



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup de Mutagènesi

Estudio de biomonitorización de una población de  
trabajadores expuestos al arsénico y caracterización  
de los posibles factores moduladores del daño  
genotóxico

Tesis Doctoral

Leiliane Paiva Sousa

2007

Estudio de biomonitorización de una población de  
trabajadores expuestos al arsénico y caracterización de los  
posibles factores moduladores del daño genotóxico

Memoria presentada por **Leiliane Paiva Sousa**,  
para optar al grado de doctora en Genética por  
la Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)  
Octubre de 2007

Vº Bº  
Los directores de la tesis

Dr. Amadeu Creus Capdevila  
Profesor Titular de Genética  
UAB

Dr. Ricard Marcos Dauder  
Catedrático de Genética  
UAB

**A minha família**

## Agradecimientos

Al final, han sido muchas las personas implicadas directamente en este trabajo o a las que he implicado sin que tuvieran mucha oportunidad de elección... Mis agradecimientos empiezan por mis tutores y se extienden a aquellos con quienes he compartido horas de microscopio, de laboratorio y aprendizaje, sin olvidar a los que han soportado mis ausencias, mi falta de tiempo, mis prisas y mi monotemático discurso sobre el arsénico...

Es cierto que la mayoría de las personas que pasan por tu vida no te dejan nada más que recuerdos, sin embargo hay unas pocas que te sorprenden de manera tal que hacen que haberlas conocido sea un evento único e irrepetible...

Por todas las experiencias, conocimientos y momentos compartidos,

¡Muchísimas gracias!

Moltes gràcies!

Thank you very much!

Muito obrigada!

Quería también agradecer la colaboración del equipo involucrado en la toma, procesamiento y análisis de las muestras del estudio de biomonitorización y a todos los voluntarios españoles y chilenos que hicieron posible la realización de gran parte de este trabajo.

Esta tesis se ha llevado a cabo en el Grup de Mutagènesi del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la direcció de los doctores Ricard Marcos y Amadeu Creus, con el disfrute de una beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya (2002-2006) y, en este último año, de una beca asociada a proyecto otorgada por el Departament de Genètica i Microbiologia de la UAB.

**ÍNDICE****RESUMEN**

Abreviaturas.....	i
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Distribución terrestre del arsénico y sus niveles ambientales.....	3
1.1.1. Distribución del arsénico en la Región de Antofagasta, Chile.....	4
1.2. Características químicas del arsénico y principales vías de absorción.....	8
1.3. Metabolismo: generalidades.....	10
1.3.1. Metabolismo del arsénico.....	12
1.3.1.1. El proceso de metabolización del arsénico.....	13
1.3.1.2. Variabilidad en el metabolismo del arsénico en humanos.....	17
1.3.1.2.1. Influencia de los factores genéticos y ambientales.....	18
1.4. Toxicidad del arsénico.....	21
1.5. Genotoxicidad del arsénico.....	22
1.5.1. Posibles mecanismos moduladores de la genotoxicidad del arsénico.....	25
1.6. Estudios de biomonitorización en la evaluación del riesgo genotóxico.....	30
1.6.1. Biomarcadores: indicadores de daño genético.....	31
1.6.1.1. Biomarcadores de exposición.....	32
1.6.1.2. Biomarcadores de efecto.....	33
1.6.1.2.1. El ensayo de micronúcleos.....	34
1.6.1.2.1.1. El uso de linfocitos de sangre periférica.....	35
1.6.1.2.1.2. El uso de células de mucosa bucal.....	36
1.6.1.2.2. El ensayo de intercambios entre cromátidas hermanas.....	37
1.6.1.3. Biomarcadores de susceptibilidad.....	38
1.7. Efectos de la exposición al arsénico en la especie humana.....	39
1.7.1. Influencia del metabolismo en los efectos inducidos por el arsénico.....	40

1.7.2. Estudios de riesgo genotóxico en poblaciones expuestas al arsénico.....	42
1.8. Glutation S-transferasas.....	44
1.8.1. La clase Omega.....	46
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
Parte I: Estudios de biomonitorización.....	51
3.1.1. Caracterización de la población estudiada.....	51
3.1.2. Obtención de las muestras.....	51
3.1.3. Metodologías aplicadas.....	52
3.1.3.1. Encuesta.....	52
3.1.3.2. Cultivo de linfocitos.....	53
3.1.3.2.1. Protocolo del ensayo de SCE.....	53
3.1.3.2.2. Protocolo del ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica.....	56
3.1.3.3. Protocolo del ensayo de MN en células de mucosa bucal.....	57
3.1.3.4. Cuantificación del arsénico en orina.....	58
3.1.3.5. Análisis estadístico.....	59
Parte II: Caracterización de las variantes polimórficas de <i>GSTO1</i> y <i>GSTO2</i> .....	60
3.2.1. Poblaciones estudiadas.....	60
3.2.2. Extracción del DNA.....	61
3.2.3. Secuenciación y análisis de los polimorfismos.....	62
3.2.4. Análisis estadístico.....	68
3.2.5. Mutagénesis dirigida.....	68
3.2.6. Expresión y purificación de proteínas.....	69
3.2.7. Ensayos enzimáticos.....	71

---

Parte III: Estudios <i>in vitro</i> .....	73
3.3.1. Cultivos celulares y compuestos utilizados.....	73
3.3.2. Ensayos de toxicidad.....	74
3.3.3. Bloqueo del ciclo celular, de la transcripción y de la traducción.....	75
3.3.4. Extracción de proteínas y <i>Western blot</i> .....	75
3.3.5. RNA de interferencia.....	77
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
Parte I. Estudios de biomonitorización.....	79
4.1. Descriptiva de las poblaciones de trabajadores expuestos al arsénico.....	79
4.1.1. Biomarcadores de exposición: niveles de arsénico y de sus metabolitos en orina.....	81
4.1.2. Biomarcadores de daño citogenético.....	83
4.1.2.1. Ensayo de SCE.....	84
4.1.2.2. Ensayo de MN en linfocitos y en células de la mucosa bucal.....	91
Parte II. Caracterización de variantes polimórficas en <i>GSTO1</i> y <i>GSTO2</i> .....	95
4.2.1 Glutation S-transferasa Omega 1 ( <i>GSTO1</i> ).....	96
4.2.1.1. Análisis de los polimorfismos del gen <i>GSTO1</i> : diferencias interétnicas.....	96
4.2.1.2. Caracterización de las variantes polimórficas Ala236Val y Glu50Gly: resultados del ensayo enzimático.....	100
4.2.1.3. Análisis de los polimorfismos del gen <i>GSTO1</i> .....	103
4.2.1.3.1. Asociación con el patrón de excreción de arsénico en orina.....	104
4.2.1.3.2. Asociación con el daño citogenético.....	112
4.2.2. Glutation S-transferasa Omega 2 ( <i>GSTO2</i> ).....	119
4.2.2.1. Caracterización del gen <i>GSTO2</i> : secuenciación de las regiones codificantes.....	119
4.2.2.2. Análisis de la frecuencia de la variante Asn142Asp: diferencias interétnicas.....	120

4.2.2.3. Papel de la variante Asn142Asp.....	121
4.2.2.3.1. Asociación con el patrón de excreción de arsénico en orina.....	123
4.2.2.3.2. Asociación con el daño citogenético.....	127
Parte III. Estudios <i>in vitro</i> .....	134
4.3. Posible relación entre <i>GSTO1</i> y los efectos causados por el arsénico.....	134
4.3.1. Caracterización de <i>GSTO1</i> .....	134
4.3.1.1. Expresión de <i>GSTO1</i> y <i>GSTO2</i> en diferentes líneas celulares.....	134
4.3.1.2. Regulación de la expresión de <i>GSTO1</i> .....	136
4.3.1.3. Vías de regulación post-transcripcional y traduccional de <i>GSTO1</i> .....	136
4.3.2. Detección de los efectos inducidos por distintos compuestos de arsénico: ensayos de toxicidad.....	137
4.3.3. Papel del gen <i>GSTO1</i> en la toxicidad del arsénico.....	138
4.3.3.1. Respuesta de las líneas celulares MRC5 y SW800 frente al daño causado por compuestos de arsénico inorgánicos y orgánicos: citotoxicidad y daño oxidativo.....	140
4.3.3.2. Reducción de la expresión del gen <i>GSTO1</i> : diferencias de respuesta frente a los efectos causados por arsénico.....	144
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>147</b>
5.1. Parte I. Estudios de biomonitorización.....	147
5.1.1. Biomarcadores de exposición: niveles de arsénico en orina.....	148
5.1.2. Biomarcadores de daño citogenético: ensayos de SCE y de MN.....	151
5.1.2.1. Análisis de los factores de confusión.....	154
5.1.3. Asociaciones entre daño genotóxico y perfil de excreción del arsénico.....	156
5.2. Parte II. Caracterización de las variantes polimórficas de <i>GSTO1</i> y <i>GSTO2</i> .....	158

---

5.2.1. Análisis de los polimorfismos de los genes <i>GSTO1</i> y <i>GSTO2</i> : diferencias interétnicas.....	158
5.2.2. Caracterización enzimática de las variantes polimórficas.....	162
5.2.3. Asociaciones entre los polimorfismos de <i>GSTO1</i> y <i>GSTO2</i> y los patrones de excreción del arsénico.....	165
5.2.4. Asociaciones entre los polimorfismos de <i>GSTO1</i> y <i>GSTO2</i> con el daño genotóxico.....	171
5.3. Parte III. Estudios <i>in vitro</i> .....	174
5.3.1. Caracterización de <i>GSTO1</i> .....	174
5.3.2. Detección de los efectos tóxicos inducidos por distintos compuestos de arsénico.....	176
5.3.3. Papel del gen <i>GSTO1</i> en la toxicidad del arsénico.....	178
5.4. Discusión general de los resultados obtenidos.....	182
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>189</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>193</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>217</b>
ANEXO 1: Encuesta.....	217
ANEXO 2: Correlaciones entre la frecuencia de SCE y arsénico en orina.....	223
ANEXO 3: Artículos.....	225
Anexo 3.1: Sister Chromatid Exchange analysis in smelting planting workers exposed to arsenic.....	225
Anexo 3.2: Evaluation of micronucleus frequencies in blood lymphocytes and buccal cells from smelting plant workers exposed to arsenic.....	231
Anexo 3.3: Polymorphism of glutathione transferase Omega 1 in a population exposed to a high environmental arsenic burden.....	251
Anexo 3.4: Role of <i>GSTO1</i> and <i>GSTO2</i> in arsenic toxicity.....	279



**RESUMEN**

Al arsénico se le considera un problema de salud mundial debido a la cantidad de poblaciones expuestas crónicamente al mismo y a la gravedad de los efectos inducidos, incluyendo el incremento de algunos tipos de cáncer. Aunque los mecanismos de acción del arsénico no están del todo dilucidados, está ampliamente aceptado su potencial citotóxico, genotóxico y carcinógeno. En este trabajo se pretende estudiar sus efectos genotóxicos, entender los mecanismos implicados en el proceso de su metabolización e investigar posibles biomarcadores de susceptibilidad asociados a la exposición.

Inicialmente, se llevó a cabo un estudio de biomonitorización para averiguar las posibles correlaciones entre efectos genotóxicos y exposición ocupacional al arsénico. Se utilizaron los niveles de arsénico y de sus metabolitos en orina como biomarcador de exposición y los ensayos de MN y de SCE como medida de daño citogenético.

