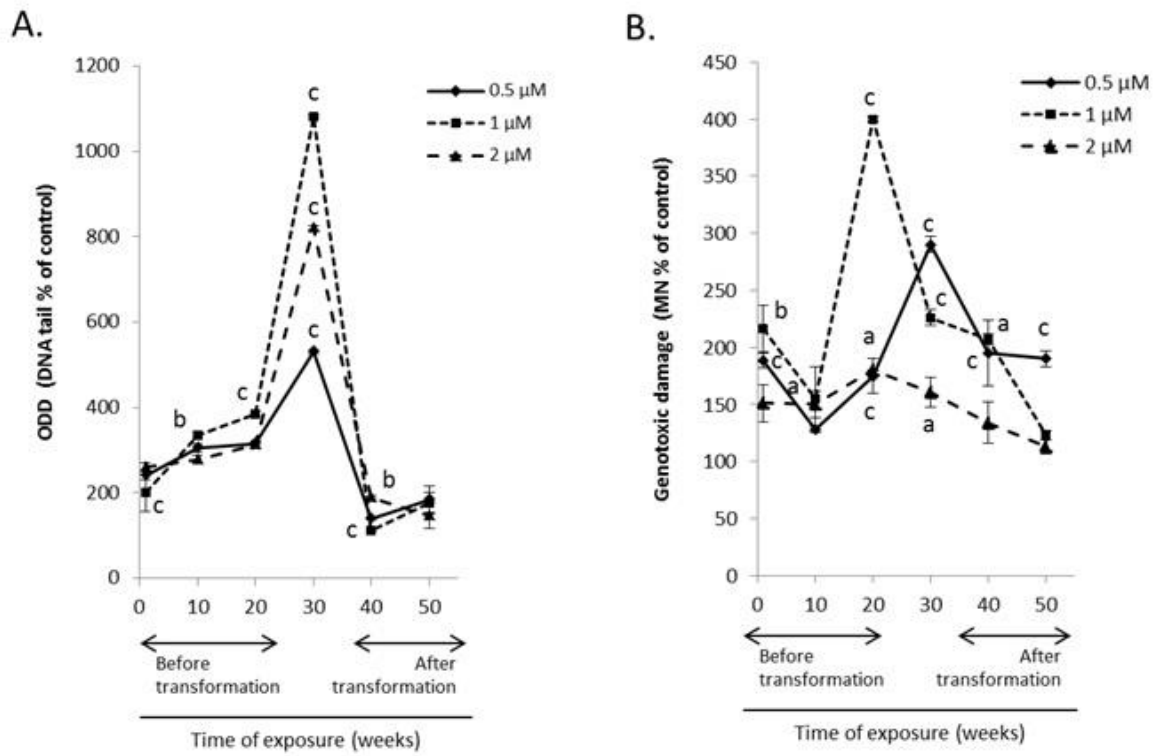


Figure 2.

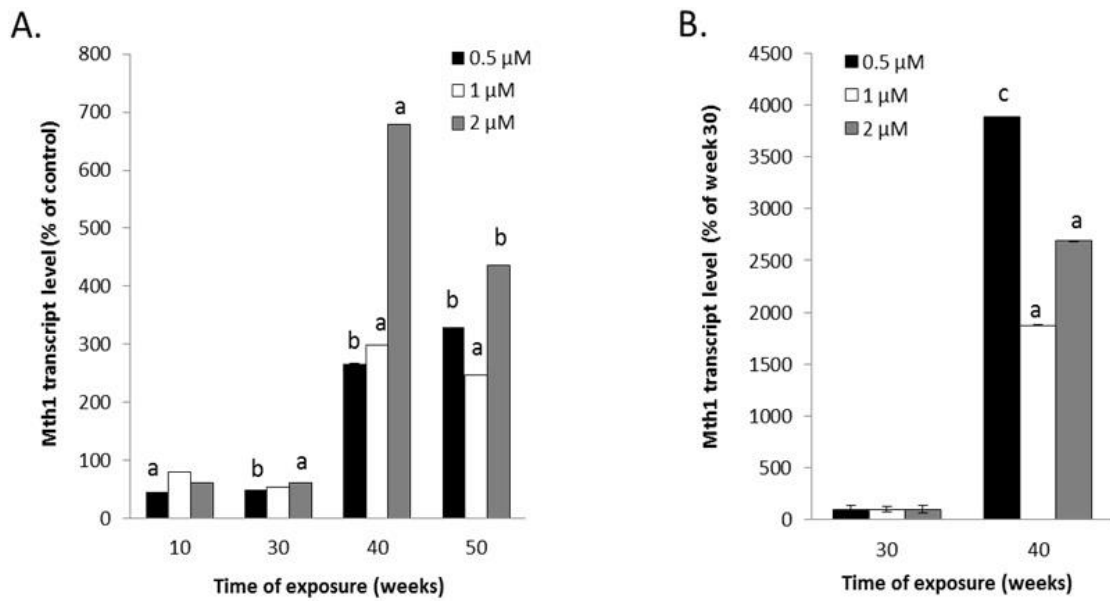


Figure 3.

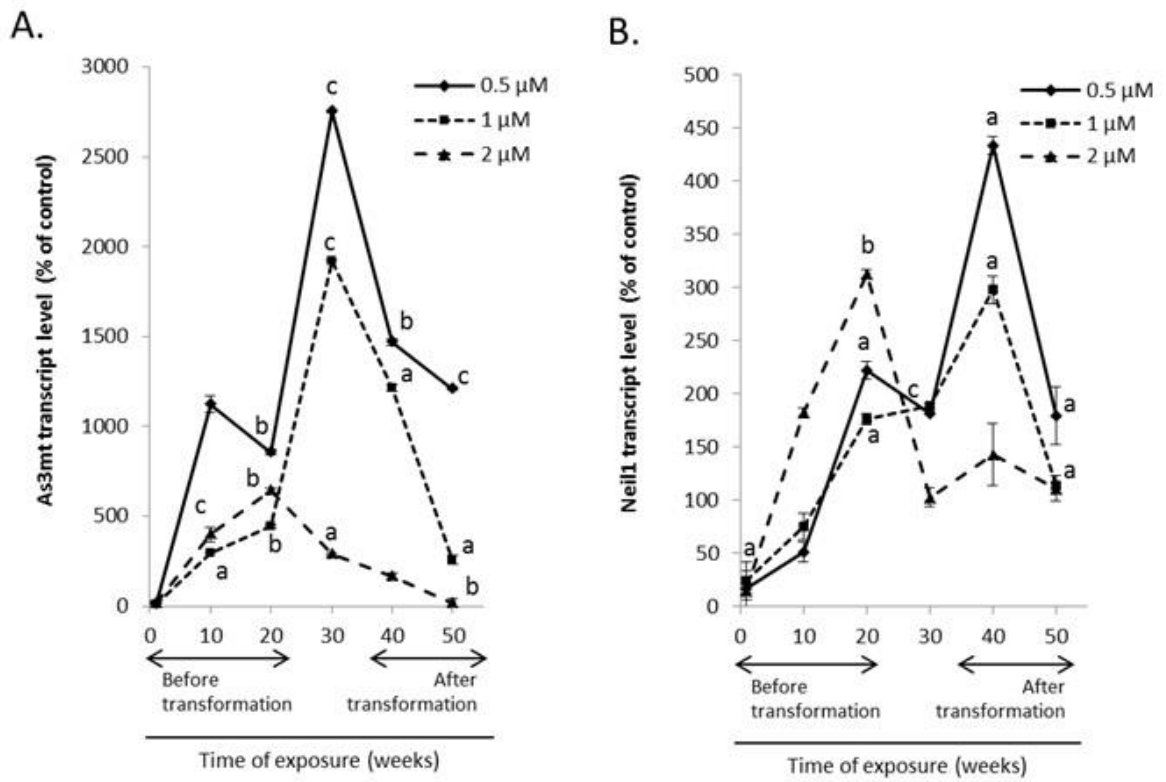
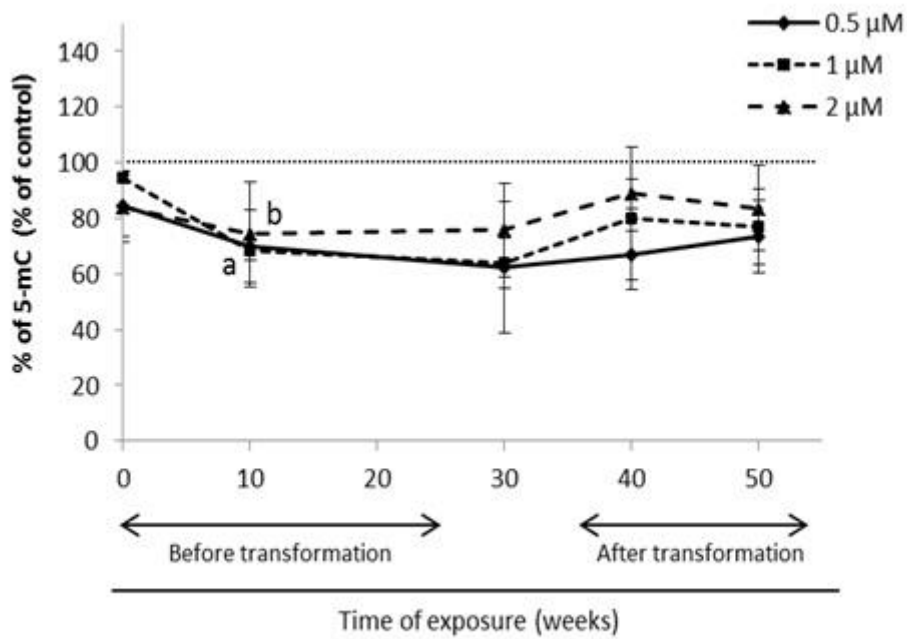


Figure 4.



2n estudi

***Arsenic exposure disrupts the normal function of the FA/BRCA  
repair pathway.***

Toxicological Sciences, 142(1): 93-104 (2014)

doi: 10.1093/toxsci/kfu159

Impact factor: 3,854



### 3.2. RESUM DEL SEGON ESTUDI

#### **Arsenic exposure disrupts the normal function of the FA/BRCA repair pathway.**

El contingut d'aquest segon estudi pretén donar resposta al segon objectiu d'aquesta Tesi, que és aprofundir en el coneixement d'un dels mecanismes d'acció proposats per a l'arsènic.

S'ha vist que una de les conseqüències de l'exposició a l'arsènic és la capacitat d'interferir en el correcte funcionament d'algunes rutes de reparació, ja sigui alterant l'expressió de gens involucrats en aquestes vies, o bé interaccionant directament amb algunes de les proteïnes claus. Són diversos els treballs que han determinat la interferència de l'arsènic amb les rutes BER (reparació per excisió de bases) i NER (reparació per excisió de nucleòtids), però hi ha pocs estudis que constatin l'alteració d'altres mecanismes de reparació. Per això, en aquest segon estudi ens vàrem plantejar avaluar si l'exposició a baixes concentracions d'arsènic és capaç de modificar la funció de la ruta FA/BRCA, disminuint la capacitat de les cèl·lules exposades de reparar correctament les lesions induïdes per la mitomicina C (MMC), el diepoxibutà (DEB) o la hidroxiaurea (HU), agents àmpliament reconeguts com a inductors d'enllaços creuats en el DNA, que són les lesions típicament reparades per la ruta FA/BRCA.

Per donar resposta a aquesta hipòtesi, s'han utilitzat dues línies cel·lulars de fibroblasts humans isogèniques: la PD20, derivada d'un pacient Fanconi deficient pel gen *FANCD2*, de manera que no serà capaç d'activar la ruta FA/BRCA, i la seva corresponent línia corregida. A més, s'han seleccionat dos compostos trivalents d'arsènic: un compost altament tòxic derivat del metabolisme de l'arsènic, el MMA<sup>III</sup>, i un derivat inorgànic utilitzat en la teràpia contra el càncer, l'ATO. Segons resultats previs del nostre grup, no publicats, la pre-exposició de les cèl·lules a aquests dos compostos mostra un efecte sinèrgic en la viabilitat cel·lular que disminueix després del tractament amb diferents concentracions de MMC, cosa que no passa amb cap dels compostos pentavalents d'arsènic utilitzats en el mateix assaig. Aquests resultats ens varen fer pensar que són els derivats trivalents de l'arsènic els que poden tenir la capacitat d'alterar la funció de la ruta FA/BRCA.

Per confirmar aquesta hipòtesi, es van seleccionar concentracions subtòxiques d'aquests dos compostos, a les que es van exposar les cèl·lules FA/BRCA corregides

durant 2 setmanes, realitzant una sèrie d'assajos per determinar i confirmar si el fenotip de les cèl·lules es veu alterat.

Segons els resultats obtinguts, s'observa com les cèl·lules FA/BRCA corregides pre-exposades a l'arsènic mostren un comportament similar a les cèl·lules FA/BRCA deficientes. Concretament, després del tractament amb MMC o HU mostren una disminució de la viabilitat, un augment del percentatge de cèl·lules bloquejades en fase G2/M del cicle cel·lular, així com una menor quantitat de proteïna FANCD2 monoubiquitinada, que es considerat el pas clau de l'activació de la ruta. A més a més, s'ha vist un augment significatiu de lesions genotòxiques quan s'analitza el nombre de micronuclis induïts després del tractament amb DEB, fet que podria contribuir en el mecanisme de carcinogènesis associat a l'exposició a l'arsènic.

Tots aquests resultats posen de manifest per primer cop que les concentracions subtòxiques utilitzades dels compostos trivalents MMA<sup>III</sup> i ATO són capaces d'alterar la funció normal de la ruta FA/BRCA, compromentent així la viabilitat cel·lular i contribuint en l'adquisició d'instabilitat genòmica, una característica altament observada en les poblacions humanes exposades a l'arsènic. Com en el cas de la ja coneguda inhibició d'altres rutes de reparació, com la BER o NER, la inhibició de la ruta FA/BRCA es revela com un mecanisme associat directament a la carcinogènesi de l'arsènic, així com també un mecanisme de co-carcinogènesi, doncs l'incorrecte funcionament de la via de reparació sensibilitzaria les persones exposades front a altres agents ambientals generadors d'un tipus de dany potencialment reparable mitjançant la via FA/BRCA.

# Arsenic Exposure Disrupts the Normal Function of the FA/BRCA Repair Pathway

Jana Peremartí\*, Facundo Ramos\*, Ricard Marcos\*,<sup>†,1</sup>, and Alba Hernández\*,<sup>†,1</sup>

\*Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain and <sup>†</sup>CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, 28029 Madrid, Spain

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed at Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain. Fax: +34 93 581 23 87. E-mail: alba.hernandez@uab.es

## ABSTRACT

Chronic arsenic exposure is known to enhance the genotoxicity/carcinogenicity of other DNA-damaging agents by inhibiting DNA repair activities. Interference with nucleotide excision repair and base excision repair are well documented, but interactions with other DNA repair pathways are poorly explored so far. The Fanconi anemia FA/BRCA pathway is a DNA repair mechanism required for maintaining genomic stability and preventing cancer. Here, interactions between arsenic compounds and the FA/BRCA pathway were explored by using isogenic *FANCD2*<sup>-/-</sup> (FA/BRCA-deficient) and *FANCD2*<sup>+/+</sup> (FA/BRCA-corrected) human fibroblasts. To study whether arsenic disrupts the normal FA/BRCA function, *FANCD2*<sup>+/+</sup> cells were preexposed to subtoxic concentrations of the trivalent arsenic compounds methylarsonous acid (MMA<sup>III</sup>) and arsenic trioxide (ATO) for 2 weeks. The cellular response to mitomycin-C, hydroxyurea, or diepoxybutane, typical inducers of the studied pathway, was then evaluated and compared to that of *FANCD2*<sup>-/-</sup> cells. Our results show that preexposure to the trivalent arsenicals MMA<sup>III</sup> and ATO induces in corrected cells, a cellular FA/BRCA-deficient phenotype characterized by hypersensitivity, enhanced accumulation in the G2/M compartment and increased genomic instability—measured as micronuclei. Overall, our data demonstrate that environmentally relevant arsenic exposures disrupt the normal function of the FA/BRCA activity, supporting a novel source of arsenic co- and carcinogenic effects. This is the first study linking arsenic exposure with the FA/BRCA DNA repair pathway.

Key words: trivalent arsenic compounds; DNA repair; Fanconi anemia FA/BRCA pathway; *FANCD2*-deficient; interstrand crosslinks; genomic instability

Environmental or occupational exposures to arsenic are associated with numerous chronic health effects in humans (Naujokas *et al.*, 2013), including increased risk of skin, lung, liver, kidney, prostate, and urinary bladder cancers (IARC, 2012). Although arsenic is well recognized as a complete carcinogen with tumor-promoting and genotoxic potential, its cocarcinogenic mode of action is becoming more widely appreciated. Thus, it has been classically shown that subtoxic concentrations of arsenite, the more common environmental form of arsenic, enhance the genotoxicity and carcinogenicity of other DNA-damaging agents, including polycyclic aromatic hydrocarbons such as benzo[a]pyrene, ultraviolet radiation, and alkylating compounds (Rossman *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 1995) by inhibiting DNA repair activities (Rossman, 2003).

Although the underlying mechanism(s) of arsenic DNA repair inhibition has not been fully described, compiled data suggest that DNA repair proteins with functional zinc finger motifs may be direct molecular targets of arsenic. Indeed, poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg), and xeroderma pigmentosum A (XPA) are all reported to be affected by arsenic via its competition with zinc, which is essential for their functions (Asmuss *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2009; Hartwig *et al.*, 2003; Piatek *et al.*, 2008). Because PARP-1 has numerous substrates in the base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER) DNA damage repair networks, its arsenic-induced inhibition broadly influences DNA repair processes. In fact, BER and NER interactions with arsenic compounds have been extensively reported (Applebaum *et al.*,



2007; Ebert *et al.*, 2011; Hartwig *et al.*, 1997). However, interferences with other repair pathways have been poorly explored so far.

The Fanconi anemia/BRCA (FA/BRCA) pathway is an essential tumor-suppressive pathway required for protecting the human genome from DNA interstrand crosslinks (ICLs), a lesion blocking DNA replication and transcription. Accordingly, cells derived from individuals with germline mutations in genes that cooperate in the pathway are hypersensitive to DNA cross-linking agents, such as mitomycin-C (MMC) or diepoxybutane (DEB), showing a dramatic increase in the frequency of chromosome aberrations (Deans and West, 2011). In fact, chromosome fragility induced by DNA ICL-inducing agents such as DEB or MMC is the “gold standard” test for the diagnosis of the FA syndrome. The survival assay and the G2/M blockade after ICL exposure are also typical tests to diagnose the FA phenotype.

The FA syndrome is in fact a chromosomal instability disorder. As genome instability represents a specific cell condition with an intimate link to tumorigenesis, cancer predisposition is characteristic feature of FA patients (Kim and D’Andrea, 2012). It is interesting to point out here the fact that arsenic-induced genomic instability has been broadly described. Among the proposed mechanism(s) involved, we find cell cycle checkpoint dysregulation, DNA damage induction, abnormal chromosome segregation, defects in cell cycle checkpoints, disabled apoptosis, telomere dysfunction, or epigenetic dysregulation (Bhattacharjee *et al.*, 2013). Despite of the evidences, however, our understanding on genomic instability mechanisms in arsenic-induced carcinogenesis is still very limited.

In order to study whether arsenic compounds are able to interact with the FA/BRCA pathway, the FA/BRCA-deficient human fibroblast cell line (*FANCD2*<sup>-/-</sup>) and its derived corrected counterpart (*FANCD2*<sup>+/+</sup>) were exposed to trivalent arsenic compounds at relevant concentrations in terms of human risk. If disruption of the normal FA/BRCA function is certainly occurring, a FA-like phenotype with increased sensitivity to ICLs is expected in the exposed FA/BRCA-corrected cells.

Two different arsenic compounds were selected for our study purposes due to their prominent role in arsenic toxicity and human exposure; the highly toxic organic methylated product methylarsonous acid (MMA<sup>III</sup>), and the arsenical-based cancer drug arsenic trioxide (ATO).

Implications in arsenic-associated carcinogenesis as well as in cancer therapy are discussed here.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell lines and arsenic compounds.** Human transformed fibroblasts *FANCD2*<sup>-/-</sup> (PD20F; referred as FA/BRCA-deficient) and their derived retrovirally corrected with pMMP-*FANCD2* cDNA *FANCD2*<sup>+/+</sup> cells (referred as FA/BRCA-corrected) were kindly shared by Dr Jordi Surrallés. Both deficient and corrected cell lines were previously described (Bogliolo *et al.*, 2007; Garcia-Higuera *et al.*, 2001). Cells were grown in Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) (Lab Clinics, Barcelona, Spain) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS; PAA, Pasching, Austria) and 2.5 µg/ml plasmocin (InvivoGen, CA) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37°C. Both cell types exhibited a similar proliferation rate at the time of initiation of the exposure, doubling their cell population approximately every 24 h.

Two different arsenic compounds were used in this study: MMA<sup>III</sup> (provided by Dr Adriana Sampayo-Reyes) and ATO (Sigma-Aldrich, MO).

**Acute toxicity assays.** To test the acute cellular sensitivity of FA/BRCA-deficient and corrected cell lines to arsenic compounds, cells were plated in triplicates at  $2.5 \times 10^5$  cells per well in 6-well plates, incubated overnight in complete medium and placed in fresh medium with increasing concentrations of MMA<sup>III</sup> or ATO for 24 h. After treatments, cells were washed twice with PBS and harvested by trypsinization. The number of cells in the resulting cell suspension was established using a Beckman-Coulter cell counter (Beckman Coulter, CA). The corresponding IC<sub>50</sub> values—defined as concentration of each arsenic compound that reduces cell number by 50%—were derived from averaging three independent cell viability curves.

**Arsenic long-term preexposure.** For the long-term arsenic pretreatment experiments, cells were continuously exposed to low concentrations of MMA<sup>III</sup> or ATO in T-75 flasks for 2 weeks as described previously (Bach *et al.*, 2014). The arsenic-containing medium was changed every 2–3 days and subconfluent cells were passaged weekly at a  $2.5 \times 10^5$  cell density. In all cases, a nontreated control was maintained for the same time-of-exposure interval. The concentrations of arsenic selected for the preexposure showed no significant effects in FA/BRCA-deficient or FA/BRCA-corrected cell viability or proliferation after 24- or 48-h treatments, with viability values in all cases within the range of 95–100%.

**Cell survival assays—sensitivity to ICL agents.** Specific cell survival assays were performed to establish the cellular sensitivity to the DNA crosslinking agent MMC (Sigma-Aldrich). A total of  $5 \times 10^4$  cells were seeded in 21.5 cm<sup>2</sup> culture dishes and allowed to sit overnight. Medium was then replaced by fresh medium with increasing concentrations of MMC and cells were grown until they underwent 5–6 replication rounds. During this period of time, cell culture medium was replaced once. After treatments, cells were washed twice with PBS and harvested by trypsinization. The number of cells in the resulting cell suspension was determined using a Beckman-Coulter cell counter. The corresponding survival curves were derived from averaging three independent experiments.

**Cell cycle analysis by flow cytometry—G2/M arrest.** Analysis of cell cycle was performed to study the characteristic accumulation in G2/M compartment induced by DNA crosslinking agents. Cells in the logarithmic growth phase were seeded in 60.8 cm<sup>2</sup> culture dishes at a density of  $5 \times 10^5$ , incubated overnight and placed in fresh medium containing different concentrations of MMC for 72 h. After treatments, cells were harvested, washed with PBS, and fixed with cold 70% ethanol. Fixed cells were then centrifuged at 1000 rpm and resuspended in 500 µl of PBS with propidium iodide (40 µg/ml) and RNase (0.1 mg/ml) for 30 min at 37°C. Flow cytometric analysis was performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, NJ) and the cell cycle distribution determined by the FlowJo software.

Cell proliferation dynamics of FA/BRCA-deficient and corrected long-term arsenic preexposed and control cells were also assessed by measuring DNA synthesis with the Click-it EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry assay kit (Molecular Probes, OR), following the manufacturer’s instructions.

**Total protein extraction and Western blot—FA/BRCA activation.** Ubiquitination of the FANCD2 protein, a central regulatory event in the FA/BRCA pathway, was studied by western blot as a signature of FA/BRCA repair activation. A total of  $1 \times 10^6$  cells were seeded in 60.8 cm<sup>2</sup> culture dishes, allowed to sit overnight and placed in fresh medium containing the corresponding MMC or hydroxyurea (HU; Sigma-Aldrich) treatment. Both MMC and HU were used as known FA/BRCA activators.

After treatments, cells were harvested by scraping and homogenized in RIPA lysis buffer. The obtained cell extracts were sonicated for 15 s at 20% amplitude on ice and further incubated with 25 U of benzonase (EMD Chemicals Inc., CA). Total protein concentration was then measured spectrophotometrically with the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, CA) according to the manufacturer's instructions.

Approximately 50 µg of total protein extracts were separated on 6% SDS/PAGE gel and blotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. After blocking the nonspecific binding sites for 3 h with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline (TTBS), membranes were incubated overnight at 4°C with the primary monoclonal antibodies against human FANCD2 (ab2187 at 1:2500 dilution) and human VINCULIN (ab18058 at 1:5000 dilution) as loading control. Next, membranes were subjected to three 15-min washes with TTBS and then incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody at a 1:2500 dilution for 1 h at room temperature. The membranes were then washed three times with TTBS and developed using an enhanced chemiluminescence system (Millipore, MA). A relative quantification of protein expression was assessed using the analysis software Genome Tools (Syngene, Cambridge, UK).

**Micronucleus assay after DEB acute exposure—genomic instability.** The micronucleus (MN) assay scored by flow cytometry was performed as a measure of genomic instability after challenging cells with the potent DNA crosslinking agent DEB (Sigma-Aldrich), typically used for chromosome fragility/instability tests in FA patients. Cells were seeded at a  $1 \times 10^6$  density in 60.8 cm<sup>2</sup> culture dishes, allowed to sit overnight and placed in fresh medium containing 0.1 µg/ml of DEB for 72 h. Cells were then harvested by trypsinization and collected by centrifugation at a reason of  $1 \times 10^6$  cells/tube before staining with 25 µl of ethidium monoazide bromide (EMA) dye solution containing 0.125 mg/ml of EMA in 2% FBS. Tubes were then kept in ice with a visible light source (fluorescent bulb) positioned ~30 cm above the level of the cell suspensions for 20 min.

After the photoactivation period, 3 ml of ice-cold PBS + 2% FBS solution were added to each sample. From this point forward, exposure of samples to light was minimized. The cells were collected via centrifugation, and the supernatants aspirated such that ~50 µl of supernatant remained per tube. The cells were gently resuspended, incubated for 20 min at room temperature (RT) and lysed for 1 h in 250 µl of lysis solution 1 containing 1 mg/ml of RNase A, 0.2 µM of SYTOX Green, 0.584 mg/ml of NaCl, 1 mg/ml of sodium citrate and 0.3 µl/ml of IGEAL. Upon addition, each tube was immediately vortexed for 5 s. At this time, 250 µl of Lysis Solution 2 containing 0.2 µM of SYTOX Green, 15 mg/ml of citric acid, and 85.6 mg/ml of sucrose were injected forcefully into the tubes, which were immediately vortexed for 5 s and incubated for 30 min. Samples were then stored at 4°C for 24 h until flow cytometric analysis using a FAC-SCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). The gating was performed and the MN frequency determined according to Avlasevich *et al.* (2006) by the FlowJo software. The incidence of MN

was calculated based on the acquisition of 20,000 EMA-negative nuclei per sample.

**Statistical analysis.** Unpaired Student's *t*-test or analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test was performed, as appropriate, for comparisons between the different groups or treatments. In all cases, a two-sided  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

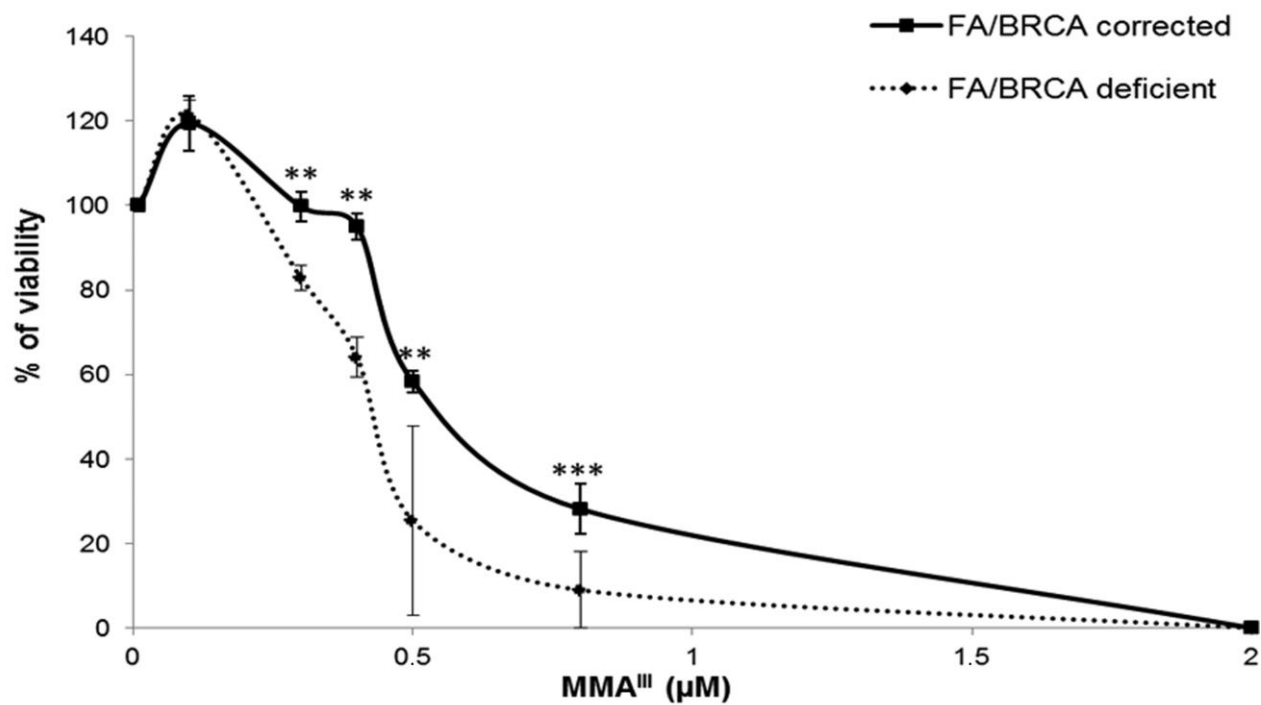
### *FA/BRCA-Deficient Cells Are More Sensitive Than FA/BRCA-Corrected Cells to Arsenic-Induced Cytotoxicity*

The selected cell lines showed a differential cytotoxicity behavior after exposure to the arsenic compounds MMA<sup>III</sup> and ATO (Fig. 1). The IC<sub>50</sub> values derived from the MMA<sup>III</sup> and ATO toxicity curves in FA/BRCA-deficient cells were  $0.44 \pm 0.00$  and  $5.38 \pm 1.12$  µM, respectively, whereas the IC<sub>50</sub> values found in FA/BRCA-corrected cells were  $0.69 \pm 0.02$  and  $14.60 \pm 2.70$  µM, respectively ( $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ ). As long described before, the obtained data indicate a range of cytotoxicities that strongly depends on the nature of the compound, with MMA<sup>III</sup> being the most toxic, followed by ATO. The differences found between FA/BRCA-deficient and corrected cell lines support the involvement of the FA/BRCA pathway, at least under an acute scenario of exposure.

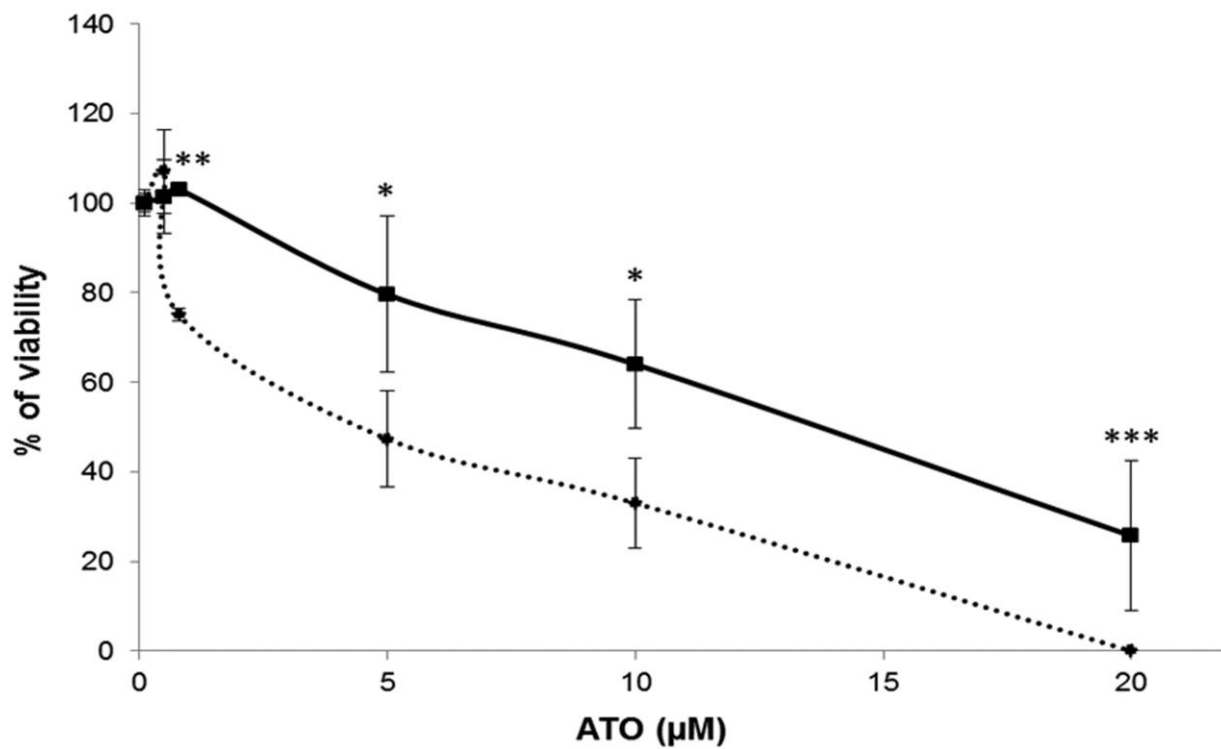
### *Trivalent Arsenicals Disrupt the Normal Function of the FA/BRCA Pathway*

As human populations are environmentally exposed to subtoxic concentrations of arsenic, it was of our interest to determine whether arsenic exposures relevant in terms of human risk were able to disrupt the FA/BRCA function. Thus, FA/BRCA-corrected cells were preexposed to low concentrations of arsenic compounds previous to a MMC cell survival assay. A non pre-exposed FA/BRCA-corrected control and the FA/BRCA-deficient cell line were also included for comparisons. The MMC survival curves obtained indicated that FA/BRCA-corrected cells preexposed to 0.05 and 0.1 µM of MMA<sup>III</sup> and 0.25 and 0.5 µM of ATO exhibit a survival behavior to MMC similar to that of FA/BRCA-deficient cells. It was therefore confirmed that preexposure to subtoxic concentrations of MMA<sup>III</sup> and ATO sensitizes FA/BRCA-corrected cells front ICLs, inducing a phenotype similar to that of FA/BRCA-deficient cells (Figs. 2A and 2B). Flow cytometry cell cycle assays performed with our FA/BRCA-deficient and corrected control cell lines showed the characteristic high accumulation in G2/M of deficient cells after exposure to an ICL agent such as MMC—25 and 50 nM (Figs. 3A and 3B). In fact, the highest concentration of MMC used was able to induce certain degree of G2/M accumulation also in FA/BRCA-corrected cells, but in all cases to a lesser extent than in FA/BRCA-deficient cells, which is in accordance with their genotype characteristics. When FA/BRCA-corrected cells were preexposed to 0.05 and 0.1 µM of MMA<sup>III</sup>, the obtained blockade of cells after 25 nM of MMC appeared close to that of FA/BRCA-deficient cells, and significantly more pronounced than that of non pre-exposed corrected cells (Figs. 3A and 3B). The same was found after exposure to 50 nM of MMC; in this case, the inversion of the peaks of G1 and G2 populations—typical of FA/BRCA-deficient cells—is even evident in preexposed FA/BRCA-corrected cells. Quantification of the percentage of the population blocked in G2/M is shown in Figure 3B. As indicated, significant increases in G2/M populations were observed in FA/BRCA-corrected cells preexposed to MMA<sup>III</sup>, indicating a FA/BRCA-deficient like behavior.