Dado que recientemente se ha propuesto que los dos miembros funcionales de la nueva clase Omega, GSTO1 y GSTO2, juegan un papel importante en la homeostasis celular, estando también involucradas en la biotransformación del arsénico, hemos postulado que, polimorfismos en estos genes podrían estar correlacionados con cambios en la actividad de estas proteínas que lleven a diferencias en el perfil de excreción del arsénico y, consecuentemente, a diferencias de respuesta frente a una exposición. La segunda parte del trabajo ha consistido en el análisis de los polimorfismos de *GSTO1* y de *GSTO2* entre tres grupos étnicos y en la caracterización enzimática de dos de las variantes de *GSTO1*. Además, los polimorfismos de *GSTO1* y de *GSTO2* también se han analizado en la población de trabajadores chilenos, estableciéndose correlaciones entre genotipos, perfil de excreción y daño citogenético, integrando así las dos partes del estudio.

A pesar de los avances en los estudios de expresión de *GSTO1*, el papel que ejerce esta enzima en el metabolismo y en la toxicidad del arsénico sigue en discusión. Así, se han utilizado dos líneas celulares con diferentes niveles de expresión de *GSTO1*, junto con la reducción de sus niveles de expresión mediante la técnica de RNAi, para evaluar las diferencias de respuesta frente a distintos compuestos de arsénico. No se han detectado diferencias en la toxicidad del arsénico relacionadas con los diferentes niveles de expresión. En contraste, la reducción del estrés oxidativo por la NAC indica que diferencias en los niveles de *GSTO1* pueden estar modulando las diferencias de respuesta al estrés oxidativo inducido por los compuestos de arsénico. Nuestros resultados excluyen la participación de otras enzimas en el proceso de biotransformación y toxicidad del arsénico.



**ABREVIATURAS**

<b>ACT</b>	Actinomicina D
<b>As</b>	Arsénico
<b>As<sup>III</sup></b>	Arsenito
<b>As<sup>V</sup></b>	Arsenato
<b>AsBe</b>	Arsenobetaína
<b>AsC</b>	Arsenocolina
<b>As-GSH</b>	Complejo arsénico-glutation
<b>As-i</b>	Arsénico inorgánico
<b>As3MT</b>	Arsénico metiltransferasa
<b>As org</b>	Arsénico orgánico
<b>ATG</b>	Arsénico tri-glutation
<b>ATP</b>	Adenosina 5' trifosfato
<b>ATO</b>	Arsénico trióxido
<b>ATSDR</b>	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i> - Agencia para Substancias Tóxicas y Registro de Enfermedades
<b>BCMN</b>	<i>Buccal Cells with Micronucleus</i> - Células bucales con micronúcleos
<b>bp</b>	<i>Base pair</i> - par de bases
<b>BNMN</b>	<i>Binucleated Cells with Micronucleus</i> - Células binucleadas con micronúcleos
<b>BrDU</b>	5-Bromodesoxiuridina
<b>CA</b>	<i>Chromosomal Aberrations</i> - Aberraciones cromosómicas
<b>CBPI</b>	<i>Cytokinesis Block Proliferation Index</i> - Índice del bloqueo de la citocinesis

<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>Cyt-B</b>	Citocalasina B
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
<b>DMA<sup>V</sup></b>	Ácido dimetilarsínico
<b>DMAG</b>	Dimetil arsínico glutation
<b>EE</b>	Error estándar
<b>EM</b>	Algoritmo de expectación máxima
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency (USA)</i> - Agencia de Protección Ambiental
<b>gl</b>	Grados de libertad
<b>GPx</b>	Glutation peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutation
<b>GSTs</b>	Glutation S-transferasas
<b>GSTO</b>	Glutation S-transferasa de la clase Omega
<b>GSTO1</b>	Glutation S-transferasa Omega 1
<b>GSTO2</b>	Glutation S-transferasa Omega 2
<b>GSTM1</b>	Glutation S-transferasa Mu 1
<b>GSTP1</b>	Glutation S-transferasa Pi 1
<b>GSTT1</b>	Glutation S-transferasa Theta 1
<b>HFC</b>	<i>High Frequency Cells</i> - Células de alta frecuencia de SCE
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografía líquida de alta resolución
<b>IC</b>	Intervalo de confianza

---

<b>ICP/ MS</b>	<i>Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometer</i> - Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research in Cancer</i> - Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
<b>OD</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OSHA</b>	<i>Occupational Safety and Health Administration</i> - Departamento de Seguridad e Higiene en el Trabajo
<b>PRI</b>	<i>Proliferation Index</i> - Índice de proliferación celular
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>MADG</b>	Monometil arsénico diglutation
<b>MMA<sup>V</sup></b>	Ácido monometilarsonico
<b>MN</b>	Micronúcleos
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>NAT</b>	N-acetiltransferasas
<b>PBS</b>	Solución salina fosfatada
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción
<b>RNAi</b>	<i>RNA interference</i> - RNA de interferencia
<b>scRNAi</b>	<i>scrambled RNA</i> - RNAs interferentes mezclados (control)
<b>siRNAi</b>	<i>small interference RNAi</i> - RNA de interferencia corto
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina

<b>SCE</b>	<i>Sister Chromatid Exchange</i> - Intercambio entre cromátidas hermanas
<b>T</b>	Timidina
<b>TMAO</b>	Óxido de trimetilarsino
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>XTT</b>	Ensayo de proliferación celular
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> - Organización Mundial de la Salud
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>

## INTRODUCCIÓN

El arsénico es un metaloide de origen natural que tiene una amplia distribución en la corteza terrestre, pudiendo encontrarse en niveles traza en todos los tipos de ambiente (agua, aire y suelo). Sin embargo, en algunas regiones del planeta los niveles de As se ven incrementados de forma significativa por las condiciones geológicas y/o por la actividad humana.

Cabe destacar que el arsénico puede presentarse en formas químicas orgánicas e inorgánicas y existir en tres estados de oxidación: elemental (0), trivalente (+3, -3) y pentavalente (+5, -5). Las diferencias entre los distintos estados de oxidación tienen gran importancia en relación con su biodisponibilidad y su toxicidad. Además de poseer diferentes estados de oxidación, el arsénico tiene la capacidad de cambiar de un estado a otro y, de este modo, es capaz de participar en un gran número de reacciones químicas y biológicas, incluyendo reacciones de oxidación-reducción, reacciones de ácido-base, interacciones covalentes con otros metales y no metales, y reacciones de metilación y desmetilación. La complejidad y las interacciones entre estas reacciones han contribuido, en parte, a la dificultad para comprender los mecanismos de acción de este metaloide. Sumado a esto, está el papel del metabolismo, que difiere entre especies (distintos procesos de metabolización del arsénico) e, incluso, entre individuos de una misma especie, dando origen a una gran variabilidad de respuestas frente a la exposición a este elemento (Wildfang *et al.*, 2000; Vahter, 2002; Aposhian y Aposhian, 2006).

Al principio, se consideraba que las formas de arsénico inorgánicas eran más tóxicas que las orgánicas, y que su metabolización a formas orgánicas era un mecanismo de detoxificación. Sin embargo, se ha llegado a un consenso de que las formas trivalentes son más tóxicas que las formas pentavalentes y que el metabolismo ejerce un importante papel en la toxicidad, siendo la forma trivalente de los metabolitos metilados la más tóxica (Basu *et al.*, 2001; Kligerman *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Tapio y Grosche, 2006).

Desde que el arsénico se identificó y aisló por vez primera en 1250 por Alberto Magno, éste se ha utilizado ampliamente debido a sus propiedades medicinales y tóxicas (Mandal y Suzuki, 2002). Hasta la década de los años 1940, los compuestos arsenicales eran empleados en el tratamiento de varias enfermedades como la sífilis, la leucemia y la psoriasis; así como agentes antiparasitarios en la profilaxis de la tripanosomiasis y la

amebiasis en humanos. La aparición de la penicilina y de otros antibióticos permitió reducir el uso de los compuestos arsenicales en los productos usados como medicamentos. No obstante, cabe resaltar que últimamente se viene utilizando con éxito el trióxido de arsénico en la terapia de algunos tipos de cáncer. Los compuestos de arsénico también se han aplicado en otros campos como la agricultura, la electrónica y la metalurgia y siguen teniendo usos comerciales en plaguicidas, preservantes de la madera y en la producción de vidrio, papel y semiconductores (Jager y Ostrosky-Wegman, 1997; ATSDR, 2000; Tchounwou *et al.*, 2004).

Actualmente el arsénico y sus compuestos están clasificados por la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) como carcinógenos en humanos (grupo I). La primera evaluación de la IARC del potencial carcinogénico del arsénico y de sus compuestos se llevó a cabo en 1973, encontrándose una relación causal entre su exposición crónica y la incidencia de cáncer. No obstante, los estudios experimentales en animales se han considerado inadecuados y su modo de acción permanecía sin estar dilucidado. En 1979, la IARC volvió a clasificar al arsénico y a algunos de sus compuestos en el grupo I, basándose en estudios epidemiológicos que relacionaban su exposición con el cáncer de piel. En 1980, una reevaluación de los datos determinó que la exposición al arsénico estaba relacionada con el cáncer de pulmón en humanos. A pesar de las limitadas evidencias de carcinogenicidad en animales, desde 1987 se considera que el arsénico es el causante de diversos cánceres en humanos (IARC, 2004).

En general, los colectivos humanos expuestos de forma crónica al arsénico presentan incrementos en las tasas de enfermedades como el cáncer de piel, vejiga, pulmón, hígado y sangre, además de lesiones cutáneas y otros desórdenes (Gebel, 2001; Mandal y Suzuki, 2002; Tapio y Grosche, 2006). Por lo tanto, aunque los mecanismos implicados en el proceso no estén totalmente dilucidados, se puede concluir que existe una asociación inequívoca entre exposición al arsénico e inducción de cáncer.

En el contexto actual, la exposición al arsénico se ha convertido en un problema de salud mundial debido a la cantidad de población expuesta a niveles suficientemente altos y a la complejidad de los efectos causados por este elemento. Se hace necesario, pues, comprender los factores que influyen la naturaleza y la severidad de los daños genotóxicos inducidos por el arsénico, para una mejor evaluación del riesgo causado por su exposición.

### **1.1. Distribución terrestre del arsénico y sus niveles ambientales**

El arsénico es un elemento ubicuo, que se encuentra en el vigésimo lugar en cuanto a su abundancia en la corteza terrestre. Este metaloide raramente se encuentra en la naturaleza en su forma elemental, presentándose como constituyente de compuestos químicos variados y complejos. Aparece ampliamente en rocas ígneas y sedimentarias, pero su presencia principal es en minerales sulfurados de cobre, plomo, zinc y oro. Cuando está combinado con estos minerales se encuentra en su forma inorgánica mientras que, en su forma orgánica, está combinado con carbono e hidrógeno. Los compuestos en forma inorgánica se encuentran de manera natural en la litosfera (90 % en rocas, suelos, sedimentos), en la atmósfera (7-8 %), en la hidrosfera (mares, lagos, cursos superficiales y profundos de aguas) y en la biosfera (Biondi *et al.*, 1995).

Los compuestos de arsénico presentes en el agua y en el suelo son predominantemente inorgánicos, mientras que en los alimentos existe una amplia cantidad y variedad de arsénico orgánico. Los organismos marinos tales como peces, moluscos y mariscos destacan por contener una gran cantidad de arsénico, principalmente compuestos orgánicos trimetilados como la arsenobetaina y la arsenocolina. Sin embargo, aunque estas formas sean abundantes, no se consideran tóxicas ya que son rápidamente excretadas después de ser ingeridas. En otros alimentos (frutas y verduras) también se encuentran compuestos de arsénico, pero en concentraciones muy bajas (excepto en aquellos cultivados en suelos, aguas o aire contaminados). Hay que señalar que el uso de plaguicidas y/o aditivos alimentarios que contengan arsénico puede aumentar de forma considerable sus niveles en alimentos, bebidas y tabaco (Wildfang *et al.*, 2000; Morgan, 2001).

Dado que el arsénico es un componente natural de la corteza terrestre, éste puede estar presente en todos los medios, incluso en el agua del mar. En algunos países como Japón, Nueva Zelanda y EEUU se pueden encontrar altos niveles de este compuesto en el suelo y en las rocas, mientras que en Chile, Argentina, Taiwán y Reino Unido existen elevadas concentraciones (superiores a 1100 µg/L) en el agua de consumo (Leonard y Lauwerys, 1980). En el aire, el arsénico existe predominantemente unido a partículas y se presenta usualmente como una mezcla de arsenito, arsenato y especies orgánicas. En áreas no industriales, la concentración de arsénico en el aire se encuentra en un valor promedio de algunos ng/m<sup>3</sup>, mientras que cuando se trata de regiones industrializadas, la media puede ser superior a 1.000 ng/m<sup>3</sup>. Este nivel de arsénico en el ambiente puede aumentar de forma

considerable debido a procesos industriales (utilización de combustibles fósiles, actividades mineras de extracción y fundición de metales no ferrosos) y por la utilización de algunos productos que contienen el metal como, por ejemplo, pigmentos, preservantes de la madera y plaguicidas, entre otros (Morgan, 2001; Mandal y Suzuki, 2002).

Los niveles ambientales de arsénico se vienen incrementando de forma significativa en distintas regiones del planeta. India y Bangladesh son las zonas más afectadas, donde más de 500 millones de personas se encuentran en situación de riesgo por el consumo de agua contaminada. Sin embargo, los efectos causados por la exposición crónica a este elemento también se observan en países como China, Argentina, Chile, México, Tailandia, Taiwán y Japón, entre otros. Más recientemente, también se han encontrado casos de exposición ocupacional y/o ambiental en algunas regiones de Europa y EEUU (Huang *et al.*, 2004; Tchounwou *et al.*, 2004; Mead, 2005).

Con el objetivo de reducir el riesgo de exposiciones a concentraciones de arsénico consideradas peligrosas para la salud, se empieza a regular sus niveles ambientales. En 1942, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), basándose en datos del Servicio de Salud Pública, estableció el límite de 50  $\mu\text{g/L}$  en el agua de consumo. De modo general, este límite es el que se viene utilizando como valor de referencia en los demás países. En enero del año 2001, después de llevar a cabo estudios de evaluación de riesgo y analizar datos epidemiológicos de exposición al arsénico, la EPA redujo el nivel permisible en agua de 50 a 10  $\mu\text{g/L}$ . Aunque esta medida debería de haberse hecho efectiva a partir del 2006, se ha retrasado su entrada en vigor. El valor de 10  $\mu\text{g/L}$  también es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo, considerando que en el caso del arsénico todavía no se ha podido detectar valores de exposición que no produzcan ningún efecto adverso sobre la salud, la EPA ha propuesto alcanzar el nivel cero en agua. Cabe destacar que tal medida es técnicamente inalcanzable (EPA, 2002). En el caso de exposiciones laborales, la Administración de Seguridad y Salud Laboral (OSHA) recomienda el límite de 10  $\mu\text{g/m}^3$  en el aire por cada 8 horas de trabajo, considerando una jornada de trabajo de 40 horas semanales (ATSDR, 2005).

### **1.1.1. Distribución del arsénico en la Región de Antofagasta, Chile**

En Chile, la presencia de arsénico en el ambiente puede obedecer tanto a causas naturales (características hidrogeológicas de la región) como antropogénicas (relacionadas con la

actividad minera). La región de Antofagasta (fig. 1) se encuentra en el norte de Chile, entre los 26° y 21° de latitud sur y presenta un alto contenido de arsénico en gran parte de sus suelos y aguas.



Fig. 1. Mapa de la región de Antofagasta.

El alto contenido de arsénico observado en esta región está relacionado con el vulcanismo cuaternario característico de los Andes Centrales. Las aguas originadas en las zonas volcánicas de los Andes Centrales, tanto superficiales como de los flujos freáticos, lagunas y géiseres, contienen altas concentraciones de arsénico y de otros elementos como vanadio, flúor y azufre.

Se puede considerar que las condiciones hidrogeológicas son el origen natural de la contaminación por arsénico de aguas y suelos de la zona, así como de los alimentos cultivados en tales condiciones. En Chile, las concentraciones de arsénico en el agua potable muestran un gradiente que disminuye de norte a sur, siendo la región de Antofagasta una de las que presentan las mayores concentraciones medias de arsénico (Biondi *et al.*, 1995).

Actualmente, y a pesar de las medidas tomadas, aún se detectan niveles elevados de arsénico en la red de agua que abastece las localidades de esta región y el agua tiene que someterse a tratamientos para alcanzar los límites establecidos por la norma chilena

vigente para el agua potable, que recomienda una concentración máxima de 50 µg/L. Sin embargo, durante la década de 1960 ocurrió un grave problema epidemiológico en la región, debido a la contaminación por arsénico del agua de consumo. Así, durante 12 años, de 1959 a 1970, unos 130.000 habitantes estuvieron consumiendo agua con contenidos de arsénico del orden de 800 µg/L, sin que se conociera tal exposición. Los síntomas de toxicidad crónica empezaron a aparecer, especialmente en niños, como manifestaciones dermatológicas (alteraciones pigmentarias, queratosis arsenicales), síndrome de Raynaud y otros problemas cardiovasculares. Para mitigar el problema, se construyeron plantas de abatimiento de arsénico que redujeron significativamente sus niveles en el agua de consumo (Biondi *et al.*, 1995; Mandal y Suzuki, 2002).

Datos recientes (tabla 1) indican que en el norte de Chile (región de Antofagasta) hay un incremento de las tasas de cáncer de piel, vejiga y pulmón y una mayor mortalidad por estos tipos de cáncer en comparación con el resto del país, lo que se puede asociar con la exposición de los años 60 (Ferreccio *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000).

Tabla 1. Datos de mortalidad por cáncer de vejiga y pulmón en Chile y en sus regiones

Chile, Regiones y Provincias (1976-1991)		
Lugar	Tasa Promedio (DE)	
	Mortalidad / 100.000 habitantes	
	cáncer vejiga	cáncer broncopulmonar
Chile	1,4 (0,2)	9,9 (0,8)
I Región	1,9 (0,7)	13,0 (2,4)
II Región	6,2 (1,7)	28,6 (4,49)
Antofagasta	8,2 (2,7)	37,6 (5,7)
Tocopilla	9,3 (5,8)	36,4 (16,2)
El Loa	1,2 (1,1)	9,0 (3,3)
III Región	1,8 (0,9)	13,7 (3,2)

DE: desviación estándar

Además de la contaminación natural, en la región de Antofagasta existe una intensa actividad minera que, de modo general, contamina de forma significativa el aire, aunque también ejerce influencia sobre las aguas, suelos y alimentos, aumentando los niveles de

contaminación de la región. En las zonas donde existe actividad minera, la situación de contaminación por arsénico en el aire se agrava en los sitios próximos a los sectores donde se dan emisiones de fundiciones de cobre y de plantas de tueste. En este contexto, hay que señalar que en esta región se localiza el complejo cuprífero de Chuquicamata, que es uno de los mayores del mundo en el proceso de fundición de cobre. En todo el proceso de extracción y manufacturación del cobre existen distintas etapas que llevan a la producción de una gran cantidad de residuos líquidos y sólidos. En el tratamiento de los minerales de cobre, el arsénico se concentra principalmente en las escorias de fundición, en los polvos de fundición o efluentes generados en el tratamiento hidrometalúrgico de los mismos, en los efluentes de las plantas de ácidos y en los efluentes de descarte de la refinería. Actualmente, una de las mayores dificultades metalúrgicas con las que se enfrenta la producción del cobre está relacionada con el creciente contenido en arsénico de los minerales chilenos. Estos niveles han complicado los tratamientos convencionales existentes, además de estar contaminando severamente el ambiente (Biondi *et al.*, 1995).

Las concentraciones de arsénico en el aire no se presentan de forma constante a lo largo del tiempo, debido a la variabilidad de las condiciones meteorológicas y de las emisiones; con todo, mediciones realizadas en el material particulado atmosférico muestran una gran diferencia de concentraciones entre las localidades afectadas directamente por las emisiones de las fundiciones y otras localidades no afectadas. La Comisión Nacional del Medio Ambiente de Chile (CONAMA) viene estudiando diferentes opciones para regular las concentraciones de arsénico en la atmósfera, incluyendo herramientas tales como normas de calidad y normas de emisión (Gutiérrez y Wiertz, 1997; Ulriksen y Cabello, 1997). De acuerdo con la “norma de emisión para la regulación del contaminante arsénico en el aire” establecida por el CONAMA en 1999, las emisiones máximas permitidas en el aire serían establecidas dependiendo del tipo de fuente y de la región. A partir del 2004, en el caso específico de la región de Antofagasta, las fuentes emisoras con capacidad de producción de cobre igual o superior a 200.000 t/año, podrán emitir hasta un total de 34 t/año. Desde la entrada en vigor de las normativas, las empresas de fundición empiezan a tratar el problema de las emisiones de arsénico de modo más específico, haciéndose estimas de las emisiones actuales y futuras, y buscando alternativas para su reducción.

A modo de resumen, podemos afirmar que las características geológicas de la región de Antofagasta y el desarrollo de la actividad minera, originan la emisión de elevadas

cantidades de arsénico, que interactúan con el medio ambiente y la población de esta región, generando altos niveles de exposición.

## **1.2. Características químicas del arsénico y principales vías de absorción**

El arsénico es un elemento que químicamente se encuentra entre los metales y los no metales y sus propiedades responden a su situación dentro del grupo V(A) de la tabla periódica. Según tal sistema de clasificación, el arsénico tiene un número atómico de 33, unidad de masa atómica de 74,92 y comparte características químicas con nitrógeno, fósforo, antimonio y bismuto.

Como se ha indicado anteriormente, en el ambiente (agua, suelos, atmósfera) se encuentran de modo más frecuente las formas de arsénico inorgánico, generalmente en estado de valencia +3 y +5 (Leonard y Lauwerys, 1980). La estabilidad de los compuestos inorgánicos del arsénico depende de su valencia y de la naturaleza del medio. En medios oxigenados y con pH alto se favorece la forma pentavalente (arsenatos), mientras que en los medios reducidos y/o ácidos, son las formas trivalentes (arsenitos) las favorecidas. En medios con condiciones reductoras moderadas, el arsénico se combina frecuentemente con el azufre y con el hierro, formando arsénico-sulfitos, que son insolubles en agua. En condiciones extremadamente reductoras, pueden existir el arsénico elemental (0) y el arsénico (-3), aunque tales condiciones son muy raras (WHO, 2001; Jones, 2007).

Los compuestos orgánicos de arsénico como la arsenobetaina (AsBe), la arsenocolina (AsC), las sales de tetrametilarsonio, los arsenoazúcares y los lípidos con arsénico se encuentran fundamentalmente en organismos marinos (aunque también se han detectado algunos de ellos en especies terrestres). Además de estos compuestos, existen las formas orgánicas que tienen origen en el proceso de metabolización de los compuestos inorgánicos. Así, las formas más comunes son los derivados metilados conocidos como MMA, DMA y TMAO- ácido monometilarsónico, ácido dimetilarsínico y óxido de trimetilarsino, respectivamente (Wildfang *et al.*, 2000; WHO, 2001). En la tabla 2 se relacionan los compuestos de arsénico inorgánicos y orgánicos más comunes.

Cada una de las formas de arsénico posee distintas propiedades fisicoquímicas y una gran variabilidad en cuanto a su disponibilidad en el medio. El arsénico contenido en el agua (principalmente en forma inorgánica) presenta disponibilidad biológica y los compuestos

de arsénico en los alimentos (en forma orgánica o inorgánica) en su mayoría también poseen tal disponibilidad, siendo fácilmente absorbidos.