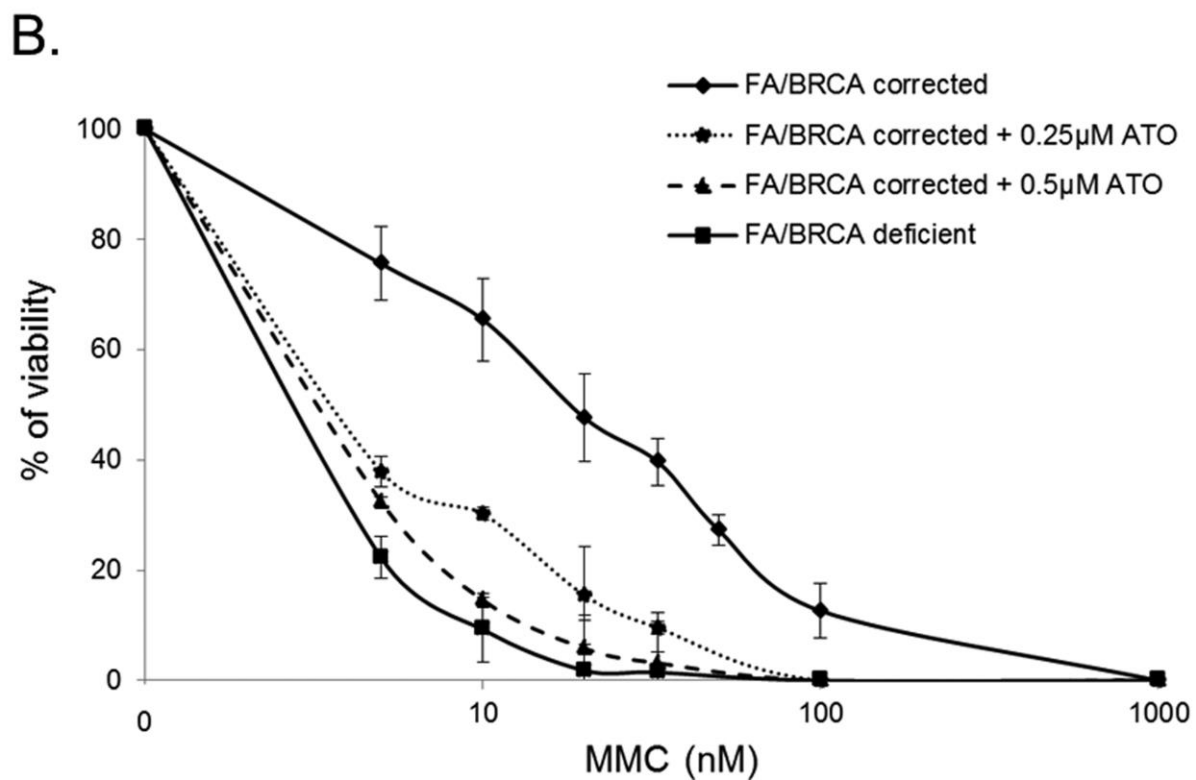
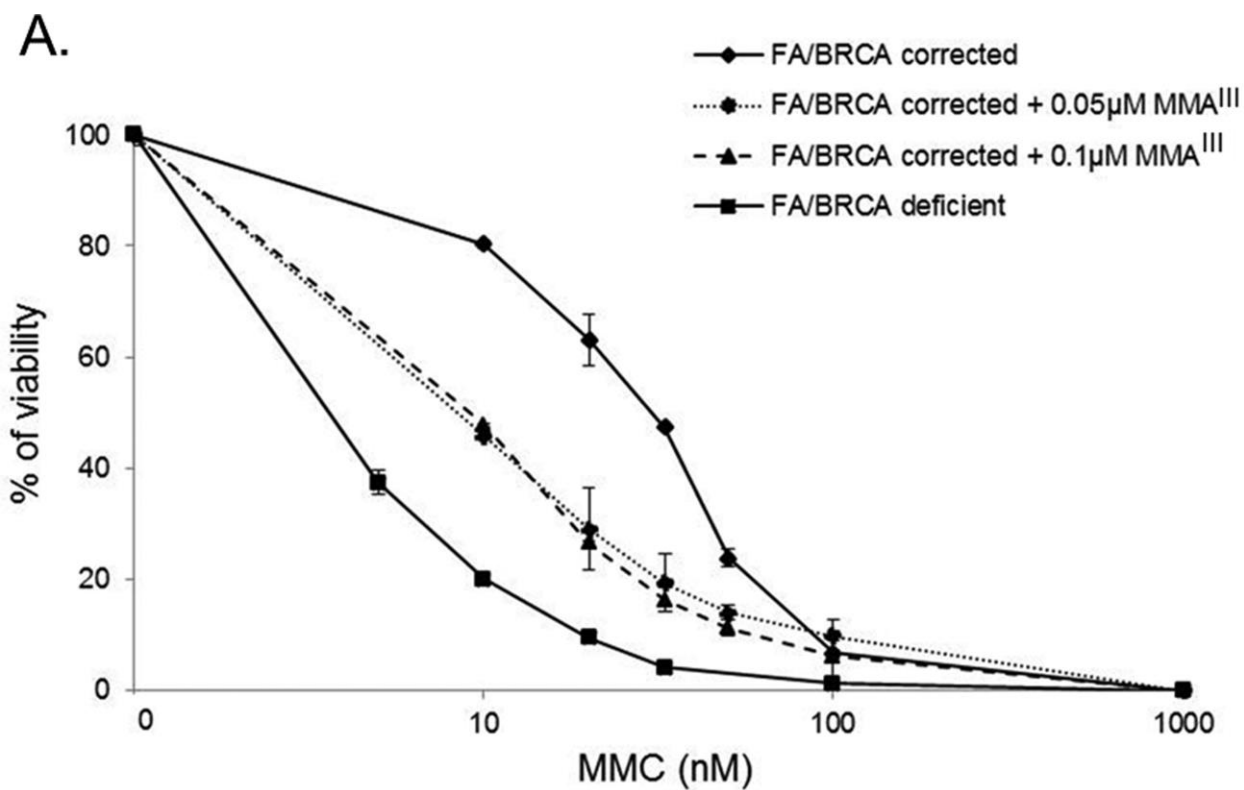
A.



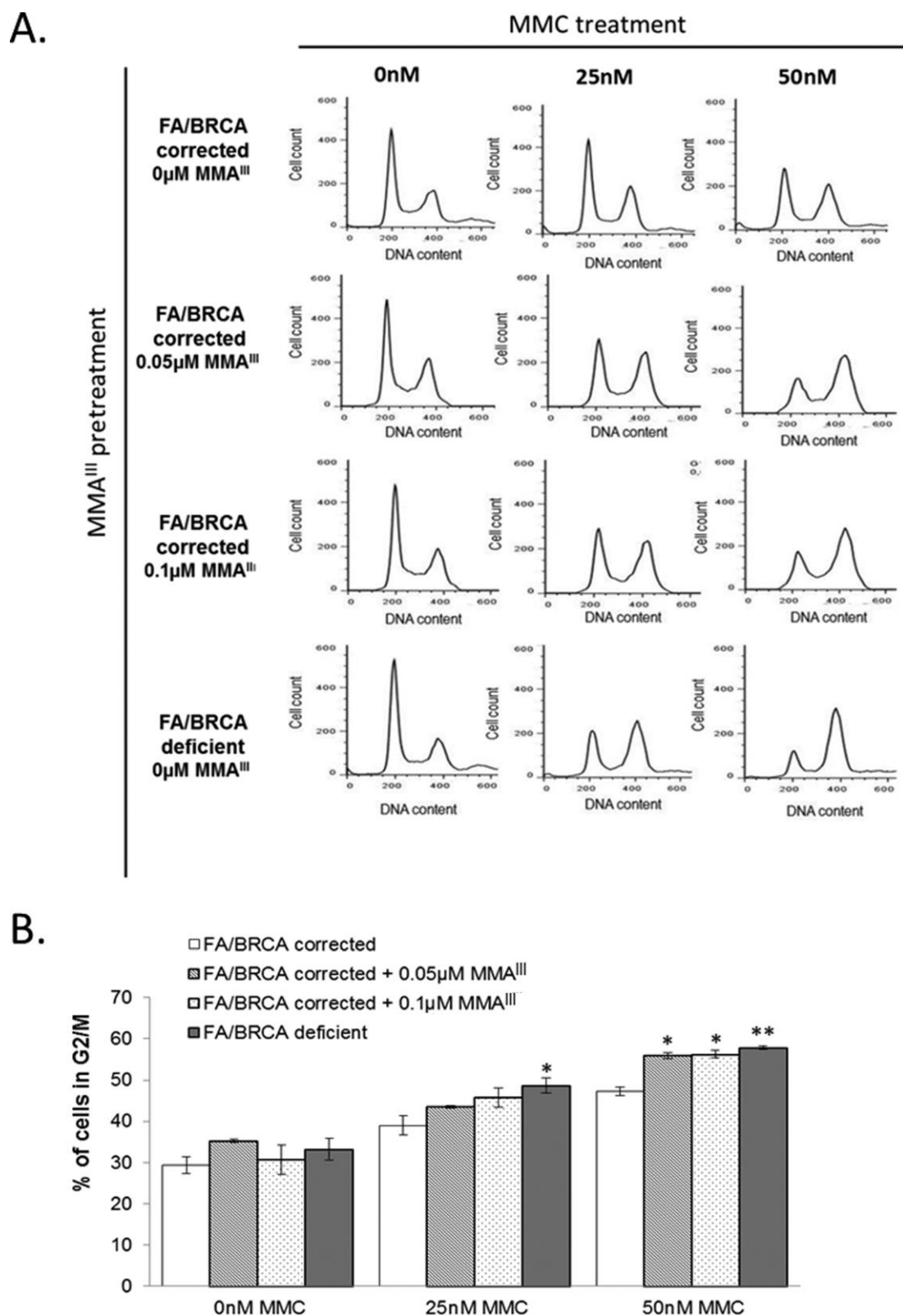
B.



**FIG. 1.** MMA<sup>III</sup> and ATO 24 h cell viability curves for FA/BRCA-deficient and FA/BRCA-corrected cells. FA/BRCA-deficient cells are significantly more sensitive to MMA<sup>III</sup> and ATO cytotoxicity than their corrected counterparts. Data are presented as mean values of independent experiments ( $n = 3$ ). Error bars represent standard error of the mean. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.005$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .



**FIG. 2.** MMC cell survival curves for FA/BRCA-corrected cells pretreated with MMA<sup>III</sup> (A) and ATO (B). Cells preexposed to low doses of MMA<sup>III</sup> and ATO for 2 weeks exhibit a survival behavior toward MMC similar to that of FA/BRCA-deficient cells. Data are presented as mean values of independent experiments ( $n = 3$ ). Error bars represent standard error of the mean.



**FIG. 3.** Cell cycle analysis of arsenic pretreated cells after exposure to MMC. As expected, FA/BRCA-deficient cells show a characteristic dose-dependent G2/M blockade when exposed to MMC. The cell cycle distribution (A) and the percentage of cells accumulated in G2/M compartment (B) of MMA<sup>III</sup> pretreated cells are similar to that of FA/BRCA-deficient cells. Data are presented as mean values of independent experiments ( $n = 3$ ). Error bars represent standard error of the mean. \* $p \leq 0.05$  compared with FA/BRCA-corrected cells; \*\* $p \leq 0.01$  compared with FA/BRCA-corrected cells.

A higher G2/M accumulation was also found after MMC treatment in FA/BRCA-corrected cells preexposed to 0.25 and 0.5  $\mu\text{M}$  of ATO (Figs. 4A and 4B), again indicating that ATO preexposure produces a cellular phenotype similar to that of FA/BRCA-deficient cells. Figure 4B shows the quantified percent of cells in G2/M, where it is appreciable that the observed blockade is significantly different between FA/BRCA-corrected controls and preexposed cells.

Figure 5 shows the western blot analysis of FANCD2 ubiquitination (ub) as a measure of FA/BRCA activation. Untreated cells and cells preexposed to 0.05 and 0.1  $\mu\text{M}$  of MMA<sup>III</sup> present the typical basal situation where nonactivated FANCD2 is much more abundant than the activated—ubiquitinated—version of the protein (Fig. 5A, lanes 1–3). The same is observed in Figure 5B, lanes 1–3, in this case in untreated cells and cells preexposed to ATO. When untreated cells were exposed to MMC and HU—both compounds block the replication fork, therefore triggering the FA/BRCA response—a clear shift in the proportion of the two forms of the protein in favor of the band corresponding to the activated ub-FANCD2 was observed (Figs. 5A and 5B, lanes 4 and 7). This shift going from an overabundance of non-ub-FANCD2 to an overabundance of ub-FANCD2 is indicative FA/BRCA activation. When the same concentrations of MMC and HU were applied to induce FA/BRCA activation in FA/BRCA-corrected cells preexposed to MMA<sup>III</sup>, we observed a less pronounced shift than that of controls (Fig. 5A, lanes 5–6 compared to lane 4 and lanes 8–9 compared with lane 7). The same occurred with cells preexposed to ATO, which also failed to activate the FA/BRCA pathway to the same extent than nonexposed cells (Fig. 5B, lanes 5–6 compared with lane 4, and lanes 8–9 compared with lane 7).

As repair of ICLs by the FA/BRCA repair pathway occurs during the S-phase of cell cycle, it is certainly important to ensure that the observed differences in activating the FA/BRCA route are not due to divergences in the proportion of S-phase between the different treatments. Thus, preexposed and controls cells were pulse-labeled with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and the proportion of EdU-labeled cells was then analyzed by flow cytometry. Results showed that all cells incorporated EdU at a similar rate (Supplementary fig. 1), indicating that arsenic pretreatments did not affect DNA synthesis progression.

#### *Arsenic-Induced FA/BRCA Pathway Disruption Leads to Genome Instability*

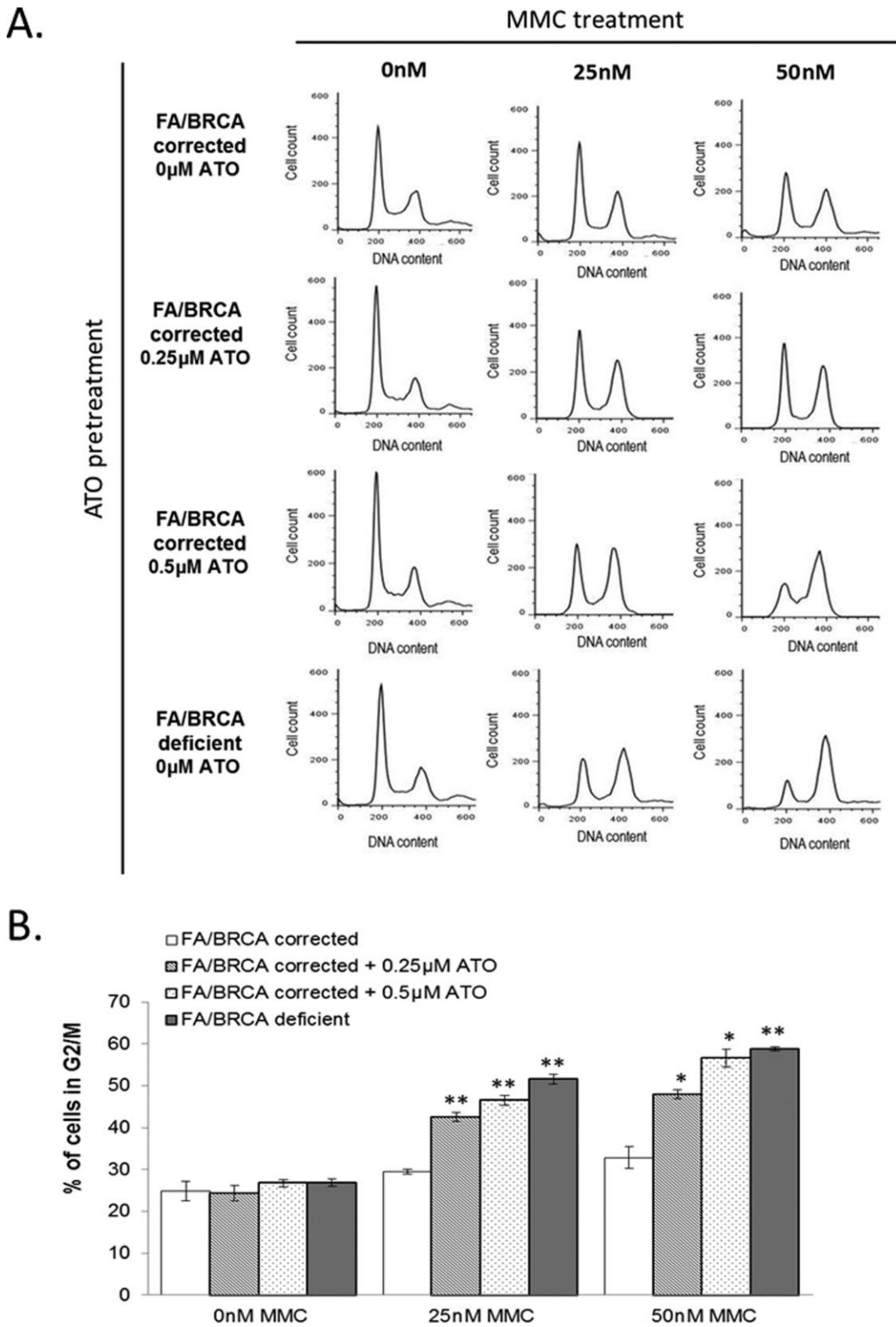
To unravel the existence of arsenic-induced genomic instability, FA/BRCA-corrected cells preexposed to the subtoxic concentrations of MMA<sup>III</sup> and ATO known to disrupt the FA function were challenged with DEB. The MN assay was performed thereafter. FA/BRCA-corrected controls were also included in the analysis to establish the level of DEB-induced MN within an intact DNA repair background (Fig. 6). As shown in the figure, FA/BRCA-corrected cells preexposed to 0.05 and 0.1  $\mu\text{M}$  of MMA<sup>III</sup> present around four- and sixfold higher increases in the number of DEB-induced MN than FA/BRCA-corrected cells (Fig. 6A). This observation confirms the cellular sensitivity of MMA<sup>III</sup> preexposed cells to ICL agents, supporting the FA-like phenotype and evidencing the genomic instability characteristic of FA cells.

The same was found for cells preexposed to 0.25 and 0.5  $\mu\text{M}$  of ATO (Fig. 6B), where around 1.5 and 2 higher fold increases of DEB-induced MN were observed for ATO preexposed cells compared to non-preexposed controls.

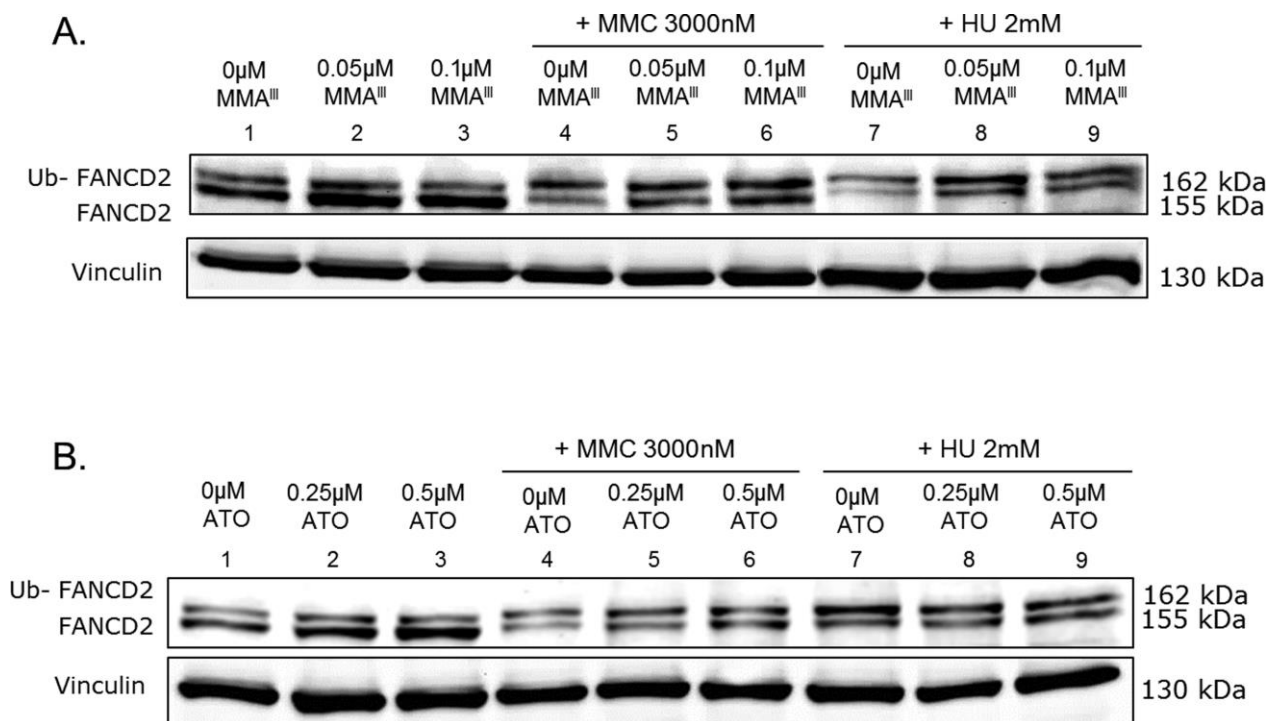
## DISCUSSION

Arsenic is a widely spread environmental contaminant affecting millions of people worldwide (Naujokas *et al.*, 2013). It is classified as human carcinogen based on *in vitro*, *in vivo*, and epidemiological evidence (International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012), and although its mechanism(s) of action remain incompletely characterized, emerging evidence suggest that inhibition of DNA repair is of paramount importance in terms of arsenic-associated carcinogenic risk. However, until now only BER and NER repair pathways have been well studied and described to be affected by environmentally relevant arsenic exposures, this effect being caused by arsenic-induced inhibition of the PARP-1 protein via direct interaction with its zinc finger motifs (Ding *et al.*, 2009; Hartwig *et al.*, 2003). Binding of trivalent arsenicals to cysteine-rich proteins such as hemoglobin, tubulin, and metallothionein has long been recognized (Aposhian and Aposhian, 2006), and there has been considerable focus on arsenic interaction of cysteine-containing peptides, including those derived from zinc finger domains of DNA repair proteins. Interestingly, the recent work of Zhou *et al.* (2011) shows how arsenite interaction with this zinc finger motifs is stable—and thereby with sustained biological impact—only for those containing three or more cysteine residues (CCHC or CCCC), as is the case of the PARP-1 and XPA proteins involved in NER and BER (Zhou *et al.*, 2011). This apparent arsenic binding selectivity explains why a limited number of zinc finger DNA repair proteins have been found to be arsenic targets, as the majority in the human genome are of the CCHH variety. Notably, proteins involved in the Fanconi anemia/BRCA repair pathway (FA/BRCA) are potential arsenic targets; several FA/BRCA nucleases contain an exclusive UBZ4 domain defined as a CCHC zinc finger module (Hofmann, 2009), and the ubiquitin ligase USP1 that catalyzes the key regulatory step in the pathway contains a ring-type zinc finger CCCHCCCC (Cole *et al.*, 2010).

When the interactions of arsenic compounds with the FA/BRCA pathway were explored here, we observed that 2 weeks of exposure to subtoxic concentrations of the trivalent arsenic compounds MMA<sup>III</sup>—a methylated form of arsenic—and ATO—an inorganic derivative of arsenic used in cancer therapy—were able to diminish the normal function of the route. Preexposed cells exhibit a phenotype similar to that of FA/BRCA-deficient cells to ICL agents, characterized by an increased sensitivity and a higher percent of cells accumulated in G2/M compartment due to a reduced ubiquitination of the FANCD2 protein, the key regulatory step in the FA/BRCA route activation. The direct interaction of these arsenic compounds with the zinc finger domains of the FA/BRCA protein is something that certainly has to be addressed in the future. However, we cannot exclude the possibility of arsenic disrupting the FA/BRCA pathway through additional mechanism(s), as the route must coordinate with other DNA damage-responsive events to stabilize the stalled replication fork, to convey signals to DNA checkpoint pathways, and to facilitate recovery of replication forks after ICL lesions. Several proteins different from those of FA/BRCA such as ATR,  $\mu$ -H2AX, or others involved in homologous recombination (HR) play part there (Kee and D'Andrea, 2010), and even those of the NER and BER pathways already known to be inhibited by arsenic (Kim and D'Andrea, 2012; Wilson and Seidman, 2010). Of interest here is the fact that cells defective in NER or HR, such as ataxia telangiectasia, xeroderma pigmentosum, or BRCA2-deficient cells are more susceptible to arsenite exposure (Mei *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2009; Ying *et al.*, 2009). Whether this contributes to our observed arsenic-induced



**FIG. 4.** Cell cycle analysis of arsenic pretreated cells after exposure to MMC. As expected, FA/BRCA-deficient cells show a characteristic dose-dependent G2/M blockade when exposed to MMC. The cell cycle distribution (A) and the percentage of cells accumulated in G2/M compartment (B) of ATO pretreated cells are similar to that of FA/BRCA-deficient cells. Data are presented as mean values of independent experiments ( $n = 3$ ). Error bars represent standard error of the mean. \* $p \leq 0.05$  compared with FA/BRCA-corrected cells; \*\* $p \leq 0.01$  compared with FA/BRCA-corrected cells.



**FIG. 5.** FANCD2 monoubiquitination as a trait of FA/BRCA pathway activation. FANCD2 monoubiquitination was induced by 24 h treatment with MMC or HU at the indicated doses. The Western blots show that cells preexposed to MMA<sup>III</sup> (A) and ATO (B) fail to activate FANCD2 to the same extent than the unexposed cells. Equal loading was assessed by immunoblotting with anti-VINCULIN antibody. Data are presented as representative pictures.

acquisition of FA/BRCA-deficient phenotype or is indeed a consequence of its inhibition is something that also needs to be clarified in the future. Also of note here is our previous finding showing that arsenic inhibits the hepatocyte nuclear factor 4 alpha (Pastoret *et al.*, 2013), a protein that binds the FA proteins FANCF and USP1 to exert some of its broad spectrum of established functions (Bolotin *et al.*, 2010).

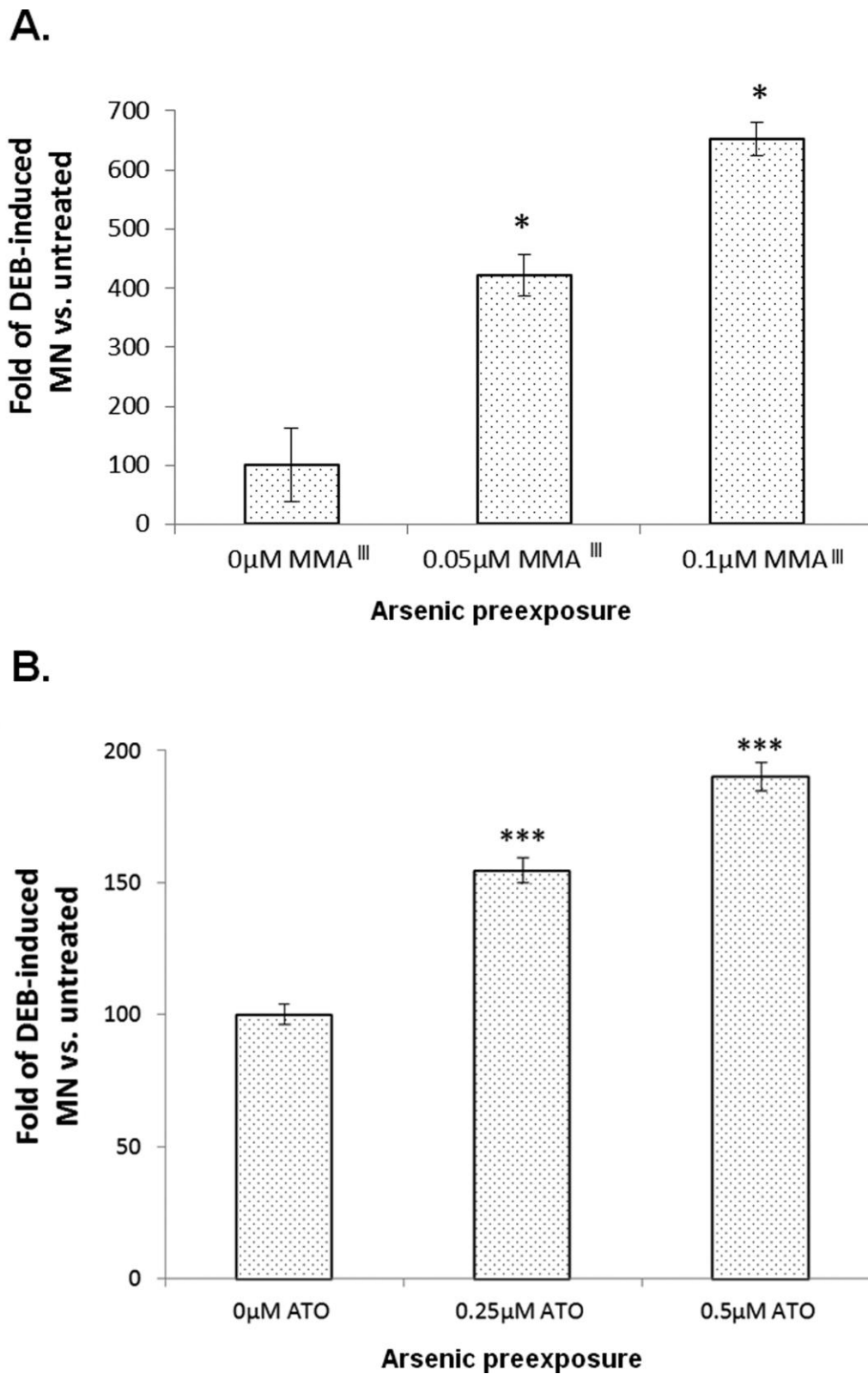
Consequently to our observations, others have previously noticed that cells exposed to arsenic increased their sensitivity to ICL agents. Thus, the levels of chromosome aberrations in normal human lymphocytes treated with low concentrations of arsenite in combination with the potent DNA crosslinking agent DEB produce effects higher than those expected from the simple additive effect (Wiencke and Yager, 1992). Also, combining ATO and a synthetic agent derived from 3a-aza-cyclopenta[a]indene causing DNA ICLs was found to be significantly more effective in killing cancer cells and reducing tumor volumes in nude mice (Lee *et al.*, 2010). Both works suggested DNA repair inhibition as a possible mechanism responsible of their observations, although none of them studied or pointed out the intervention of the FA/BRCA pathway. This is, in fact, the first time that the FA/BRCA pathway is proposed to be affected by arsenic exposure, at least to our knowledge.

Having affected the FA/BRCA repair function will amplify DNA damage caused by other chemical agents producing ICL, such as aldehydes found in tobacco smoke or automotive exhaust, and psoralens found in plants (Cho *et al.*, 2006). Further, it will also increase the effect of agents from a different nature, because the FA/BRCA pathway is involved in other repair mechanisms as it was discussed earlier, and FA patients are hypersensitive to agents causing double-strand breaks (DSBs) such as ionizing radiation (Bremer *et al.*, 2003). Pentavalent arsenic com-

pounds are known to generate DSBs that may persist in S-phase, thereby needing the activation of the FA/BRCA pathway to repair collapsed replication forks. Assuming a realistic human scenario of exposure, the inorganic environmental forms of arsenic As<sup>III</sup> and As<sup>V</sup> would be absorbed and biotransformed to give origin to the organic mono- and di-methylated products MMA<sup>V</sup> and <sup>III</sup> and DMA<sup>V</sup> and <sup>III</sup> in the exposed organism (Vahter, 2002). Derived from this exposure mixture, trivalent arsenicals would reduce the FA/BRCA function that may be needed to repair the lesions produced by the pentavalent forms, thereby aggravating its effects.

Besides of its contribution to the cocarcinogenic mode of action of arsenic, the induced effects in the FA/BRCA pathway also represent a rational explanation to the genomic instability found in cells and human populations chronically exposed to arsenic (Bhattacharjee *et al.*, 2013). The genetic instability found in FA/BRCA-deficient cells makes them prone to the translocation of oncogenes or the deletion of tumor suppressor genes, leading to cancer predisposition (Deans and West, 2011). As it occurs in FA/BRCA-deficient cells, the incidence of point mutations does not seem to be increased after long-term exposure to arsenic, but genomic rearrangements are favored. Thus, a significant increase in the frequency of structural chromosomal aberrations, with ring, dicentric, chromatid exchanges, end-to-end fusion, translocations, chromatid type deletions, acentric fragments, dicentric, and rings were reported from arsenic exposed populations (Banerjee *et al.*, 2007, 2008; Dulout *et al.*, 1996). Also, Moore *et al.* (2002) showed that bladder tumors from arsenic-exposed cancer patients showed significantly higher levels of chromosomal instability compared to tumors from unexposed cancer patients (Moore *et al.*, 2002). As an unstable genome is characteristic feature of cancer cells, this genomic instability derived





**FIG. 6.** Genomic instability of arsenic pretreated cells after acute exposure to DEB. DEB-induced MN frequencies were measured after 72 h of DEB treatment. FA/BRCA- corrected cells preexposed to MMA<sup>III</sup> (A) and ATO (B) show a significantly higher fold increase of DEB-induced MN when compared to that of FA/BRCA-corrected control cells. Data are presented as mean values of independent experiments ( $n = 3$ ). Error bars represent standard error of the mean. \* $p \leq 0.05$  compared with FA/BRCA-corrected cells; \*\*\* $p \leq 0.01$  compared with FA/BRCA-corrected cells.

from DNA repair defects would contribute to arsenic-mediated carcinogenesis. Altogether, the data presented here indicate that environmentally relevant arsenic exposures disrupt the FA/BRCA function, therefore sensitizing cells to those compounds able to block the replication fork by double-strand breaks or ICLs induction. In this sense, findings point out a novel mechanism of arsenic cocarcinogenesis. Concurrently, arsenic-induced genomic instability via FA/BRCA pathway disruption would contribute to arsenic carcinogenic effects directly. Our findings are certainly relevant for the use of arsenicals in cancer therapy, with especial attention to the case of ATO. As it sensitizes cells to ICLs, we suggest that combination chemotherapy of ATO and an ICL-crosslinking agent would increase the response and decrease the likelihood of the cancer becoming resistant. This would therefore be our recommended choice of treatment for drug-resistant tumors susceptible to be treated with ICLagents.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <http://toxsci.oxfordjournals.org/>.

## FUNDING

Generalitat de Catalunya (2009SGR-725); Universitat Autònoma de Barcelona (APOSTA-2011 to A.H., PIF-UAB to J.P.); Spanish Ministry of Education and Science (SAF2008-02933, SAF2011-23146).

## ACKNOWLEDGMENT

We wish to thank Dr B. Annangi for his critical review of this manuscript.

## REFERENCES

- Aposhian, H. V. and Aposhian, M. M. (2006). Arsenic toxicology: Five questions. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1–15.
- Applebaum, K. M., Karagas, M. R., Hunter, D. J., Catalano, P. J., Byler, S. H., Morris, S. and Nelson, H. H. (2007). Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, arsenic exposure, and non-melanoma skin cancer in New Hampshire. *Environ. Health Perspect.* **115**, 1231–1236.
- Asmuss, M., Mullenders, L. H., Eker, A. and Hartwig, A. (2000). Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis* **21**, 2097–2104.
- Avlasevich, S. L., Bryce, S. M., Cairns, S. E. and Dertinger, S. D. (2006). In vitro micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. *Environ. Mol. Mutagen.* **47**, 56–66.
- Bach, J., Sampayo-Reyes, A., Marcos, R. and Hernández, A. (2014). Ogg1 genetic background determines the genotoxic potential of environmentally relevant arsenic exposures. *Arch. Toxicol.* **88**, 585–596.
- Banerjee, M., Sarkar, J., Das, J. K., Mukherjee, A., Sarkar, A. K., Mondal, L. and Giri, A. K. (2007). Polymorphism in the ERCC2 codon 751 is associated with arsenic-induced premalignant hyperkeratosis and significant chromosome aberrations. *Carcinogenesis* **28**, 672–376.
- Banerjee, M., Sarma, N., Biswas, R., Roy, J., Mukherjee, A. and Giri, A. K. (2008). DNA repair deficiency leads to susceptibility to develop arsenic-induced premalignant skin lesions. *Int. J. Cancer* **123**, 283–287.
- Bhattacharjee, P., Banerjee, M. and Giri, A. K. (2013). Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ. Int.* **53**, 29–40.
- Bogliolo, M., Lyakhovich, A., Callén, E., Castellà, M., Cappelli, E., Ramírez, M. J., Creus, A., Marcos, R., Kalb, R., Neveling, K., et al. (2007). Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J.* **26**, 1340–1351.
- Bolotin, E., Liao, H., Ta, T. C., Yang, C., Hwang-Versluis, W., Evans, J. R., Jiang, T. and Sladek, F. M. (2010). Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4alpha target genes using protein binding microarrays. *Hepatology* **51**, 642–653.
- Bremer, M., Schindler, D., Gross, M., Dörk, T., Morlot, S. and Karstens, J. H. (2003). Fanconi's anemia and clinical radiosensitivity report on two adult patients with locally advanced solid tumors treated by radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* **179**, 748–753.
- Cho, Y. J., Wang, H., Kozekov, I. D., Kurtz, A. J., Jacob, J., Voehler, M., Smith, J., Harris, T. M., Lloyd, R. S., Rizzo, C. J., et al. (2006). Stereospecific formation of interstrand carbinolamine DNA crosslinks by crotonaldehyde- and acetaldehyde-derived alpha-CH3-gamma-OH-1,N2-propano-2'-deoxyguanosine adducts in the 5'-CpG-3' sequence. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 195–208.
- Cole, A. R., Lewis, L. P. C. and Walden, H. (2010). The structure of the catalytic subunit FANCL of the Fanconi anemia core complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 294–298.
- Deans, A. J. and West, S. C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 467–480.
- Ding, W., Liu, W., Cooper, K. L., Qin, X.-J., de Souza Bergo, P. L., Hudson, L. G. and Liu, K. J. (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by arsenite interferes with repair of oxidative DNA damage. *J. Biol. Chem.* **284**, 6809–6817.
- Dulout, F. N., Grillo, C. A., Seoane, A. I., Maderna, C. R., Nilsson, R., Vahter, M., Darroudi, F. and Natarajan, A. T. (1996). Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. *Mutat. Res.* **370**, 151–158.
- Ebert, F., Weiss, A., Bülttemeyer, M., Hamann, I., Hartwig, A. and Schwerdtle, T. (2011). Arsenicals affect base excision repair by several mechanisms. *Mutat. Res.* **715**, 32–41.
- García-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M. S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M. and D'Andrea, A. D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol. Cell* **7**, 249–262.
- Hartwig, A., Blessing, H., Schwerdtle, T. and Walter, I. (2003). Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. *Toxicology* **193**, 161–169.
- Hartwig, A., Groblichhoff, U. D., Beyersmann, D., Natarajan, A. T., Filon, R. and Mullenders, L. H. (1997). Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* **18**, 399–405.
- Hofmann, K. (2009). Ubiquitin-binding domains and their role in the DNA damage response. *DNA Repair* **8**, 544–556.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2012). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres and Dusts, Vol. 100C, pp. 41–93. IARC Press, Lyon.
- Kee, Y. and D'Andrea, A. D. (2010). Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev.* **24**, 1680–1694.