Tabla 2. Principales compuestos de arsénico

Compuestos inorgánicos	Fórmula química
Arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ )	$\text{AsO}_2^-$ , $\text{AsO}_3^{-3}$
Arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ )	$\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ , $\text{HAsO}_4^{-2}$ , $\text{AsO}_4^{-3}$
Ácido arsenoso	$\text{H}_3\text{AsO}_3$
Ácido arsénico	$\text{H}_3\text{AsO}_4$
Trióxido de arsénico	$\text{As}_2\text{O}_3$
Pentóxido de arsénico	$\text{As}_2\text{O}_5$
Arseniuro de galio	$\text{GaAs}$
Arseniuro de indio	$\text{InAs}$
Arsina	$\text{AsH}_3$
Compuestos orgánicos	Fórmula química
Ácido monometilarsónico (MMA)	$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$
Ácido dimetilarsínico (DMA)	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$
Óxido de trimetilarsina (TMAO)	$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$
Arsenobetaína	$(\text{CH}_3)_3\text{As}+\text{CH}_2\text{COO-X-}$
Arsenocolina	$(\text{CH}_3)_3\text{As}+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OHX-}$

Normalmente se considera que la dieta es la principal vía de exposición humana no ocupacional al arsénico y se estima que su ingestión a través de alimentos y bebidas se sitúa entre 20 y 300  $\mu\text{g}/\text{día}$ . En zonas en las que existen altas concentraciones de este elemento, sea de forma natural o antropogénica, la exposición puede ocurrir también por inhalación y por contacto dérmico. Además, existe la exposición pulmonar al arsénico a través del humo del tabaco, que puede llegar a unos 10  $\mu\text{g}/\text{día}$  en un fumador y en torno a 1  $\mu\text{g}/\text{día}$  en una persona no fumadora, siendo estos valores más elevados en las zonas contaminadas (WHO, 2001).

La mayor parte del arsénico ingerido (60-90 %) es rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal y entra en el torrente sanguíneo. La disponibilidad biológica del arsénico

ingerido es variable y depende del medio en que haya sido ingerido (a través de la comida, bebida, etc.), de la solubilidad del compuesto y de la presencia de otros alimentos o nutrientes en el tracto gastrointestinal (Morgan, 2001; Mandal y Suzuki, 2002).

La absorción del arsénico a través de la respiración consiste en la deposición de las partículas inhaladas en el tracto respiratorio, seguida de la absorción de las partículas depositadas. Siendo así, la tasa de absorción del arsénico inhalado dependerá principalmente de la solubilidad y del tamaño de las partículas. A pesar de no existir ninguna estimación exacta de la tasa de absorción del As inhalado, parece ser similar a la del tracto gastrointestinal. La absorción a través de la piel y de la placenta también se ha puesto de manifiesto, aunque tenga una menor importancia en comparación con las otras vías de penetración (Morgan, 2001; Jones, 2007).

Después de ser absorbido, la distribución del arsénico en los tejidos depende del flujo sanguíneo, de los coeficientes de difusión, de las características de las membranas y de las afinidades de los tejidos. Sin embargo, hay que señalar que en pocas horas su concentración en la sangre decrece a niveles normales. Inicialmente, el arsénico se acumula en hígado, bazo, riñones, pulmones y tracto gastrointestinal; sin embargo, su eliminación de estos tejidos ocurre de manera rápida.

Normalmente, entre el 40 y el 70 % del arsénico procedente de una exposición es absorbido, metabolizado y excretado en un período de 48 horas. Aunque la principal vía de excreción del arsénico sea por la orina, también se elimina a través de las heces, el sudor y la descamación cutánea. Entre dos y cuatro semanas después del final de la exposición, la mayor parte del arsénico que permanece en el organismo se encuentra en tejidos ricos en queratina como la piel, el pelo y las uñas. En general, los niveles de arsénico o de sus metabolitos en pelo, uñas y orina son muy útiles como herramientas para evaluar y cuantificar la exposición al arsénico (WHO, 2001; Mandal y Suzuki, 2002).

### **1.3. Metabolismo: generalidades**

El hombre está constantemente expuesto a un gran número de compuestos exógenos debido a exposiciones ambientales y/o ocupacionales, además de exposiciones relacionadas con los hábitos y estilos de vida, tales como la dieta, el consumo de alcohol y el hábito de fumar, entre otros. La respuesta a estos agentes potencialmente tóxicos

depende de diversos factores, entre los cuales hay que destacar el metabolismo, que juega un papel esencial en la eliminación y/o destoxificación de estos compuestos xenobióticos.

En principio, el metabolismo está formado por distintas fases y el proceso metabólico consiste en transformar el compuesto inicial en otro menos tóxico y/o más excretable. Sin embargo, en este proceso, compuestos que antes eran inactivos pueden ser activados, siendo transformados en especies más reactivas. De modo general, el metabolismo se divide en dos etapas: las reacciones de fase I (funcionalización) y las reacciones de fase II (conjugación).

Las enzimas involucradas en los procesos de fase I están representadas mayoritariamente por enzimas de la superfamilia P450 (CYP), que se hallan de forma abundante en hígado, pulmón, tracto gastrointestinal y riñones. Estas enzimas participan en la destoxificación de un amplio número de fármacos y contaminantes ambientales y tienen por finalidad modificar la molécula (generalmente con la adición de grupos hidroxilos, epóxidos y óxidos) transformándola en un compuesto intermediario más hidrofílico, que podrá ser excretado o pasar a la fase II.

Las enzimas involucradas en los procesos de fase II constituyen una variedad de superfamilias incluyendo, entre otras, las glutation-S-transferasas (GSTs) y las N-acetiltransferasas (NATs). Éstas se caracterizan por presentar actividad sustrato específica, catalizando reacciones de conjugación y biosíntesis que tienen lugar sobre los productos de la fase I. En esta fase, los compuestos intermediarios de la fase I se transforman en derivados altamente hidrosolubles y fácilmente excretables (Xu *et al.*, 2005; Nebert, 2006). Cabe destacar que en ambas fases del proceso metabólico puede ocurrir la transformación de xenobióticos inertes en intermediarios genotóxicos, así como la inducción de daño oxidativo.

El proceso enzimático del metabolismo también incluye enzimas transportadoras, actualmente clasificadas como enzimas de fase III. Estas enzimas pueden ser ATP dependientes, como por ejemplo las P-glicoproteínas (P-gp) y las proteínas asociadas a resistencia a multidrogas (MRPs), o por otro lado, ser enzimas transportadoras independientes del ATP, como el caso de las transportadoras de aniones orgánicos (OATP2). En general, las enzimas de fase III se expresan en numerosos tejidos (hígado, intestino, cerebro, riñón) y, además de actuar como una barrera contra la entrada de los

xenobióticos, tienen un papel fundamental en la absorción, distribución y excreción de los mismos (Xu *et al.*, 2005).

Las diferencias en relación con la función, modo de acción y ritmo de la actividad de las enzimas involucradas en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los xenobióticos pueden conducir a diferencias inter- e intraindividuales en la respuesta frente a una misma exposición. La existencia de polimorfismos en genes que codifican para estas enzimas tiene un importante papel modulador en los procesos de mutagénesis, influyendo de forma determinante en la toxicidad y genotoxicidad de los compuestos.

### **1.3.1. Metabolismo del arsénico**

El metabolismo y la toxicidad del arsénico dependen de la forma química de los compuestos y del estado de valencia en que se encuentre. Comúnmente, la metilación viene siendo considerada como la principal ruta de detoxificación del arsénico en mamíferos; sin embargo, existen importantes diferencias interespecíficas cualitativas y cuantitativas en este proceso, hasta el punto de que algunas especies poseen una capacidad de metilación nula o casi nula.

De modo general, la mayor parte de los animales excretan más DMA y menos MMA en la orina, en comparación con el hombre (Vahter, 1999 a). Animales de laboratorio como la rata, el hámster y el conejo, difieren de la mayoría de los mamíferos y excretan niveles muy bajos de monometil arsónico (MMA), mientras que la cobaya, el chimpancé y algunos primates son incapaces de metilar el arsénico (Vahter *et al.*, 1995; Seoane *et al.*, 1998; Wildfang *et al.*, 1998).

A pesar de no existir un modelo animal totalmente fiable para la extrapolación al hombre, durante décadas se viene investigando sobre la cinética y el metabolismo del arsénico. En este contexto, los estudios epidemiológicos han contribuido de forma significativa a la caracterización del metabolismo del arsénico en humanos (Aposhian *et al.*, 2000; Wildfang *et al.*, 2000).

La exposición humana al arsénico inorgánico, ya sea por ingestión o por inhalación, implica la excreción en orina de una parte inorgánica y de sus dos principales metabolitos, MMA y DMA. Los compuestos inorgánicos parcialmente metilados son rápidamente excretados por la orina, así como los compuestos orgánicos finales. Por otro lado, los

compuestos de arsénico orgánico encontrados en los animales marinos son moléculas muy complejas y parecen ser bastante resistentes a los procesos de biotransformación. Es por ello que no son considerados tóxicos para el hombre y se eliminan en su forma inicial inalterada (Morgan, 2001).

Existen rutas alternativas de excreción del arsénico a través de la bilis, la piel, las uñas y el pelo. La fracción de arsénico inorgánico absorbida se acumula en el organismo y puede encontrarse distribuida en casi todos los tejidos (Seoane *et al.*, 1998; Mandal y Suzuki, 2002; Jones, 2007).

### **1.3.1.1. El proceso de metabolización del arsénico**

El proceso de biotransformación del arsénico inorgánico a sus derivados metilados viene siendo estudiado desde hace mucho tiempo y, últimamente, este tema está adquiriendo especial interés debido a la correlación existente entre metabolismo y toxicidad/genotoxicidad. En 1977 se demostró la existencia de un proceso de metilación en humanos (Crecelius, 1977), y en general en mamíferos; éste consistía en una reacción catalizada enzimáticamente, y que requería la reducción previa del  $\text{As}^{\text{V}}$  a  $\text{As}^{\text{III}}$ .

En humanos, la mayor parte del  $\text{As}^{\text{V}}$  absorbido se reduce rápidamente a  $\text{As}^{\text{III}}$ , principalmente en la sangre. Los tioles y, en particular, el glutatión tienen un papel esencial en este proceso de reducción. Posiblemente el  $\text{As}^{\text{III}}$  se une a un ditiol, una proteína transportadora, antes que el grupo metilo sea incorporado. Debido a que el  $\text{As}^{\text{III}}$  posee una mayor toxicidad que el  $\text{As}^{\text{V}}$ , este primer paso de la biotransformación del As puede considerarse como una bioactivación. La mayor parte del  $\text{As}^{\text{III}}$  formado en esta reacción inicial se distribuirá en los tejidos y se transformará a MMA y DMA (Vahter, 2002), siendo el hígado el principal centro de metilación. No obstante, se ha demostrado que la mayoría de los tejidos (riñones, pulmón, testículos, etc.) también tienen capacidad metiladora (Healy *et al.*, 1998).

En el proceso de metilación del arsénico, además de las metiltransferasas, también está involucrada la S-adenosilmetionina (SAM), que se considera como la principal donante del grupo metilo. Se ha comprobado que la inhibición de la metilación SAM-dependiente resulta en una disminución de la excreción de DMA. Otros estudios *in vitro* revelan que, en

preparaciones de hígado de rata incubadas con arsenito, se necesita la SAM para que se formen MMA y DMA (Vahter, 1999 a).

A pesar de la existencia de diversos estudios sobre las metiltransferasas, de momento éstas no están totalmente caracterizadas. Zakharyan y colaboradores, utilizando enzimas de conejo purificadas, detectaron que la actividad arsenito-metiltransferasa y MMA-metiltransferasa correspondían a una misma proteína con un peso molecular de unos 60 kDa, observándose la existencia de un pH óptimo y distintas concentraciones de saturación para cada uno de los sustratos (Zakharyan *et al.*, 1995). En 1998, se obtuvieron resultados similares en un estudio comparativo realizado con enzimas de hámster purificadas, excepto con relación al peso molecular que era aproximadamente de unos 46 kDa (Wildfang *et al.*, 1998). Posteriormente, se pudo detectar la presencia de actividad arsenito metiltransferasa en hepatocitos humanos cultivados, descubriéndose también que MMA<sup>III</sup> es el sustrato para la MMA-metiltransferasa (Zakharyan *et al.*, 1999).