- Kim, H. and D'Andrea, A. D. (2012). Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev.* **26**, 1393–1408.
- Lee, P.-C., Kakadiya, R., Su, T.-L. and Lee, T.-C. (2010). Combination of bifunctional alkylating agent and arsenic trioxide synergistically suppresses the growth of drug-resistant tumor cells. *Neoplasia* **12**, 376–387.
- Mei, N., Lee, J., Sun, X., Xing, J. Z., Hanson, J., Le, X. C. and Weinfeld, M. (2003). Genetic predisposition to the cytotoxicity of arsenic: The role of DNA damage and ATM. *FASEB J.* **17**, 2310–2312.
- Moore, L. E., Smith, A. H., Eng, C., Kalman, D., DeVries, S., Bhargava, V., Chew, K., Moore, D., Ferreccio, C., Rey, O. A., et al. (2002). Arsenic-related chromosomal alterations in bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1688–1696.
- Naujokas, M. F., Anderson, B., Ahsan, H., Aposhian, H. V., Graziano, J. H., Thompson, C. and Suk, W. A. (2013). The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: Update on a worldwide public health problem. *Environ. Health Perspect.* **121**, 295–302.
- Pastoret, A., Marcos, R., Sampayo-Reyes, A., Saucedo-Cardenas, O., Lozano-Garza, G. H. and Hernandez, A. (2013). Inhibition of hepatocyte nuclear factor 1 and 4 alpha (HNF1 $\alpha$  and HNF4 $\alpha$ ) as a mechanism of arsenic carcinogenesis. *Arch. Toxicol.* **87**, 1001–1012.
- Piatek, K., Schwerdtle, T., Hartwig, A. and Bal, W. (2008). Monomethylarsonous acid destroys a tetrathiolate zinc finger much more efficiently than inorganic arsenite: Mechanistic considerations and consequences for DNA repair inhibition. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 600–606.
- Rossman, T. G. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: An integrated approach. *Mutat. Res.* **533**, 37–65.
- Rossman, T. G., Uddin, A. N. and Burns, F. J. (2004). Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **198**, 394–404.
- Shen, S., Lee, J., Cullen, W. R., Le, X. C. and Weinfeld, M. (2009). Arsenite and its mono- and dimethylated trivalent metabolites enhance the formation of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in Xeroderma pigmentosum complementation group A cells. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 382–390.
- Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* **181–182**, 211–217.
- Wiencke, J. K. and Yager, J. W. (1992). Specificity of arsenite in potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane. *Environ. Mol. Mutagen.* **19**, 195–200.
- Wilson, D. M. and Seidman, M. M. (2010). A novel link to base excision repair? *Trends Biochem. Sci.* **35**, 247–252.
- Yamamoto, S., Konishi, Y., Matsuda, T., Murai, T., Shibata, M. A., Matsui-Yuasa, I., Otani, S., Kuroda, K., Endo, G. and 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.
- Ying, S., Myers, K., Bottomley, S., Helleday, T. and Bryant, H. E. (2009). BRCA2-dependent homologous recombination is required for repair of Arsenite-induced replication lesions in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **37**, 5105–5113.
- Zhou, X., Sun, X., Cooper, K. L., Wang, F., Liu, K. J. and Hudson, L. G. (2011). Arsenite interacts selectively with zinc finger proteins containing C3H1 or C4 motifs. *J. Biol. Chem.* **286**, 22855–22863.

3r Estudi

***Arsenic trioxide enhances the antitumor activity of cisplatin in bladder tumor cell line models via inhibition of FA/BRCA repair pathway.***

Manuscrit pendent de publicació



### 3.3. RESUM DEL TERCER ESTUDI

#### **Arsenic trioxide enhances the antitumor activity of cisplatin in bladder tumor cell line models via inhibition of FA/BRCA repair pathway.**

Aquest tercer estudi es deriva dels resultats obtinguts en el treball anterior, on vàrem demostrar que l'arsènic es capaç d'alterar la funció de la ruta FA/BRCA, sensibilitzant les cèl·lules enfront d'agents inductors d'enllaços creuats entre cadenes (ICLs) del DNA.

Actualment, hi ha molts fàrmacs antitumorals que actuen generant aquest tipus de lesions, però en alguns casos deixen de ser efectius degut als elevats efectes secundaris que generen, o bé a l'adquisició de resistències per part dels tumors.

En aquest context, l'objectiu d'aquest tercer estudi ha estat avaluar si diferents concentracions moderades d'arsènic, en combinació amb un agent antitumoral inductor d'ICLs, són beneficioses pel tractament de certs tipus de càncer.

Per provar aquesta hipòtesi, es van seleccionar tres línies cel·lulars de càncer de bufeta (T24, 5637 i SW800) i es van tractar amb una combinació d'ATO, un derivat trivalent de l'arsènic ja comercialitzat pel tractament de la leucèmia promielocítica aguda, i cisplatí, un fàrmac àmpliament utilitzat en la teràpia del càncer de bufeta.

Primer de tot, es va voler confirmar si la combinació de concentracions subtòxiques d'aquests dos compostos era capaç d'alterar la funció normal de la ruta FA/BRCA en les cèl·lules tumorals de bufeta. Així, mitjançant *western blot* i immunofluorescència contra la proteïna FANCD2, es va veure que després del tractament durant 24 hores, les cèl·lules tenien una menor capacitat d'activar la ruta. A continuació, es va avaluar la toxicitat del tractament i els efectes sobre altres paràmetres característics de les cèl·lules tumorals.

Els resultats mostren que, en les tres línies cel·lulars estudiades, l'ATO té un efecte sinèrgic en combinació amb el cisplatí, de manera que disminueix significativament la viabilitat de les cèl·lules exposades, disminueix el nombre de colònies capaces de créixer independentment d'ancoratge a substrat, disminueix la velocitat de migració, la secreció de metalloproteïnases de matriu, i la capacitat d'invasió de les cèl·lules, en comparació amb el tractament de cisplatí en solitari.

Com a conclusió d'aquest estudi es proposa que aquesta estratègia podria ser útil com una nova teràpia contra el càncer de bufeta, ja que per arribar als mateixos resultats

antitumorals serien necessàries dosis de cisplatí més baixes, podent-se evitar, així, els seus efectes secundaris tòxics i els fenòmens de resistència i recurrència observats típicament durant el tractament d'aquest tipus de càncer.

**Arsenic trioxide enhances the antitumor activity of cisplatin in bladder tumor cell line models, via inhibition of FA/BRCA repair pathway.**

**Jana Peremartí<sup>1</sup>, Ricard Marcos<sup>1,2,§</sup>, Alba Hernández<sup>1,2,§</sup>**

<sup>1</sup>Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup>CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Spain.

<sup>§</sup>Corresponding authors at: Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain.

E-mail: [alba.hernandez@uab.cat](mailto:alba.hernandez@uab.cat) (A. Hernández)

[ricard.marcos@uab.es](mailto:ricard.marcos@uab.es) (R. Marcos)

**Running title:** ATO increases the antitumor response to cisplatin via FA/BRCA disruption.



**ABSTRACT**

Arsenic trioxide (ATO) is an inorganic arsenic derivative administered to treat certain types of cancers, although its adverse side effects and unknown mechanism(s) of action may confine its therapeutic effect in clinical practice. Our previous studies demonstrated that ATO is able to inhibit the Fanconi anemia FA/BRCA repair function, sensitizing exposed cells to interstrand crosslinks (ICLs)-inducing agents. The present work aims to determine whether ATO is able to potentiate the antitumor effects of the ICL-inducer cisplatin (CDDP) in bladder cancer cells via FA/BRCA disruption, eventually reducing the need of using high toxic doses to achieve a positive chemotherapeutic response. Thus, SW800, 5637 and T24 cell lines were co-treated with different doses of ATO and CDDP alone or in combination. The FA/BRCA repair pathway integrity was analyzed after the treatments, together with cell viability and several characteristic bladder cancer features. Our results show that ATO co-treatments reduce the cellular capacity to trigger the CDDP-dependent FA/BRCA function in all cases, as indicated by a significant decrease in the FANCD2 ubiquitination and foci formation. Consequently, combinations of ATO and CDDP synergistically induce toxicity in bladder cancer cells, along with a significant decrease in SW800, 5637 and T24 anchorage-independent cell growth, migration capacity, and secretion of matrix metalloproteinases. This is the first study demonstrating the potential beneficial effects of ATO and CDDP combined therapy via FA/BRCA disruption, and opens the door to an alternative strategy to fight against the frequent CDDP-resistant and recurrent bladder tumors.

**Key words:** ATO, cisplatin, bladder cancer, synergism, FA/BRCA repair pathway.

## INTRODUCTION

Inorganic arsenic is a widespread metalloid that can be found in water, soil and air coming from natural or anthropogenic sources. Epidemiological data show an increase in the incidence of cancers of skin, lung, bladder, liver, prostate and kidney in human populations living in arsenic-rich areas (IARC, 2012), although the associated carcinogenic mechanisms remain unclear. Some evidences suggest that pentavalent arsenic can replace phosphate in many biochemical reactions (Jomova et al., 2011; Sattar et al., 2016), but trivalent arsenicals have more potent toxic properties as they can easily react with thiol-containing molecules such as GSH and cysteine (Zhou et al., 2011), leading to inhibition of important biochemical events which could also promote toxicity (Ebert et al., 2011; Shen et al., 2013a, 2013b).

Arsenic trioxide (ATO) is a trivalent inorganic arsenic derivative that despite of its toxicity has been commonly used for its medicinal properties. It was first used by Greeks, Romans and Chinese, and many years later Thomas Fowler developed the *Fowler's solution* for the treatment of asthma, psoriasis, malaria and ulcers, among others, which was used during the 18<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> century. After a period of ATO disuse, the US Food and Drug Administration (FDA) approved in 2000 the use of ATO as a chemotherapy drug to treat relapsed and/or refractory acute promyelocytic leukemia (Lengfelder et al., 2012). This achievement prompted investigators to test if it also can have clinical benefits on solid tumors. Some trials tested the effectiveness of ATO as a single-agent therapy, but no clinical response was documented and most of the patients had severe side-effects due to its toxicity (Subbarayan and Ardalán, 2014). However, when ATO was used in combination therapy results were promising as numerous patients showed partial or complete response with mild side-effects (Lee et al., 2010; Podolsky et al., 2011; Grimm et al., 2012).

Cisplatin (CDDP), a platinum chemotherapeutic agent, is considered among the most potent anticancer drug. It has been used for the treatment of several types of cancers, such as ovarian, testicular, head and neck, non-small cell lung and bladder (Alderden et al., 2006). The major type of lesions that are induced by CDDP are intrastrand DNA crosslinks, being about the 85-90% of the total, but the most harmful effects are produced by interstrand crosslinks (ICLs), although they contribute only a 1-

2% of the total (Köberle et al., 2010; Macciò and Madeddu, 2013). Despite its role as a potent anticancer drug, nowadays CDDP application in certain types of cancer is limited because of its severe toxicity and cellular resistance. Therefore, novel and customized treatment strategies are required to overcome chemotherapeutic drug resistance and to lower the doses of cisplatin needed for a therapeutic response.

ICLs caused by CDDP are repaired by a combination of events from several DNA repair pathways like nucleotide excision repair, homologous recombination, translesion DNA synthesis and, importantly, the Fanconi anemia/BRCA (FA/BRCA) pathway. During the S phase of the cell cycle, the FA/BRCA pathway is activated in response to stalled replication forks for the excision of ICLs, a lesion blocking both cellular replication and transcription (Dong et al., 2015; Lopez-Martinez et al., 2016). The known FA proteins, along with several FA-associated proteins, cooperate in this pathway to detect, unhook and excise DNA cross-links and subsequently repair the double-strand breaks generated during the process (Mamrak et al., 2016). Disruption of this pathway makes cells sensitive to ICLs-inducing agents, such as mitomycin C, hydroxyurea or CDDP (Kim and D'Andrea, 2012). Several authors have described that the inhibition of FA/BRCA pathway is a promising anticancer strategy as it has shown a strong impact on sensitizing cancer cells against CDDP, and a powerful effect on reversing CDDP resistance in several cancer types (Burkitt and Ljungman, 2008; Chen et al., 2015; Dai et al., 2015).

Our previous work demonstrated that long-term exposure to subtoxic concentrations of ATO disrupts the normal FA/BRCA function, inducing a cellular FA/BRCA-deficient phenotype characterized by hypersensitivity to ICLs-inducing agents, enhanced accumulation of cells in the G2/M compartment, decreased monoubiquitinated FANCD2 protein, and increased genomic instability (Peremartí et al., 2014). Our present hypothesis is that the combination therapy with acute doses of ATO plus CDDP would synergistically improve the outcomes obtained from single-agent CDDP therapy, eventually reducing the need of using high toxic CDDP doses.

Three different bladder carcinoma cell lines were used to demonstrate the effectiveness of this new proposed strategy. Bladder cancer (BC) is one of the most prevalent cancers worldwide; it is the 4<sup>th</sup> most common cancer in men and the 11<sup>th</sup> in women (Siegel et al., 2015). Studies show that about 70% of patients develop non-muscle-invasive BC, which tend to be low grade and in some cases they can reappear

but are generally not severe; nevertheless, about 30% of patients present muscle-invasive associated with a high risk of metastatic disease (Kamat et al., 2016). Although first-lane therapy with CDDP produced some promising responses in the treatment of locally invasive tumors, little improvement has been achieved with recurrences, where more than 90% of patients relapse and eventually succumb to their cancer (Yafi et al., 2011). Its nephrotoxicity and disappointing survival data have prompt investigators to improve their achievements by exploring new combinations drugs.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Cell lines and arsenic compounds*

The human transitional BC cell lines SW800, 5637 and T24 were kindly shared by Dra. Esther Julián. Cells were grown in DMEM-F12 medium (Lab Clinics, Barcelona, Spain) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; PAA, Pasching, Austria) and 2.5 µg/mL plasmocin (InvivoGen, CA, USA) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37 °C.

Arsenite trioxide (ATO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and cis-diamineplatinum(II) dichloride (CDDP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used for the different treatments.

### *Cell viability assays*

To test the cellular sensitivity of each cell line to ATO and CDDP, cells were plated in triplicates at  $1 \times 10^5$  cells per well in 12-well plates, incubated overnight in complete medium and placed in fresh medium with increasing concentrations of one or the other compound for 24 h. After treatments, cells were washed twice with PBS and harvested by trypsinization. The number of cells in the resulting cell suspension was counted in a Beckman-Coulter cell counter (Beckman coulter, Brea, CA, USA). The IC<sub>50</sub> and IC<sub>25</sub> were derived from averaging three independent cell viability curves.

When studying the effect of the interaction of ATO and cisplatin, cells were incubated with concentrations close to their IC<sub>50</sub> and IC<sub>25</sub> for each compound, individually or in combination. The potential interactions were evaluated using CalcuSyn software (Version 2.0, Biosoft, Cambridge, UK). The combination index (CI) method of

Chou and Talalay was adopted to define synergism ( $CI < 0.9$ ), additivity ( $CI = 0.9-1.1$ ) or antagonism ( $CI > 1.1$ ) (Chou, 2010).

#### *Total protein extraction and Western blot analysis*

A total of  $1 \times 10^6$  cells were seeded in  $60.8 \text{ cm}^2$  culture dishes, allowed to sit overnight and placed in fresh medium containing the selected concentrations of ATO, CDDP or the combinations for 24 h. Hydroxyurea (HU; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as the positive control, as it is a well-known FA/BRCA pathway activator.

After treatments, cells were harvested by scraping and homogenized in RIPA lysis buffer. The obtained cell extracts were sonicated for 15 s at 20% amplitude on ice and further incubated with 25 U of benzonase (EMD Chemicals Inc, CA, USA). Total protein concentration was measured spectrophotometrically with the BioRad Protein Assay kit (Biorad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Approximately 50  $\mu\text{g}$  of total protein extracts were separated on 6% SDS/PAGE gel and blotted onto PVDF membranes. After blocking the nonspecific binding sites for 3 h with 5% nonfat milk in TTBS, membranes were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with the primary monoclonal antibodies anti-human FANCD2 (ab2187 at 1:2500 dilution) and anti-human VINCULIN (ab18058 at 1:5000 dilution), as loading control. Next, membranes were subjected to three 15-min washes with TTBS and then incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody at a 1:2500 dilution for 1 h at room temperature. The membranes were then washed three times with TTBS and developed using an enhanced chemiluminescence system (Millipore, MA, USA). A relative quantification of protein expression was assessed using the analysis software Genome Tools (Syngene, Cambridge, UK).

#### *Immunohistochemistry*

A total of 200,000 cells were seeded on glass coverslips and incubated overnight before being treated with the indicated concentrations of ATO, CDDP or the combination of the two drugs. After 24 h, medium was removed and cells were incubated with new medium containing 10  $\mu\text{M}$  of EdU for 30 minutes (Click-it® EdU Alexa Fluor 488 Imaging kit, Molecular probes, Eugene, OR, USA). Then, cells were washed with PBS and fixed with 4% formaldehyde for 15 min at room temperature. Fixed cells were permeabilized with

0.5% Triton X-100 (Sigma Co., USA) for 10 min, and after, coverslips were incubated for 15 min at room temperature with a blocking solution consisting of PBS, 5% BSA, and 0.05% Tween-20.

For EdU detection manufacturer's instructions were followed. Anti-FANCD2 (ab2187; 1:250) or anti- $\gamma$ -H2AX (Upstate Millipore; 1:3000) antibodies were diluted in blocking solution, applied to the coverslips, and left to incubate for 1 h at 37 °C. Cells were washed and then incubated with fluorescent secondary antibodies (Alexa Fluor 568, 1:500; Molecular probes, Invitrogen) for 30 min at 37 °C. Finally, coverslips were mounted in VECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) containing DAPI. Slides were analyzed with a fluorescence microscope Axioplan2 (Carl Zeiss). Cells with >5 nuclear foci were considered positive. All the samples were blindly coded before scoring.

#### *Anchorage independent cell growth*

Colony formation in soft-agar was performed in all cell lines after the treatment with ATO, CDDP or the combinations for 24 h, as previously described by us (Bach et al., 2016) to assess cell capacity for anchorage independent growth.

Briefly, treated and control cells were collected and passed through a 30- $\mu$ m mesh to obtain single cell suspensions. Subsequently, 65,000 cells in 1.75 mL of DMEM containing 10% of FBS, 1% NEEA, 1% L-Glu 200 mM and 2.5  $\mu$ g/mL plasmocin were mixed in a 1:1:1 ratio with 2X DMEM containing 20% of FBS, 2% NEEA, 2% L-Glu 200 mM and 2% of penicillin–streptomycin, and with 1.2% of bactoagar (DIFCO, MD, USA). This mixture was enough to prepare triplicates containing 20,000 cells each by dispensing 1.5 mL of the mixture over a 0.6% base agar (in supplemented 2X DMEM) in 35 mm plates.

Plates were allowed to sit for 45 min and then kept in the cell incubator for 14 days. Cells that were able to form colonies were stained by 24 h incubation with 1 mg/mL of (2-p-iodophenyl)3-3(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT; Sigma, MO, USA). Plates were scanned and colony counting was performed using the colony cell counter software OpenCFU version 3.9.0.

### *Wound-healing assay*

A total of 750,000 cells were seeded into T-25 flasks and 24 h later treated with the desired concentrations of ATO, CDDP or the combination of the two drugs for 24 h. Subsequently, cells were washed with PBS, trypsinized and 200,000 cells were seeded in 24-well plates and grown overnight to confluence. Wounds were created using a sterile 2  $\mu$ L pipette tip and cells washed with PBS and replaced with serum-free medium. The rate of cell-covered area was assessed and photographed at 3 h intervals for 37 h with a microscope Axioplan2 (Carl Zeiss). Each value is derived from three randomly selected fields.

### *Secretion of MMP-2 and MMP-9*

A total of 750,000 cells were seeded in T-25 flasks and allowed to sit for 24 h. Cells were treated with the indicated concentrations of ATO, CDDP or the combinations for 24 h, and then medium was replaced by 3 mL of serum-free medium for 72 h. The obtained conditioned media was collected, cleared by centrifugation, concentrated using the Eppendorf centrifugal vacuum concentrator (Sigma, MO, USA) and relativized according to cell number.

For determining the activity of secreted matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) a zymography assay with reagents purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA) was performed. The same medium, used for culturing the cells with 10% of FBS, was used as positive control. Briefly, samples were resolved in 10% precast polyacrylamide gel with gelatin at 100 V for 90 min and then soaked in 1X zymogram renaturing buffer for 30 min. Subsequently, gels were incubated overnight with 1X zymogram developing buffer at 37 °C to achieve maximum sensitivity. Finally, gels were stained with 0.5% of Coomassie brilliant blue R-250 for 1 h and destained in 40% methanol and 10% acetic acid, until the areas of protease activity appeared as clear bands. Bands were quantified densitometrically using the ImageJ analysis program.

### *Statistical analysis*

Unpaired Student's *t*-test or analysis of variance followed by Dunnett multiple comparison test was performed, as appropriate, for comparisons between the different

groups or treatments. In all cases, a two-sided  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

Our previously published findings indicated that long-term exposure to low doses of ATO induced, in normal cells, a cellular phenotype similar to that of FA/BRCA-deficient cells. Thus, ATO exposed cells become hypersensitive to ICLs, showing an abnormal arrest in G2/M phase and are unable to properly activate the FA/BRCA repair pathway after exposure to chemicals known to trigger this repair function (Peremartí et al., 2014). These findings had interesting implications in arsenic-based cancer therapy since combined chemotherapy using ATO would be expected to increase the response to ICL-crosslinking agents such as CDDP. Indeed, we propose here that co-treatment with ATO and CDDP would increase the anticancer response at lower CDDP doses, eventually diminishing its toxic associated side-effects and the likelihood of the cancer becoming resistant. As BC is commonly treated with CDDP and recurrence is often observed in CDDP treated patients, three different BC cell lines were co-treated here with ATO and CDDP to test our hypothesis.

### ***ATO and CDDP toxicity in bladder cancer cells***

The effect of ATO and CDDP 24h-treatment was first assessed in SW800, 5637 and T24 BC cell lines. For this, each cell line was treated separately with increasing concentrations of the two compounds, ranging from 1 to 5  $\mu\text{M}$  of ATO or 1 to 8  $\mu\text{M}$  of CDDP in the case of SW800, from 2 to 30  $\mu\text{M}$  of ATO and 1 to 100  $\mu\text{M}$  of CDDP for 5637 cells and, finally, from 0.5 to 20  $\mu\text{M}$  of ATO and 1 to 200  $\mu\text{M}$  of CDDP for T24 cells. Cell viability was reduced in a dose-dependent manner after treatments lasting for 24 h, as shown in Supplementary Figure 1. The  $\text{IC}_{50}$  values found for ATO in SW800, 5637 and T24 were  $1.58 \pm 0.35 \mu\text{M}$ ,  $5.87 \pm 1.15 \mu\text{M}$ , and  $6.16 \pm 0.34 \mu\text{M}$ , respectively; whereas for CDDP were  $2.46 \pm 0.66 \mu\text{M}$ ,  $18.05 \pm 4.16 \mu\text{M}$ , and  $42.22 \pm 3.30 \mu\text{M}$ . The selected cell lines show a differential cytotoxicity behavior after the exposure, being SW800 cells the most sensitive to both compounds and T24 cells the most resistant, especially with



CDDP. For subsequent combined treatments several concentrations of each compound with viability over 50%, were used for each cell line.

***ATO co-treatment disrupts the CDDP-dependent FA/BRCA pathway activation in bladder cancer cells***

To assess the FA/BRCA function, SW800, 5637 and T24 BC cells were exposed to the selected concentrations of ATO, CDDP and its combination for 24 h, and then the monoubiquitination (ub) of FANCD2 by western blot was determined, as a measure of FA/BRCA pathway activation. Unexposed cells and cells treated with ATO alone presented the basal situation where non-ub FANCD2 is much more abundant than the ub-FANCD2 form, as shown in Figure 1. Conversely, when cells were exposed to 2 mM of hydroxyurea (HU; positive control) or the selected doses of CDDP, we observed an expected significant increase in the percentage of ub-FANCD2, being indicative of FA/BRCA pathway activation. Noteworthy, this observed CDDP-dependent ubiquitination of FANCD2 was significantly decreased when the same doses of CDDP were used in combination with ATO treatment, evidencing that the inhibitory effect of ATO towards the FA/BRCA function previously described by us is reproducible under the experimental doses and cell systems used in the current study. As observed in Figure 1, the inhibitory effect was present in all three cell lines and doses used, ranging from 1.5 to 2.5-fold in SW800 cells ( $P < 0.05$  in both cases), from 2.5 to 6-fold in 5637 cells ( $P < 0.05$  in all cases), and from 1.4 to 1.5-fold in T24 cells ( $P < 0.05$  in both cases).

Since it is known that FANCD2 forms nuclear foci at DNA damage sites that can be detected by immunofluorescence, we assessed the FANCD2 nuclear foci formation in all three cell lines after 24 h of the different treatments to further demonstrate the disruption of the FA/BRCA function by ATO. Results showed a dose-dependent increase of the number of cells with more than five FANCD2 foci after CDDP-treatments (Figure 2), but the number of foci dropped to levels close to non-treated cells when CDDP was used in combination with ATO treatment (see Figure 2 for quantitative data and Supplementary Figure 2 for representative immunofluorescent images). The obtained results were in concordance with western blot data. Importantly, the  $\gamma$ -H2AX expression, commonly measured by immunofluorescent foci staining as a double-strand

breaks marker, was found to be increased in all treatments (see Supplementary Figure 3), ruling out the possibility of having a decreased FA/BRCA function due to a diminution of the damage.

#### ***ATO co-treatment enhances CDDP-induced cell death in bladder cancer cells***

Evaluation of combination therapy effect on cell viability was studied after 24-h treatment with ATO, CDDP or its combination. In all three BC cell lines, results showed a significant reduction of cell viability when CDDP was used in combination with ATO treatment when compared to CDDP-treatment alone, as shown in Figure 3.

SW800 cells showed the major decrease in viability, changing from  $62\% \pm 5.3$  and  $48\% \pm 8.5$  in 1.5 and 2  $\mu\text{M}$  CDDP treatments to  $27\% \pm 7.1$  ( $P < 0.001$ ) and  $22\% \pm 13.3$  ( $P < 0.001$ ) in the combination therapy. To further confirm this reduction, even lower concentrations for each compound were chosen with a viability of  $86\% \pm 4.83$  in ATO 0.5  $\mu\text{M}$  and  $92\% \pm 3.43$  in CDDP 0.5  $\mu\text{M}$ . When these subtoxic ATO and CDDP concentrations were combined, a 1.7-fold decrease was observed giving a viability of  $55 \pm 2.8\%$ . Regarding the other cell lines, 5637 and T24, the decreasing folds of viability were similar being around 2-, 1.7- and 1.3-folds for each combined treatment compared to its corresponding CDDP-treatment alone. Of interest here, are the differences on cell behavior, whereas in SW800 and 5637 cells a CDDP-induced cell death can be observed, in T24 a reduced proliferation rate was easily recognized.

The effect of ATO and cisplatin interaction was evaluated by calculating the combination index (CI), according to Chou-Talalay method (Chou, 2010) where synergism was defined by  $CI < 0.9$ , additivity by  $CI = 0.9 - 1.1$  and antagonism by  $CI > 1.1$ . In most of the concentrations chosen for BC cell lines, the CDDP-induced cell death was synergistically increased by the combination with ATO (Table 1). Notably, no antagonistic effects were observed in any of the used cell lines.

**Table 1.** Synergistic effect of CDDP and ATO treatment on proliferation of SW800, 5637 and T24 cell lines.

SW800		5637		T24	
Concentration	CI	Concentration	CI	Concentration	CI
0.5 ATO + 0.5 CDDP	0.575	1.8 ATO + 4 CDDP	0.965	1 ATO + 2 CDDP	0.684
1 ATO + 1.5 CDDP	0.584	1.8 ATO + 11 CDDP	0.805	1 ATO + 13 CDDP	0.772
1 ATO + 2 CDDP	0.567	1.8 ATO + 30 CDDP	0.896	1 ATO + 25 CDDP	0.658
		5.5 ATO + 4 CDDP	0.976	3 ATO + 2 CDDP	0.475
		5.5 ATO + 11 CDDP	0.458	3 ATO + 13 CDDP	0.711
		5.5 ATO + 30 CDDP	0.503	3 ATO + 25 CDDP	0.938

#### ***ATO and CDDP co-treatment reduce carcinogenic phenotypic features in bladder cancer cells***

To demonstrate the tumor suppressive effects of the ATO and CDDP co-treatment, the ability of treated BC cells to form colonies able to grow independently of a solid surface was assessed by implementing the soft-agar assay. Results showed that unexposed cells, as it is expected in cancer cell lines, have a great capacity of forming colonies, being around 400 colonies in SW800 cells and around 6000 colonies in 5637 and T24 cells. Also, a different trend in colony size was observed while SW800 colonies were big and clear, 5637 and T24 colonies were smaller and very abundant, as shown in Figure 4D.

After colony quantification, slight and no relevant changes were seen in cells exposed to ATO-treatment alone, but significantly lower number of colonies were observed for CDDP alone, highlighting the anticancer effect of this drug.

Interestingly, we found that the number of colonies after the combined treatment significantly dropped in all three cell lines. For SW800 cells the observed fold decreases were 6.8 in ATO 0.5+CDDP 0.5, 3.5 in ATO 1+CDDP 1.5 and 2.5 in ATO 1+CDDP 2. For 5637 cells the fold decreases were 1.18 in ATO 5.5+CDDP 4 and 2.8 in ATO 5.5+CDDP 11.

Finally, for T24 cells the obtained fold decreases were 1.4 in ATO 1+CDDP 2, 3.5 in ATO 1+CDDP 13, 1.56 in ATO 3+CDDP 2, and 5.56 in ATO 3+CDDP 13. All values attaining statistical significance.

To study cell migration ability, another important hallmark of cancer, the wound healing assay was performed. BC cell lines displayed different migratory capacities during wound healing. Unexposed SW800 cells seemed to migrate randomly and after 24 h displayed a 73% of the initial wound area covered. Otherwise non-treated 5637 and T24 showed a cohesive unidirectional migration, and they filled around the 68% and 50%, respectively, of the wound area. According to these results SW800 and 5637 were the cell lines with the faster migration capacity.

The percent of cell-covered area 24 h after the wounds were made was quantified for each treatment (Figure 5). In SW800 cells, ATO-treatment alone seemed to have no effect on migration capacity when compared to unexposed cells, while CDDP treatment inhibited the migration capacity of cells in a dose-dependent manner, being very significant in CDDP 2  $\mu$ M where some signs of apoptosis can be observed. When the same doses of CDDP were used in combination with ATO treatment, an important decrease of cell-covered area was evident changing from 55% in 1.5  $\mu$ M CDDP to 20% in ATO 1+CDDP 1.5  $\mu$ M. Almost no cellular migratory ability was observed in ATO 1+CDDP 2  $\mu$ M exposed cells. With regard to 5637 and T24 cell lines no differences were observed in cells exposed to ATO alone or the lowest dose of CDDP, whereas in its combination a decrease of around 17% in the cell-covered area was observed compared to CDDP-alone treatment. The same effect was observed with the highest concentration of CDDP.

Another key aspect of tumor cells playing a major role in cancer metastasis and cancer progression is the expression of matrix metalloproteinases (MMP). When the secreted MMPs activity was evaluated in SW800 cells, a drop was observed in the ATO+CDDP-exposed cells compared to the corresponding CDDP-treatment alone, being of 1.57-folds ( $P<0.05$ ) lower in the case of ATO 1+CDDP 1.5  $\mu$ M and 2-folds ( $P<0.05$ ) in ATO 1+CDDP 2  $\mu$ M (Figure 6A). For 5637 cells no effects were observed in cells exposed to ATO or CDDP alone, but when cells were treated with ATO and the increasing concentrations of CDDP, a decrease of 1.55- ( $P<0.05$ ), 1.62- ( $P<0.05$ ) and 1.6-fold ( $P<0.05$ ) in the percent of secreted MMPs in each treatment can be observed (Figure 6B). A similar pattern was observed in T24 cells, where no changes were observed with

the drugs alone whereas a decrease of 1.47-fold ( $P<0.05$ ) was present in ATO3+CDDP 13 and 1.88-fold ( $P<0.001$ ) in ATO3+CDDP25 (Figure 6C).

## DISCUSSION

Bladder cancer (BC) is one of the most prevalent cancers in the world (Siegel et al., 2015). There are several risk factors linked to this malignancy but the most relevant are those associated with environmental exposures, being smoking one of the most important risk factors (Kaufman et al., 2009). Epidemiological data suggest that around 70% of patients develop non-muscle-invasive BC, which tend to be low grade and generally not severe. The initial strategy with these patients is transurethral resection to remove all visible tumors, sometimes followed by intravesical chemotherapy, which is showing promising results with these kind of local tumors (Kamat et al., 2016). However, about 30% of BC patients present muscle-invasive cancers associated with high risk of metastasis, most of them tending to be high grade. Radical cystectomy, often preceded by neoadjuvant chemotherapy, particularly cisplatin-based, is generally considered the standard of care for these invasive tumors. However, single-agent therapy with platinum-based drugs, give negative outcomes due to its discouraging survival rates. This has prompt researchers to investigate new combination therapies, whereby gemcitabine-cisplatin treatment has become the standard regime for patients with high grade invasive tumors. Despite high rates of tumor response and survival benefit with cisplatin-based combination therapy, certain patients are not suitable for this treatment because of its significant side effects that have to be considered for future studies (Yafi et al., 2011). Moreover, high rates of recurrence have been found for both non-muscle-invasive and muscle-invasive tumors, where some tumors lose their sensitivity to cisplatin and develop resistance. Thus, new strategies are needed to prevent or reverse cisplatin resistance in BC patients.

Although arsenic is a widely spread environmental contaminant mainly known for its toxic properties, it has been used as a medicine for over 2,400 years (Kritharis et al., 2013). The role of arsenic, specifically the trivalent compound arsenic trioxide (ATO), has emerged nowadays as a therapeutic agent, and its effectiveness has been demonstrated in several cases of acute promyelocytic leukemia (APL), where patients achieved

complete remission of the disease (Lengfelder et al., 2012). After several trials with positive results, ATO was approved by the Food and Drug Administration (FDA) of the United States, in 2000, for its use in cases of relapsed APL.

Our previous study (Peremartí et al., 2014) showed how trivalent arsenic compounds are able to interfere with the FA/BRCA DNA repair pathway. These findings are certainly relevant for the use of arsenicals in cancer therapy. As arsenic sensitizes cells to those compounds able to block the replication fork by double-strand breaks or ICLs induction, we proposed that combinations of ATO and a crosslinking agent would increase the chemotherapy response and improve outcomes by lowering the associated toxicity side-effects. According to that, the goal of the present study is to determine whether the combination of ATO and cisplatin, would synergistically improve the outcomes obtained from single-agent cisplatin therapy.

Our results show that after the exposure to a combination of environmentally relevant doses of ATO and cisplatin in BC cell lines, their ability to repair DNA damage caused by cisplatin is compromised. This is achieved by a significant decrease in the amount of monoubiquitinated FANCD2 protein, as well as a reduced number of induced FANCD2-foci, being both events correlated with a low activation of the route. Some evidences suggest that part of the chemoresistance against cisplatin, developed by certain tumors types, are due to a high expression of the FA/BRCA pathway (Nakashima et al., 2015). In this way, downregulation of the pathway could be a good strategy to overcome this chemoresistance. Similar results have been reported in literature. The natural compound curcumin sensitized human ovarian and breast cancer cells to cisplatin (Chirnomas et al., 2006), reversed multidrug resistance of multiple myeloma cell lines (Xiao et al., 2010), and enhanced the proliferation inhibitory effect and apoptosis of cisplatin in resistant lung cancer cells (Chen et al., 2015). In all these cases the effects were associated with a FA/BRCA pathway inhibition. In addition, FANCD2 monoubiquitination and nuclear foci formation were downregulated in the presence of curcumin plus cisplatin, together with an elevated induction of apoptosis. Furthermore, Burkitt and Ljungman (2008) suggested that phenylbutyrate may have therapeutic utility as a cisplatin sensitizer in head and neck cancer by also inhibiting the FA/BRCA pathway, through the downregulation of BRCA1.

Cells exposed to the combination therapy showed a significant decrease in viability compared to ATO and cisplatin-single treatments. In fact, a synergistic effect was found in most of the used concentrations in all three cell lines. However, in the co-treatments there are still a 20-30% of surviving cells that could be responsible for tumor relapse. To check the carcinogenic potential of these remaining cells, we evaluated several hallmarks of cancer. Our results indicate that the ATO/cisplatin co-treatment decreases the number of colonies able to grow in soft-agar, as well as the cell migration rate, the MMP secretion, and the cell invasion capacity. Therefore, despite the ability of these cells to overcome the combined treatment, its carcinogenic potential is significantly decreased. Although there may be other mechanisms involved, we suggest that this enhancement of cisplatin toxicity is mainly due to the inhibition of the FA/BRCA pathway exerted by ATO. Consequently, cells cannot repair the damage and its viability is compromised. This synergistic effect would suppose a reduction in the concentrations to be used of the individual drugs, which would decrease the associated side-effects and the acquired resistance of tumors.

Currently few studies on the combined effect of ATO and cisplatin have been reported. Such studies used different tumor targets as hepatocellular carcinoma (Wang et al., 2001), ovarian cancer (Zhang et al., 2009), head and neck squamous cell cancer (Kotowski et al., 2012), lung cancer (Zheng et al., 2013), oral squamous cell carcinoma (Nakaoka et al., 2014), or osteosarcoma (Saitoh et al., 2016). Nevertheless, no previous studies have been reported using BC. This means that this is the first study demonstrating that combination therapy of cisplatin plus ATO shows synergistic effects compared to cisplatin-single therapy in the BC treatment. This gives relevant importance to our study showing the potential use of arsenicals in chemotherapy.

**Funding:** This work was supported by the *Universitat Autònoma de Barcelona* [APOSTA-2011 to A.H. and PIF-UAB to J.P.] and the Spanish Ministry of Education and Science [SAF2008-02933 and SAF2011-23146].

**Acknowledgements:** We wish to thank Maria José Ramírez for her advice on different parts of the experimental task.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**REFERENCES**

- Alderden, R.A., Hall, M.D., and Hambley, T.W. (2006). The Discovery and Development of Cisplatin. *J. Chem. Educ.* *83*, 728.
- Burkitt, K., and Ljungman, M. (2008). Phenylbutyrate interferes with the Fanconi anemia and BRCA pathway and sensitizes head and neck cancer cells to cisplatin. *Mol. Cancer* *7*, 24.
- Chen, P., Li, J., Jiang, H.-G., Lan, T., and Chen, Y.-C. (2015). Curcumin reverses cisplatin resistance in cisplatin-resistant lung cancer cells by inhibiting FA/BRCA pathway. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *36*, 3591–3599.
- Chirnomas, D., Taniguchi, T., de la Vega, M., Vaidya, A.P., Vasserman, M., Hartman, A.-R., Kennedy, R., Foster, R., Mahoney, J., Seiden, M.V., et al. (2006). Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 952–961.
- Chou, T.-C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* *70*, 440–446.
- Dai, C.-H., Li, J., Chen, P., Jiang, H.-G., Wu, M., and Chen, Y.-C. (2015). RNA interferences targeting the Fanconi anemia/BRCA pathway upstream genes reverse cisplatin resistance in drug-resistant lung cancer cells. *J. Biomed. Sci.* *22*, 77.
- Dong, H., Nebert, D.W., Bruford, E.A., Thompson, D.C., Joenje, H., and Vasiliou, V. (2015). Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Hum. Genomics* *9*.
- Ebert, F., Weiss, A., Bültemeyer, M., Hamann, I., Hartwig, A., and Schwerdtle, T. (2011). Arsenicals affect base excision repair by several mechanisms. *Mutat. Res.* *715*, 32–41.
- Grimm, S.A., Marymont, M., Chandler, J.P., Muro, K., Newman, S.B., Levy, R.M., Jovanovic, B., McCarthy, K., and Raizer, J.J. (2012). Phase I study of arsenic trioxide and temozolomide in combination with radiation therapy in patients with malignant gliomas. *J. Neurooncol.* *110*, 237–243.
- IARC, I.A. for R. on C. (2012). Arsenic, metals fibres and dusts. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. *Int. Agency Res. Cancer Lyon* *100 C*.
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C.J., and Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol. JAT* *31*, 95–107.
- Kamat, A.M., Hahn, N.M., Efstathiou, J.A., Lerner, S.P., Malmström, P.-U., Choi, W., Guo, C.C., Lotan, Y., and Kassouf, W. (2016). Bladder cancer. *The Lancet* *388*, 2796–2810.
- Kaufman, D.S., Shipley, W.U., and Feldman, A.S. (2009). Bladder cancer. *The Lancet* *374*, 239–249.



- Kim, H., and D'Andrea, A.D. (2012). Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev.* *26*, 1393–1408.
- Köberle, B., Tomicic, M.T., Usanova, S., and Kaina, B. (2010). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* *1806*, 172–182.
- Kotowski, U., Heiduschka, G., Brunner, M., Erovic, B.M., Martinek, H., and Thurnher, D. (2012). Arsenic trioxide enhances the cytotoxic effect of cisplatin in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol. Lett.* *3*, 1326–1330.
- Kritharis, A., Bradley, T.P., and Budman, D.R. (2013). The evolving use of arsenic in pharmacotherapy of malignant disease. *Ann. Hematol.* *92*, 719–730.
- Lee, P.-C., Kakadiya, R., Su, T.-L., and Lee, T.-C. (2010). Combination of bifunctional alkylating agent and arsenic trioxide synergistically suppresses the growth of drug-resistant tumor cells. *Neoplasia N. Y. N* *12*, 376–387.
- Lengfelder, E., Hofmann, W.-K., and Nowak, D. (2012). Impact of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* *26*, 433–442.
- Lopez-Martinez, D., Liang, C.-C., and Cohn, M.A. (2016). Cellular response to DNA interstrand crosslinks: The Fanconi anemia pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 3097–3114.
- Macciò, A., and Madeddu, C. (2013). Cisplatin: an old drug with a newfound efficacy -- from mechanisms of action to cytotoxicity. *Expert Opin. Pharmacother.* *14*, 1839–1857.
- Mamrak, N.E., Shimamura, A., and Howlett, N.G. (2016). Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Rev.*
- Nakaoka, T., Ota, A., Ono, T., Karnan, S., Konishi, H., Furuhashi, A., Ohmura, Y., Yamada, Y., Hosokawa, Y., and Kazaoka, Y. (2014). Combined arsenic trioxide-cisplatin treatment enhances apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Cell. Oncol. Dordr.* *37*, 119–129.
- Nakashima, S., Kobayashi, S., Nagano, H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Asaoka, T., Hama, N., Wada, H., Kawamoto, K., Marubashi, S., et al. (2015). BRCA/Fanconi anemia pathway implicates chemoresistance to gemcitabine in biliary tract cancer. *Cancer Sci.* *106*, 584–591.
- Peremartí, J., Ramos, F., Marcos, R., and Hernández, A. (2014). Arsenic exposure disrupts the normal function of the FA/BRCA repair pathway. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *142*, 93–104.
- Podolsky, L., Oh, M., Subbarayan, P.R., Francheschi, D., Livingstone, A., and Ardalan, B. (2011). 5-Fluorouracil/Leucovorin and arsenic trioxide for patients with

- refractory/relapsed colorectal carcinoma: a clinical experience. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *50*, 602–605.
- Saitoh, Y., Setoguchi, T., Nagata, M., Tsuru, A., Nakamura, S., Nagano, S., Ishidou, Y., Nagao-Kitamoto, H., Yokouchi, M., Maeda, S., et al. (2016). Combination of Hedgehog inhibitors and standard anticancer agents synergistically prevent osteosarcoma growth. *Int. J. Oncol.* *48*, 235–242.
- Sattar, A., Xie, S., Hafeez, M.A., Wang, X., Hussain, H.I., Iqbal, Z., Pan, Y., Iqbal, M., Shabbir, M.A., and Yuan, Z. (2016). Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *48*, 214–224.
- Shen, S., Li, X.-F., Cullen, W.R., Weinfeld, M., and Le, X.C. (2013a). Arsenic binding to proteins. *Chem. Rev.* *113*, 7769–7792.
- Shen, S., Wang, C., Weinfeld, M., and Le, X.C. (2013b). Inhibition of nucleotide excision repair by arsenic. *Chin. Sci. Bull.* *58*, 214–221.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA. Cancer J. Clin.* *65*, 5–29.
- Subbarayan, P.R., and Ardalan, B. (2014). In the war against solid tumors arsenic trioxide needs partners. *J. Gastrointest. Cancer* *45*, 363–371.
- Wang, W., Qin, S.-K., Chen, B.-A., and Chen, H.-Y. (2001). Experimental study on antitumor effect of arsenic trioxide in combination with cisplatin or doxorubicin on hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* *7*, 702–705.
- Xiao, H., Xiao, Q., Zhang, K., Zuo, X., and Shrestha, U.K. (2010). Reversal of multidrug resistance by curcumin through FA/BRCA pathway in multiple myeloma cell line MOLP-2/R. *Ann. Hematol.* *89*, 399–404.
- Yafi, F.A., North, S., and Kassouf, W. (2011). First- and second-line therapy for metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Curr. Oncol.* *18*, e25–e34.
- Zhang, N., Wu, Z.-M., McGowan, E., Shi, J., Hong, Z.-B., Ding, C.-W., Xia, P., and Di, W. (2009). Arsenic trioxide and cisplatin synergism increase cytotoxicity in human ovarian cancer cells: therapeutic potential for ovarian cancer. *Cancer Sci.* *100*, 2459–2464.
- Zheng, C., Lam, S., Li, Y., Fong, B.M., Mak, J.C., and Ho, J.C. (2013). Combination of arsenic trioxide and chemotherapy in small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* *82*, 222–230.
- Zhou, X., Sun, X., Cooper, K.L., Wang, F., Liu, K.J., and Hudson, L.G. (2011). Arsenite interacts selectively with zinc finger proteins containing C3H1 or C4 motifs. *J. Biol. Chem.* *286*, 22855–22863.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** FANCD2 monoubiquitination quantification as a trait of FA/BRCA pathway activation in SW800 (A), 5637 (B) and T24 (C) cell lines treated with ATO, CDDP or the combinations at the indicated concentrations for 24 h. Representative western-blot images from all three cell lines are shown (D). Cells with the combined treatment fail to activate FANCD2 to the same extent than the corresponding CDDP treatment alone. Hydroxyurea exposure was used as a positive control. Equal loading was assessed by immunoblotting with anti-vinculin antibody. Data are presented as mean values of independent experiments (n=3). Error bars represent standard error of the mean. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.005$  and \*\*\* $P \leq 0.001$ , compared to non-treatment. <sup>+</sup> $P \leq 0.05$  compared to ATO treatment. <sup>~</sup> $P \leq 0.05$  compared to CDDP treatment.

**Figure 2.** FANCD2 nuclear foci formation induced by different ATO and CDDP combined treatments was analyzed by immunofluorescent staining in SW800 (A), 5637 (B) and T24 (C) cell lines. Percentages of cells containing five or more FANCD2 nuclei foci were determined under a fluorescent microscope. Cells with the combined treatment showed significant low levels of FANCD2 nuclear foci. Data are presented as mean values of independent experiments (n=3). Error bars represent standard error of the mean. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.005$  and \*\*\* $P \leq 0.001$  compared to non-treatment. <sup>+</sup> $P \leq 0.05$  compared to ATO treatment. <sup>~</sup> $P \leq 0.05$  and <sup>~</sup> $P \leq 0.005$  compared to CDDP treatment.

**Figure 3.** Effect of ATO and CDDP combinations on cell viability of SW800 (A), 5637 (B) and T24 (C) cell lines. Cells were treated with the indicated concentrations of ATO and/or CDDP for 24 h and cell viability was assessed by the Beckman counter method. In all three cell lines, combined treatments show a significant decrease in cell viability. Data are presented as mean values of independent experiments (n=3). Error bars represent standard error of the mean. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.005$  and \*\*\* $P \leq 0.001$ , compared to non-treatment. <sup>++</sup> $P \leq 0.005$  and <sup>+++</sup> $P \leq 0.001$ , compared to ATO treatment. <sup>~</sup> $P \leq 0.05$ , <sup>~</sup> $P \leq 0.005$  and <sup>~</sup> $P \leq 0.001$  compared to CDDP treatment.

**Figure 4.** Anchorage-independent growth quantification in SW800 (A), 5637 (B) and T24 (C) cells after exposure to different concentrations of ATO and/or CDDP. Representative soft-agar colonies from all three cell lines are shown (D). The tumor cell colony formation assay shows a significant decrease in the number of colonies after the combined treatments. Data are presented as mean values of independent experiments (n=3). Error bars represent standard error of the mean. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.005$  and \*\*\* $P \leq 0.001$ , compared to non-treatment. + $P \leq 0.05$  and +++ $P \leq 0.001$  compared to ATO treatment. ~ $P \leq 0.05$ , ~~ $P \leq 0.005$  and ~~~ $P \leq 0.001$  compared to CDDP treatment.

**Figure 5.** Wound healing assay assessing migration capacity of SW800 (A), 5637 (B) and T24 (C) cells after 24 h of ATO and/or CDDP treatment. The percent of cell-covered area was assessed at 3 h intervals for a total of 32 h. The assay shows a significant decrease in the cellular migration capacity after the combined treatments. Data are presented as mean values of independent experiments (n=3). Error bars represent standard error of the mean. \* $P \leq 0.05$  and \*\*\* $P \leq 0.001$  compared to non-treatment. + $P \leq 0.05$ , ++ $P \leq 0.005$  and +++ $P \leq 0.001$ , compared to ATO treatment. ~ $P \leq 0.05$  and ~~~ $P \leq 0.001$  compared to CDDP treatment.

**Figure 6.** Effects of different ATO and CDDP combined treatments on MMPs secretion in SW800 (A), 5637 (B) and T24 (C) cells. Gelatin zymography performed with conditioned media showed a decrease in the expression of MMPs after the combined treatments. Data are presented as mean values of independent experiments (n=3). Error bars represent standard error of the mean. \* $p \leq 0.05$  compared to no treatment. \*\* $p \leq 0.005$  compared to no treatment. \*\*\* $p \leq 0.001$  compared to no treatment. + $p \leq 0.05$  compared to ATO treatment. ~ $p \leq 0.05$  compared to CDDP treatment.

FIGURES

Figure 1.

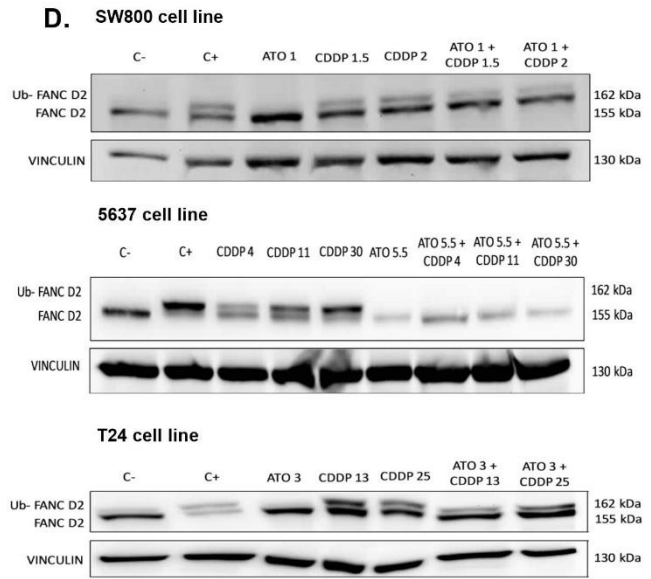
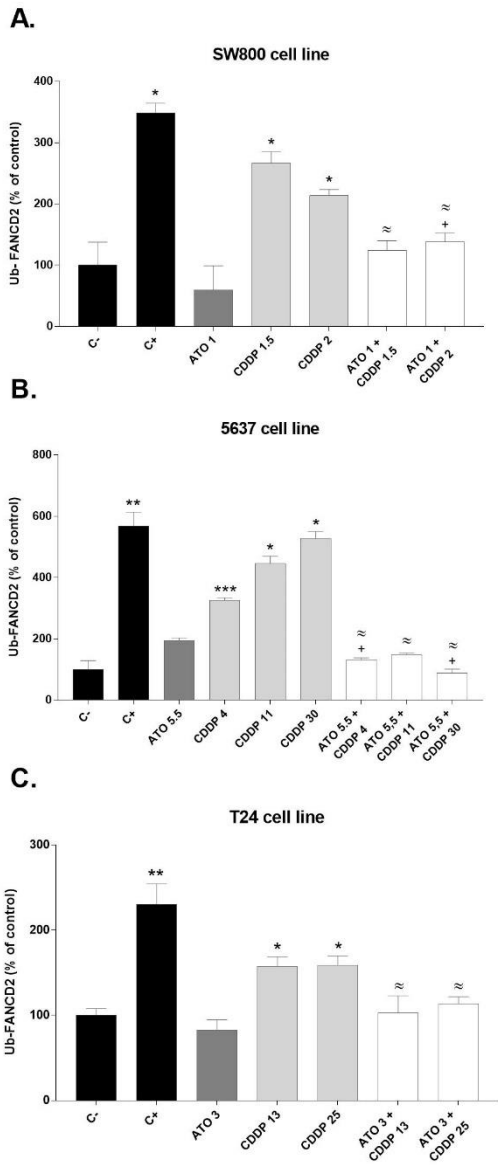


Figure 2.

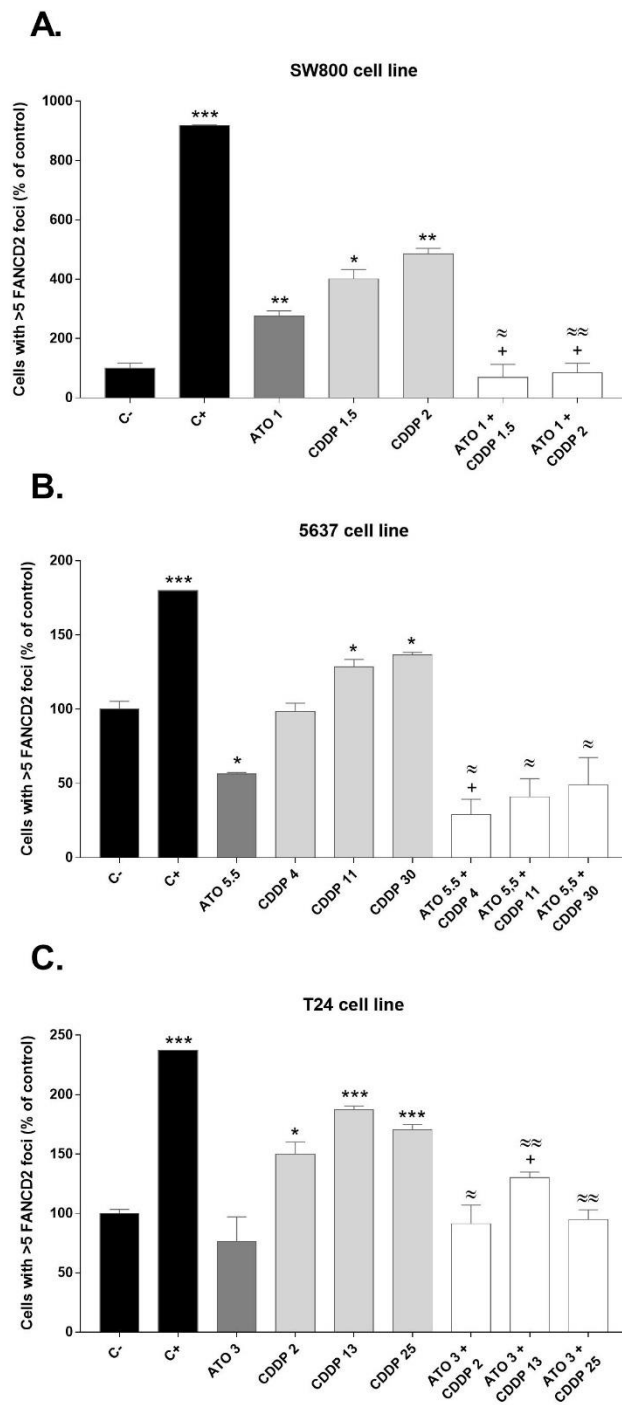


Figure 3.

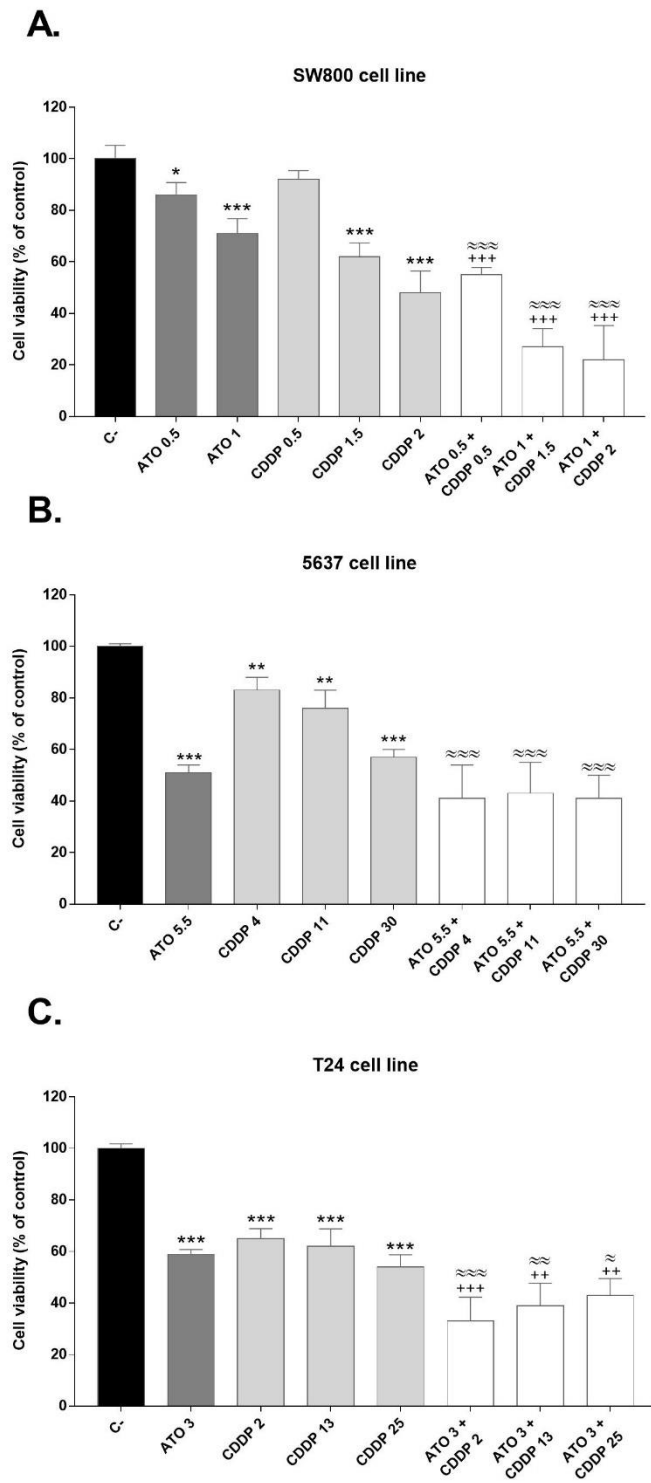


Figure 4.

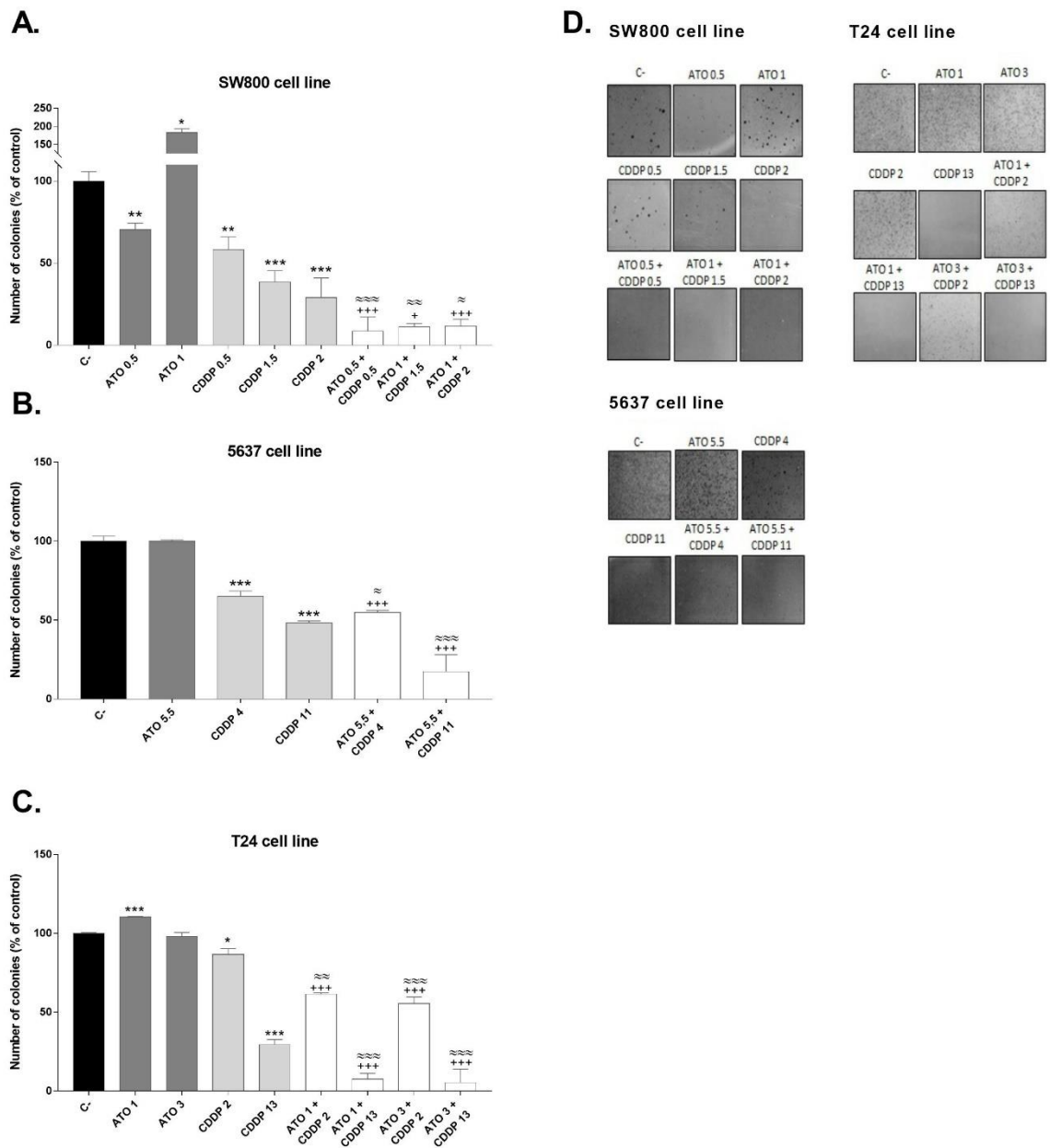




Figure 5.

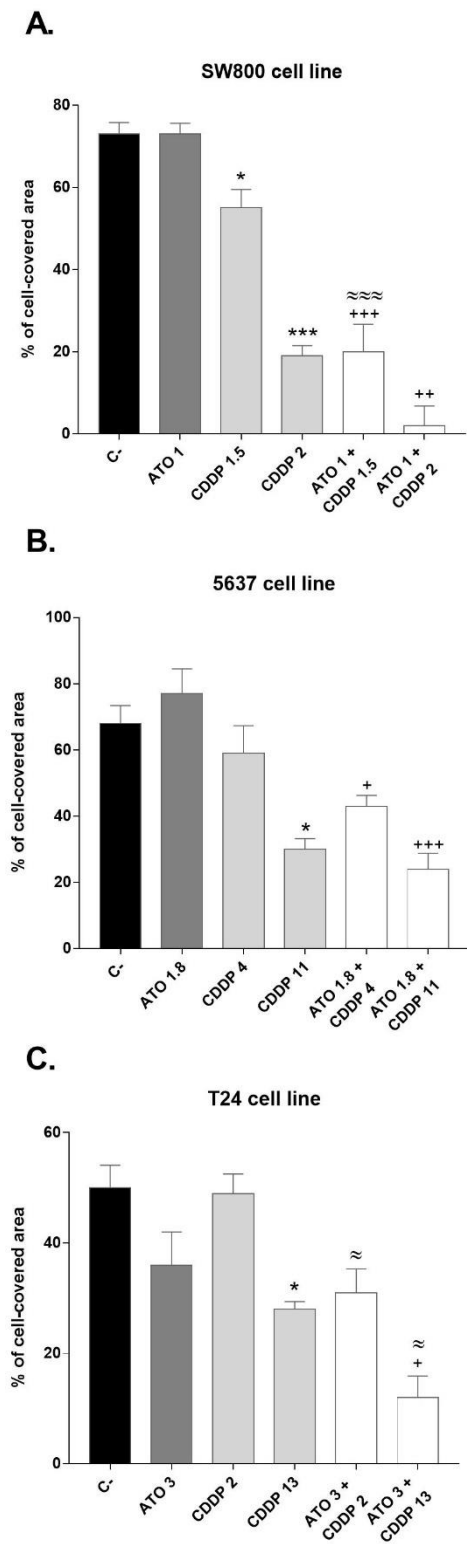
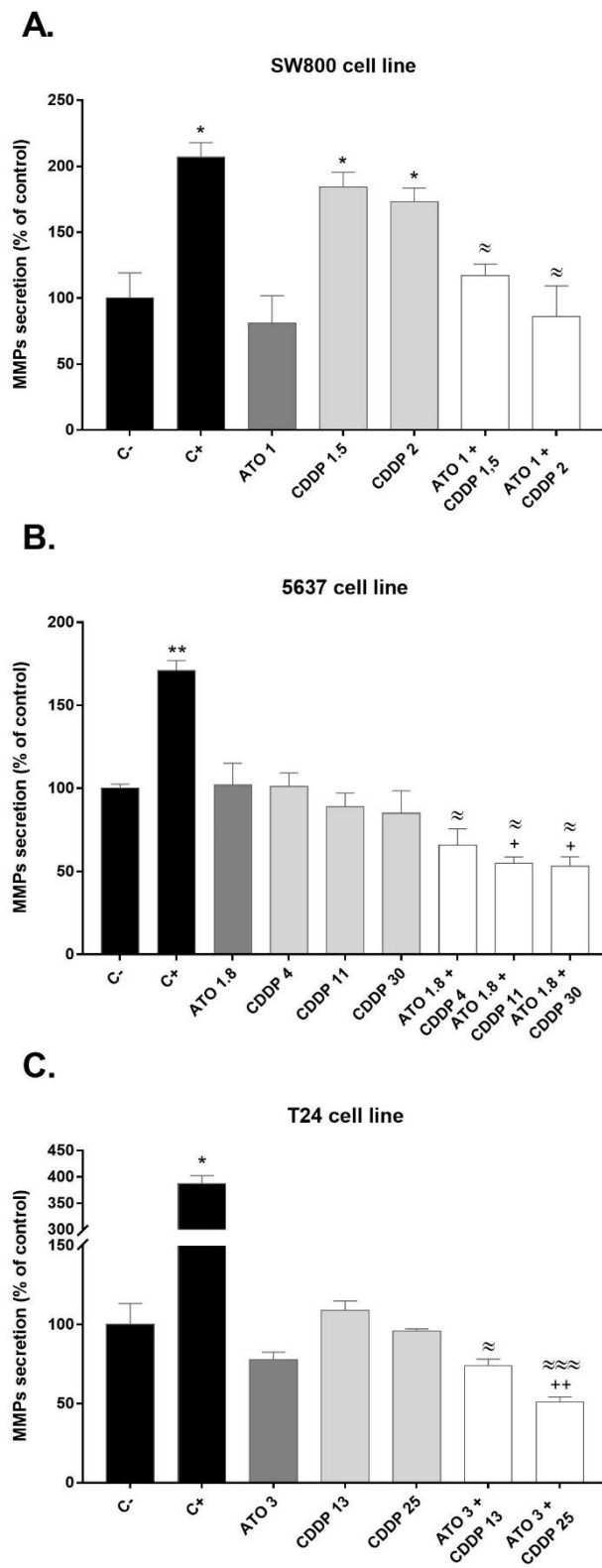
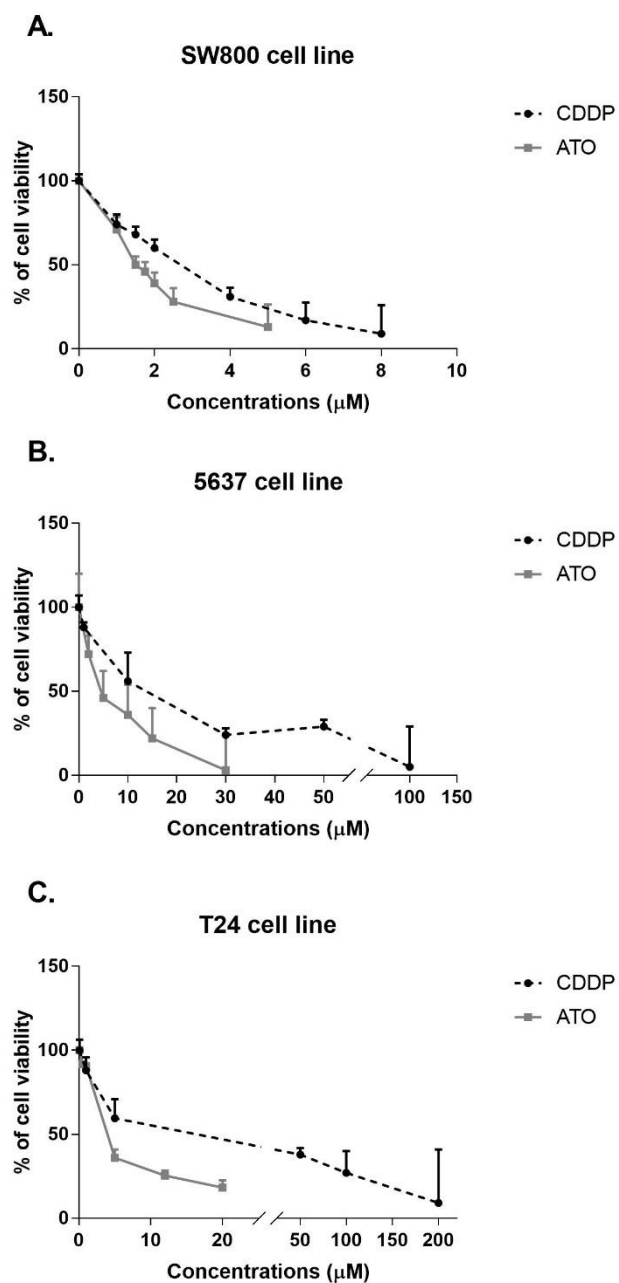


Figure 6.



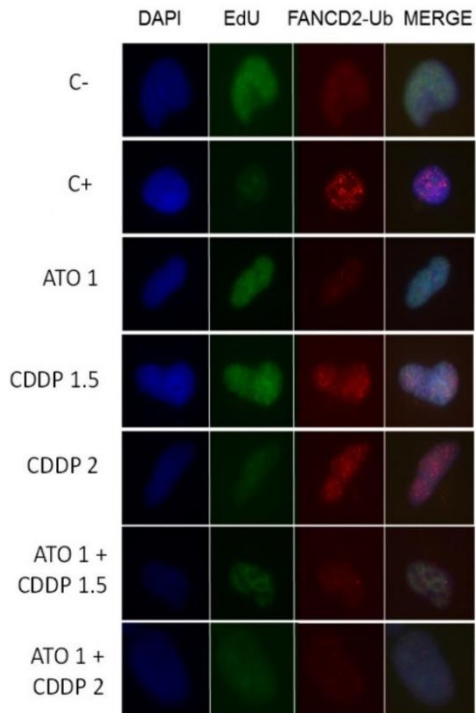
## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Supplementary Figure 1.** Cell viability curves for SW800 (A), 5637 (B) and T24 (C) in response to different concentrations of ATO or CDDP for 24 h. Data are presented as mean values of independent experiments (n=3). Error bars represent standard error of the mean.