Lin y colaboradores, en un estudio realizado con una nueva metiltransferasa (S-adenosil-metionina As<sup>III</sup> metiltransferasa) purificada a partir de hígado de rata, corroboraron la evidencia de que los compuestos arsenicales trivalentes son el sustrato para esta enzima y que su actividad era dependiente de la concentración de SAM (AdoMet) en la reacción. Además, esta metiltransferasa se expresaba también en tejidos humanos y presentaba una secuencia homóloga a la del gen *Cyt19*, que se conoce actualmente como *As3MT* (Lin *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2006). Por otro lado, la metilación del arsénico inorgánico también puede ocurrir por una vía no enzimática (Zakharyan y Aposhian, 1999).

Actualmente, existen dos propuestas para describir la biotransformación enzimática del arsénico inorgánico a los compuestos metilados (Hayakawa *et al.*, 2005; Aposhian y Aposhian, 2006; Thomas, 2007). La ruta de la metilación oxidativa fue propuesta originalmente en 1951 y corroborada por Cullen y colaboradores en 1984. Ésta consiste en reacciones de oxidación/reducción seguidas de reacciones de metilación, en las que el arsénico inorgánico se convierte en productos orgánicos mono-, di- y trimetilados, a partir de la incorporación del grupo metilo de la SAM a los sustratos de arsénico trivalente. Siempre se requiere la reducción previa para que ocurra la metilación oxidativa (fig. 2).

Hasta el momento, se han identificado dos enzimas capaces de reducir el As<sup>V</sup>. La primera, parcialmente purificada a partir de hígado humano, presenta una secuencia de aminoácidos

homóloga a la proteína humana purina nucleósido fosforilasa, conocida como PNP (Radabaugh *et al.*, 2002). No obstante, parece que la PNP sólo posee actividad  $\text{As}^{\text{V}}$  reductasa en unas condiciones *in vitro* muy específicas. En estudios *in vivo* realizados en eritrocitos humanos y en ratas, no se pudo comprobar la actividad reductora de esta enzima (Nemeti *et al.*, 2003). Sin embargo, el  $\text{As}^{\text{V}}$  también puede ser reducido por una segunda enzima, la  $\text{MMA}^{\text{V}}$  reductasa, que se ha considerado como el factor limitante en el proceso de metabolización del arsénico.

Se ha demostrado que la reducción del  $\text{MMA}^{\text{V}}$  a  $\text{MMA}^{\text{III}}$  es enzimática y dependiente de GSH (Zakharyan *et al.*, 2001). Actualmente se sabe que esta enzima, idéntica a una nueva clase de glutathion-S-transferasa denominada GSTO1, es capaz de catalizar todas las reacciones de reducción del arsénico. Cabe destacar que el  $\text{As}^{\text{V}}$  puede ser reducido por el glutathion y otros tioles, a partir de una reacción química no enzimática (Bertolero *et al.*, 1987; Scott *et al.*, 1993; Radabaugh y Aposhian, 2000).

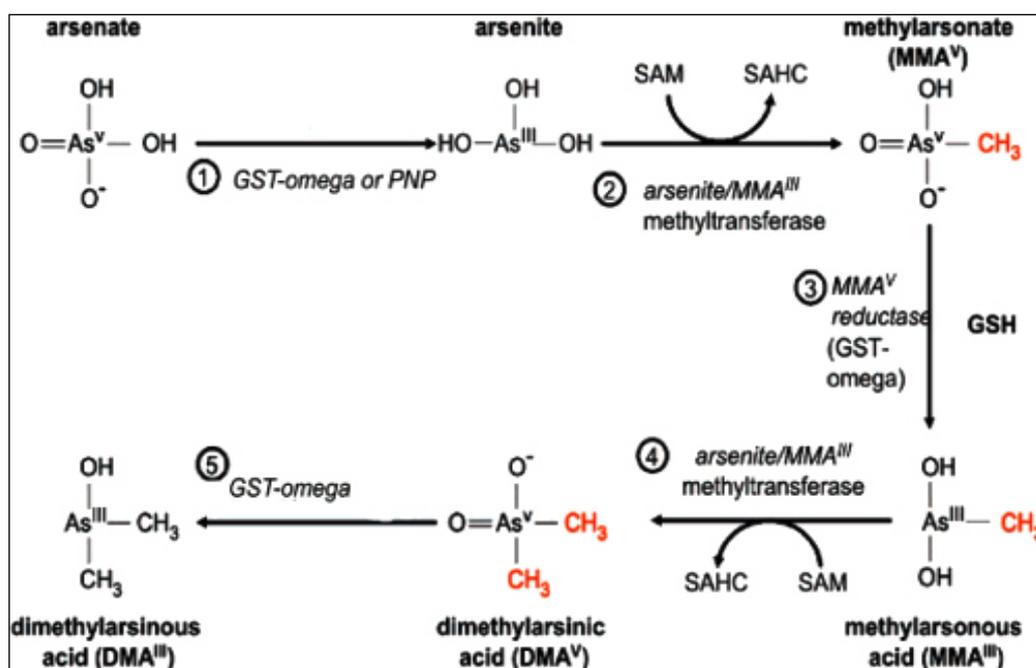


Fig. 2. Esquema de los pasos enzimáticos en el metabolismo del arsénico.

Por lo tanto, de acuerdo con el esquema clásico, la metabolización del arsénico requiere básicamente dos enzimas: una metiltransferasa y GSTO1. El arsénico inorgánico se metaboliza a partir de sucesivas reducciones y metilaciones oxidativas, en compuestos trivalentes metilados como metabolitos finales. Posteriormente se ha propuesto que las especies de arsénico trivalentes podrían ser oxidadas y detoxificadas por el peróxido de

hidrógeno, siendo así transformadas en especies pentavalentes menos reactivas (Aposhian *et al.*, 2003, 2004).

La segunda ruta propuesta sobre el metabolismo del arsénico se basa en evidencias de la existencia de la vía de reducción no enzimática del  $As^V$ . En este modelo alternativo, la metiltransferasa ( $As_3MT$ ) es la única enzima requerida para llevar a cabo todo el proceso de biotransformación del arsénico (Hayakawa *et al.*, 2005). Consiste en la reducción previa del  $As^V$  a  $As^{III}$  y la posterior conjugación de las formas trivalentes con la GSH, formando complejos As-GSH. Estos complejos se constituyen en los sustratos para la acción de la metiltransferasa (fig. 3).

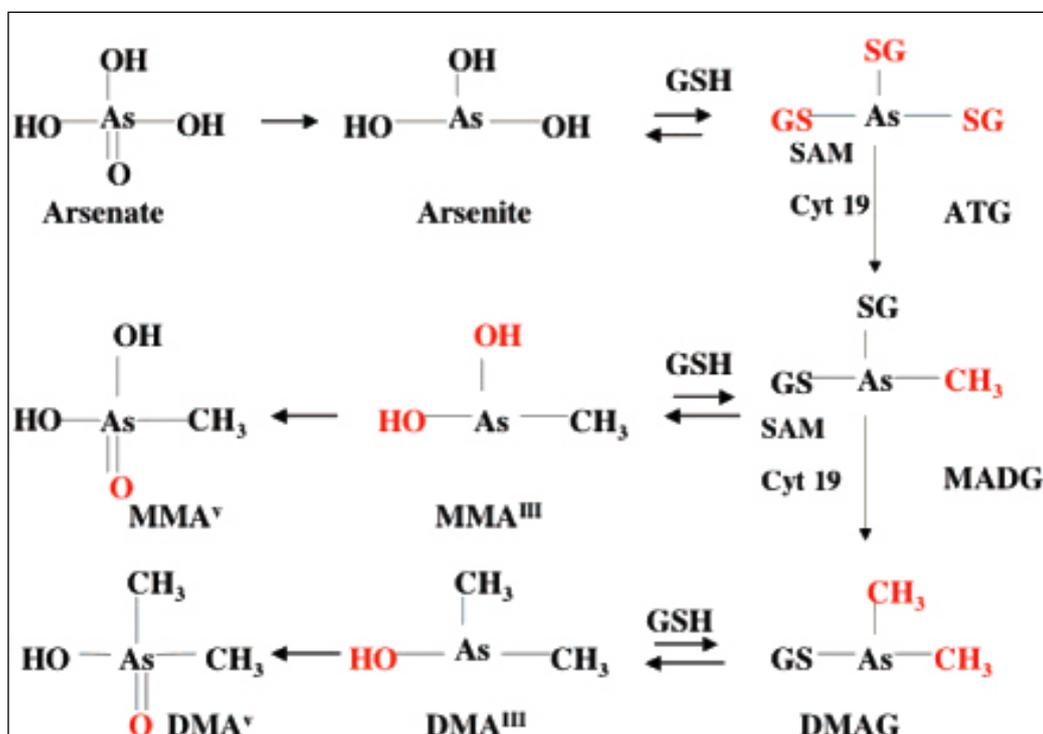


Fig. 3. Metabolismo alternativo del arsénico a través de la formación de complejos As-GSH.

En este esquema de reacciones no oxidativas, los primeros compuestos que se forman son los trivalentes. Una vez que se produce el ATG (arsénico tri-glutation), éste se metila mediante la acción de la  $As_3MT$  y se transforma en MADG (monometilarsénico di-glutation) y DMAG (dimetil arsénico glutation). Estos compuestos son oxidados y convertidos en las formas pentavalentes  $MMA^V$  y  $DMA^V$ . Sin embargo, los metabolitos y productos intermediarios originados por esta vía metabólica alternativa, especialmente los

complejos As-GSH, no se han confirmados y, por lo tanto, se hace necesario investigar de forma más detallada los pasos propuestos (Aposhian y Aposhian, 2006). Además, no se puede descartar la posibilidad de que haya nuevas enzimas involucradas en el proceso de formación y oxidación de los complejos As-GSH.

Por el momento, se puede afirmar que los modos de acción del arsénico y de sus metabolitos son extremadamente variados, complejos y, en gran parte, aún desconocidos. A pesar de eso, la correlación existente entre el metabolismo y la toxicidad del arsénico es incuestionable. Siendo así, dilucidar los procesos y enzimas involucrados en la biotransformación del arsénico contribuirá de forma definitiva en la búsqueda de respuestas frente a la variabilidad al daño inducido por este compuesto.

#### **1.3.1.2. Variabilidad en el metabolismo del arsénico en humanos**

Aunque existen muchas diferencias relacionadas con el proceso de metabolización del arsénico inorgánico, gran parte de las personas y animales utilizan la metilación como principal vía de biotransformación, excretando la mayor parte de los metabolitos por la orina.

Independientemente del tipo y de la duración de la exposición, la distribución media relativa de metabolitos de arsénico en orina en los individuos expuestos parece ser relativamente constante: 10-30 % de As inorgánico; 10-20 % de MMA y 60-80 % de DMA (Vahter y Concha, 2001; Brima *et al.*, 2006). No obstante, existen algunas excepciones. Así, estudios realizados con poblaciones indígenas de los Andes (norte de Chile y Argentina) han puesto de manifiesto la presencia de un menor porcentaje de MMA en la orina, difiriendo de los resultados obtenidos en otras poblaciones, en las que solamente unos pocos individuos presentan este patrón (Hopenhayn-Rich *et al.*, 1996; Vahter, 1999 b, 2000, 2002; Brima *et al.*, 2006).