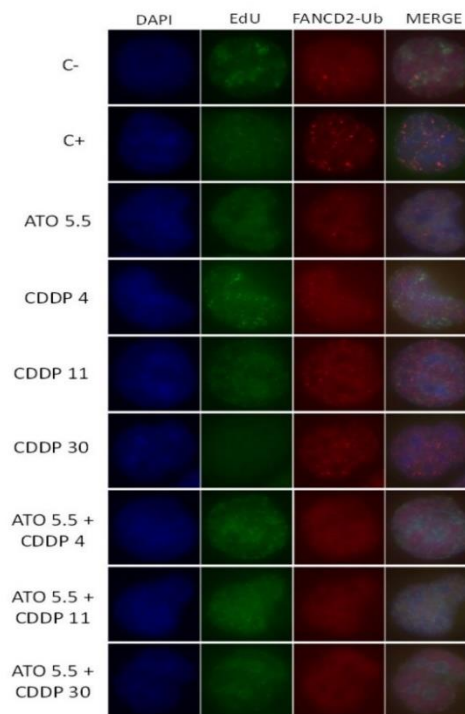


**Supplementary Figure 2.** Immunofluorescent analysis of FANCD2 foci formation (red) in SW800 (A), 5637 (B) and T24 (C) cell lines. Nuclei were counterstained with DAPI (blue) and only cells in the S-phase were analyzed according to EdU staining (green). Representative confocal images are shown.

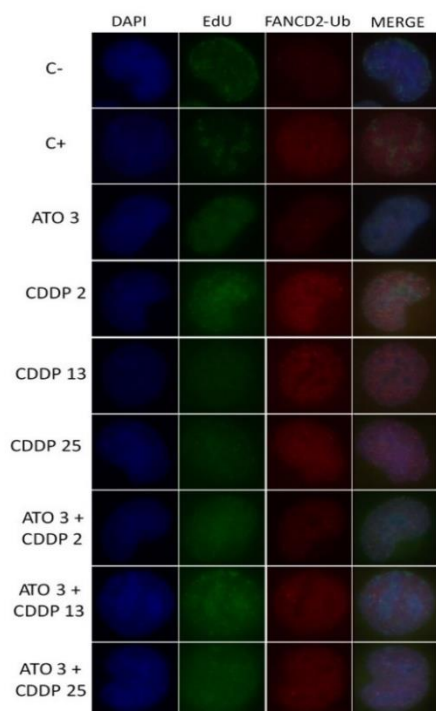
### A. SW800 cell line



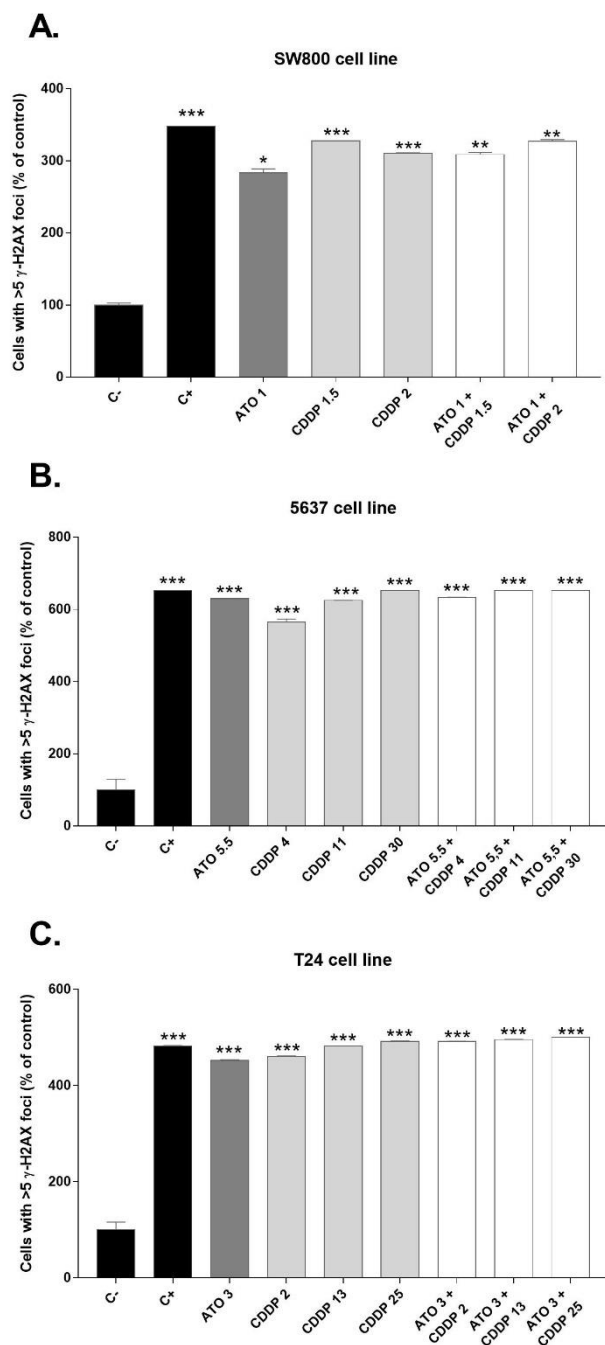
### B. 5637 cell line



### C. T24 cell line



**Supplementary Figure 3.**  $\gamma$ -H2AX nuclear foci formation as a measure of DNA damage after a 24 h of ATO/CDDP treatment in SW800 (A), 5637 (B) and T24 (C) cell lines. Percentages of cells containing five or more  $\gamma$ -H2AX nuclei foci were determined under a fluorescent microscope. Data are presented as mean values of independent experiments (n=3). Error bars represent standard error of the mean. \*\*\* $P \leq 0.001$  compared to no treatment



## **4. DISCUSSIÓ**



## 4. DISCUSSIÓ

### 4.1. DANY OXIDATIU I GENOTÒXIC DURANT EL PROCÉS DE TRANSFORMACIÓ CARCINOGENÈICA *IN VITRO* INDUÏT PER L'ARSÈNIC. PAPER DELS ENZIMS AS3MT I MTH1.

L'arsènic és un element natural àmpliament distribuït en el medi ambient, podem trobar-lo tant en el sòl, l'aigua o l'aire. Degut, principalment, a diverses activitats antropogèniques s'ha provocat un alliberament extra d'arsènic en l'ambient, amb la consegüent repercussió sobre la salut de la població.

Des de fa molts anys, estudis epidemiològics en poblacions afectades per aigües contaminades amb alts nivells d'arsènic mostren un augment significatiu en l'aparició de diferents tipus de càncer, com el de bufeta, de pell, de fetge o de pulmons. Per això, diversos organismes internacionals han classificat l'arsènic com a potent carcinogen en humans (IARC, 2012). Tant per l'elevada incidència com per l'elevada transcendència d'aquests càncers, fa molts anys que científics d'arreu del món s'han centrat en desenvolupar models, tant *in vitro* com *in vivo*, per mimetitzar l'exposició en humans amb l'objectiu d'estudiar a fons i desvetllar els mecanismes a través dels quals l'arsènic genera aquestes lesions. Tot i la gran quantitat d'esforços realitzats, es va trobar que l'arsènic era un dels pocs carcinògens que no induïen tumors en animals de laboratori, sinó era amb unes dosis extremadament elevades que no representen les condicions reals d'exposició en humans. El motiu, probablement, és la diferència que existeix en el procés de metabolització d'aquest compost entre humans i rosegadors (Cohen et al., 2013). Per tot això, definir els mecanismes involucrats en la carcinogènesis de l'arsènic en condicions ambientalment rellevants, s'ha presentat com un repte al llarg dels anys. En absència de models animals rellevants, s'ha proposat com alternativa la utilització *in vitro* de models cel·lulars. Tot i les limitacions que presenten, amb els anys els models *in vitro* s'han tornat més sofisticats donat al desenvolupament de noves tècniques de biologia molecular, i s'estan aplicant àmpliament en l'estudi dels mecanismes d'acció de diversos compostos, de manera que han contribuït en gran mesura al coneixement actual dels orígens del càncer (Breheny et al., 2011).

Diversos autors han mostrat la implicació de l'arsènic inorgànic en els processos de transformació cel·lular *in vitro* en diverses cèl·lules de teixits diana de l'arsènic. Per



exemple, en la línia cel·lular humana de pròstata RWPE-1 després de ser tractada durant 29 setmanes amb 5  $\mu\text{M}$  d'arsenit es va observar un augment significatiu de la secreció de la metal·lo proteïnasa de matriu 9 (MMP-9), un tret característic dels tumors malignes de pròstata. A més, es va confirmar aquesta transformació quan aquestes cèl·lules van ser capaces de generar tumors *in vivo* en ratolins (Achanzar et al., 2002). Un altre grup va aconseguir transformar aquesta mateixa línia prostàtica, RWPE-1, després d'exposar-la durant 6 mesos a tan sols 100  $\text{pg/mL}$  d'arsenit, observant un augment significatiu en la capacitat d'aquestes cèl·lules de créixer de forma independent d'ancoratge a substrat (Treas et al., 2013). Igualment, dos grups diferents van aconseguir transformar la línia cel·lular humana de bufeta, UROtsa, en ser exposada crònicament a 1  $\mu\text{M}$  d'arsenit (Sens et al., 2004) o bé a 50 nM de MMA<sup>III</sup> durant 52 setmanes (Wnek et al., 2010). En ambdós casos, els autors van confirmar l'adquisició del fenotip tumoral en observar un augment en la capacitat d'aquestes cèl·lules de créixer de forma independent d'ancoratge a substrat i amb la formació de tumors en ser injectades en ratolins (Sens et al., 2004; Wnek et al., 2010). La pell és un altre òrgan diana de l'exposició a l'arsènic, per això, diversos grups també han valorat els efectes de l'arsènic en aquest tipus de teixit. Pi et al. (2008) van aconseguir l'adquisició del fenotip tumoral en la línia cel·lular de queratinòcits humans (HaCaT), en exposar-la durant 28 setmanes a 100 nM d'arsenit, quan van observar que les cèl·lules eren capaces de formar tumors subcutanis en ser injectades en ratolins (Pi et al., 2008). Uns altres òrgans diana de l'arsènic són els pulmons, de manera que diversos autors també han estudiat la transformació *in vitro* d'aquest tipus cel·lular. Un grup va assolir la transformació *in vitro* en exposar la línia HPL-1D durant 38 setmanes a 2  $\mu\text{M}$  d'arsenit, confirmant l'adquisició del fenotip tumoral amb un augment significatiu de la secreció de la MMP-2, juntament amb la capacitat invasiva de les cèl·lules, i la capacitat de formar colònies independentment de substrat (Person et al., 2015). Un altre grup, va assolir la transformació de la línia pulmonar HELF, després de l'exposició a 1  $\mu\text{M}$  d'arsenit durant 15 setmanes, quan van observar que les cèl·lules havien adquirit la capacitat de créixer de forma independent d'ancoratge a substrat (Ling et al., 2012).

#### **4.1.1. Evolució del dany oxidatiu i genotòxic durant el procés de transformació in vitro induït per l'arsènic**

Un dels mecanismes d'acció de l'arsènic més estudiat i acceptat és la generació de ROS derivades de diferents processos, principalment de la metabolització de l'arsènic inorgànic en les cèl·lules (Flora, 2011). Tot i així, encara existeix molta incertesa al voltant del seu paper a dosis ambientals, a les que generalment els humans estan exposats, ja que la majoria d'estudis en que es troba un augment en la formació de radicals lliures ho fan després d'una exposició a dosis molt per sobre del que es considera ambientalment rellevant (Cohen et al., 2016). Quan l'exposició es fa utilitzant baixes dosis d'arsènic, podem trobar exemples d'estudis *in vivo* en els quals s'ha mostrat poc o cap paper del dany oxidatiu en la toxicitat induïda per l'arsènic (Suzuki et al., 2009; Cohen et al., 2013). A més, recentment en alguns estudis epidemiològics es conclou que no existeix cap correlació entre els biomarcadors de dany oxidatiu utilitzats i els diversos efectes biològics produïts per l'arsènic, com és el cas del recent estudi de Harper et al. (2014), desenvolupat a Bangladesh, una de les zones amb nivells d'arsènic en aigua més elevats, o el cas de Normandin et al. (2014), en una població rural del Canadà.

D'altra banda, existeixen gran quantitat d'estudis on si que s'observa una correlació dels biomarcadors de dany oxidatiu amb l'exposició a l'arsènic en diferents poblacions. Així, en un estudi es va analitzar el dany genètic d'una població del nord de Mèxic exposada a arsènic, mitjançant la tècnica del cometa en limfòcits perifèrics. Els autors van trobar una associació positiva entre els nivells d'exposició i el dany genètic, mesurat com a percentatge de DNA en la cua dels cometes (Sampayo-Reyes et al., 2010). Un dels marcadors genètics més reconeguts fins al moment és l'expressió d'*OGG1*, que s'ha associat positivament amb els nivells d'arsènic en l'aigua i en les ungles d'individus exposats. En diversos estudis s'ha trobat una sobreexpressió d'aquest gen en diferents poblacions humanes exposades a arsènic (Kondo et al., 2000; Mo et al., 2006), convertint-lo en un bon biomarcador per detectar estrès oxidatiu.

Degut a la importància del paper del dany oxidatiu en la carcinogènesi (Bustaffa et al., 2014), la possibilitat de que dosis ambientals d'arsènic puguin generar espècies reactives, ha fet que la comunitat científica es plantegi si aquesta generació de ROS i dany és un dels principals mecanismes de carcinogènesi induïda per l'arsènic. Cal tenir

en compte que s'ha vist que una de les lesions més importants induïdes per les ROS és la 8-oxoguanosina (8-OH-dG), que pot aparèixer tant en el conjunt de nucleòtids lliures, com integrada en al molècula del DNA. Si aquesta lesió inicial no es repara correctament es capaç de generar mutacions puntuals en les cadenes del DNA, i promoure l'aparició d'instabilitat genòmica (Hirano, 2008).

No obstant, tot i els esforços dedicats fins al moment, encara no és del tot clar si una acumulació d'estrès oxidatiu derivada d'exposicions a dosis ambientalment rellevants d'arsènic, en realitat està relacionat amb un augment en la incidència del càncer (Cohen et al., 2013). De fet, recentment en un article publicat en la revista *Nature* s'exposa que la relació entre el càncer i l'estrès oxidatiu és un mite que ha guanyat força durant els últims anys, degut a interessos comercials (Scudellari, 2015).

En aquest context, en el nostre Grup es van plantejar una sèrie d'estudis per mirar de donar resposta a aquests dubtes. Per tal de mimetitzar l'exposició de les poblacions humanes i estudiar la seva relació amb l'estrès oxidatiu induït per l'arsènic, en el nostre laboratori es va aconseguir crear un model cel·lular de transformació *in vitro*, promogut per l'exposició a baixes concentracions d'arsènic (Bach et al., 2016). En aquests estudis, fibroblasts embrionaris de ratolí (MEF) van ser tractats durant 50 setmanes a diferents concentracions subtòxiques d'arsenit ( $As^{III}$ ): 0,5, 1 i 2  $\mu M$ . En paral·lel també es van mantenir cèl·lules sense arsènic, com a control. Cal esmentar que es van utilitzar dos línies isogèniques: les MEF *Ogg1*<sup>+/+</sup>, la variant salvatge normal, i les MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup>, en les quals s'ha eliminat el gen *OGG1* i que per tant són deficientes en la reparació de les 8-OH-dG a través de la ruta BER.

La nostra hipòtesis inicial, era comprovar si realment el dany oxidatiu en el DNA era un dels principals mecanismes d'acció en la carcinogènesi exercida per l'arsènic. Si era així, l'adquisició d'aquest fenotip tumoral es veuria accelerada en les línies MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup> com a conseqüència de l'acumulació de lesions sense reparar derivades de les ROS induïdes. Es va veure que, al voltant de la setmana 30 d'exposició, les cèl·lules MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup> tractades amb arsenit van començar a mostrar característiques fenotípiques de transformació tumoral, com l'adquisició d'una morfologia allargada, signe de la transició epiteli-mesènquima, la desregulació dels patrons d'expressió de marcadors d'identitat de teixit, o una disminució significativa del temps de duplicació (Bach et al., 2016). A més, també es van detectar tot un seguit de canvis en el comportament de les cèl·lules,

associats als últims estadis del càncer, veient-se un augment en la capacitat de créixer de forma independent d'ancoratge a substrat, un increment en la secreció de metalloproteïnases, un increment en la capacitat de promoure el creixement tumoral d'altres línies cel·lulars i, finalment, en la capacitat de promoure la invasió cel·lular (Bach et al., 2016).

És important recalcar, que en aquests estudis els efectes indicats es van observar abans, i amb major virulència, en la línia deficient (MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup>) que en la seva corresponent línia salvatge (MEF *Ogg1*<sup>+/+</sup>), que va començar a mostrar efectes de transformació molt més lleus a partir de la setmana 40. Tot això, posa de manifest que l'exposició crònica a concentracions subtòxiques d'arsenit és capaç d'induir l'aparició del fenotip tumoral en la línia cel·lular MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup>, vinculant l'acumulació de dany oxidatiu en el DNA i la incapacitat de reparar aquestes lesions, amb la carcinogènesi exercida per l'arsènic.

En concordança amb els nostres resultats, altres autors també han estudiat la implicació del any oxidatiu en la transformació *in vitro* exercida per l'arsènic. Així, Li et al. (2011) van observar l'adquisició del fenotip tumoral en cèl·lules epitelials de pulmó de rata (LEC) després de ser tractades amb baixes concentracions d'arsenit (1,5-2 µM) durant 16 setmanes. Van veure que l'exposició a arsènic causava un increment dels nivells cel·lulars de ROS, i una disminució dels nivells d'antioxidants, que a la vegada promovien l'activació de la via de senyalització MAPK/ERK, donant com a resultat final un alt nivell de proliferació cel·lular incontrolat (Li et al., 2011). En un altre estudi, Kojima et al. (2009) van mostrar la transformació de dues línies cel·lulars després de ser tractades amb concentracions subtòxiques d'arsenit: 0,25, 0,5 i 1 µM en el cas de la TRL1215, una línia cel·lular hepàtica de rata amb capacitat per metilar l'arsènic, i 1, 2,5 i 5 µM en el cas de la RWPE-1, una línia cel·lular humana de pròstata amb una capacitat molt reduïda de metilació. Aquests autors van trobar que en les cèl·lules TRL1215 es produïa ODD com a resultat de la metilació de l'arsènic, mentre que això no passava en les RWPE-1, amb una capacitat limitada per metilar l'arsènic. No obstant, ambdues línies cel·lulars van estar exposades durant un temps i a concentracions d'arsènic suficients, com per adquirir el fenotip tumoral *in vitro*, fet que es produïa al voltant de la setmana 18 en les TRL1215, i en la setmana 30 en les RWPE-1. Els autors van concloure que la metilació de l'arsènic i el dany oxidatiu, tenen un paper clau en l'acceleració de la transformació *in vitro*. En un altre estudi, es va veure que l'exposició a arsenit (5 µM) durant set mesos

promovia la transformació *in vitro* de la mateixa línia cel·lular de pròstata RWPE-1, de manera que aquestes cèl·lules eren capaces de formar tumors en ratolins. D'altra banda, van observar com l'arsènic causa una disminució severa del potencial de membrana mitocondrial, i un augment significatiu de l'expressió del gen *NOX4*, un oncogen involucrat en la formació de ROS (Singh et al., 2016). Igualment, en un estudi *in vivo* realitzat en ratolins *Ogg1*<sup>-/-</sup>, es va veure que tots els ratolins desenvolupaven tumors en els pulmons després de 72 setmanes d'exposició a 200 ppm de DMA<sup>V</sup> en l'aigua. A més, les cèl·lules pulmonars d'aquests animals presentaven un augment significatiu de la proliferació cel·lular i una important acumulació dels nivells de 8-OH-dG, en comparació amb els ratolins control (Kinoshita et al., 2007). Cal destacar, que tot i els resultats positius d'aquest últim estudi, les concentracions d'arsènic utilitzades van ser considerablement superiors a les ambientalment rellevants, posant de manifest una altra vegada, les diferències implícites en els estudis amb animals de laboratori.

Per aprofundir una mica més en el comportament de l'estrès oxidatiu durant el procés d'adquisició del fenotip tumoral, hem volgut estudiar quina és l'evolució del dany oxidatiu i del dany genotòxic abans, durant i després del punt de transformació de les cèl·lules MEF *Ogg1*<sup>-/-</sup> tractades amb les diferents dosis d'arsenit (1r estudi).

L'assaig del cometa és àmpliament utilitzat per a estudiar el dany en el DNA de manera ràpida, senzilla i econòmica i, a més, una simple modificació del protocol ens permet avaluar la presència de bases oxidades (Collins, 2014). De fet, aquest assaig ha estat àmpliament utilitzat com a biomarcador de poblacions humanes exposades a l'arsènic (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009; Sampayo-Reyes et al., 2010). Els nostres resultats amb aquesta tècnica, mostren un augment significatiu dels nivells del dany oxidatiu (ODD) en les cèl·lules fins la setmana 30, el punt aproximat de transformació. A partir d'aquest moment, es produeix una davallada dels nivells d'ODD fins a nivells propers als basals. Donat que l'assaig del cometa mesura dany primari al DNA, per l'anàlisi del dany genotòxic fixat hem utilitzat l'assaig de micronuclis (MN), que és una de les tècniques més ben acceptades. El recompte d'aquestes estructures (MN) ens donarà informació sobre l'estat dels cromosomes i dels nivells d'inestabilitat genètica presents en les cèl·lules analitzades. Tal i com es recull en l'article de revisió d'Annangi et al. (2016), existeixen múltiples estudis que relacionen un increment en la freqüència de MN amb

l'exposició crònica a l'arsènic, ja sigui a causa de la ingestió d'aigües contaminades amb elevats nivells d'arsènic, o bé a causa de l'exposició a partícules alliberades durant activitats industrials (Annangi et al., 2016). Per exemple, Basu et al. han realitzat diferents estudis en la regió de Bengala Occidental, amb individus exposats a arsènic que presenten signes cutanis d'arsenicosi. S'ha vist un augment significatiu de la freqüència de MN en cèl·lules de descamació de la mucosa bucal, cèl·lules de descamació urotelials o en limfòcits de sang perifèrica, en comparació amb les freqüències dels individus controls (Basu et al., 2002, 2004). Resultats similars s'han observat en altres estudis amb individus exposats en diverses regions, com la zona central de Mongòlia (Tian et al., 2001), el nord de Xile (Martínez et al., 2004) o l'Argentina (Bartolotta et al., 2011). Tot i això, alguns autors posen en dubte aquesta correlació degut a les nombroses dificultats per interpretar els resultats obtinguts, com ara l'avaluació inadequada de l'exposició a l'arsènic, els mètodes de mesura dels MN i possibles factors de confusió com l'exposició al tabac o deficiències en la dieta, entre altres (Cohen et al., 2016). A més a més, aquests dubtes s'han observat en diferents estudis epidemiològics. Per exemple, en un treball centrat en la regió de Xile, es van observar diferències en els nivells d'arsènic en l'orina de diferents treballadors d'una mina respecte els controls no exposats. No obstant, les diferències entre les freqüències de MN observades en aquests grups no van arribar a ser significatives (Paiva et al., 2008). En un altre estudi, es van veure diferències en la quantitat d'arsènic retingut en les ungles de dos poblacions, una exposada a nivells elevats d'arsènic en l'aigua de consum, i l'altra no. Quan es van comparar les freqüències observades de MN, es va veure que tot i que el nombre de MN en la població exposada era major que el de la població no exposada, aquesta diferència tampoc era estadísticament significativa (Martínez et al., 2005).

Com en el cas de l'ODD, els nostres resultats avaluant el dany cromosòmic fixat mostren un increment en la freqüència de MN fins als voltants del punt de transformació, i posteriorment una disminució fins als nivells basals, indicant que el dany oxidatiu i el cromosòmic, que tenen lloc després d'una exposició crònica a l'arsenit, segueixen el mateix patró.

Tant en el cas del dany oxidatiu, com en el cas dels MN, es produeix una davallada dels nivells de dany que presenten les cèl·lules després del punt de transformació. Aquest fet

ja ha estat descrit amb anterioritat per altres autors, tot i que no van poder detallar el mecanisme pel qual això es produïa. Kojima et al. (2009) van tractar amb concentracions subtòxiques d'arsenit cèl·lules hepàtiques de rata (TRL1215), amb capacitat per metilar l'arsènic, i cèl·lules humanes de pròstata (RWPE-1), amb una capacitat molt reduïda de metilació. Al voltant de la setmana 18 i la setmana 30, respectivament, van observar l'adquisició del fenotip tumoral en ambdós línies. Quan van estudiar l'evolució del dany oxidatiu durant el procés de transformació, van observar que en el cas de les TRL1215 aquest augmentava durant el període inicial d'exposició a arsènic, fins la setmana 18, i a partir d'aquí disminuïa considerablement fins a nivells basals. En el cas de les RWPE-1 no es va observar la presència de dany oxidatiu en cap punt del procés de transformació. Aquests autors van proposar una adaptació progressiva a l'arsènic com a possible explicació del pic d'ODD en les TRL1215, però aquesta va quedar descartada en veure que l'expressió de diversos gens involucrats en el procés d'adaptació, com ara gens del metabolisme del glutatió, transportadors d'arsènic o gens antioxidants, es trobava expressada de la mateixa manera en les dos línies cel·lulars. De manera que no van trobar cap explicació per aquest succés (Kojima et al., 2009). Anys més tard, aquest grup va assolir la transformació de les mateixes línies cel·lulars, TRL1215 i RWPE-1, al voltant de la setmana 20 d'exposició a concentracions subtòxiques de MMA<sup>III</sup>. Una altra vegada en fer el seguiment del dany oxidatiu al llarg del procés tumoral van observar, d'acord amb els nostres resultats, un increment inicial, i després una caiguda dràstica de l'ODD després del punt de transformació. També van analitzar l'expressió de diversos gens antioxidants, com ara *SOD-1*, *SOD-2*, *HO-1* i *NRF2*, obtenint una resposta força variable entre les dues línies cel·lulars. Tot i que, en alguns casos, com *HO-1* i *SOD-1*, si que es veia un augment significatiu en l'expressió d'aquests gens antioxidants en la setmana 30, que podia ser el motiu de la disminució de l'ODD, els resultats no eren reproduïbles en les dues línies cel·lulars. En aquest nou estudi, doncs, van proposar que la caiguda de l'ODD podia ser a conseqüència d'una inducció dels mecanismes antioxidants, tot i que finalment els resultats no van ser del tot rellevants, suggerint l'actuació de diferents mecanismes en cada línia (Tokar et al., 2014).

Un altre grup d'investigació va aconseguir transformar la línia de cèl·lules epitelials bronquials humanes, BEAS-2B, en exposar-la crònicament durant 24 setmanes a concentracions subtòxiques d'arsenit (Chang et al., 2010). Van veure que les cèl·lules

transformades *in vitro*, mostraven una menor quantitat de ROS en ser exposades a arsenit, en comparació amb les cèl·lules no transformades. Aquest grup, en canvi, si que va trobar una sobreexpressió dels gens antioxidants, *SOD-2* i *catalasa*, en les cèl·lules transformades. De manera que van plantejar un mecanisme, on la sobreexpressió d'aquests gens, provocava una disminució de la quantitat de ROS en les cèl·lules, que a la vegada era responsable d'un augment de la proliferació cel·lular, resistència a la toxicitat exercida per l'arsènic i capacitat per créixer independentment d'ancoratge a substrat, tots signes de transformació cel·lular (Chang et al., 2010). Tot i que aquests resultats semblen coincidir amb els obtinguts en el nostre grup, aquests autors van quantificar la inducció de ROS, però no el seu efecte directe, és a dir, la producció de dany oxidatiu. Podria ser que el comportament de les ROS es veiés afectat per altres factors, i finalment no es reflectís en la presència de dany en la molècula del DNA.

El dany en el DNA és considerat la lesió més important en una cèl·lula, per això les cèl·lules tenen diferents mecanismes de reparació específics per a cada tipus de lesió, i a la vegada diferents enzims que realitzen una funció similar, és a dir isoenzims. Aquest és el cas d'OGG1 i NEIL1. Ambdós enzims, són endonucleases que participen en la ruta BER reparant bases oxidades en el DNA, però, mentre que l'OGG1 és l'encarregat principal de reparar les lesions en la guanina (Hirano, 2008), la NEIL1 té una major afinitat per les lesions que afecten les bases pirimidíniques, com ara el 8-hidroxiuracil (Bandaru et al., 2002). L'estudi de Bach et al. (2015) revelà com en una situació d'exposició crònica a arsenit, les cèl·lules deficientes en *Ogg1* mostren una acumulació de dany oxidatiu en el DNA i, a més, presenten una sobreexpressió de *Neil1*. Per compensar la falta d'OGG1, les cèl·lules busquen un altre mecanisme mitjançant el qual eliminar l'acumulació d'ODD i disminuir la toxicitat, de manera que sobreexpressen aquest enzim, tot i que al no ser específic d'aquest tipus de lesió, no és tan eficient reparant, i per tant el dany oxidatiu s'acumula igualment.

En el nostre estudi hem analitzat l'expressió de *Neil1* durant tot el procés de transformació carcinogènica, i hem vist que aquest augmenta en paral·lel a l'increment del dany oxidatiu, allargant-se fins al voltant de la setmana 40. Després, en disminuir l'ODD, l'expressió de *Neil1* també es redueix, degut a que ja no hi ha lesions que s'hagin



de reparar. Per tant, *Nei1* té un comportament clarament dependent de la quantitat de lesions que hi ha en el DNA.

#### **4.1.2. Paper del gen *Mth1* durant el procés de transformació in vitro induït per l'arsènic**

Per mirar de trobar una explicació a la disminució del dany oxidatiu després del punt de transformació, hem estudiat l'expressió del gen *Mth1* al llarg del procés tumoral. MTH1 és un enzim que s'encarrega de sanejar el conjunt de nucleòtids lliures, és a dir, elimina les bases oxidades evitant així la seva incorporació en el DNA (Nakabeppu et al., 2016). De manera que podria tenir un paper clau en la disminució del dany oxidatiu observat després del punt de transformació.

Els nostres resultats mostren, que durant les setmanes inicials l'expressió de *Mth1* en totes les cèl·lules mostra uns nivells basals semblants, però en les setmanes 40 i 50 l'expressió de l'enzim es dispara significativament en les cèl·lules que han estat exposades crònicament a l'arsènic. D'aquesta manera, les cèl·lules transformades, en detectar l'acumulació de bases oxidades, augmentarien l'expressió de *Mth1* per poder sanejar el conjunt de nucleòtids lliures, evitant la seva incorporació en les molècules de DNA i assegurant-se la viabilitat a llarg termini. De fet, en varis estudis s'ha vist que després de l'adquisició del fenotip tumoral *in vitro*, les cèl·lules transformades mostren resistència a l'apoptosi en general, i tolerància a la toxicitat produïda per noves exposicions a arsènic (Qu et al., 2002; Pi et al., 2005; Chang et al., 2010).

En línia amb els nostres resultats, s'ha demostrat en diversos estudis que l'expressió de *Mth1* augmenta significativament en pacients amb diversos tipus de tumors com els cerebrals (Iida et al., 2001), els de pulmó de cèl·lules no petites (Kennedy et al., 2003), d'estómac (Song et al., 2015), carcinomes de cèl·lules escamoses d'esòfag (Akiyama et al., 2016), o mieloma múltiple (Zhou et al., 2016). En molts d'aquests estudis es considera la sobreexpressió de *Mth1* com un factor de mal pronòstic en el desenvolupament de la malaltia.

Cal emfatitzar, finalment, que el nostre és el primer estudi en el que es relaciona l'exposició crònica a l'arsènic amb un increment en l'expressió de *Mth1*, de manera que proposem aquest gen com a un nou biomarcador de la carcinogènesi exercida per

l'arsènic. L'anàlisi de la seva expressió, es podria incloure en la bateria d'assajos utilitzats per confirmar la transformació carcinogènica exercida per l'arsènic, ja sigui *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

#### **4.1.3. Paper del gen *As3mt* durant el procés de transformació *in vitro* induït per l'arsènic**

Un altre punt inclòs en el nostre estudi ha estat avaluar la implicació de la metilació de l'arsènic en la producció de dany oxidatiu durant el procés de transformació tumoral. Cal recordar que un cop l'arsènic es absorbit i internalitzat, experimenta una sèrie de reaccions d'oxidació-reducció i altres de metilació, en les quals se l'hi afegeix un, dos o fins a tres grups metils, donant lloc a compostos monometilats, dimetilats o trimetilats (Cullen i Reimer, 1989). L'enzim clau d'aquests processos de metilació és l'arsènic-3-metiltransferasa (AS3MT).

En un inici es va considerar que aquestes reaccions eren una via de desintoxicació de l'arsènic, ja que les espècies metilades eren més fàcilment excretades en l'orina. No obstant, amb els anys, aquesta idea s'ha hagut de modificar ja que s'ha vist que els compostos metilats, com el MMA<sup>III</sup>, són molt més tòxics que els seus precursors inorgànics (Petrick et al., 2000; Styblo et al., 2000).

En referència a la transformació tumoral *in vitro* exercida per l'arsènic, s'ha vist que el MMA<sup>III</sup> es capaç de transformar la mateixa línia cel·lular amb igual, o inclús menys, temps d'exposició que l'As<sup>III</sup> (Tokar et al., 2014). En canvi, els nivells d'ODD obtinguts en les cèl·lules durant el procés de transformació utilitzant l'arsènic inorgànic (As<sup>III</sup>) són més elevats en comparació amb els nivells obtinguts amb la transformació induïda pel MMA<sup>III</sup> (Tokar et al., 2014). Es coneix que la formació de ROS durant els passos finals de la metilació de l'arsènic és força menor, i per tant també la capacitat d'induir dany oxidatiu en el DNA. En canvi, durant la metabolització de l'arsenit, en ser un compost inicial, és produiran nivells de ROS més elevats, que tindran major capacitat d'oxidar els nucleòtids.

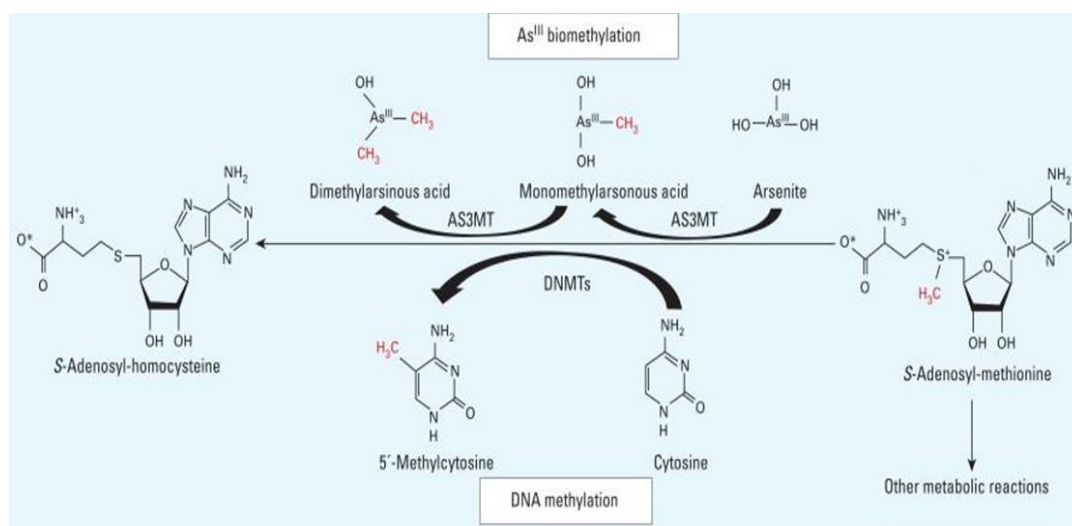
Seguint amb l'objectiu del nostre estudi d'analitzar el comportament de diferents esdeveniments al llarg del procés de transformació tumoral, vam voler fer un seguiment de l'expressió de l'*As3mt*. Tot i que aquest enzim té un paper clau en el metabolisme de

l'arsènic, aquest és el primer estudi en què s'analitza l'expressió d'aquest gen al llarg del procés de transformació *in vitro* induïda per l'arsènic.

Sorprenentment, hem observat que es reproduïx el mateix patró observat en l'ODD i en el dany genotòxic fixat, és a dir, un increment gradual de la seva expressió fins al punt de transformació, i posteriorment una davallada fins als nivells basals. Així, les cèl·lules exposades a l'arsènic augmenten la seva capacitat de metilació per tal de convertir l'arsènic inorgànic en compostos metilats, fàcilment eliminats en l'orina. Després de l'adquisició del fenotip tumoral, els nivells d'ODD disminueixen, i per tant, ja no caldrà seguir sobreexpressant l'AS3MT, ja que les cèl·lules hauran trobat un mecanisme alternatiu per eliminar el dany oxidatiu causat pel propi arsenit.

#### 4.1.4. Evolució de l'estat de metilació global del DNA durant el procés de transformació *in vitro* induït per l'arsènic

Com s'ha vist anteriorment, l'AS3MT és l'enzim encarregat d'incorporar els grups metils als diferents compostos d'arsènic. Durant aquesta reacció, el coenzim responsable d'aportar aquests grups metils és la S-adenosilmetionina (SAM). Aquest cofactor és també l'utilitzat en altres reaccions cel·lulars, sent una de les prioritàries la incorporació de grups metil en el DNA.



**Figura 11.** Esquema simplificat on es mostra la implicació del coenzim SAM en la metilació del DNA i el metabolisme de l'arsènic (Adaptat de Ren et al., 2011).

En una situació d'estrès crònic induït per l'arsènic, les cèl·lules augmenten significativament l'expressió de l'AS3MT. Aquest increment es tradueix en una major necessitat de grups metil (-CH<sub>3</sub>) i, per tant, en un major consum de SAM, de manera que tots els processos paral·lels es veuran afectats. Una de les implicacions més importants és l'alteració de la funció de les DNA metiltransferases, el que comporta una hipometilació del DNA, que al seu torn pot tenir conseqüències sobre l'expressió de diversos gens com l'increment en l'expressió d'oncogens, contribuint a l'adquisició del fenotip tumoral (Reichard and Puga, 2010; Bustaffa et al., 2014a). De fet, alteracions en la metilació del DNA s'han associat amb diverses malalties humanes (Robertson, 2005), i s'ha vist que l'hipometilació global del DNA és un tret característic en molts tipus de càncer (Esteller et al., 2001).

En diferents estudis, s'ha vist que diverses línies cel·lulars tractades crònicament amb baixes concentracions d'arsènic presenten aquesta disminució de la metilació global del DNA, concordant amb una reducció dels nivells de SAM en les cèl·lules (Benbrahim-Tallaa et al., 2005; Reichard et al., 2007; Coppin et al., 2008). D'acord amb la bibliografia actual, en el nostre estudi hem observat una hipometilació del DNA al llarg del procés d'adquisició del fenotip tumoral *in vitro*, que es manté inclús després del punt de transformació. Tot i que a partir d'aquest moment, l'expressió de l'AS3MT mostra una davallada important degut a la disminució del dany oxidatiu, observem que els nivells de metilació del DNA no es recuperen del tot, determinant que, en aquest cas, aquests canvis són irreversibles un cop les cèl·lules han adquirit el fenotip tumoral.

El grup de Sciandrello et al. recull en varis articles com la inestabilitat genètica generada durant l'exposició a l'arsènic està relacionada amb els mecanismes epigenètics. Així, després d'una exposició aguda (10 µM durant 24 hores) a l'arsenit en cèl·lules V79 de hàmmster xinès, aquests autors van demostrar que les cèl·lules descendents de les supervivents continuaven sent genèticament inestables fins a dos mesos després de finalitzar l'exposició a l'arsènic, mostrant aneuploïdies, canvis estructurals en els cromosomes o increments en les freqüències de cèl·lules amb micronuclis (Sciandrello et al., 2004, 2011). Una possible explicació a aquests resultats, es basaria en el fet de que, l'exposició a l'arsènic indueix canvis de metilació en promotors de gens específics, així com una hipometilació global del DNA, que s'ha vist que està relacionada amb la presència d'inestabilitat genòmica a llarg termini (Mauro et al., 2016). Aquests canvis

produeixen una descondensació de la cromatina, donant lloc a conformacions de recombinació permissives, o causant l'activació d'elements transponibles (Yegnasubramanian et al., 2008).

En aquest estudi, els autors van veure com amb el pas del temps l'estat natural de metilació de les cèl·lules es recuperava gradualment després de que l'exposició a arsènic acabés (Mauro et al., 2016). A diferència del que nosaltres hem observat, que les modificacions epigenètiques durant el procés de transformació *in vivo* són irreversibles. No obstant, cal tenir en compte que l'objectiu fonamental d'aquest grup era determinar com una exposició aguda a curt termini podia tenir efectes a llarg termini. De manera que el resultat final poden dependre del tipus d'exposició inicial que s'hagi experimentat; així, una exposició aguda permetria recuperar gradualment els nivells de metilació inicial, mentre que una exposició crònica pot ser no.

Com a conclusió final del nostre estudi, hem observat que les cèl·lules exposades crònicament a concentracions subtòxiques d'arsenit tendeixen a augmentar la seva capacitat de metilació per tal d'excretar les espècies metilades ràpidament i evitar la toxicitat exercida per l'arsènic inorgànic. No obstant, aquesta metilació accelerada té conseqüències directes negatives en les cèl·lules, com una disminució dels nivells de metilació global del DNA i un augment dels nivells de ROS, que en el cas de les nostres cèl·lules *Ogg1*-deficients, s'acumularan provocant lesions tan importants com l'increment del dany oxidatiu i l'aparició d'instabilitat genòmica. Tot això, juntament amb altres fenòmens, fomentarà el desenvolupament del fenotip tumoral en les cèl·lules. Així, a partir del punt de transformació un augment en l'expressió del gen *MTH1*, provocarà una davallada dels nivells d'ODD, de manera que les cèl·lules seran resistents al dany exercit per l'arsenit i disminuiran l'expressió d'*AS3MT*.

Amb aquest estudi, hem aconseguit per primer cop posar de manifest alguns dels canvis associats a l'adquisició del fenotip tumoral *in vitro*, monitoritzats al llarg de tot el procés, el que ens ajuda a entendre una mica millor quins són els mecanismes que actuen durant l'exposició crònica a l'arsènic.

#### 4.2. L'EXPOSICIÓ A L'ARSÈNIC AFECTA EL FUNCIONAMENT NORMAL DE LA RUTA DE REPARACIÓ FA/BRCA

Una altra de les principals característiques de l'arsènic es que pot actuar com a cocarcinogen a baixes concentracions, és a dir que es capaç d'intensificar els efectes nocius d'altres agents. Per exemple, s'ha vist que interacciona amb els efectes de la llum ultraviolada (UV), dels rajos X, dels agents alquilants com la N-metil-N-nitrosourea (MNU) o el metilmetà sulfonat (MMS), o dels agents capaços de produir enllaços creuats en el DNA com es el cas del diepoxibutà (DEB), entre altres agents (Salnikow i Zhitkovich, 2008). Tot i que els mecanismes involucrats en aquests processos encara no són del tot clars, una de les hipòtesis més esteses és que es degut a la seva capacitat per interaccionar amb els mecanismes de reparació del dany en el DNA.

En aquest context cal destacar els estudis realitzats per T.G. Rossman on es mostra que l'arsènic pot interaccionar amb la llum UV en la inducció del càncer de pell (Rossman et al., 2002, 2004). Per confirmar aquest fet es va dissenyar un estudi en ratolins sense pèl, on es van establir 3 grups de tractament: uns exposats a 10 mg/L d'arsenit en l'aigua durant 26 setmanes, uns altres a una dosi no irritant de radiació UV, i finalment un tercer grup a la combinació de les dos exposicions. Com era d'esperar, l'arsenit en solitari no induïa la formació de tumors, mentre que la radiació UV sí. A més a més, la combinació de les dues exposicions incrementava de manera significativa l'efecte, amb una resposta dosi-dependent, de manera que els tumors apareixien abans, eren més grans i més agressius que els tumors derivats de la radiació UV en solitari. Davant d'aquestes dades van plantejar que aquest efecte podia ser degut a la inhibició, per part de l'arsènic, dels mecanismes de reparació del dany induït per la llum UV (Rossman et al., 2001). Incidint en aquest tema, en un altre estudi es va veure com l'arsènic també potencia els efectes del benzo( $\alpha$ )pirè (BaP), una combinació força present en el medi ambient. Maier et al. (2002) van veure com en exposar cèl·lules hepàtiques de ratolí (Hepa-1) a baixes concentracions d'arsenit (0, 5 i 10  $\mu$ M), s'incrementava fins a 18 vegades la formació d'adductes entre el DNA i el BaP. També van observar que l'arsenit no afectava la reparació dels adductes, de manera que van descartar la seva interacció amb els mecanismes de reparació (Maier et al., 2002).

En un altre estudi, es va mostrar com l'arsenit a baixes concentracions (2,5  $\mu\text{M}$ ) es capaç d'interaccionar amb la ruta NER de fibroblasts humans, després de la irradiació amb llum UV. Es va veure que aquest afecta bàsicament al procés de la incisió, mentre que el pas de lligació tant sol es veu inhibit a concentracions molt elevades (20-50  $\mu\text{M}$ ) (Hartwig et al., 1997). En aquest article els autors discuteixen sobre els resultats d'altres estudis, com el de Lee-Chen et al. (1992), on es veu que la inhibició més important de l'arsenit és en el pas de la lligació. No obstant, manifesten que aquests estudis s'han realitzat a dosis molt elevades d'arsènic (50-200  $\mu\text{M}$ ), de manera que els efectes no són rellevants per a l'exposició humana.

Cal senyalar que altres treballs també han mostrat que l'arsènic es capaç d'alterar la funció de la ruta BER (Li i Rossman, 1989a). En un estudi, s'ha vist que cèl·lules V79 de hámster exposades a arsenit més N-metil-N-nitrosourea (MNU), mostren elevats nivells de trencaments en el DNA tres hores després de l'exposició, mentre que en aquest mateix temps però en absència d'arsenit, els trencaments ja han estat reparats. En experiments posteriors, es va observar que el procés de lligació es trobava inhibit, i més concretament que l'activitat de la DNA lligassa III havia disminuït. Quan es va analitzar l'activitat d'aquest mateix enzim, únicament sota l'exposició a arsenit, es va veure que l'activitat sol s'alterava a dosis molt elevades, indicant que l'efecte es potenciava en el tractament combinat d'arsenit més MNU (Li i Rossman, 1989b).

Tots aquests estudis posen de manifest la capacitat cocarcinogènica de l'arsènic i, a més, la seva capacitat d'interaccionar amb els mecanismes de reparació del dany en el DNA. Com es pot concloure dels estudis abans indicats, l'alteració de les rutes de reparació BER o NER ha estat àmpliament descrita al llarg del temps, en canvi no hi ha gaire informació sobre si l'arsènic és capaç de interaccionar amb altres mecanismes de reparació. En aquest context, en la segona part d'aquesta Tesis ens centrarem en estudiar si existeix una interacció entre concentracions rellevants d'arsènic i la ruta de reparació FA/BRCA (Peremartí et al., 2014).

S'ha descrit que la funció principal d'aquesta ruta és eliminar els enllaços creuats entre cadenes del DNA (ICLs), a través de la coordinació amb altres mecanismes clàssics de reparació, com ara la reparació per excisió de nucleòtids (NER), la síntesis per trans-lesió (TLS) o la recombinació homòloga (HR). Cal recordar que si aquest tipus de lesió no es repara correctament, es bloquegen processos tan importants com la replicació o la

transcripció del DNA, comprometent la viabilitat cel·lular, donant lloc a l'aparició d'instabilitat genòmica, i promovent l'adquisició del fenotip tumoral (Moldovan i D'Andrea, 2009; Deans i West, 2011).

#### **4.2.1. Selecció dels compostos d'arsènic rellevants en la interacció amb la ruta FA/BRCA**

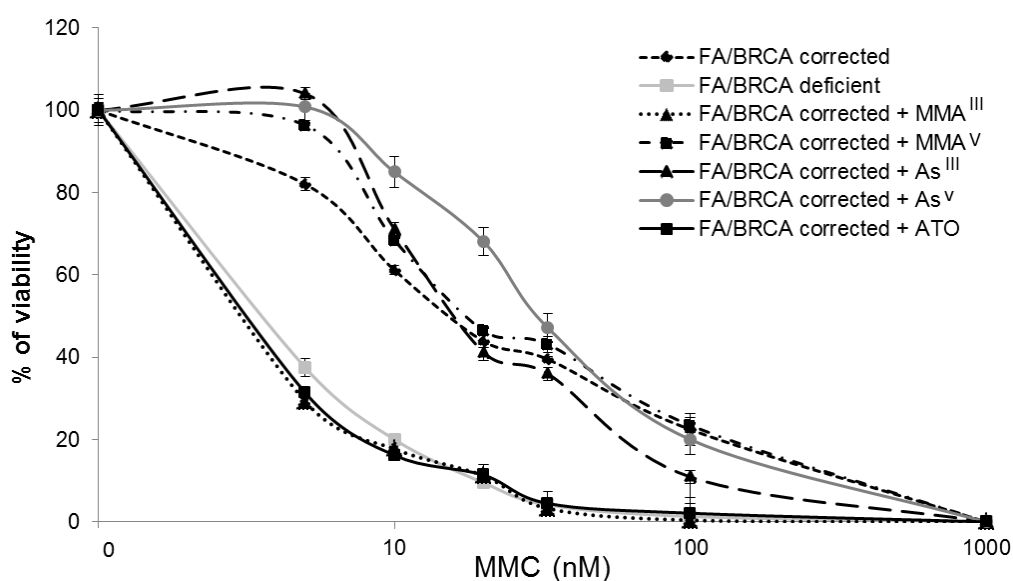
Degut al gran nombre de compostos d'arsènic existents i als efectes tan diversos que aquests poden realitzar, primer de tot vam determinar quins dels principals derivats de l'arsènic podien tenir un efecte sobre la ruta FA/BRCA. Per això es van seleccionar 5 compostos diferents d'arsènic cobrint les diferents possibilitats: trivalents o pentavalents, i orgànics o inorgànics. Així els compostos seleccionats van ser: l'arsenat ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), l'arsenit ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), el triòxid d'arsènic (ATO), l'àcid monometilarsínic ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ) i l'àcid monometilarsènic ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ). Per dur a terme aquest estudi es van utilitzar dues línies cel·lulars transformades de fibroblasts humans: La PD20, derivada d'un pacient Fanconi deficient pel gen *FANCD2*, de manera que no serà capaç d'activar la ruta FA/BRCA (citada com a FA/BRCA-deficient), i la seva corresponent línia isogènica corregida amb un vector retroviral pMMp-FANCD2 cDNA (citada com FA/BRCA-corregida).

Per tal d'avaluar si l'arsènic es capaç d'interferir amb la ruta FA/BRCA alterant la capacitat de reparar de les cèl·lules, es va exposar la línia FA/BRCA-corregida a concentracions subtòxiques dels compostos nombrats anteriorment (5  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$  i 0,25  $\mu\text{M}$  d' $\text{As}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{MMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MMA}^{\text{III}}$  i ATO, respectivament) durant una setmana, i a continuació es va fer un assaig de supervivència front a la mitomicina C (MMC), per determinar la sensibilitat de les cèl·lules enfront d'un agent causant d'ICLs àmpliament utilitzat. En l'experiment també es van incloure les línies FA/BRCA-deficient i FA/BRCA-corregida sense pre-tractament amb arsènic, per utilitzar com a controls.

En la figura 12, es pot observar com de tots els tractaments realitzats, únicament les cèl·lules FA/BRCA-corregides pre-exposades als compostos trivalents d'arsènic,  $\text{MMA}^{\text{III}}$  i ATO, mostren una sensibilitat a la MMC comparable a la que mostra la línia deficient en la ruta FA/BRCA incapaç de reparar les lesions ocasionades per la MMC. Per tant, es posa de manifest que, d'alguna manera, aquests compostos d'arsènic tenen un efecte sobre el correcte funcionament de la ruta FA/BRCA, que sens dubte cal ser explorat.



Analitzant el cas de l'arsenit, un dels agents trivalents, s'observa que tot i que no mostra una clara alteració de la ruta, s'intueix un comportament intermedi entre la línia FA/BRCA-deficient i la FA/BRCA-corregida, ja que a concentracions elevades de MMC la viabilitat de les cèl·lules disminueix. A més, cal destacar que en el tractament amb arsenit, el ritme de divisió de les cèl·lules es redueix en comparació a la resta de compostos, això fa pensar que si s'allargués el temps de proliferació i les cèl·lules es dividissin alguns cops més, segurament obtindríem un patró molt semblant al de les cèl·lules FA/BRCA-deficients.



**Figura 12.** Corbes de supervivència a la MMC en cèl·lules FA/BRCA-corregides pre-tractades amb diferents compostos d'arsenic. Les línies FA/BRCA-deficient i FA/BRCA-corregida sense pre-tractament amb arsenic, es van afegir com a controls (Dades no publicades).

D'aquests resultats sembla que els derivats pentavalents, As<sup>V</sup> i MMA<sup>V</sup>, no afectin la ruta FA/BRCA ja que les cèl·lules pre-tractades amb aquests compostos mostren un comportament molt similar a les cèl·lules FA/BRCA-corregides control, de manera que en un principi la seva capacitat de reparar els danys causats per la MMC no es veu afectada.

Així, en aquest experiment inicial vàrem observar com els diferents compostos d'arsenic poden tenir un paper diferent en funció del seu estat oxidatiu. Cal recordar, que durant el metabolisme de l'arsenic en les cèl·lules es generen diferents espècies derivades. S'ha

vist que cada un d'aquests compostos pot tenir unes característiques físico-químiques diferents i, per tant, exercir els seus efectes a través de diversos mecanismes (Flora, 2011). De manera general, es considera que els compostos inorgànics poden ser més tòxics que els orgànics, i que les formes trivalents ho són més que les pentavalents (Styblo et al., 2000). D'acord amb la bibliografia, s'ha vist que un dels mecanismes pel qual els compostos d'arsènic pentavalents actuen, és afectant la progressió de moltes reaccions metabòliques en reemplaçar el grup fosfat d'algunes molècules per l'arsenat, degut a la seva estructura anàloga (Hughes et al., 2011; Jomova et al., 2011; Sattar et al., 2016). D'altra banda, els compostos trivalents, degut a la seva alta afinitat pels grups tiol, són capaços d'unir-se a gran quantitat de proteïnes, alterant així la seva funció, conformació i interacció amb altres proteïnes, així com afectant la seva participació en diverses rutes cel·lulars (Mandal i Suzuki, 2002; Lu et al., 2004; Bergquist et al., 2009; Sattar et al., 2016).

#### **4.2.2. Els compostos trivalents d'arsènic, MMA<sup>III</sup> i ATO, interfereixen en la funció de la ruta FA/BRCA**

Quan es van explorar les interaccions dels compostos d'arsènic amb la via FA/BRCA, es va observar que dues setmanes d'exposició a dosis subtòxiques dels compostos d'arsènic trivalents MMA<sup>III</sup> i ATO, afecten la capacitat de les cèl·lules FA/BRCA-correctes de reparar les lesions produïdes per diferents agents inductors d'ICLs, com són la MMC o la hidroxiurea (HU), de manera que les cèl·lules pre-exposades exhibeixen un fenotip similar al de les cèl·lules FA/BRCA-deficients. Aquest fenotip es caracteritza per una disminució de la viabilitat després de l'exposició a agents activadors de la ruta FA/BRCA, una acumulació significativa de cèl·lules en fase G2/M del cicle cel·lular, indicatiu de que les cèl·lules acumulen lesions i no poden progressar normalment i, finalment, una disminució en la capacitat de monoubiquitinar la proteïna FANCD2, el pas clau, i per tant d'activar la ruta (Peremartí et al., 2014).

Tot i que en aquest estudi no ens hem centrat en descriure el mecanisme exacte pel qual s'altera aquesta via, creiem que una de les possibilitats és la interacció dels compostos trivalents amb les proteïnes de la ruta. En molts altres estudis, ja s'ha descrit que els derivats trivalents d'arsènic són capaços d'interaccionar amb proteïnes d'algunes de les

principals rutes de reparació, com ara PARP-1 (Hartwig et al., 2003; Ding et al., 2009; Gurung et al., 2010), XPA (Zhou et al., 2011; Shen et al., 2013), hOGG1 (Ebert et al., 2011) o XRCC1 (Xu et al., 2008; Ebert et al., 2011).

Moltes d'aquestes proteïnes són dianes potencials de l'arsènic, ja que en la seva estructura contenen dominis del tipus *dits de zinc* amb tres o més residus de cisteïnes disponibles. Zhou et al. han descrit en diversos articles la selectivitat de l'arsènic per interaccionar amb dominis que contenen configuracions amb 3 (C3H1) o 4 cisteïnes (C4). Degut a l'alta afinitat de l'arsènic amb els grups tiol, la substitució de l'àtom de zinc per un altre d'arsènic, alteraria l'estructura dels *dits de zinc*, de manera que provocaria una modificació de la seva funció, com en el cas de PARP-1 i XPA, proteïnes involucrades en les rutes BER i NER respectivament (Zhou et al., 2011, 2014).

S'ha determinat que moltes de les proteïnes que intervenen en el funcionament de la ruta FA/BRCA contenen un domini UBZ4 amb 3 cisteïnes (C2HC), com RAD18, una proteïna amb funció ubiquitin-lligasa implicada en l'activació de la ruta, SLX4 (FANCP) que actua durant els passos finals formant part de la maquinària de la recombinació homòloga, la nucleasa FAN1, la nucleasa SNM1A i la proteïna Fanconi associada FAAP20 (Hofmann, 2009; Kim i D'Andrea, 2012). A més a més, la proteïna FANCL, que forma part del complex FA, és una proteïna amb activitat ubiquitin-lligasa que s'ha vist que conté un domini *dit de zinc* RING amb una estructura C3HC4 (Hodson et al., 2011), amb alta afinitat amb les molècules d'arsenit. Tot i l'alta probabilitat de que l'arsènic interaccioni directament amb aquests dominis *dits de zinc* i, conseqüentment, bloquegi la funció d'aquestes proteïnes, aquest és un tema que queda pendent de confirmar.

D'una altra banda, també s'ha vist que l'afinitat de l'arsènic pels dominis *dits de zinc*, indirectament provoca una alteració en la funció d'algunes proteïnes de la ruta FA/BRCA i, per tant, disminueix la eficiència de la reparació dels trencaments de cadena doble (DSB). L'exposició a arsenit (5 i 20  $\mu$ M durant 24 hores) en cèl·lules HeLa disminueix de forma dosi-dependent, el reclutament tant de BRCA1 (FANCS) com de RAD51 (FANCR) en el lloc del dany. A més, s'ha comprovat que aquesta disminució no es deguda a una alteració dels nivells d'expressió, ja que els resultats de la PCR a temps real, mostren que l'arsenit no afecta els nivells ni de *BRCA1 (FANCS)* ni *RAD51 (FANCR)*, ni tampoc d'altres gens importants en la reparació dels trencaments de doble cadena (DSB), com *XRCC1*, *Ku70* o *Ku80*. Així doncs, Zhang et al. (2014) van confirmar que l'arsenit es capaç d'unir-

se al domini *dits de zinc* RING de RNF20-RNF40, un heterodímer encarregat d'ubiquitinar la histona H2B. Aquesta, al seu torn, és l'encarregada de descompactar la cromatina facilitant la reparació dels DSB per part d'altres proteïnes efectores com BRCA1 (FANCS) o RAD51 (FANCR). De manera que, l'arsenit en unir-se amb RNF20-RNF40, inhibeix la ubiquitinació de la histona H2B, que no realitza la seva funció descompactadora i això interfereix en l'activitat de BRCA1 (FANCS) i RAD51 (FANCR), inhibint la reparació dels DSB (Zhang et al., 2014).

En molts estudis s'ha descrit la capacitat de l'arsènic per interferir amb el funcionament dels mecanismes de reparació BER o NER, però aquest és el primer cop que es relaciona directament l'arsènic amb la interacció de la ruta FA/BRCA.

#### **4.2.3. Conseqüències de l'alteració de la funció de la ruta FA/BRCA: Inestabilitat genòmica**

Per mantenir la integritat genòmica, les cèl·lules tenen mecanismes que assegurin una bona duplicació i distribució del DNA, una alta fidelitat en la replicació, al temps que eviten la divisió de cèl·lules anormals i reparen el dany en el DNA. Quan es produeixen situacions on s'acumulen nivells molt elevats de dany, o els sistemes de reparació són incapaçs de reparar o hi ha un desequilibri entre la proporció de proliferació cel·lular i mort, sorgeix l'anomenada inestabilitat genòmica. Els genomes de certes cèl·lules són més susceptibles que d'altres en acumular dany genètic, i l'acumulació d'un gran nombre d'aberracions pot fer que finalment les cèl·lules es tornin tumorals. Per tant, la inestabilitat genètica és un tret característic de les cèl·lules tumorals (Bhattacharjee et al., 2013).

L'arsènic és considerat un agent genotòxic des de fa molt de temps. Colognato et al. (2007) van analitzar els efectes genotòxics de diferents compostos d'arsènic en limfòcits perifèrics humans a través de l'assaig de micronuclis (MN). Van veure que tots els derivats de l'arsènic eren capaços d'induir MN en les cèl·lules excepte el DMA<sup>V</sup>, però cada un a un rang de concentracions diferents. El compost que induïa un major dany va resultar ser el MMA<sup>III</sup> a una concentració de 2 µM. A més, van analitzar l'origen d'aquests MN utilitzant tècniques de FISH i van veure que es formaven a causa d'efectes aneugènics (Colognato et al., 2007). En un altre estudi, utilitzant l'assaig del cometa

també es va demostrar la capacitat genotòxica d'alguns dels vuit compostos d'arsènic estudiats, com ara l'arsenat o l'arsenit, en cèl·lules limfoblastoides humanes (Guillamet et al., 2004).

Una característica típica de moltes de les poblacions crònicament exposades a arsènic, on la incidència de certs tipus de càncer és significativament elevada, es que presenten elevats nivells de dany en el DNA (Tian et al., 2001; Basu et al., 2004; Martínez et al., 2004; Bartolotta et al., 2011; Annangi et al., 2016). Tot i que s'ha vist que l'arsènic indueix l'adquisició del fenotip tumoral, els mecanismes que provoquen l'aparició d'instabilitat genòmica poden ser molts i no estan del tot ben caracteritzats. Alguns dels mecanismes proposats són l'alteració dels punts de control del cicle cel·lular, el dany genètic, la segregació anormal dels cromosomes, la disfunció telomèrica, alteracions en l'estructura de la cromatina o la inhibició de l'apoptosi, entre d'altres (Bhattacharjee et al., 2013). En l'estudi anterior, ja hem explorat com la inducció de ROS o la hipometilació del DNA estan vinculats amb aquest fet, però en aquest estudi vam voler veure com la inhibició dels mecanismes de reparació pot influenciar l'adquisició d'instabilitat genòmica.

Per analitzar el comportament de les freqüències de MN induïts pel diepoxibutà (DEB), un potent agent inductor d'enllaços creuats entre cadenes del DNA, després del pretractament de les cèl·lules FA/BRCA-correctes amb MMA<sup>III</sup> i ATO, vam realitzar el test de MN mitjançant citometria de flux. Tal i com preveníem, aquestes freqüències són molt més elevades després de la inhibició de la ruta FA/BRCA exercida pels compostos trivalents d'arsènic (Peremartí et al., 2014). Els enllaços creuats entre cadenes del DNA (ICLs) es consideren una de les lesions més greus en el material genètic. L'alteració de la ruta FA/BRCA, i per tant la impossibilitat de reparar aquest tipus de lesions, pot induir trencament cromosòmic, sent una altra possible causa d'instabilitat genòmica, contribuint als efectes carcinogènics de l'arsènic.

En línia amb els nostres resultats, en un estudi es va analitzar la inducció d'intercanvis entre cromàtides germanes (SCE) i d'aberracions cromosòmiques (CA) en limfòcits humans tractats amb baixes concentracions d'arsenit (0,5-2  $\mu$ M), de DEB, o amb arsenit en combinació amb DEB (Wiencke i Yager, 1992). Es va veure que tant l'arsènic com el DEB en solitari, augmentaven les freqüències de SCE respecte el control sense tractar, així com també el nombre d'aberracions cromosòmiques. En analitzar els resultats

obtinguts després del tractament combinat d'arsènic més DEB, van veure que les freqüències eren molt superiors al simple efecte additiu esperat. Mentre que el nombre de CA era d'unes 4 a 8 vegades superior, les freqüències de SCE eren entre 7 i 40 vegades majors, indicant una interacció específica de l'arsenit amb la inducció o la reparació del dany produït pel DEB (Wiencke i Yager, 1992). Ja en aquest estudi, es va suggerir que el motiu d'aquests resultats podia ser la interacció de l'arsènic amb els mecanismes de reparació, i que l'augment de la inestabilitat genòmica observada podia ser important per la carcinogènesis exercida per l'arsènic. Malgrat aquestes dades, no ha estat fins la publicació del nostre estudi quan s'ha relacionat per primer cop la interferència de dosis ambientalment rellevants de dos compostos d'arsènic, MMA<sup>III</sup> i ATO, amb el correcte funcionament de la ruta FA/BRCA.

#### **4.3. APLICACIONS DE L'ALTERACIÓ DE LA FUNCIÓ DE LA RUTA FA/BRCA: TERÀPIA ANTITUMORAL**

Els resultats obtinguts en el nostre tercer estudi considerem que són certament rellevants per l'ús dels derivats de l'arsènic en la teràpia contra el càncer. L'alteració de la funció de la ruta FA/BRCA amplificarà el dany causat pels agents terapèutics que promouen la formació d'ICLs o altres lesions reparades a través de la ruta FA/BRCA, augmentant la resposta, millorant els resultats obtinguts i disminuint la probabilitat de que apareguin efectes secundaris. De fet aquest plantejament no és el primer cop que es proposa. Així, modular la resposta de les vies de senyalització és un objectiu emergent per al desenvolupament de noves teràpies contra el càncer. Diversos grups d'investigació han suggerit que moltes de les resistències que desenvolupen certs tipus de tumors són degudes a una sobre activació de la ruta FA/BRCA (Nakashima et al., 2015), de manera que es podrien superar amb una estratègia d'aquest tipus.

El cisplatí (CDDP) és un agent quimioterapèutic derivat del platí, considerat un dels medicaments contra el càncer més potents d'avui en dia. Des de que va ser aprovat l'any 1978, ha estat utilitzat àmpliament per al tractament de diversos tipus de càncers, com ara el d'ovari, de testicle, de cap i coll, de pulmó i de bufeta, administrat sol, o en combinació amb altres fàrmacs (Alderden et al., 2006). Degut a la seva estructura, el cisplatí pot reaccionar fàcilment amb proteïnes, DNA, RNA, fosfolípids de membrana, o

amb molècules que contenen grups tiol, com el glutatió, cisteïnes o metionina (Macciò i Madeddu, 2013). Les principals lesions que indueix el cisplatí són enllaços creuats dins de la mateixa cadena del DNA entre guanines adjacents, que representen aproximadament un 65% del total, o adductes entre guanines i adenines, el 25% del total. Però els efectes més nocius són els produïts pels enllaços entre dues guanines en cadenes oposades (ICLs), tot i que aquestes lesions suposen menys del 5% del total (Köberle et al., 2010). Aquests danys desencadenen diverses respostes cel·lulars com inhibició de la transcripció, bloqueig del cicle cel·lular, interferència amb la reparació del DNA, apoptosi, entre altres. També s'ha vist que el cisplatí pot unir-se als grups tiol d'algunes proteïnes, tot i que el dany derivat d'aquest fet és poc rellevant. Una altra característica del cisplatí és que pot generar estrès oxidatiu, ja sigui augmentant els nivells de ROS, o bé interferint amb les defenses antioxidants (Macciò i Madeddu, 2013). Així doncs, les lesions induïdes pel cisplatí desencadenaran una resposta cel·lular, que inclou l'activació de múltiples mecanismes de reparació del DNA, com ara la reparació per escissió de nucleòtids (NER), la recombinació homòloga (HR), la síntesis de DNA a través de la lesió (TLS), així com la ruta FA/BRCA. Com hem dit, les lesions més perjudicials són els ICLs, de manera que l'activació de la ruta FA/BRCA pot ser la via més rellevant.

Tot i ser un potent fàrmac anticancerigen, avui en dia l'aplicació del cisplatí en certs tipus de càncers és limitada, a causa dels greus efectes secundaris que genera. L'experiència obtinguda en estudis i en el seu ús en la clínica, mostren una correlació entre la dosi i l'eficàcia. No obstant, els efectes secundaris del cisplatí també són dosi-dependents, de manera que això limita la utilització de dosis elevades, comproment així el seu èxit (Macciò i Madeddu, 2013). Un altre problema de l'ús del cisplatí, que també limita la seva eficàcia terapèutica, és la resistència cel·lular que han desenvolupat certs tumors en incrementar la seva capacitat de reparació i tolerar lesions en el DNA. Encara no es coneixen ben bé els mecanismes pels quals els tumors es fan resistents al cisplatí, però pel que s'ha estudiat en diverses línies cel·lulars resistents, sembla ser un procés multifactorial (Dean et al., 2005; Köberle et al., 2010). S'ha demostrat que les cèl·lules canceroses poden desenvolupar resistència al cisplatí a través de canvis en el transport de fàrmacs, el que provoca una acumulació reduïda de cisplatí intracel·lular (Kuo et al., 2007). Altres mecanismes també involucrats són: i) un sistema millorat de desintoxicació

de fàrmacs a causa de nivells elevats de neutralitzadors (*scavengers*) intracel·lulars com ara el glutatió o les metal·lotioneïnes (Jansen et al., 2002; Surowiak et al., 2007), ii) canvis en els sistemes de reparació del DNA que impliquen una major activitat de la ruta NER o FA/BRCA (Ferry et al., 2000; Wynne et al., 2007) o pèrdua de la ruta de reparació per aparellaments incorrectes (MMR)(Papouli et al., 2004), iii) canvis en els mecanismes de tolerància al dany del DNA, incrementant l'expressió de polimerases de baixa fidelitat amb tendència a errors (Haynes et al., 2015), o iv) finalment canvis en les vies d'apoptosi (Gadducci et al., 2002; Yang et al., 2004).

Centrant-nos en el punt de l'alteració dels mecanismes de reparació, i més concretament en l'augment de l'activitat de la ruta FA/BRCA, diversos grups d'investigació fa molt temps que centren els seus esforços en realitzar assajos amb milers de molècules per identificar agents que siguin capaços d'inhibir la funció de la ruta FA/BRCA (Chirnomas et al., 2006; Jacquemont et al., 2012). Tot i que, els efectes combinats del cisplatí amb aquestes molècules varien en funció del tipus cel·lular i del context, s'han trobat diverses molècules que compleixen aquest requisit i, fins i tot, en alguns casos s'estan realitzant assajos clínics per valorar la seva eficàcia.

Una de les molècules que ha mostrat més efectivitat ha estat la curcumina, un polifenol natural derivat de les arrels de la cúrcuma. Aquest compost és efectiu en inhibir la funció de la ruta FA/BRCA i sensibilitzar els tumors enfront del cisplatí, en càncer d'ovari i de mama (Chirnomas et al., 2006), en mielomes múltiples (Xiao et al., 2010), i en càncer de pulmó. La combinació de curcumina més cisplatí, provoca una disminució de la monoubiquitinació de FANCD2, una disminució del nombre de *foci* nuclears de FANCD2 formats i un augment de l'apoptosi. Per tot això, els autors conclouen que la curcumina exerceix un efecte sinèrgic sobre la toxicitat del cisplatí en les cèl·lules resistents. Encara que no aprofundeixen en el mecanisme d'acció d'aquest fet, els autors plantegen que podria ser degut a una inhibició de la funció del proteosoma, que es necessari per a l'activació de la ruta FA/BRCA i per la senyalització de la reparació del dany al DNA (Chen et al., 2015).

En un altre estudi, es mostra com el fenilbutirat, un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), també es capaç de sensibilitzar les cèl·lules de càncer de cap i coll resistents al cisplatí. Aquesta sensibilització es correlaciona amb una disminució significativa de la formació de *foci* de FANCD2 induïts pel cisplatí. No obstant, en aquest estudi es mostra



que l'alteració de la ruta FA/BRCA no es deguda a una disminució de la capacitat de monoubiquitar FANCD2, sinó a una disminució de l'expressió de la proteïna BRCA1. A més, els autors observen que després del tractament amb fenilbutirat de cèl·lules tumorals amb la ruta FA/BRCA defectuosa, aquestes també es tornen sensibles al cisplatí, indicant que hi podria haver un altre mecanisme implicat (Burkitt i Ljungman, 2008).

Segons els resultats obtinguts en el nostre estudi (Peremartí et al., 2014), la utilització de derivats trivalents de l'arsènic, com ara el MMA<sup>III</sup> o l'ATO, també és útil per a inhibir la funció de la ruta FA/BRCA. Per tant, proposem aquesta nova estratègia per al tractament de tumors.