En el norte de Chile, algunos de los individuos expuestos a una concentración media de 600 µg As/L excretaban niveles de MMA inferiores al 5 %, cuando la media del grupo era del 15 %. Todos estos individuos eran de origen atacameño (etnia indígena de la región). Por otro lado, un estudio de biomonitorización realizado en una población de Taiwán expuesta al arsénico indica un alto porcentaje de MMA en orina, superior a los niveles encontrados normalmente (Vahter, 1999 b, 2000, 2002).

Es interesante resaltar que la población atacameña que vive en el norte de Chile y Argentina ha estado expuesta a altas concentraciones de arsénico durante miles de años, mientras que otras poblaciones están expuestas al arsénico desde mucho más recientemente. Por lo tanto, la variabilidad observada en el perfil de excreción de estos individuos podría estar relacionada con la existencia de variantes alélicas que puedan haber sido seleccionadas o que se presenten en distintas frecuencias en este grupo étnico.

Además de las diferencias encontradas entre grupos poblacionales (relacionados con diferencias entre etnias), existe también una importante variabilidad interindividual en la metabolización del arsénico, probablemente causada por factores ambientales y otros determinados genéticamente, como por ejemplo, polimorfismos en la capacidad metabólica y en genes reguladores de la expresión de las arsénico metiltransferasas, entre otros (Vahter, 2000).

#### **1.3.1.2.1. Influencia de los factores genéticos y ambientales**

Es evidente que la gran variabilidad en el proceso de metabolización del arsénico, que se ve reflejada en diferencias en el perfil de excreción del compuesto y de sus metabolitos, está asociada con la susceptibilidad frente a sus efectos tóxicos entre poblaciones e, incluso, entre individuos de una misma población expuesta. A pesar de ello, todavía se hace necesario investigar sobre los posibles factores moduladores de esta variabilidad, sean de origen genético y/o ambiental.

La existencia de una base genética asociada al metabolismo del arsénico se ha comprobado en un estudio en el cual se demostró la existencia de un patrón de agregación familiar en la excreción de los metabolitos metilados del arsénico (Chung *et al.*, 2002). Sin embargo, el papel de los factores genéticos en el metabolismo del arsénico no está totalmente elucidado.

En un estudio realizado en Taiwán, se investigó la relación entre los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* y el patrón de excreción de metabolitos arsenicales en la orina de 115 individuos expuestos al arsénico. Los individuos que poseían genotipo nulo para *GSTM1* tenían un aumento del porcentaje de arsénico inorgánico, mientras que los individuos *GSTT1* nulos presentaban un porcentaje elevado de DMA en orina. Los resultados del estudio indican una asociación entre los dos tipos de polimorfismos de las GSTs y el proceso de metilación

del arsénico (Chiou *et al.*, 1997). Por otro lado, en otro estudio llevado a cabo en nuestro Grupo sólo se ha detectado una tendencia de los genotipos nulos *GSTM1* y *GSTP1* con referencia a las diferencias en el perfil de excreción de MMA y de DMA, respectivamente (Marcos *et al.*, 2006).

Aposhian y colaboradores han estudiado la relación entre los polimorfismos en el gen *GSTO1*, limitante en el metabolismo del arsénico y los cambios en su patrón de excreción en una población mejicana, detectando 2 individuos con genotipos que podrían estar asociados con la incapacidad de metabolizar el arsenato de modo normal (Marnell *et al.*, 2003). Más recientemente, se ha llevado a cabo un estudio investigando las posibles correlaciones existentes entre variante polimórficas de 6 genes implicados en el metabolismo y el patrón de excreción de un grupo de mujeres indígenas argentinas expuestas al arsénico. Los resultados indican una asociación positiva entre polimorfismos del gen *AS3MT* y la excreción de un menor porcentaje de MMA y un mayor porcentaje de DMA. Además, los polimorfismos de los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *MTR* y *MTHFR* podrían también estar asociados con las diferencias en el perfil de excreción observado en esta población (Engstrom *et al.*, 2007).

Por otro lado, distintos factores ambientales como el nivel de exposición, la dosis, el sexo (diferencias hormonales), la edad, el hábito de fumar y el estado nutricional, entre otros, parecen también modular la variabilidad de respuesta frente a la exposición al arsénico.

Los posibles efectos de la dosis y del nivel de exposición al arsénico se han discutido ampliamente en diversos estudios. En general, se propone que la actividad As-metiltransferasa puede saturarse a niveles altos de exposición. Varios estudios revelan un aumento del cociente MMA/DMA en poblaciones expuestas, al compararse con los grupos controles, lo que indicaría una reducción de la capacidad de metilación a altas dosis de arsénico. Sin embargo, hay otros autores que consideran que no hay evidencias suficientes que apoyen esta hipótesis (Vahter, 2000).

No obstante, factores como el sexo, la edad y el hábito de fumar parece que pueden alterar de manera significativa el proceso de metilación. Algunos estudios (Concha *et al.*, 1998; Kurttio *et al.*, 1998; Del Razo *et al.*, 1999) indican que la edad puede influir en el metabolismo del arsénico en humanos y que la eficiencia del proceso de metabolización se puede alterar o depender de este factor. Los resultados de estos estudios sugieren que los

niños, en comparación con los adultos, poseen una menor capacidad de metilación y probablemente acumulan más arsénico que los adultos, siendo por lo tanto más susceptibles a la toxicidad del arsénico y de sus metabolitos.

En individuos chilenos expuestos al arsénico a través del agua de bebida en el norte de Chile se ha observado que el sexo, la etnia, la duración de la exposición y el consumo de tabaco, aparentemente ejercen una pequeña, aunque significativa, influencia sobre la cantidad de metabolitos arsenicales en la orina. Con relación al género, los resultados demostraron que las mujeres tenían en orina un 3% más de DMA y menos MMA que los hombres. También se demostró que el hecho de fumar 10 o más cigarrillos al día resultaba en un aumento del porcentaje de MMA y la correspondiente reducción del porcentaje de DMA (Hopenhayn-Rich *et al.*, 1996).

Otras variables que también pueden alterar el metabolismo del arsénico están relacionadas con aspectos nutricionales. Existen numerosos factores de la dieta que influyen en la toxicidad del arsénico. En la mayoría de las áreas donde se detectan problemas graves de salud debidos a los altos niveles de arsénico, se observa una carencia nutricional en sus habitantes. Probablemente, este factor es un potenciador de los efectos tóxicos del arsénico (Guha Mazumder *et al.*, 1998; Mitra *et al.*, 2004). En Taiwán se detectó que la incidencia de la enfermedad del pie negro (*black foot disease*) se ve incrementada por una deficiencia nutricional de zinc (Gebel, 2000). Otro ejemplo sería la ingesta de metionina que, por ser considerada la mayor fuente de SAM, es de suponer que la metilación del arsénico inorgánico deba de ser dependiente de los niveles de este aminoácido en el organismo. Estudios realizados con animales que tenían una dieta baja en metionina, colina o proteínas revelaron una disminución del proceso de metilación del arsénico y, consecuentemente, una mayor acumulación del mismo en los tejidos (Vahter, 2000).

Por lo tanto, estos distintos factores (ambientales y genéticos) influyen de manera significativa en el proceso de metabolización del arsénico y ejercen un papel esencial como moduladores de su toxicidad y la de sus metabolitos (Kurtio *et al.*, 1998; Vahter, 1999 b; Morgan, 2001; Tapio y Grosche, 2006).

#### 1.4. Toxicidad del arsénico

Las formas químicas y los estados de oxidación tienen gran importancia en la toxicidad del arsénico. Sin embargo, también son muy importantes otros factores como la naturaleza química y el estado físico del compuesto, la tasa de absorción celular y la tasa de eliminación, así como el estado en que se encuentra el organismo expuesto (Mandal y Suzuki, 2002; Huang *et al.*, 2004).

Se considera que los compuestos de arsénico en las formas trivalentes tienen mayor toxicidad que las formas pentavalentes. Las formas trivalentes son capaces de formar fuertes complejos con los tioles interaccionando con el grupo sulfidril de proteínas, enzimas o de sus cofactores y, por lo tanto, inhibiendo un gran número de enzimas como, por ejemplo, el complejo piruvato-deshidrogenasa, enzimas involucradas en la ubiquitinización de proteínas, tirosina fosfatasas, entre otras. Por otro lado, las formas pentavalentes son análogos del fosfato y puede sustituirlo de forma competitiva en reacciones endógenas como la síntesis del ATP, teniendo como consecuencia la pérdida de energía (Huang *et al.*, 2004; Jones, 2007).

Al principio se creía que los compuestos de arsénico inorgánico tenían una mayor toxicidad que los compuestos orgánicos y que el proceso de metilación del arsénico inorgánico consistía en un proceso de destoxificación. Así, resultados *in vitro* e *in vivo* indicaban una disminución de la citotoxicidad proporcional al aumento de la cantidad de grupos metilo, que poseen una menor reactividad que los grupos hidroxilo (Eguchi *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997; Kurttio *et al.*, 1998; Vahter, 2000).

Sin embargo, numerosos estudios han ido demostrando que los compuestos trivalentes metilados, intermediarios en el proceso de metilación del arsénico, son los más tóxicos (Yamanaka *et al.*, 1997; Aposhian *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001; Hughes, 2002; Mandal y Suzuki, 2002). Así, resultados obtenidos con células humanas indican que el MMA<sup>III</sup> posee un mayor efecto citotóxico en comparación con el arsenito, mientras que otros compuestos de arsénico metilados, como el MMA<sup>V</sup> y el DMA<sup>V</sup>, son menos tóxicos que el MMA<sup>III</sup> o que el arsénico inorgánico (Styblo *et al.*, 1999, 2000; Petrick *et al.*, 2000). Se puede concluir, por lo tanto, que los compuestos arsenicales metilados que poseen arsénico trivalente son más citotóxicos, más genotóxicos y tienen mayor potencial para inhibir las actividades de algunas enzimas, en comparación con los compuestos trivalentes

de arsénico inorgánicos. Asimismo, Petrick y colaboradores observaron que el MMA<sup>III</sup> tiene una LD<sub>50</sub> menor que el arsenito en hámster y, por primera vez, demostraron una mayor toxicidad *in vivo* del MMA<sup>III</sup>, respecto a la del arsenito (Petrick *et al.*, 2001).

Es evidente que los metabolitos metilados trivalentes contribuyen significativamente al aumento de la toxicidad y de los efectos carcinogénicos asociados con la exposición al arsénico y por lo tanto, la metilación no es estrictamente un proceso de detoxificación (Kligerman *et al.*, 2003; Hirano *et al.*, 2004; Drobna *et al.*, 2005; Tapio y Grosche, 2006). Además, hay que destacar que durante la metabolización del arsénico se genera daño oxidativo, debido a las reacciones con el oxígeno molecular formado durante su proceso de reducción (Yamanaka *et al.*, 1997; Pi *et al.*, 2002; Hirano *et al.*, 2004; Kligerman y Tennant, 2007).

### 1.5. Genotoxicidad del arsénico

El término genotóxico se aplica a aquellos compuestos que inducen daño genético a concentraciones no citotóxicas, o que estén asociadas a un bajo grado de citotoxicidad. Así, el arsénico está clasificado como carcinógeno en humanos y presenta potencial genotóxico en diferentes estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Históricamente, a la metilación se la ha considerado como un mecanismo de detoxificación del arsénico. No obstante, y como ya se ha indicado, estudios más recientes han demostrado que los compuestos metilados trivalentes (MMA<sup>III</sup> y DMA<sup>III</sup>) presentan una mayor citotoxicidad y genotoxicidad, incluso cuando se comparan con el As<sup>III</sup>. A pesar de que el potencial genotóxico del arsénico ha sido bastante estudiado, la complejidad de los resultados obtenidos hace necesaria una mejor caracterización de los mecanismos involucrados en estos procesos.