Tot i que l'arsènic es conegut bàsicament per les seves propietats tòxiques, s'ha estat utilitzat com a agent terapèutic des de fa més de 2.400 anys (Kritharis et al., 2013). Els primers casos documentats són de l'època dels grecs i els romans, anys més tard es va popularitzar l'ús de l'anomenada *Fowler's Solution*, i a principis de la dècada de 1910 es va desenvolupar el *Salvarsan*. Tots aquests fàrmacs van ser utilitzats eficaçment pel tractament d'abscessos i úlceres, asma, psoriasis, malària i sífilis (Waxman i Anderson, 2001). Però amb el temps, l'ús de l'arsènic va perdre popularitat degut a la seva toxicitat i efectes secundaris, i al seu probable paper com a carcinogen (Emadi i Gore, 2010). Més recentment, el paper de l'arsènic com antitumoral, concretament del triòxid d'arsènic (ATO), ha ressorgit donada la seva eficàcia demostrada en diversos casos de leucèmia promielocítica aguda (APL), on els pacients han aconseguit una remissió completa de la malaltia (Lengfelder et al., 2012). Finalment, a l'any 2000 després de diversos assajos amb resultats positius, l'ATO va ser aprovat per la *Food and Drug Administration* (FDA) dels Estats Units per a l'ús en casos de recaiguda d'APL. El ressorgiment de l'ús de l'arsènic en teràpia, ha plantejat la seva aplicació en altres malalties, com els mielomes múltiples o altres tumors sòlids. No obstant, el seu ús com a agent en solitari en diversos assajos clínics no ha donat una resposta beneficiosa. Així, s'ha provat la seva administració en pacients amb càncer de cèl·lules germinals (Beer et al., 2006), amb carcinomes renals metastàtics (Vuky et al., 2002), amb carcinomes hepatocel·lulars (Lin et al., 2007), o amb càncer de pàncreas (Kindler et al., 2008), entre d'altres, i en les condicions utilitzades en aquests estudis aquesta teràpia no ha estat efectiva degut a la seva elevada toxicitat i als efectes secundaris severos apareguts. Malgrat aquestes dades,

l'ús de l'ATO en teràpia combinada amb altres agents antitumorals ha donat resultats més prometedors, ja que nombrosos pacients han mostrat una resposta positiva, parcial o completa, amb efectes secundaris lleus (Ardalan et al., 2010; Podolsky et al., 2011). En un estudi *in vitro*, Kumar et al. (2008) van demostrar l'efectivitat de l'ATO en combinació amb la radiació ionitzant. Van veure com en cèl·lules de carcinoma oral escamós augmentava l'índex d'apoptosi, es reduïa la formació de colònies amb capacitat de créixer independentment de substrat i es reduïa la capacitat d'angiogènesi de les cèl·lules. Sorprenentment, també van veure que el tractament combinat no tenia cap efecte nociu sobre cèl·lules normals d'osteoblasts, un efecte secundària freqüent en la radioteràpia. Van confirmar tots aquests efectes en ratolins, suggerint una nova estratègia per millorar els efectes secundaris de la radiació (Kumar et al., 2008). En un altre treball, també s'ha demostrat que la combinació de l'ATO amb agents alquilants causants d'enllaços creuats entre cadenes del DNA (ICLs), és una combinació útil per a tractar tumors resistents a la quimioteràpia normalment establerta. En aquest context, Lee et al. (2010) van veure que la teràpia combinada amb ATO i l'agent BO-1012, un compost causant d'ICLs, reduïa dràsticament el creixement de cèl·lules tumorals de bufeta resistents al cisplatí. A més, el dany generat pel BO-1012 no era reparat eficaçment i, a conseqüència, augmentaven els números de *focis* de  $\gamma$ -H2AX. A més, en ratolins aquest tractament combinat era capaç de reduir significativament la mida dels tumors (Lee et al., 2010). Aquests estudis, entre d'altres, posen de manifest que l'ús de l'ATO en combinació amb altres agents, és una estratègia prometedora en la lluita contra el càncer. Tot i això, encara queden molts buits per omplir, remarcant la necessitat de fer més estudis.

Per contribuir al coneixement de les avantatges de l'ús de l'arsènic en la teràpia antitumoral, i veure si la inhibició de la ruta FA/BRCA per aquest compost és rellevant, en aquesta Tesis ens vàrem plantejar un estudi utilitzant la combinació de cisplatí més ATO per al tractament de cèl·lules tumorals de bufeta.

Cal recordar que el càncer de bufeta és un dels més importants a nivell mundial, en quant a la seva incidència. De fet, a l'any 2015 és considerava com el quart tipus més comú en homes i l'onzè en dones (Siegel et al., 2015). Els factors de risc per al desenvolupament del càncer de bufeta es poden classificar en tres grups: i) anomalies

genètiques o moleculars, que inclou mutacions en oncogens o en gens supressors de tumors; ii) exposicions químiques o ambientals, per exemple a nitrits o nitrats, amines aromàtiques, acroleïna, carbó o arsènic, o iii) bé degut a irritacions cròniques. Tot i així, el factor de risc més important està associat al consum de tabac (Kaufman et al., 2009). Els tumors de bufeta es poden classificar en quatre categories segons la seva histologia patològica: papil·lomes, neoplàsia papil·lar amb baix potencial maligne, carcinoma papil·lar de baix grau, i carcinoma papil·lar d'alt grau. Un 75% dels pacients presenten tumors no invasius, i d'aquests un 50% solen ser de baix grau, mentre que l'altre 25% seran tumors invasius o metastàtics, on la majoria són d'alt grau (Kamat et al., 2016). La quimioteràpia convencional per tractar aquests tumors sol estar basada en fàrmacs derivats del platí, principalment el cisplatí, que mostren resultats prometedors en tumors localitzats. La problemàtica sorgeix en aquells pacients amb tumors metastàtics, o en aquells en els que reapareix un tumor resistent després d'un primer tractament. Un 90% d'aquests pacients no superen la seva malaltia.

Amb els anys han sorgit noves formes de teràpia en les quals es combinen diferents agents per augmentar l'èxit dels tractaments, però malauradament s'ha arribat a un estancament, degut a les altes dosis requerides, els seus efectes secundaris, i el fracàs de les teràpies combinades (Yafi et al., 2011). Per tot això, molts investigadors estan centrant els seus estudis en l'exploració de noves combinacions de fàrmacs que puguin ser útils en aquests procediments.

Així doncs, en un esforç per millorar els resultats actuals i disminuir els efectes secundaris, en el nostre estudi hem utilitzat tres línies de cèl·lules de carcinoma de bufeta diferents amb la finalitat de demostrar l'eficàcia d'aquesta nova estratègia proposada. Aquestes són la SW800, la T24, provinent d'un tumor d'alt grau, i la 5637, provinent d'un tumor de baix grau. Ambdós últimes línies han estat àmpliament utilitzades en diversos estudis com a models de càncer de bufeta (Tatokoro et al., 2012; Sun et al., 2017). Els nostres resultats mostren que, després del tractament combinat a dosis ambientalment rellevants d'ATO i cisplatí en les tres línies cel·lulars escollides, la capacitat de reparar els danys ocasionats pel cisplatí es veu compromesa. A més, podem concloure que la funció de la ruta FA/BRCA en aquestes cèl·lules es troba alterada com a conseqüència del tractament combinat, ja que les cèl·lules, tot i tenir els mateixos nivells de dany, mostren una disminució significativa de la quantitat de proteïna FANCD2

monoubiquitinada, així com un menor nombre de *foci* induïts, fets que es correlacionen amb una menor activació de la ruta. A més, les cèl·lules exposades al tractament combinat mostren una reducció significativa de la viabilitat, en comparació amb els tractaments d'ATO i cisplatí en solitari. De fet, s'ha comprovat que aquest efecte mostra una relació sinèrgica en la majoria de concentracions utilitzades per les tres línies cel·lulars, segons els valors dels índex d'interacció obtinguts (Chou, 2010).

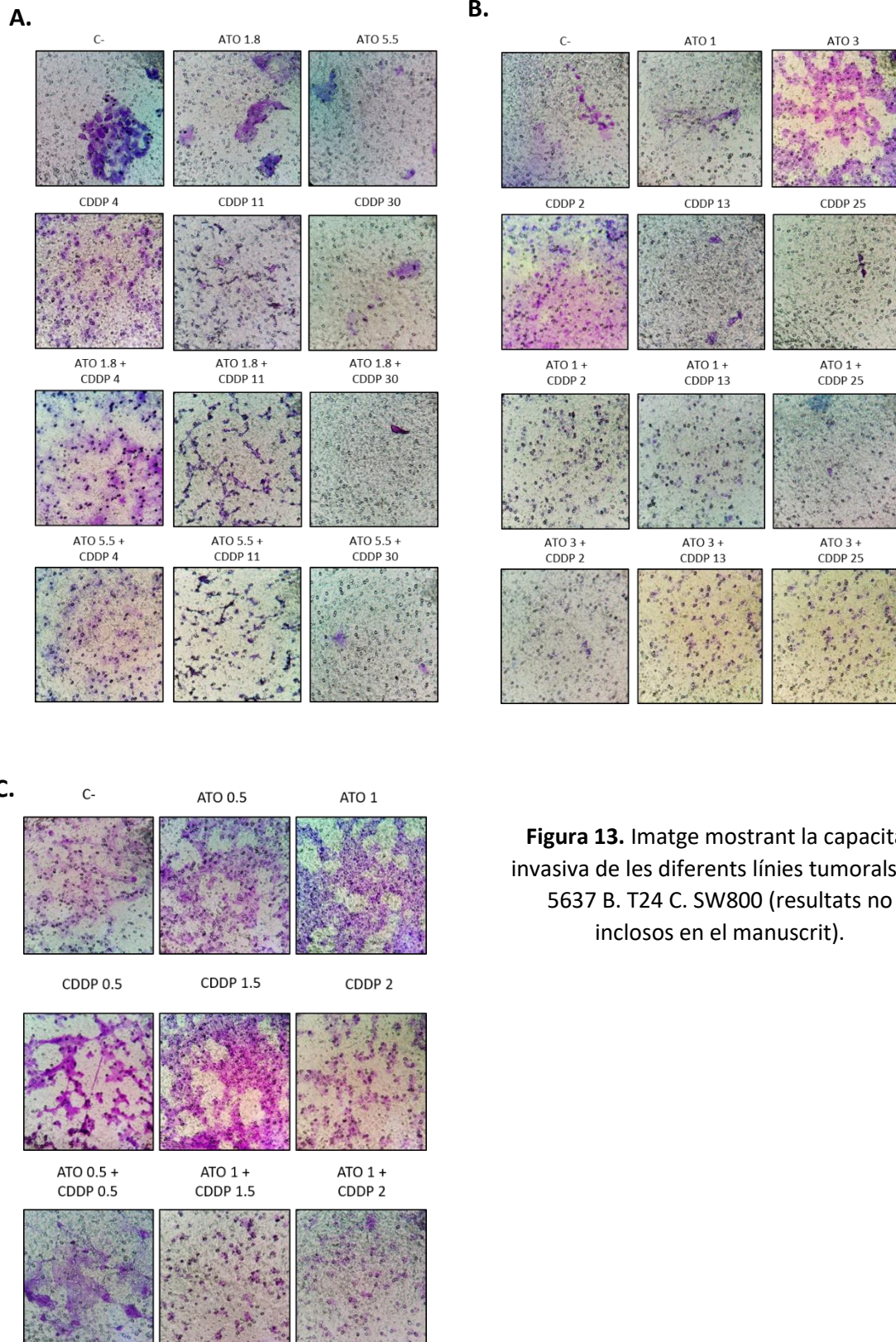
Tot i que la teràpia combinada mata gairebé totes les cèl·lules tumorals, de vegades poden sobreviure poblacions molt reduïdes de cèl·lules que mostren característiques de cèl·lules mare tumorals (CSC). Aquestes poblacions residuals podrien tenir un paper molt important en els mecanismes de resistència a fàrmacs, ja que presenten la capacitat de regenerar el tumor. Per exemple, s'ha vist que en injectar aquestes cèl·lules en ratolins, o bé en plaquejar-les en medi amb *agar tou*, aquestes cèl·lules tenen la capacitat de créixer i seguir proliferant (Dean et al., 2005). En el nostre estudi, després d'aplicar els tractaments combinats a les cèl·lules, encara hi ha un 20-30% de cèl·lules que sobreviuen. Aquestes cèl·lules que no moren, podrien ser les responsables d'iniciar els processos de resistència anteriorment descrits, per això hem volgut dur a terme una sèrie d'anàlisi per comprovar el potencial carcinogènic d'aquestes cèl·lules supervivents. Un dels trets més característics, i a l'hora un dels biomarcadors de transformació *in vitro* més utilitzats, és la capacitat de les cèl·lules de formar colònies que creixen de manera independentment d'ancoratge a substrat, el que és més conegut com l'assaig del *soft-agar* (Borowicz et al., 2014). Les nostres cèl·lules, en ser tumorals, ja presenten aquesta característica de per si; per tant, el que avaluarem serà la disminució d'aquesta capacitat després del tractament combinat d'ATO i cisplatí. Els resultats obtinguts mostren una disminució significativa del nombre de colònies que aquestes cèl·lules han estat capaces de formar, en comparació amb el tractament de cisplatí en solitari, que de per si ja havia reduït la capacitat de les cèl·lules enfront els controls no tractats.

Una altra característica important de les cèl·lules tumorals és l'habilitat de migrar i envair, el que els hi permet canviar de posició entre els teixits o entrar en el corrent sanguini, disseminar-se i créixer en un altre òrgan, provocant metàstasi tumoral. Per migrar, les cèl·lules han de reorganitzar el seu citoesquelet i perdre rigidesa per a poder interactuar amb les estructures dels teixits circumdants. En aquest punt, la matriu extracel·lular (ECM), una xarxa complexa de macromolècules com col·lagen,

proteoglicans, fibronectina o laminina, actua a l'hora com a substrat i com a barrera, per a la mobilitat de les cèl·lules (Friedl i Wolf, 2003). Les cèl·lules canceroses normalment secreten nivells elevats d'enzims amb capacitat de degradar la ECM creant un espai per a la migració i la invasió de les cèl·lules. En aquest procés les metallo proteïnases de matriu (MMP), juguen un paper molt important en la mobilitat cel·lular, l'angiogènesi i la progressió del càncer. De les més de vint MMPs descrites fins al moment, la MMP-2 i la MMP-9 són molt importants en el càncer en humans, estant involucrades en la degradació del col·lagen tipus IV i la gelatina, els dos components principals de la ECM (Roomi et al., 2009). A més, la sobreexpressió d'aquestes MMPs s'ha correlacionat específicament amb tumors de bufeta d'alt grau, i amb un factor de pronòstic greu en pacients (Fus i Górnicka, 2016).

En el nostre estudi es va avaluar la capacitat migratòria, i la quantitat de MMPs secretades, així com la capacitat invasiva de les cèl·lules després dels diferents tractaments. Els resultats mostren que l'exposició a ATO en solitari no té cap efecte significatiu sobre cap dels tres paràmetres analitzats, mentre que el cisplatí en solitari tant sols redueix la capacitat migratòria en les concentracions més elevades. En referència al tractament combinat, observem en tots els casos una disminució significativa de la capacitat migratòria, al temps que observem una disminució en la secreció de MMP2+9 que es correlaciona també amb una menor capacitat invasiva de les cèl·lules en comparació amb el tractament de cisplatí sol (figura 13).

Per tant, d'aquest estudi podem concloure que tot i la capacitat d'aquestes cèl·lules de sobreviure al tractament combinat, el seu potencial carcinogènic es troba significativament disminuït, i no presenten el fenotip de cèl·lules mare tumorals. Seria interessant per futurs estudis, confirmar aquest plantejament, analitzant la presència de marcadors de superfície específics de càncer de bufeta, com ara CD44, CD133, CD47, CD49 o *KRT14* (Ohishi et al., 2015).



**Figura 13.** Imatge mostrant la capacitat invasiva de les diferents línies tumorals. A. 5637 B. T24 C. SW800 (resultats no inclosos en el manuscrit).

En general, existeixen pocs estudis on s'hagi provat l'efecte combinat de l'ATO i el cisplatí. Alguns d'ells són en carcinoma hepatocel·lular (Wang et al., 2001), càncer d'ovari (Zhang et al., 2009), càncer escamós de cap i coll (Kotowski et al., 2012), càncer de pulmó (Zheng et al., 2013), carcinoma oral escamós (Nakaoka et al., 2014) o osteosarcoma (Saitoh et al., 2016). En el seu estudi, Wang et al. (2001) i Zhang et al. (2009) van demostrar que les taxes d'inhibició de la proliferació cel·lular de l'ATO en combinació amb el cisplatí són més altes que les de l'ATO o el cisplatí en solitari. En aquests estudis, la interacció entre l'ATO i el cisplatí va resultar sinèrgica, i en major intensitat a baixes concentracions. Una possible raó d'aquestes dades es que l'activitat antitumoral d'un fàrmac individual es satura a altes concentracions, i es difícil d'incrementar després de la combinació amb un altre fàrmac, o també pot ser que a concentracions elevades hi hagi un efecte antagonista entre la combinació dels dos fàrmacs, que contraresti l'efecte individual.

D'altra banda, un altre estudi en càncer escamós de cap i de coll també va demostrar un efecte sinèrgic entre l'ATO i el cisplatí, però en aquest cas les concentracions utilitzades van ser molt elevades, de manera que no són rellevants per al seu ús en teràpia clínica. En aquest estudi tampoc es va veure cap efecte sobre la inducció d'apoptosi, de manera que tot i mostrar alguns resultats prometedors, la conclusió es que són necessaris més estudis per demostrar l'aplicabilitat d'aquesta teràpia combinada en aquests tipus de tumor (Kotowski et al., 2012).

En un altre estudi, ja més complert, amb cèl·lules tumorals de pulmó, també s'ha validat l'efecte sinèrgic de l'ATO en combinació amb el cisplatí. Els autors van observar una disminució de la viabilitat, una disminució dels nivells intracel·lulars de glutatió i una despolarització de la membrana mitocondrial, tot això incrementant els nivells d'apoptosi en els tractament combinats, suggerint la implicació de la via mitocondrial. A més, van observar un augment significatiu en el nombre de trencaments de doble cadena, quantificats gràcies als *focus* de la histona H2AX. D'altra banda, també van estudiar la interacció de l'ATO amb l'agent antitumoral etoposid, però aquesta relació va resultar antagonista. Els resultats van ser confirmats *in vivo* en ratolins (Zheng et al., 2013).

Altres estudis com el de Nakaoka et al. (2014) també proposen l'apoptosi com a mecanisme involucrat en l'eficàcia de la combinació de l'ATO i el cisplatí, en cèl·lules de

carcinoma oral escamós. Aquests autors van observar un efecte sinèrgic del tractament combinat en la disminució de la proliferació cel·lular, que resulta en un augment de l'apoptosi degut a un increment de les ROS i una activació de les caspases 3 i 7 (Nakaoka et al., 2014).

Es coneix que l'ATO inhibeix l'activació de la via de senyalització *Hedgehog*, promovent l'apoptosi en cèl·lules d'osteosarcoma. Però en estudis *in vivo* s'ha vist que per a que aquest efecte sigui significatiu, les concentracions utilitzades d'ATO han de ser molt més elevades que les dosis utilitzades en la teràpia en humans. Per mirar de reduir aquestes dosis d'ATO, Saitoh et al. (2016) han provat diferents combinacions amb fàrmacs estàndards. Els seus resultats mostren que la combinació de l'ATO amb el cisplatí, la ifosfamida o la doxorubicina inhibeix la proliferació *in vitro* de les cèl·lules d'osteosarcoma. Aquests resultats han estat confirmats *in vivo*, observant una reducció significativa de la mida dels tumors induïts en ratolins. D'aquests resultats és interessant destacar, que la ifosfamida és un fàrmac antitumoral pertanyent al grup de les mostasses nitrogenades, agents alquilants amb habilitat de formar ICLs en el DNA (Panasci et al., 2002), mentre que la doxorubicina és un tipus d'antraciclina, fàrmacs amb habilitat per generar trencaments de doble cadena en el DNA (Yang et al., 2015). Per tant, ambdós agents tenen la capacitat d'activar la ruta FA/BRCA durant els processos de reparació de les lesions que indueixen. Així, els resultats d'aquest estudi estarien en línia amb els nostres resultats, contribuint així amb la hipòtesi plantejada en aquesta Tesis.

Finalment, voldríem destacar que aquest és el primer estudi on es demostra que la teràpia combinada d'ATO i cisplatí mostra uns efectes sinèrgics respecte la teràpia de cisplatí en solitari, en el tractament del càncer de bufeta. Això posa de rellevància la importància de l'ús dels derivats d'arsènic en la teràpia antitumoral. Tot i que podria haver-hi altres mecanismes involucrats, el nostre Grup proposa, per primer cop, que aquest augment dels efectes del cisplatí es degut a la inhibició de la funció de la ruta FA/BRCA per part de l'ATO, de manera que les cèl·lules no podran reparar els danys ocasionats en el DNA i la seva viabilitat es veu compromesa. La sinèrgia observada en el tractament combinat, permet plantejar una reducció de les concentracions de fàrmacs individuals utilitzades, contribuït així en la reducció dels efectes secundaris associats i l'adquisició de resistència per part dels tumors.





## **5. CONCLUSIONS**



## 5. CONCLUSIONS

According with the objectives raised in the frame of this Thesis, and after the discussion of the obtained results, we conclude that:

1. A time-dependent accumulation of ODD and chromosome genotoxic DNA damage take place during the acquisition of the arsenite-associated transformed phenotype, a carcinogenic mechanism where *As3mt* overexpression is involved. Our results also demonstrate that chronic arsenite exposure leads to a DNA damage resistant phenotype in arsenite-transformed cells, through *Mth1* induction.
2. Exposure to non-cytotoxic doses of the trivalent arsenic compounds MMA<sup>III</sup> and ATO disrupt the FA/BRCA function, therefore sensitizing cells to those compounds causing double-strand breaks or ICLs, displaying a novel mechanism of arsenic-induced genomic instability and co-carcinogenesis.
3. Combination therapy of ATO plus cisplatin improves anticancer outcomes in bladder cancer models, compared to cisplatin-single therapy. Enhancement of cisplatin toxicity is mainly due to the ATO-induced inhibition of the FA/BRCA pathway.



## 5. CONCLUSIONS

Tenint en compte els objectius plantejats en l'inici d'aquesta Tesi, i després de la discussió dels resultats obtinguts, d'aquest treball se'n deriven les següents conclusions:

1. Durant el procés d'adquisició del fenotip tumoral induït per l'arsènic, es produeix una acumulació de dany oxidatiu i dany cromosòmic en el DNA, un mecanisme associat a la carcinogènesi de l'arsènic, on també s'ha vist involucrada una sobreexpressió del gen *As3mt*. Els nostres resultats també demostren que les cèl·lules transformades *in vitro*, després de l'exposició crònica a arsenit, presenten un fenotip resistent als danys en el DNA, caracteritzat per la inducció del gen *Mth1*.
2. L'exposició a concentracions no citotòxiques dels compostos trivalents d'arsènic MMA<sup>III</sup> i ATO, es capaç d'alterar la funció normal de la ruta FA/BRCA, sensibilitzant les cèl·lules enfront d'agents que causen trencaments de doble cadena o enllaços creuats en el DNA, presentant-se com un nou mecanisme de co-carcinogènesi causant d'instabilitat genòmica associat a l'arsènic.
3. En models de càncer de bufeta, la teràpia combinada d'ATO més cisplatí millora significativament els resultats antitumorals obtinguts en els tractaments de cisplatí en solitari. Aquest augment de la toxicitat del cisplatí es deu principalment a la inhibició de la ruta FA/BRCA induïda per l'ATO.



## **6. BIBLIOGRAFIA**





## 6. BIBLIOGRAFIA

- Achanzar, W.E., Brambila, E.M., Diwan, B.A., Webber, M.M., and Waalkes, M.P. (2002). Inorganic arsenite-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 1888–1891.
- Adair, B.M., Hudgens, E.E., Schmitt, M.T., Calderon, R.L., and Thomas, D.J. (2006). Total arsenic concentrations in toenails quantified by two techniques provide a useful biomarker of chronic arsenic exposure in drinking water. *Environ. Res.* *101*, 213–220.
- Akiyama, S., Saeki, H., Nakashima, Y., Imori, M., Kitao, H., Oki, E., Oda, Y., Nakabeppu, Y., Kakeji, Y., and Maehara, Y. (2016). Prognostic impact of MutT homolog-1 expression on esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med.*
- Alderden, R.A., Hall, M.D., and Hambley, T.W. (2006). The Discovery and Development of Cisplatin. *J. Chem. Educ.* *83*, 728.
- Annangi, B., Bonassi, S., Marcos, R., and Hernández, A. (2016). Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. *Mutat. Res.* *770*, 140–161.
- Applebaum, K.M., Karagas, M.R., Hunter, D.J., Catalano, P.J., Byler, S.H., Morris, S., and Nelson, H.H. (2007). Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, arsenic exposure, and non-melanoma skin cancer in New Hampshire. *Environ. Health Perspect.* *115*, 1231–1236.
- Ardalan, B., Subbarayan, P.R., Ramos, Y., Gonzalez, M., Fernandez, A., Mezentsev, D., Reis, I., Duncan, R., Podolsky, L., Lee, K., et al. (2010). A phase I study of 5-fluorouracil/leucovorin and arsenic trioxide for patients with refractory/relapsed colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 3019–3027.
- Arnold, L.L., Eldan, M., Nyska, A., van Gemert, M., and Cohen, S.M. (2006). Dimethylarsinic acid: results of chronic toxicity/oncogenicity studies in F344 rats and in B6C3F1 mice. *Toxicology* *223*, 82–100.
- Avlasevich, S., Bryce, S., De Boeck, M., Elhajouji, A., Van Goethem, F., Lynch, A., Nicolette, J., Shi, J., and Dertinger, S. (2011). Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures: past, present and future. *Mutagenesis* *26*, 147–152.
- Avlasevich, S.L., Bryce, S.M., Cairns, S.E., and Dertinger, S.D. (2006). In vitro micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. *Environ. Mol. Mutagen.* *47*, 56–66.
- Bach, J., Peremartí, J., Annangi, B., Marcos, R., and Hernández, A. (2015). Reduced cellular DNA repair capacity after environmentally relevant arsenic exposure. Influence of Ogg1 deficiency. *Mutat. Res.* *779*, 144–151.
- Bach, J., Peremartí, J., Annangi, B., Marcos, R., and Hernández, A. (2016). Oxidative DNA damage enhances the carcinogenic potential of in vitro chronic arsenic exposures. *Arch. Toxicol.* *90*, 1893–1905.

- Bandaru, V., Sunkara, S., Wallace, S.S., and Bond, J.P. (2002). A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to *Escherichia coli* endonuclease VIII. *DNA Repair* 1, 517–529.
- Banerjee, M., Sarma, N., Biswas, R., Roy, J., Mukherjee, A., and Giri, A.K. (2008). DNA repair deficiency leads to susceptibility to develop arsenic-induced premalignant skin lesions. *Int. J. Cancer* 123, 283–287.
- Bartolotta, S.A., Pacskowski, M.G., Hick, A., and Carballo, M.A. (2011). Micronuclei Assay in Exfoliated Buccal Cells from Individuals Exposed to Arsenic in Argentina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 337–343.
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., and Giri, A.K. (2001). Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat. Res.* 488, 171–194.
- Basu, A., Mahata, J., Roy, A.K., Sarkar, J.N., Poddar, G., Nandy, A.K., Sarkar, P.K., Dutta, P.K., Banerjee, A., Das, M., et al. (2002). Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat. Res.* 516, 29–40.
- Basu, A., Ghosh, P., Das, J.K., Banerjee, A., Ray, K., and Giri, A.K. (2004). Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 13, 820–827.
- Basu, A., Som, A., Ghoshal, S., Mondal, L., Chaubey, R.C., Bhilwade, H.N., Rahman, M.M., and Giri, A.K. (2005). Assessment of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals susceptible to arsenic induced toxicity in West Bengal, India. *Toxicol. Lett.* 159, 100–112.
- Beer, T.M., Tangen, C.M., Nichols, C.R., Margolin, K.A., Dreicer, R., Stephenson, W.T., Quinn, D.I., Raghavan, D., and Crawford, E.D. (2006). Southwest oncology group phase II study of arsenic trioxide in patients with refractory germ cell malignancies. *Cancer* 106, 2624–2629.
- Benbrahim-Tallaa, L., Waterland, R.A., Styblo, M., Achanzar, W.E., Webber, M.M., and Waalkes, M.P. (2005). Molecular events associated with arsenic-induced malignant transformation of human prostatic epithelial cells: aberrant genomic DNA methylation and K-ras oncogene activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 288–298.
- Bergquist, E.R., Fischer, R.J., Sugden, K.D., and Martin, B.D. (2009). Inhibition by methylated organo-arsenicals of the respiratory 2-oxo-acid dehydrogenases. *J. Organomet. Chem.* 694, 973–980.
- Bhattacharjee, P., Banerjee, M., and Giri, A.K. (2013). Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ. Int.* 53, 29–40.
- Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M.K., Tauler, J., Bikkavilli, R.K., and Winn, R.A. (2014). The soft agar colony formation assay. *J. Vis. Exp. JoVE* e51998.
- Brambila, E.M., Achanzar, W.E., Qu, W., Webber, M.M., and Waalkes, M.P. (2002). Chronic arsenic-exposed human prostate epithelial cells exhibit stable arsenic tolerance:

- mechanistic implications of altered cellular glutathione and glutathione S-transferase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *183*, 99–107.
- Breheny, D., Oke, O., and Faux, S.P. (2011). The use of in vitro systems to assess cancer mechanisms and the carcinogenic potential of chemicals. *Altern. Lab. Anim. ATLA* *39*, 233–255.
- Bryce, S.M., Bemis, J.C., Avlasevich, S.L., and Dertinger, S.D. (2007). In vitro micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. *Mutat. Res.* *630*, 78–91.
- Burgess, J.L., Meza, M.M., Josyula, A.B., Poplin, G.S., Kopplin, M.J., McClellan, H.E., Stürup, S., and Lantz, R.C. (2007). Environmental Arsenic Exposure and Urinary 8-OHdG in Arizona and Sonora. *Clin. Toxicol. Phila. Pa* *45*, 490–498.
- Burkitt, K., and Ljungman, M. (2008). Phenylbutyrate interferes with the Fanconi anemia and BRCA pathway and sensitizes head and neck cancer cells to cisplatin. *Mol. Cancer* *7*, 24.
- Burns, F.J., Uddin, A.N., Wu, F., Nádas, A., and Rossman, T.G. (2004). Arsenic-induced enhancement of ultraviolet radiation carcinogenesis in mouse skin: a dose-response study. *Environ. Health Perspect.* *112*, 599–603.
- Bustaffa, E., Stoccoro, A., Bianchi, F., and Migliore, L. (2014). Genotoxic and epigenetic mechanisms in arsenic carcinogenicity. *Arch. Toxicol.* *88*, 1043–1067.
- Chakraborty, T., Das, U., Poddar, S., Sengupta, B., and De, M. (2006). Micronuclei and chromosomal aberrations as biomarkers: a study in an arsenic exposed population in West Bengal, India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *76*, 970–976.
- Chang, Q., Pan, J., Wang, X., Zhang, Z., Chen, F., and Shi, X. (2010). Reduced reactive oxygen species-generating capacity contributes to the enhanced cell growth of arsenic-transformed epithelial cells. *Cancer Res.* *70*, 5127–5135.
- Chen, P., Li, J., Jiang, H.-G., Lan, T., and Chen, Y.-C. (2015). Curcumin reverses cisplatin resistance in cisplatin-resistant lung cancer cells by inhibiting FA/BRCA pathway. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *36*, 3591–3599.
- Chirnomas, D., Taniguchi, T., de la Vega, M., Vaidya, A.P., Vasserman, M., Hartman, A.-R., Kennedy, R., Foster, R., Mahoney, J., Seiden, M.V., et al. (2006). Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 952–961.
- Chou, T.-C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* *70*, 440–446.
- Chou, W.-C., Chung, Y.-T., Chen, H.-Y., Wang, C.-J., Ying, T.-H., Chuang, C.-Y., Tseng, Y.-C., and Wang, S.-L. (2014). Maternal arsenic exposure and DNA damage biomarkers, and the associations with birth outcomes in a general population from Taiwan. *PloS One* *9*, e86398.
- Chung, C.-J., Huang, C.-J., Pu, Y.-S., Su, C.-T., Huang, Y.-K., Chen, Y.-T., and Hsueh, Y.-M. (2008). Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and urothelial carcinoma risk in low arsenic exposure area. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *226*, 14–21.

- Cohen, S.M., Arnold, L.L., Beck, B.D., Lewis, A.S., and Eldan, M. (2013). Evaluation of the carcinogenicity of inorganic arsenic. *Crit. Rev. Toxicol.* *43*, 711–752.
- Cohen, S.M., Chowdhury, A., and Arnold, L.L. (2016). Inorganic arsenic: A non-genotoxic carcinogen. *J. Environ. Sci. China* *49*, 28–37.
- Collins, A.R. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1840*, 794–800.
- Colognato, R., Coppedè, F., Ponti, J., Sabbioni, E., and Migliore, L. (2007). Genotoxicity induced by arsenic compounds in peripheral human lymphocytes analysed by cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* *22*, 255–261.
- Coppin, J.-F., Qu, W., and Waalkes, M.P. (2008). Interplay between cellular methyl metabolism and adaptive efflux during oncogenic transformation from chronic arsenic exposure in human cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 19342–19350.
- Cullen, W.R. (2008). *Is Arsenic an Aphrodisiac?: The Sociochemistry of an Element* (Cambridge: Royal Society of Chemistry).
- Cullen, W.R., and Reimer, K.J. (1989). Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* *89*, 713–764.
- Dávila-Esqueda, M.E., Jiménez-Capdeville, M.E., Delgado, J.M., De la Cruz, E., Aradillas-García, C., Jiménez-Suárez, V., Escobedo, R.F., and Llerenas, J.R. (2012). Effects of arsenic exposure during the pre- and postnatal development on the puberty of female offspring. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Toxikol. Pathol.* *64*, 25–30.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Barbier, O., Ruiz-Ramos, R., and Cebrian, M.E. (2009a). Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutat. Res.* *674*, 85–92.
- Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 275–284.
- Deans, A.J., and West, S.C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 467–480.
- Ding, W., Liu, W., Cooper, K.L., Qin, X.-J., de Souza Bergo, P.L., Hudson, L.G., and Liu, K.J. (2009). Inhibition of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 by Arsenite Interferes with Repair of Oxidative DNA Damage. *J. Biol. Chem.* *284*, 6809–6817.
- Dong, H., Nebert, D.W., Bruford, E.A., Thompson, D.C., Joenje, H., and Vasiliou, V. (2015). Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Hum. Genomics* *9*.
- Drobna, Z., Xing, W., Thomas, D.J., and Stýblo, M. (2006). shRNA silencing of AS3MT expression minimizes arsenic methylation capacity of HepG2 cells. *Chem. Res. Toxicol.* *19*, 894–898.
- Drobna, Z., Naranmandura, H., Kubachka, K.M., Edwards, B.C., Herbin-Davis, K., Styblo, M., Le, X.C., Creed, J.T., Maeda, N., Hughes, M.F., et al. (2009). Disruption of the arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase gene in the mouse alters the phenotype for methylation of arsenic and affects distribution and retention of orally administered arsenate. *Chem. Res. Toxicol.* *22*, 1713–1720.

- Ebert, F., Weiss, A., Bültemeyer, M., Hamann, I., Hartwig, A., and Schwerdtle, T. (2011). Arsenicals affect base excision repair by several mechanisms. *Mutat. Res.* 715, 32–41.
- Emadi, A., and Gore, S.D. (2010). Arsenic trioxide - An old drug rediscovered. *Blood Rev.* 24, 191–199.
- Engström, K., Vahter, M., Mlakar, S.J., Concha, G., Nermell, B., Raqib, R., Cardozo, A., and Broberg, K. (2011). Polymorphisms in arsenic(+III oxidation state) methyltransferase (AS3MT) predict gene expression of AS3MT as well as arsenic metabolism. *Environ. Health Perspect.* 119, 182–188.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 1148–1159.
- Esteller, M., Fraga, M.F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A.K., Trojan, J., Vaurs-Barrière, C., Bignon, Y.J., Ramus, S., et al. (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum. Mol. Genet.* 10, 3001–3007.
- Farzan, S.F., Karagas, M.R., and Chen, Y. (2013). In utero and early life arsenic exposure in relation to long-term health and disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 384–390.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2, 1084–1104.
- Ferry, K.V., Hamilton, T.C., and Johnson, S.W. (2000). Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1305–1313.
- Flora, S.J.S. (2011). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 257–281.
- Flora, S.J.S., Bhadauria, S., Kannan, G.M., and Singh, N. (2007). Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review. *J. Environ. Biol.* 28, 333–347.
- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A.G., and Panayiotidis, M.I. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 266, 6–11.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3, 362–374.
- Fus, Ł.P., and Górnicka, B. (2016). Role of angiogenesis in urothelial bladder carcinoma. *Cent. Eur. J. Urol.* 69, 258–263.
- Gad, H., Koolmeister, T., Jemth, A.-S., Eshtad, S., Jacques, S.A., Ström, C.E., Svensson, L.M., Schultz, N., Lundbäck, T., Einarsdottir, B.O., et al. (2014). MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature* 508, 215–221.
- Gadducci, A., Cosio, S., Muraca, S., and Genazzani, A.R. (2002). Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 23, 390–396.

- García-Quispes, W.A., Pastor, S., Galofré, P., Biarnés, F., Castell, J., Velázquez, A., and Marcos, R. (2013). Influence of DNA-repair gene variants on the micronucleus frequency in thyroid cancer patients. *Mutat. Res.* 750, 34–39.
- Garry, M.R., Santamaria, A.B., Williams, A.L., and DeSesso, J.M. (2015). In utero arsenic exposure in mice and early life susceptibility to cancer. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 73, 378–390.
- Ghosh, P., Basu, A., Mahata, J., Basu, S., Sengupta, M., Das, J.K., Mukherjee, A., Sarkar, A.K., Mondal, L., Ray, K., et al. (2006). Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water. *Int. J. Cancer* 118, 2470–2478.
- Guillamet, E., Creus, A., Ponti, J., Sabbioni, E., Fortaner, S., and Marcos, R. (2004). In vitro DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 19, 129–135.
- Gurung, R.L., Balakrishnan, L., Bhattacharjee, R.N., Manikandan, J., Swaminathan, S., and Hande, M.P. (2010). Inhibition of poly (ADP-Ribose) polymerase-1 in telomerase deficient mouse embryonic fibroblasts increases arsenite-induced genome instability. *Genome Integr.* 1, 5.
- Hall, M., Chen, Y., Ahsan, H., Slavkovich, V., van Geen, A., Parvez, F., and Graziano, J. (2006). Blood arsenic as a biomarker of arsenic exposure: results from a prospective study. *Toxicology* 225, 225–233.
- Harper, K.N., Liu, X., Hall, M.N., Ilievski, V., Oka, J., Calancie, L., Slavkovich, V., Levy, D., Siddique, A., Alam, S., et al. (2014). A dose-response study of arsenic exposure and markers of oxidative damage in Bangladesh. *J. Occup. Environ. Med.* 56, 652–658.
- Hartwig, A., Groblichhoff, U.D., Beyersmann, D., Natarajan, A.T., Filon, R., and Mullenders, L.H. (1997). Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* 18, 399–405.
- Hartwig, A., Pelzer, A., Asmuss, M., and Bürkle, A. (2003). Very low concentrations of arsenite suppress poly(ADP-ribosylation) in mammalian cells. *Int. J. Cancer* 104, 1–6.
- Hayakawa, T., Kobayashi, Y., Cui, X., and Hirano, S. (2005). A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch. Toxicol.* 79, 183–191.
- Haynes, B., Saadat, N., Myung, B., and Shekhar, M.P.V. (2015). Crosstalk between translesion synthesis, Fanconi anemia network, and homologous recombination repair pathways in interstrand DNA crosslink repair and development of chemoresistance. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 763, 258–266.
- Hei, T.K., and Filipic, M. (2004). Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 574–581.
- Hernández, A., and Marcos, R. (2008). Genetic variations associated with interindividual sensitivity in the response to arsenic exposure. *Pharmacogenomics* 9, 1113–1132.