De un modo general, los estudios de genotoxicidad revelan que el arsénico no es un mutágeno muy potente y, por lo tanto, no presenta resultados positivos en los ensayos de mutagenicidad en sistemas bacterianos (con o sin activación metabólica), ni tampoco en los ensayos que miden mutaciones puntuales en células de mamífero (Basu *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004). Varios compuestos de arsénico han dado resultados negativos en el test de Ames (Shelby, 1988), mientras que en los ensayos de mutagenicidad con *E. coli* se observan tanto resultados negativos (Rossman *et al.*, 1980) como positivos (Yamanaka *et*

*al.*, 1989). En estudios realizados con levaduras se obtuvieron resultados positivos para mutación reversa y una respuesta débil para conversión génica (Kharab y Singh, 1985).

También se han obtenido resultados contradictorios en los estudios de mutagenicidad realizados con *D. melanogaster*. Así, al utilizar el ensayo SMART de alas, que es capaz de medir mutación y recombinación somática, se detectan tanto resultados positivos (De la Rosa *et al.*, 1994), como negativos (Tripathy *et al.*, 1990; Rizki *et al.*, 2002) mientras que, utilizando el ensayo de letales recesivos ligados al sexo (SLRLT), se obtuvieron resultados positivos para el arsenito sódico y el arsenato sódico, confirmando que la forma trivalente es más tóxica y mutagénica que la pentavalente (Ramos-Morales y Rodríguez-Arnaiz, 1995).

En un estudio más reciente, se evaluó el potencial mutagénico de seis compuestos arsenicales, incluyendo las formas metiladas trivalentes, utilizando un ensayo con *Salmonella* sin que se obtuvieran resultados positivos para ninguno de ellos. Por otro lado, utilizando el ensayo de linfoma de ratón (MLA), se pudo detectar que las especies inorgánicas y las formas trivalentes metiladas inducían mutaciones cromosómicas (Kligerman *et al.*, 2003).

Por lo tanto, a diferencia de otros carcinógenos, el arsénico no presenta un gran potencial mutagénico en los ensayos clásicos de mutagenicidad. Sin embargo, si que es capaz de inducir mutaciones *multilocus* y, considerando que estas mutaciones suelen ser incompatibles con la supervivencia celular, no son detectadas en la mayoría de los ensayos de mutagenicidad con bacterias o células humanas (Huang *et al.*, 2004).

A pesar de los resultados contradictorios o negativos obtenidos en la mayoría de los ensayos de mutagenicidad realizados, está ampliamente demostrada la capacidad del arsénico para actuar como comutágeno frente a la radiación UV y otros agentes mutagénicos (Rojas *et al.*, 1999; Basu *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004). Se ha observado que el arsenito aumenta la frecuencia de mutaciones inducidas por la radiación UV en ensayos bacterianos. Otros compuestos de arsénico también son capaces de producir citotoxicidad, daño genético y clastogenicidad en células de mamífero, cuando se combinan con luz UV, benzo[ $\alpha$ ]pireno, rayos X y agentes alquilantes, entre otros (Hartwig *et al.*, 1997). Así, por ejemplo, en un estudio *in vitro* realizado por Lee y colaboradores se observó que el arsenito sódico aumenta la clastogenicidad y la mutagenicidad de los

agentes alquilantes en células de hámster (CHO) y en fibroblastos humanos (Lee *et al.*, 1986). Resultados similares se han obtenido en linfocitos humanos tratados con arsenito y con el agente alquilante diepoxibutano (Wiencke y Yager, 1992).

Además de actuar de forma sinérgica con aquellos agentes que tienen actividad genotóxica, el arsénico y sus metabolitos poseen la capacidad de inducir daño en el DNA detectable en diferentes sistemas de ensayo, tanto *in vivo* como *in vitro*. Así, numerosos estudios describen efectos clastogénicos y aneugénicos, inducción de daño oxidativo, amplificación génica y transformación celular, producción de enlaces cruzados y roturas en el DNA de cadena sencilla (Basu *et al.*, 2001; Mouron *et al.*, 2001; Rossman, 2003; Kligerman y Tennant, 2007).

La mayoría de los ensayos citogenéticos, como los de micronúcleos (MN), aberraciones cromosómicas (CA) e intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) demuestran el efecto clastogénico del arsénico. En este contexto, Rasmussen y Menzel llevaron a cabo un estudio comparativo para verificar los efectos genotóxicos del arsenito en linfocitos humanos y en células de una línea linfoblastoide, sugiriendo que el arsénico puede inducir CA, SCE y MN en varios sistemas celulares de mamíferos tanto *in vitro* como *in vivo* (Rasmussen y Menzel, 1997), mientras que en otro estudio se demostraba que el arsenito induce MN en células CHO y V79 (Gebel, 1998). Numerosos estudios corroboran el potencial clastogénico del arsénico en estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando diferentes tipos celulares (Basu *et al.*, 2001; Rossman, 2003; Kligerman y Tennant, 2007).

En general, las formas de arsénico trivalentes metiladas son más citotóxicas y clastogénicas que las formas pentavalentes (Mass *et al.*, 2001; Petrick *et al.*, 2001; Nesnow *et al.*, 2002; Dopp *et al.*, 2004). En este contexto, Moore y colaboradores analizaron el potencial mutagénico y clastogénico de distintos compuestos de arsénico orgánicos e inorgánicos, concluyendo que los compuestos inorgánicos son más citotóxicos, clastogénicos y mutagénicos que los compuestos orgánicos, además de ser capaces de inducir poliploidía y endoreduplicación (Moore *et al.*, 1997).

El arsénico, además de ser clastogénico, también presenta potencial aneugénico. Al complementar el ensayo de MN con anticuerpos anticinetocoro se ha comprobado que el arsenito sódico, a pesar de actuar mayoritariamente como un clastógeno, poseía también

potencial aneugénico (Eastmond y Tucker, 1989). En un estudio posterior se demostró que, dependiendo del tipo de exposición, el arsenito puede producir efectos aneugénicos o clastogénicos (Yih y Lee, 1999). Asimismo, Huang y colaboradores observaron que el arsenito es capaz de detener el ciclo celular en la fase G2, inducir endoreduplicación cromosómica por inhibición de la actividad de la proteína fosfatasa, interferir en la división mitótica e inhibir las fibras del huso, posiblemente a través de interacciones con el grupo sulfidril de las moléculas de tubulina (Huang *et al.*, 1995). Otros estudios *in vitro* también demuestran el potencial aneugénico del arsénico y de sus metabolitos en la inducción de aneuploidías y sugieren que este fenómeno podría estar asociado con el potencial carcinogénico del arsénico (Ramírez *et al.*, 1997; Kashiwada *et al.*, 1998; Rossman, 2003). Estudios más recientes indican que los compuestos trivalentes de arsénico (inorgánicos o metilados) son capaces de interactuar con las fibras del huso mitótico, inhibiendo la polimerización de la tubulina, y proponen que los efectos aneugénicos causados por los compuestos pentavalentes podrían estar asociados con su reducción a las formas trivalentes (Kligerman *et al.*, 2003; Kligerman y Tennant, 2007). El complejo comportamiento del arsénico requiere la realización de más trabajos para poder explicar los mecanismos por los cuales éste induce genotoxicidad, especialmente con el objetivo de dilucidar las relaciones existentes entre inducción de daño genético y carcinogenicidad.

En la mayoría de los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a arsénico también se observan efectos genotóxicos tales como incrementos en las frecuencias de MN, SCE y AC, tanto en linfocitos como en células epiteliales de descamación (Tapio y Grosche, 2006). Sin embargo, a pesar de las evidencias entre exposición al arsénico y riesgo de cáncer, en algunos de estos estudios no se ha observado una asociación directa entre daño citogenético y exposición. Hay que destacar que los efectos genotóxicos inducidos por el arsénico y sus metabolitos también pueden reflejar consecuencias de daños en el DNA inducidos de forma indirecta. Los resultados de los estudios de riesgo genotóxico en poblaciones expuestas al arsénico se discutirán con mayor detalle más adelante.

### **1.5.1. Posibles mecanismos moduladores de la genotoxicidad del arsénico**

Las investigaciones sobre la genotoxicidad inducida por el arsénico, tanto *in vivo* como *in vitro*, parecen demostrar que distintos modos de acción, como por ejemplo la capacidad de alterar los patrones de metilación, la inducción de muerte y de proliferación celular, la

inducción de anomalías cromosómicas, la inhibición de la capacidad de reparación del DNA, entre otros, están involucrados de forma directa o indirecta en este proceso. Probablemente, la interferencia con los mecanismos de reparación y la inducción de daño oxidativo sean los principales mecanismos relacionados con el potencial del arsénico como agente comutagénico y como genotóxico indirecto (Rojas *et al.*, 1999; Rossman, 2003; Tchounwou *et al.*, 2004; Tapio y Grosche, 2006).

Aunque el modo cómo el arsénico actúa sobre los mecanismos de reparación del DNA, tanto en bacterias como en mamíferos, no está totalmente dilucidado, existen numerosas evidencias de que el arsénico inorgánico y sus metabolitos interfieren en distintas etapas de la reparación (Hartwig y Schwerdtle, 2002; Huang *et al.*, 2004; Tapio y Grosche, 2006; Yu *et al.*, 2006). Siguiendo esta línea de investigación, se observó que lesiones genéticas en células humanas inducidas por los mutágenos benzo( $\alpha$ )pireno y metil metanosulfonato persistían al ser tratadas con CdSO<sub>4</sub> y NaAs<sub>2</sub>, sugiriendo que estos compuestos interferían en la reparación del DNA (Hartmann y Speit, 1996). Más tarde, se observaron los efectos del arsénico trivalente sobre los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos (NER) en fibroblastos humanos irradiados, corroborando así que la reparación global del genoma y la reparación acoplada a la transcripción estaban alteradas (Hartwig *et al.*, 1997).

Otros estudios indican que el arsénico, a concentraciones no citotóxicas, altera la reparación del DNA, reduciendo particularmente la actividad de la DNA ligasa (Li y Rossman, 1989; Jha *et al.*, 1992; Lynn *et al.*, 1997). También se ha demostrado que el arsenito tiene una gran capacidad para inhibir los pasos de ligación (reunión de roturas de simple cadena) y la reparación post-replicativa del DNA (Lee-Chen *et al.*, 1992, 1994).

No obstante, Hu y colaboradores observaron que diversas enzimas de reparación del DNA (polimerasa  $\alpha$ , ligasa I y II) no se veían afectadas por el arsénico, concluyendo que éste no inhibe directamente la actividad enzimática en los procesos de reparación. Asimismo, estos autores sugieren que los efectos causados por el arsénico pueden estar relacionados con alteraciones en los niveles celulares de iones reductores, en los pasos de transducción de señales y, consecuentemente, en cambios de la expresión génica (Hu *et al.*, 1998). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Yager y Wiencke quienes demostraron que el arsenito, a concentraciones muy bajas (5  $\mu$ M), es capaz de inhibir la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), una enzima importante en la activación de la reparación del DNA

(Yager y Wiencke, 1997). Se han obtenido resultados similares mediante la técnica de inmunofluorescencia *in situ*, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-poli(ADP-ribosa), y evaluando concentraciones no citotóxicas de arsenito (Hartwig *et al.*, 2003). Estos resultados tienen una gran relevancia, considerando que la actividad enzimática de la PARP constituye la respuesta celular inmediata al daño genético y juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad genómica. La reducción de esta actividad por el arsénico puede explicar, en parte, la clastogenicidad y el efecto inhibitorio del sistema de reparación por escisión de bases (BER), especialmente en los pasos de ligación y en la reparación de daños endógenos en el DNA.

La inducción de estrés oxidativo constituye otro importante factor modulador de la toxicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad del arsénico. El origen del estrés oxidativo inducido está intrínsecamente relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de radicales libres, durante el proceso de metabolización del arsénico inorgánico (Basu *et al.*, 2001; Aposhian y Aposhian, 2006; Tapio y Grosche, 2006). Hay que considerar que los compuestos de arsénico tienen una gran afinidad por los grupos tioles, también presentes en la GSH en su estado reducido y, por lo tanto, podrían llevar a cambios en las funciones de protección celular contra el daño oxidativo (Yu *et al.*, 2006).