- Hernández, A., Paiva, L., Creus, A., Quinteros, D., and Marcos, R. (2014). Micronucleus frequency in copper-mine workers exposed to arsenic is modulated by the AS3MT Met287Thr polymorphism. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 759, 51–55.
- Hirano, T. (2008). Repair system of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine as a defense line against carcinogenesis. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 49, 329–340.
- Hodson, C., Cole, A.R., Lewis, L.P.C., Miles, J.A., Purkiss, A., and Walden, H. (2011). Structural Analysis of Human FANCL, the E3 Ligase in the Fanconi Anemia Pathway. *J. Biol. Chem.* 286, 32628–32637.
- Hofmann, K. (2009). Ubiquitin-binding domains and their role in the DNA damage response. *DNA Repair* 8, 544–556.
- Huang, C.-Y., Su, C.-T., Chung, C.-J., Pu, Y.-S., Chu, J.-S., Yang, H.-Y., Wu, C.-C., and Hsueh, Y.-M. (2012). Urinary total arsenic and 8-hydroxydeoxyguanosine are associated with renal cell carcinoma in an area without obvious arsenic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262, 349–354.
- Huff, J., Chan, P., and Nyska, A. (2000). Is the Human Carcinogen Arsenic Carcinogenic to Laboratory Animals? *Toxicol. Sci.* 55, 17–23.
- Hughes, M.F., Beck, B.D., Chen, Y., Lewis, A.S., and Thomas, D.J. (2011). Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 123, 305–332.
- IARC, I.A. for R. on C. (1980). Some Metals and Metallic Compounds. Arsenic and arsenic compounds. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. *Int. Agency Res. Cancer Lyon* 23.
- IARC, I.A. for R. on C. (2012). Arsenic, metals fibres and dusts. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. *Int. Agency Res. Cancer Lyon* 100 C.
- Iida, T., Furuta, A., Kawashima, M., Nishida, J., Nakabeppu, Y., and Iwaki, T. (2001). Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors. *Neuro-Oncol.* 3, 73–81.
- Jacquemont, C., Simon, J.A., D'Andrea, A.D., and Taniguchi, T. (2012). Non-specific chemical inhibition of the Fanconi anemia pathway sensitizes cancer cells to cisplatin. *Mol. Cancer* 11, 26.
- Jansen, B.A.J., Brouwer, J., and Reedijk, J. (2002). Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *J. Inorg. Biochem.* 89, 197–202.
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C.J., and Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol. JAT* 31, 95–107.
- Jones, F.T. (2007). A broad view of arsenic. *Poult. Sci.* 86, 2–14.
- Kamat, A.M., Hahn, N.M., Efstathiou, J.A., Lerner, S.P., Malmström, P.-U., Choi, W., Guo, C.C., Lotan, Y., and Kassouf, W. (2016). Bladder cancer. *The Lancet* 388, 2796–2810.



- Kaufman, D.S., Shipley, W.U., and Feldman, A.S. (2009). Bladder cancer. *The Lancet* *374*, 239–249.
- Kennedy, C.H., Pass, H.I., and Mitchell, J.B. (2003). Expression of human MutT homologue (hMTH1) protein in primary non-small-cell lung carcinomas and histologically normal surrounding tissue. *Free Radic. Biol. Med.* *34*, 1447–1457.
- Kim, H., and D’Andrea, A.D. (2012). Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev.* *26*, 1393–1408.
- Kindler, H.L., Aklilu, M., Nattam, S., and Vokes, E.E. (2008). Arsenic trioxide in patients with adenocarcinoma of the pancreas refractory to gemcitabine: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Am. J. Clin. Oncol.* *31*, 553–556.
- Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nakae, D., Arai, T., Minowa, O., Noda, T., Nishimura, S., and Fukushima, S. (2007). Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in Ogg1-deficient mice. *Cancer Sci.* *98*, 803–814.
- Kitchin, K.T., and Conolly, R. (2010). Arsenic-induced carcinogenesis--oxidative stress as a possible mode of action and future research needs for more biologically based risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* *23*, 327–335.
- Kitchin, K.T., and Wallace, K. (2008). The role of protein binding of trivalent arsenicals in arsenic carcinogenesis and toxicity. *J. Inorg. Biochem.* *102*, 532–539.
- Klein, C.B., Leszczynska, J., Hickey, C., and Rossman, T.G. (2007). Further evidence against a direct genotoxic mode of action for arsenic-induced cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *222*, 289–297.
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, A.H., Harrington-Brock, K., Allen, J.W., Winkfield, E., Poorman-Allen, P., Kundu, B., Funasaka, K., Roop, B.C., et al. (2003). Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: Induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ. Mol. Mutagen.* *42*, 192–205.
- Köberle, B., Tomicic, M.T., Usanova, S., and Kaina, B. (2010). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* *1806*, 172–182.
- Koedrith, P., Kim, H., Weon, J.-I., and Seo, Y.R. (2013). Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity. *Int. J. Hyg. Environ. Health* *216*, 587–598.
- Kojima, C., Ramirez, D.C., Tokar, E.J., Himeno, S., Drobná, Z., Stýblo, M., Mason, R.P., and Waalkes, M.P. (2009). Requirement of arsenic biomethylation for oxidative DNA damage. *J. Natl. Cancer Inst.* *101*, 1670–1681.
- Kondo, S., Toyokuni, S., Tanaka, T., Hiai, H., Onodera, H., Kasai, H., and Imamura, M. (2000). Overexpression of the hOGG1 gene and high 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) lyase activity in human colorectal carcinoma: regulation mechanism of the 8-OHdG level in DNA. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 1394–1400.
- Kotowski, U., Heiduschka, G., Brunner, M., Erovic, B.M., Martinek, H., and Thurnher, D. (2012). Arsenic trioxide enhances the cytotoxic effect of cisplatin in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol. Lett.* *3*, 1326–1330.

- Kritharis, A., Bradley, T.P., and Budman, D.R. (2013). The evolving use of arsenic in pharmacotherapy of malignant disease. *Ann. Hematol.* *92*, 719–730.
- Kubota, R., Kunito, T., Agusa, T., Fujihara, J., Monirith, I., Iwata, H., Subramanian, A., Tana, T.S., and Tanabe, S. (2006). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in inhabitants chronically exposed to arsenic in groundwater in Cambodia. *J. Environ. Monit. JEM* *8*, 293–299.
- Kumar, P., Gao, Q., Ning, Y., Wang, Z., Krebsbach, P.H., and Polverini, P.J. (2008). Arsenic trioxide enhances the therapeutic efficacy of radiation treatment of oral squamous carcinoma while protecting bone. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 2060–2069.
- Kuo, M.T., Chen, H.H.W., Song, I.-S., Savaraj, N., and Ishikawa, T. (2007). The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev.* *26*, 71–83.
- Lee, P.-C., Kakadiya, R., Su, T.-L., and Lee, T.-C. (2010). Combination of bifunctional alkylating agent and arsenic trioxide synergistically suppresses the growth of drug-resistant tumor cells. *Neoplasia N. Y. N* *12*, 376–387.
- Lee-Chen, S.F., Yu, C.T., and Jan, K.Y. (1992). Effect of arsenite on the DNA repair of UV-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* *7*, 51–55.
- Lengfelder, E., Hofmann, W.-K., and Nowak, D. (2012). Impact of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* *26*, 433–442.
- Li, J.H., and Rossman, T.G. (1989a). Mechanism of comutagenesis of sodium arsenite with n-methyl-n-nitrosourea. *Biol. Trace Elem. Res.* *21*, 373–381.
- Li, J.H., and Rossman, T.G. (1989b). Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol. Toxicol.* *2*, 1–9.
- Li, G., Lee, L.-S., Li, M., Tsao, S.-W., and Chiu, J.-F. (2011). Molecular changes during arsenic-induced cell transformation. *J. Cell. Physiol.* *226*, 3225–3232.
- Li, Y., Ling, M., Xu, Y., Wang, S., Li, Z., Zhou, J., Wang, X., and Liu, Q. (2010). The repressive effect of NF- $\kappa$ B on p53 by mot-2 is involved in human keratinocyte transformation induced by low levels of arsenite. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *116*, 174–182.
- Liaw, J., Marshall, G., Yuan, Y., Ferreccio, C., Steinmaus, C., and Smith, A.H. (2008). Increased childhood liver cancer mortality and arsenic in drinking water in northern Chile. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *17*, 1982–1987.
- Lin, C.-C., Hsu, C., Hsu, C.-H., Hsu, W.-L., Cheng, A.-L., and Yang, C.-H. (2007). Arsenic trioxide in patients with hepatocellular carcinoma: a phase II trial. *Invest. New Drugs* *25*, 77–84.
- Ling, M., Li, Y., Xu, Y., Pang, Y., Shen, L., Jiang, R., Zhao, Y., Yang, X., Zhang, J., Zhou, J., et al. (2012). Regulation of miRNA-21 by reactive oxygen species-activated ERK/NF- $\kappa$ B in arsenite-induced cell transformation. *Free Radic. Biol. Med.* *52*, 1508–1518.
- Liou, S.-H., Chen, Y.-H., Loh, C.-H., Yang, T., Wu, T.-N., Chen, C.-J., and Hsieh, L.-L. (2002). The association between frequencies of mitomycin C-induced sister chromatid exchange and cancer risk in arseniasis. *Toxicol. Lett.* *129*, 237–243.

- Liu, J., Chen, H., Miller, D.S., Saavedra, J.E., Keefer, L.K., Johnson, D.R., Klaassen, C.D., and Waalkes, M.P. (2001a). Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Mol. Pharmacol.* *60*, 302–309.
- Liu, J., Benbrahim-Tallaa, L., Qian, X., Yu, L., Xie, Y., Boos, J., Qu, W., and Waalkes, M.P. (2006). Further studies on aberrant gene expression associated with arsenic-induced malignant transformation in rat liver TRL1215 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *216*, 407–415.
- Liu, S.X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C., and Hei, T.K. (2001b). Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1643–1648.
- Loewenberg, S. (2016). In Bangladesh, arsenic poisoning is a neglected issue. *Lancet Lond. Engl.* *388*, 2336–2337.
- Longás, H. (2014). Una nueva diana contra el cáncer. *EL PAÍS*.
- Lopez-Martinez, D., Liang, C.-C., and Cohn, M.A. (2016). Cellular response to DNA interstrand crosslinks: The Fanconi anemia pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 3097–3114.
- Lu, M., Wang, H., Li, X.-F., Lu, X., Cullen, W.R., Arnold, L.L., Cohen, S.M., and Le, X.C. (2004). Evidence of hemoglobin binding to arsenic as a basis for the accumulation of arsenic in rat blood. *Chem. Res. Toxicol.* *17*, 1733–1742.
- Macciò, A., and Madeddu, C. (2013). Cisplatin: an old drug with a newfound efficacy -- from mechanisms of action to cytotoxicity. *Expert Opin. Pharmacother.* *14*, 1839–1857.
- Maier, A., Schumann, B.L., Chang, X., Talaska, G., and Puga, A. (2002). Arsenic co-exposure potentiates benzo[a]pyrene genotoxicity. *Mutat. Res.* *517*, 101–111.
- Mamrak, N.E., Shimamura, A., and Howlett, N.G. (2016). Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Rev.*
- Mandal, B.K., and Suzuki, K.T. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta* *58*, 201–235.
- Marchiset-Ferlay, N., Savanovitch, C., and Sauvart-Rochat, M.-P. (2012). What is the best biomarker to assess arsenic exposure via drinking water? *Environ. Int.* *39*, 150–171.
- Marshall, G., Ferreccio, C., Yuan, Y., Bates, M.N., Steinmaus, C., Selvin, S., Liaw, J., and Smith, A.H. (2007). Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *J. Natl. Cancer Inst.* *99*, 920–928.
- Martínez, V., Creus, A., Venegas, W., Arroyo, A., Beck, J.P., Gebel, T.W., Surrallés, J., and Marcos, R. (2004). Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic. *Mutat. Res.* *564*, 65–74.
- Martínez, V., Creus, A., Venegas, W., Arroyo, A., Beck, J.P., Gebel, T.W., Surrallés, J., and Marcos, R. (2005). Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicol. Lett.* *155*, 319–327.

- Martin-Hernandez, K., Rodriguez-Vargas, J.-M., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2016). Expanding functions of ADP-ribosylation in the maintenance of genome integrity. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Styblo, M., Thomas, D.J., and Kligerman, A.D. (2001). Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* *14*, 355–361.
- Matsui, M., Nishigori, C., Toyokuni, S., Takada, J., Akaboshi, M., Ishikawa, M., Imamura, S., and Miyachi, Y. (1999). The role of oxidative DNA damage in human arsenic carcinogenesis: detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in arsenic-related Bowen's disease. *J. Invest. Dermatol.* *113*, 26–31.
- Mauro, M., Caradonna, F., and Klein, C.B. (2016). Dysregulation of DNA methylation induced by past arsenic treatment causes persistent genomic instability in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutagen.* *57*, 137–150.
- Michaud, D.S., Wright, M.E., Cantor, K.P., Taylor, P.R., Virtamo, J., and Albanes, D. (2004). Arsenic concentrations in prediagnostic toenails and the risk of bladder cancer in a cohort study of male smokers. *Am. J. Epidemiol.* *160*, 853–859.
- Mo, J., Xia, Y., Wade, T.J., Schmitt, M., Le, X.C., Dang, R., and Mumford, J.L. (2006). Chronic Arsenic Exposure and Oxidative Stress: OGG1 Expression and Arsenic Exposure, Nail Selenium, and Skin Hyperkeratosis in Inner Mongolia. *Environ. Health Perspect.* *114*, 835–841.
- Moldovan, G.-L., and D'Andrea, A.D. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 223–249.
- Nakabeppu, Y., Ohta, E., and Abolhassani, N. (2016). MTH1 as a nucleotide pool sanitizing enzyme: Friend or foe? *Free Radic. Biol. Med.*
- Nakaoka, T., Ota, A., Ono, T., Karnan, S., Konishi, H., Furuhashi, A., Ohmura, Y., Yamada, Y., Hosokawa, Y., and Kazaoka, Y. (2014). Combined arsenic trioxide-cisplatin treatment enhances apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Cell. Oncol. Dordr.* *37*, 119–129.
- Nakashima, S., Kobayashi, S., Nagano, H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Asaoka, T., Hama, N., Wada, H., Kawamoto, K., Marubashi, S., et al. (2015). BRCA/Fanconi anemia pathway implicates chemoresistance to gemcitabine in biliary tract cancer. *Cancer Sci.* *106*, 584–591.
- Naranmandura, H., Suzuki, N., and Suzuki, K.T. (2006). Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chem. Res. Toxicol.* *19*, 1010–1018.
- Nesnow, S., Roop, B.C., Lambert, G., Kadiiska, M., Mason, R.P., Cullen, W.R., and Mass, M.J. (2002). DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* *15*, 1627–1634.
- Nollen, M., Ebert, F., Moser, J., Mullenders, L.H.F., Hartwig, A., and Schwerdtle, T. (2009). Impact of arsenic on nucleotide excision repair: XPC function, protein level, and gene expression. *Mol. Nutr. Food Res.* *53*, 572–582.

- Normandin, L., Ayotte, P., Levallois, P., Ibanez, Y., Courteau, M., Kennedy, G., Chen, L., Le, X.C., and Bouchard, M. (2014). Biomarkers of arsenic exposure and effects in a Canadian rural population exposed through groundwater consumption. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* *24*, 127–134.
- Ohishi, T., Koga, F., and Migita, T. (2015). Bladder Cancer Stem-Like Cells: Their Origin and Therapeutic Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Paiva, L., Martínez, V., Creus, A., Quinteros, D., and Marcos, R. (2008). Evaluation of micronucleus frequencies in blood lymphocytes from smelting plant workers exposed to arsenic. *Environ. Mol. Mutagen.* *49*, 200–205.
- Panasci, L., Xu, Z.-Y., Bello, V., and Aloyz, R. (2002). The role of DNA repair in nitrogen mustard drug resistance. *Anticancer. Drugs* *13*, 211–220.
- Papouli, E., Cejka, P., and Jiricny, J. (2004). Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells. *Cancer Res.* *64*, 3391–3394.
- Pastor, S., Gutiérrez, S., Creus, A., Xamena, N., Piperakis, S., and Marcos, R. (2001). Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* *16*, 539–545.
- Pei, Q., Ma, N., Zhang, J., Xu, W., Li, Y., Ma, Z., Li, Y., Tian, F., Zhang, W., Mu, J., et al. (2013). Oxidative DNA damage of peripheral blood polymorphonuclear leukocytes, selectively induced by chronic arsenic exposure, is associated with extent of arsenic-related skin lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *266*, 143–149.
- Peremartí, J., Ramos, F., Marcos, R., and Hernández, A. (2014). Arsenic exposure disrupts the normal function of the FA/BRCA repair pathway. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *142*, 93–104.
- Person, R.J., Ngilame, N.N.O., Makia, N.L., Bell, M.W., Waalkes, M.P., and Tokar, E.J. (2015). Chronic inorganic arsenic exposure in vitro induces a cancer cell phenotype in human peripheral lung epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *286*, 36–43.
- Petrick, J.S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E., and Vasken Aposhian, H. (2000). Monomethylarsonous Acid (MMAIII) Is More Toxic Than Arsenite in Chang Human Hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *163*, 203–207.
- Pi, J., He, Y., Bortner, C., Huang, J., Liu, J., Zhou, T., Qu, W., North, S.L., Kasprzak, K.S., Diwan, B.A., et al. (2005). Low level, long-term inorganic arsenite exposure causes generalized resistance to apoptosis in cultured human keratinocytes: potential role in skin co-carcinogenesis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *116*, 20–26.
- Pi, J., Diwan, B.A., Sun, Y., Liu, J., Qu, W., He, Y., Styblo, M., and Waalkes, M.P. (2008). Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes: involvement of Nrf2. *Free Radic. Biol. Med.* *45*, 651–658.
- Pimparkar, B.D., and Bhave, A. (2010). Arsenicosis: review of recent advances. *J. Assoc. Physicians India* *58*, 617–624, 629.

- Podolsky, L., Oh, M., Subbarayan, P.R., Francheschi, D., Livingstone, A., and Ardan, B. (2011). 5-Fluorouracil/Leucovorin and arsenic trioxide for patients with refractory/relapsed colorectal carcinoma: a clinical experience. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 50, 602–605.
- Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* 28, 1057–1068.
- Qu, W., Bortner, C.D., Sakurai, T., Hobson, M.J., and Waalkes, M.P. (2002). Acquisition of apoptotic resistance in arsenic-induced malignant transformation: role of the JNK signal transduction pathway. *Carcinogenesis* 23, 151–159.
- Reichard, J.F., and Puga, A. (2010). Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation. *Epigenomics* 2, 87–104.
- Reichard, J.F., Schneckeburger, M., and Puga, A. (2007). Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 188–192.
- Ren, X., McHale, C.M., Skibola, C.F., Smith, A.H., Smith, M.T., and Zhang, L. (2011). An Emerging Role for Epigenetic Dysregulation in Arsenic Toxicity and Carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 119, 11–19.
- Riethmiller, S. (2005). From Atoxyl to Salvarsan: Searching for the Magic Bullet. *Chemotherapy* 51, 234–242.
- Robertson, K.D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* 6, 597–610.
- Rodríguez-Ribera, L., Pastor, S., Corredor, Z., Silva, I., Diaz, J.M., Ballarin, J., Marcos, R., and Coll, E. (2016). Genetic damage in patients moving from hemodialysis to online hemodiafiltration. *Mutagenesis* 31, 131–135.
- Romach, E.H., Zhao, C.Q., Del Razo, L.M., Cebrián, M.E., and Waalkes, M.P. (2000). Studies on the mechanisms of arsenic-induced self tolerance developed in liver epithelial cells through continuous low-level arsenite exposure. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 54, 500–508.
- Roomi, M.W., Monterrey, J.C., Kalinovsky, T., Rath, M., and Niedzwiecki, A. (2009). Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 21, 1323–1333.
- Rossman, T.G. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat. Res.* 533, 37–65.
- Rossman, T.G., Uddin, A.N., Burns, F.J., and Bosland, M.C. (2001). Arsenite is a cocarcinogen with solar ultraviolet radiation for mouse skin: an animal model for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176, 64–71.
- Rossman, T.G., Uddin, A.N., Burns, F.J., and Bosland, M.C. (2002). Arsenite cocarcinogenesis: an animal model derived from genetic toxicology studies. *Environ. Health Perspect.* 110 Suppl 5, 749–752.
- Rossman, T.G., Uddin, A.N., and Burns, F.J. (2004). Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 394–404.

- Saitoh, Y., Setoguchi, T., Nagata, M., Tsuru, A., Nakamura, S., Nagano, S., Ishidou, Y., Nagao-Kitamoto, H., Yokouchi, M., Maeda, S., et al. (2016). Combination of Hedgehog inhibitors and standard anticancer agents synergistically prevent osteosarcoma growth. *Int. J. Oncol.* *48*, 235–242.
- Salnikow, K., and Zhitkovich, A. (2008). Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem. Res. Toxicol.* *21*, 28–44.
- Sampayo-Reyes, A., Hernández, A., El-Yamani, N., López-Campos, C., Mayet-Machado, E., Rincón-Castañeda, C.B., Limones-Aguilar, M. de L., López-Campos, J.E., de León, M.B., González-Hernández, S., et al. (2010). Arsenic induces DNA damage in environmentally exposed Mexican children and adults. Influence of GSTO1 and AS3MT polymorphisms. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *117*, 63–71.
- Sattar, A., Xie, S., Hafeez, M.A., Wang, X., Hussain, H.I., Iqbal, Z., Pan, Y., Iqbal, M., Shabbir, M.A., and Yuan, Z. (2016). Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *48*, 214–224.
- Sciandrello, G., Caradonna, F., Mauro, M., and Barbata, G. (2004). Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis* *25*, 413–417.
- Sciandrello, G., Mauro, M., Catanzaro, I., Saverini, M., Caradonna, F., and Barbata, G. (2011). Long-lasting genomic instability following arsenite exposure in mammalian cells: the role of reactive oxygen species. *Environ. Mol. Mutagen.* *52*, 562–568.
- Scudellari, M. (2015). The science myths that will not die. *Nat. News* *528*, 322.
- Sens, D.A., Park, S., Gurel, V., Sens, M.A., Garrett, S.H., and Somji, S. (2004). Inorganic cadmium- and arsenite-induced malignant transformation of human bladder urothelial cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *79*, 56–63.
- Shen, S., Li, X.-F., Cullen, W.R., Weinfeld, M., and Le, X.C. (2013a). Arsenic binding to proteins. *Chem. Rev.* *113*, 7769–7792.
- Shen, S., Wang, C., Weinfeld, M., and Le, X.C. (2013b). Inhibition of nucleotide excision repair by arsenic. *Chin. Sci. Bull.* *58*, 214–221.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA. Cancer J. Clin.* *65*, 5–29.
- Singh, B., Kulawiec, M., Owens, K.M., Singh, A., and Singh, K.K. (2016). Sustained Early Disruption of Mitochondrial Function Contributes to Arsenic-Induced Prostate Tumorigenesis. *Biochem. Biokhimiia* *81*, 1089–1100.
- Smith, A.H., Lingas, E.O., and Rahman, M. (2000). Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull. World Health Organ.* *78*, 1093–1103.
- Smith, A.H., Marshall, G., Yuan, Y., Ferreccio, C., Liaw, J., von Ehrenstein, O., Steinmaus, C., Bates, M.N., and Selvin, S. (2006). Increased mortality from lung cancer and bronchiectasis in young adults after exposure to arsenic in utero and in early childhood. *Environ. Health Perspect.* *114*, 1293–1296.

- Song, W.-J., Jiang, P., Cai, J.-P., and Zheng, Z.-Q. (2015). Expression of Cytoplasmic 8-oxo-Gsn and MTH1 Correlates with Pathological Grading in Human Gastric Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *16*, 6335–6338.
- Soulier, J. (2011). Fanconi Anemia. *Am. Soc. Hematol. Educ. Program Book 2011*, 492–497.
- Spallholz, J.E., Boylan, L.M., Palace, V., Chen, J., Smith, L., Rahman, M.M., and Robertson, J.D. (2005). Arsenic and selenium in human hair: a comparison of five countries with and without arsenicosis. *Biol. Trace Elem. Res.* *106*, 133–144.
- Steinmaus, C.M., Ferreccio, C., Romo, J.A., Yuan, Y., Cortes, S., Marshall, G., Moore, L.E., Balmes, J.R., Liaw, J., Golden, T., et al. (2013). Drinking water arsenic in northern Chile: high cancer risks 40 years after exposure cessation. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *22*, 623–630.
- Stueckle, T.A., Lu, Y., Davis, M.E., Wang, L., Jiang, B.-H., Holaskova, I., Schafer, R., Barnett, J.B., and Rojanasakul, Y. (2012). Chronic occupational exposure to arsenic induces carcinogenic gene signaling networks and neoplastic transformation in human lung epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *261*, 204–216.
- Stybło, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R., and Thomas, D.J. (2000). Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch. Toxicol.* *74*, 289–299.
- Subbarayan, P.R., and Ardalan, B. (2014). In the war against solid tumors arsenic trioxide needs partners. *J. Gastrointest. Cancer* *45*, 363–371.
- Sun, G., Xu, Y., Li, X., Jin, Y., Li, B., and Sun, X. (2007). Urinary arsenic metabolites in children and adults exposed to arsenic in drinking water in Inner Mongolia, China. *Environ. Health Perspect.* *115*, 648–652.
- Sun, X., Deng, Q., Liang, Z., Liu, Z., Geng, H., Zhao, L., Zhou, Q., Liu, J., Ma, J., Wang, D., et al. (2017). Cigarette smoke extract induces epithelial-mesenchymal transition of human bladder cancer T24 cells through activation of ERK1/2 pathway. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *86*, 457–465.
- Surowiak, P., Materna, V., Maciejczyk, A., Pudelko, M., Markwitz, E., Spaczyński, M., Dietel, M., Zabel, M., and Lage, H. (2007). Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *450*, 279–285.
- Suzuki, S., Arnold, L.L., Pennington, K.L., Kakiuchi-Kiyota, S., and Cohen, S.M. (2009). Effects of co-administration of dietary sodium arsenite and an NADPH oxidase inhibitor on the rat bladder epithelium. *Toxicology* *261*, 41–46.
- Tatokoro, M., Koga, F., Yoshida, S., Kawakami, S., Fujii, Y., Neckers, L., and Kihara, K. (2012). Potential role of Hsp90 inhibitors in overcoming cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells. *Int. J. Cancer* *131*, 987–996.
- Thomas, D.J., Li, J., Waters, S.B., Xing, W., Adair, B.M., Drobna, Z., Devesa, V., and Stybło, M. (2007). Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase and the Methylation of Arsenicals. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* *232*, 3–13.



- Tian, D., Ma, H., Feng, Z., Xia, Y., Le, X.C., Ni, Z., Allen, J., Collins, B., Schreinemachers, D., and Mumford, J.L. (2001). Analyses of micronuclei in exfoliated epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in inner Mongolia, China. *J. Toxicol. Environ. Health A* *64*, 473–484.
- Tokar, E.J., Benbrahim-Tallaa, L., Ward, J.M., Lunn, R., Sams, R.L., and Waalkes, M.P. (2010). Cancer in Experimental Animals Exposed to Arsenic and Arsenic Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* *40*, 912–927.
- Tokar, E.J., Qu, W., and Waalkes, M.P. (2011a). Arsenic, stem cells, and the developmental basis of adult cancer. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *120 Suppl 1*, S192-203.
- Tokar, E.J., Diwan, B.A., Ward, J.M., Delker, D.A., and Waalkes, M.P. (2011b). Carcinogenic effects of “whole-life” exposure to inorganic arsenic in CD1 mice. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *119*, 73–83.
- Tokar, E.J., Kojima, C., and Waalkes, M.P. (2014). Methylarsonous acid causes oxidative DNA damage in cells independent of the ability to biomethylate inorganic arsenic. *Arch. Toxicol.* *88*, 249–261.
- Treas, J., Tyagi, T., and Singh, K.P. (2013). Chronic exposure to arsenic, estrogen, and their combination causes increased growth and transformation in human prostate epithelial cells potentially by hypermethylation-mediated silencing of MLH1. *The Prostate* *73*, 1660–1672.
- Tseng, C.-H. (2005). Blackfoot disease and arsenic: a never-ending story. *J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* *23*, 55–74.
- Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* *181–182*, 211–217.
- Valenzuela, O.L., Borja-Aburto, V.H., Garcia-Vargas, G.G., Cruz-Gonzalez, M.B., Garcia-Montalvo, E.A., Calderon-Aranda, E.S., and Del Razo, L.M. (2005). Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environ. Health Perspect.* *113*, 250–254.
- Vuky, J., Yu, R., Schwartz, L., and Motzer, R.J. (2002). Phase II trial of arsenic trioxide in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Invest. New Drugs* *20*, 327–330.
- Waalkes, M.P., Keefer, L.K., and Diwan, B.A. (2000). Induction of proliferative lesions of the uterus, testes, and liver in swiss mice given repeated injections of sodium arsenate: possible estrogenic mode of action. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *166*, 24–35.
- Waalkes, M.P., Liu, J., and Diwan, B.A. (2007). Transplacental arsenic carcinogenesis in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *222*, 271–280.
- Walden, H., and Deans, A.J. (2014). The Fanconi anemia DNA repair pathway: structural and functional insights into a complex disorder. *Annu. Rev. Biophys.* *43*, 257–278.
- Wang, W., Qin, S.-K., Chen, B.-A., and Chen, H.-Y. (2001). Experimental study on antitumor effect of arsenic trioxide in combination with cisplatin or doxorubicin on hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* *7*, 702–705.

- Watanabe, T., and Hirano, S. (2013). Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* *87*, 969–979.
- Waters, S.B., Devesa, V., Del Razo, L.M., Styblo, M., and Thomas, D.J. (2004). Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat cyt19, an arsenic methyltransferase. *Chem. Res. Toxicol.* *17*, 404–409.
- Waxman, S., and Anderson, K.C. (2001). History of the Development of Arsenic Derivatives in Cancer Therapy. *The Oncologist* *6*, 3–10.
- Wei, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Iwai, S., Yoshida, K., Endo, G., Nakae, D., and Fukushima, S. (2002). Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. *Carcinogenesis* *23*, 1387–1397.
- Wen, G., Calaf, G.M., Partridge, M.A., Echiburú-Chau, C., Zhao, Y., Huang, S., Chai, Y., Li, B., Hu, B., and Hei, T.K. (2008). Neoplastic transformation of human small airway epithelial cells induced by arsenic. *Mol. Med. Camb. Mass* *14*, 2–10.
- Wiencke, J.K., and Yager, J.W. (1992). Specificity of arsenite in potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane. *Environ. Mol. Mutagen.* *19*, 195–200.
- Wnek, S.M., Jensen, T.J., Severson, P.L., Futscher, B.W., and Gandolfi, A.J. (2010). Monomethylarsonous acid produces irreversible events resulting in malignant transformation of a human bladder cell line following 12 weeks of low-level exposure. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *116*, 44–57.
- Wong, R.-H., Kuo, C.-Y., Hsu, M.-L., Wang, T.-Y., Chang, P.-I., Wu, T.-H., and Huang, S. (2005). Increased levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine attributable to carcinogenic metal exposure among schoolchildren. *Environ. Health Perspect.* *113*, 1386–1390.
- Wu, F., Burns, F.J., Zhang, R., Uddin, A.N., and Rossman, T.G. (2005). Arsenite-induced alterations of DNA photodamage repair and apoptosis after solar-simulation UVR in mouse keratinocytes in vitro. *Environ. Health Perspect.* *113*, 983–986.
- Wynne, P., Newton, C., Ledermann, J.A., Olaitan, A., Mould, T.A., and Hartley, J.A. (2007). Enhanced repair of DNA interstrand crosslinking in ovarian cancer cells from patients following treatment with platinum-based chemotherapy. *Br. J. Cancer* *97*, 927–933.
- Xiao, H., Xiao, Q., Zhang, K., Zuo, X., and Shrestha, U.K. (2010). Reversal of multidrug resistance by curcumin through FA/BRCA pathway in multiple myeloma cell line MOLP-2/R. *Ann. Hematol.* *89*, 399–404.
- Xu, G., Herzig, M., Rotrekl, V., and Walter, C.A. (2008). Base excision repair, aging and health span. *Mech. Ageing Dev.* *129*, 366–382.
- Xu, Y., Zhao, Y., Xu, W., Luo, F., Wang, B., Li, Y., Pang, Y., and Liu, Q. (2013). Involvement of HIF-2 $\alpha$ -mediated inflammation in arsenite-induced transformation of human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *272*, 542–550.
- Xu, Y., Tokar, E.J., and Waalkes, M.P. (2014). Arsenic-induced cancer cell phenotype in human breast epithelia is estrogen receptor-independent but involves aromatase activation. *Arch. Toxicol.* *88*, 263–274.

- Yafi, F.A., North, S., and Kassouf, W. (2011). First- and second-line therapy for metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Curr. Oncol.* *18*, e25–e34.
- Yamauchi, H., Aminaka, Y., Yoshida, K., Sun, G., Pi, J., and Waalkes, M.P. (2004). Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning: urinary 8-hydroxydeoxyguanine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *198*, 291–296.
- Yang, F., Kemp, C.J., and Henikoff, S. (2015). Anthracyclines induce double-strand DNA breaks at active gene promoters. *Mutat. Res.* *773*, 9–15.
- Yang, H.-C., Fu, H.-L., Lin, Y.-F., and Rosen, B.P. (2012). Pathways of Arsenic Uptake and Efflux. *Curr. Top. Membr.* *69*, 325–358.
- Yang, X., Zheng, F., Xing, H., Gao, Q., Wei, W., Lu, Y., Wang, S., Zhou, J., Hu, W., and Ma, D. (2004). Resistance to chemotherapy-induced apoptosis via decreased caspase-3 activity and overexpression of antiapoptotic proteins in ovarian cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *130*, 423–428.
- Yegnasubramanian, S., Haffner, M.C., Zhang, Y., Gurel, B., Cornish, T.C., Wu, Z., Irizarry, R., Morgan, J., Hicks, J., DeWeese, T.L., et al. (2008). DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. *Cancer Res.* *68*, 8954–8967.
- Yuan, Y., Marshall, G., Ferreccio, C., Steinmaus, C., Liaw, J., Bates, M., and Smith, A.H. (2010). Kidney cancer mortality: fifty-year latency patterns related to arsenic exposure. *Epidemiol. Camb. Mass* *21*, 103–108.
- Zhang, F., Paramasivam, M., Cai, Q., Dai, X., Wang, P., Lin, K., Song, J., Seidman, M.M., and Wang, Y. (2014). Arsenite binds to the RING finger domains of RNF20-RNF40 histone E3 ubiquitin ligase and inhibits DNA double-strand break repair. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 12884–12887.
- Zhang, N., Wu, Z.-M., McGowan, E., Shi, J., Hong, Z.-B., Ding, C.-W., Xia, P., and Di, W. (2009). Arsenic trioxide and cisplatin synergism increase cytotoxicity in human ovarian cancer cells: therapeutic potential for ovarian cancer. *Cancer Sci.* *100*, 2459–2464.
- Zheng, C., Lam, S., Li, Y., Fong, B.M., Mak, J.C., and Ho, J.C. (2013). Combination of arsenic trioxide and chemotherapy in small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* *82*, 222–230.
- Zhou, H., Jian, Y., Leng, Y., Liu, N., Tian, Y., Wang, G., Gao, W., Yang, G., and Chen, W. (2016). Human MutT homologue 1 mRNA overexpression correlates to poor response of multiple myeloma. *Int. J. Hematol.*
- Zhou, X., Sun, X., Cooper, K.L., Wang, F., Liu, K.J., and Hudson, L.G. (2011). Arsenite interacts selectively with zinc finger proteins containing C3H1 or C4 motifs. *J. Biol. Chem.* *286*, 22855–22863.
- Zhou, X., Sun, X., Mobarak, C., Gandolfi, A.J., Burchiel, S.W., Hudson, L.G., and Liu, K.J. (2014). Differential binding of monomethylarsonous acid compared to arsenite and arsenic trioxide with zinc finger peptides and proteins. *Chem. Res. Toxicol.* *27*, 690–698.