Las especies reactivas de oxígeno, tales como el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y el radical hidroxilo, entre otras, pueden actuar de forma directa, produciendo roturas de simple y doble cadena en el DNA, sitios AP (apurínicos o apirimidínicos) o actuar de forma indirecta en diferentes etapas del proceso de carcinogénesis (Wang y Huang, 1994; Thomas *et al.*, 2001; Kitchin y Ahmad, 2003; Tapio y Grosche, 2006).

Por otro lado, numerosos estudios apuntan que el uso de antioxidantes puede reducir de forma significativa los efectos tóxicos del arsénico. Generalmente los antioxidantes incluyen enzimas (SOD - superóxido dismutasa, catalasa, GPx - glutatión peroxidasa), captadores de radicales libres y metales quelantes, entre otros. A parte de estos, existe también la N-acetil-cisteína (NAC), que es un compuesto que contiene un grupo tiol y parece ser un potente antioxidante en la inhibición del daño inducido por el arsénico trivalente (Shi *et al.*, 2004).

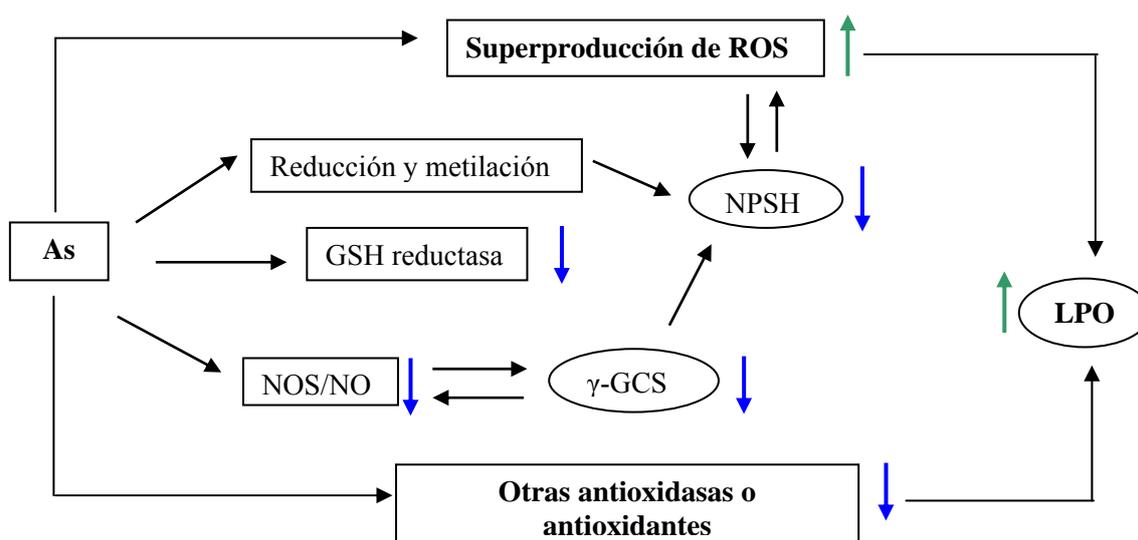
En un estudio realizado por Nordenson y Beckman, se observó que la presencia de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa, inhibía la inducción de SCE en cultivos de

linfocitos humanos tratados con arsénico (Nordenson y Beckman, 1991). Resultados similares se han obtenido al comprobarse que la adición de catalasa inhibía completamente la inducción de MN por el arsenito, en una línea celular de hámster sensible a los radicales libres (Wang y Huang, 1994). Otros estudios también han podido detectar una correlación positiva entre diferentes tipos de antioxidantes y reducción del daño (Wong *et al.*, 1998; Goering *et al.*, 1999; Petrick *et al.*, 2000; Styblo *et al.*, 2000). En el caso específico de la NAC, se ha detectado que tiene un gran efecto protector, siendo incluso capaz de intervenir eliminando las vías de activación de los mecanismos de apoptosis inducidos por el arsénico y la generación de ROS (Drinkwater, 1990; Drinkwater y Bennett, 1991).

De un modo general, estos resultados indican que los sistemas antioxidantes, intra o extracelulares, actúan de forma efectiva en la defensa contra el daño genotóxico inducido por el arsénico y sus metabolitos. Además, también vienen a corroborar que los mecanismos implicados en la inducción de estos daños se encuentran mediados por la producción de ROS.

En células tratadas con arsénico también se han podido observar incrementos en los niveles de GSH, ferritina y hemoxygenasa (HO), que son parámetros indicadores de la presencia de estrés oxidativo (Rossman, 2003). El incremento de HO, por ejemplo, se ha observado en una gran variedad de líneas celulares humanas y de animales tratados con arsénico (Lee y Ho, 1994, 1995; Rea *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2003).

La presencia de estrés oxidativo inducido por el arsénico también es evidente en los estudios epidemiológicos (Matsui *et al.*, 1999; Tapio y Grosche, 2006). En un estudio llevado a cabo con una población expuesta al arsénico a través del agua de consumo, por ejemplo, se ha confirmado una correlación positiva entre exposición crónica al arsénico y estrés oxidativo (Pi *et al.*, 2002). Se observó también una reducción en la producción de NO y la inhibición de NOS que, a su vez, causa una disminución de la síntesis de GSH debido a una limitada tasa de la enzima  $\gamma$ -GCS. Además, la inducción de estrés oxidativo se detectó por el aumento de los niveles de LPO y por la reducción de sulfidrilos no proteicos (NPSH), GSH entre otros; ambos asociados con altos niveles de arsénico y de sus productos metilados en sangre (fig. 4).



NOS/NO: óxido nítrico sintetasa/óxido nítrico; LPO: nivel de lípidoperoxidasa; NPSH: niveles de sulfidrilos no protéicos;  $\gamma$ -GCS:  $\gamma$ -glutamyl-cisteinasintetasa.

Fig. 4: Mecanismos de inducción de estrés oxidativo por arsénico (Pi *et al.*, 2002).

Es evidente que la exposición al arsénico está asociada con la alteración de los niveles redox intracelulares, resultando así en la inducción del estrés oxidativo. Cuando los niveles de estrés oxidativo presentes son bajos, se mantiene la homeostasis celular y se produce la activación de factores de transcripción que protegen contra la carcinogénesis. Al contrario, los niveles altos, además de producir daño oxidativo, están asociados a alteraciones en los sistemas inmune y cardiovascular y a la inactivación de factores de transcripción involucrados en la carcinogénesis (Del Razo *et al.*, 2001).

Los niveles elevados de estrés oxidativo también están asociados a una elevada expresión de proteínas de estrés, que representan un mecanismo de defensa celular en caso de condiciones adversas. Estas proteínas constituyen una gran familia que incluyen las Hsp (*heat shock proteins*), MT (metalotioninas) y UB (ubiquitinas), entre otras. Se ha observado en diferentes estudios, *in vitro* e *in vivo*, que el arsénico tiene la capacidad de modular la expresión y/o acumulación de estas proteínas, siendo el arsénico inorgánico (III) el mayor inductor de Hsp en diferentes órganos y sistemas. La expresión de las Hsp está regulada por un complejo sistema de señales que están involucradas en los mecanismos de muerte celular y carcinogénesis (Albores *et al.*, 1992; Romach *et al.*, 2000; Del Razo *et al.*, 2001; Rossman, 2003).

Finalmente, cabe destacar también que el arsénico posee la capacidad de alterar los patrones de mutación y del ciclo celular, interferir en los índices de división mitótica y en los niveles de expresión de p53, entre otros. Parece ser que el estrés oxidativo puede influir de forma directa o indirecta en todos estos procesos y, por lo tanto, juega un papel importante en la genotoxicidad y carcinogenicidad del arsénico (Vogt y Rossman, 2001; Rossman, 2003; Huang *et al.*, 2004; Tapio y Grosche, 2006).

### **1.6. Estudios de biomonitorización en la evaluación del riesgo genotóxico**

El ser humano está expuesto a un gran número de agentes químicos, físicos y biológicos, naturales o resultantes de la actividad humana. A partir de la década de 1940, se ha ido demostrando que un número considerable de estos agentes son potencialmente peligrosos para la salud y pueden inducir efectos genotóxicos que afectan la integridad del genoma (Creus, 2002 a).

La Toxicología Genética surge con el objetivo de detectar e identificar los agentes capaces de producir daño genético y de evaluar si estos daños provocan efectos adversos a la salud humana (Venitt y Phillips, 1995). Desde entonces, se han implementado metodologías, como por ejemplo el uso de ensayos *in vitro* e *in vivo*, para identificar y evaluar el riesgo genético, tanto en células somáticas como en células germinales. En la década de los 60, empezaron a desarrollarse los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a distintos agentes genotóxicos y/o cancerígenos (Creus, 2002 b). Estos estudios de biomonitorización posibilitan la caracterización y cuantificación de exposiciones a genotóxicos *in vivo*, y tienen como principal objetivo detectar el posible riesgo genotóxico de tal exposición. Por lo tanto, consisten básicamente en el estudio de la etiología, prevención y control del riesgo genético.

Actualmente, las metodologías clásicas utilizadas en los estudios de biomonitorización como, por ejemplo, el ensayo de aberraciones cromosómicas (CA), de intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) y de micronúcleos (MN), se están complementando con técnicas de cuantificación de la dosis biológicamente relevante, con la evaluación del efecto biológico inducido y con la variabilidad de la respuesta frente a la acción de un compuesto, entre otras. Con el uso de estas nuevas herramientas, se están obteniendo resultados más relevantes en la estima de riesgo genotóxico (Au *et al.*, 1998; Sram y Binkova, 2000). Cabe destacar que la incorporación de técnicas de laboratorio en los

estudios de epidemiología tradicional también está contribuyendo a dilucidar las bases bioquímicas y/o moleculares de la etiología de distintas enfermedades.

### **1.6.1. Biomarcadores: indicadores de daño genético**

La exposición a agentes genotóxicos puede originar una variedad de efectos, que se expresan inmediatamente o producen algún tipo de alteración que tardará varios años en manifestarse. El creciente aumento de la exposición a agentes potencialmente genotóxicos genera la necesidad de identificar, caracterizar y evaluar el riesgo de una determinada exposición, con el objetivo final de establecer medidas para la reducción y prevención de este riesgo, tanto en el ámbito individual como poblacional.

Los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas implican la utilización de medidas moleculares, celulares o bioquímicas indicadoras y cuantificables de alteraciones en eventos fisiológicos, celulares, subcelulares y moleculares, que generalmente están involucrados en el desarrollo de una enfermedad específica (Albertini y Robinson, 1991; Albertini *et al.*, 1996). En general, estas medidas se conocen como biomarcadores, que también se definen como cambios fisiológicos (en la actividad enzimática o en la presencia de un compuesto endógeno específico) y/o alteraciones y reordenaciones en el DNA, que pueden ser inducidos por una variedad de factores (Wang *et al.*, 2001).

Los biomarcadores se clasifican en al menos tres categorías: biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad. Los biomarcadores de exposición son indicadores de que el organismo ha estado expuesto a agentes genotóxicos o a sus metabolitos, los de efecto identifican el daño genético causado por la exposición, mientras que los biomarcadores de susceptibilidad detectan la variabilidad de respuesta de los individuos frente a una determinada exposición (Albertini, 1994; Albertini *et al.*, 1996). No obstante, teniendo en cuenta la gran distancia existente entre exposición y efectos, aparece la necesidad de buscar marcadores intermedios en este proceso. Surgen, por lo tanto, los biomarcadores de efecto intermedio que consisten en medidas de la dosis eficaz y/o de los efectos biológicos tempranos (fig. 5).

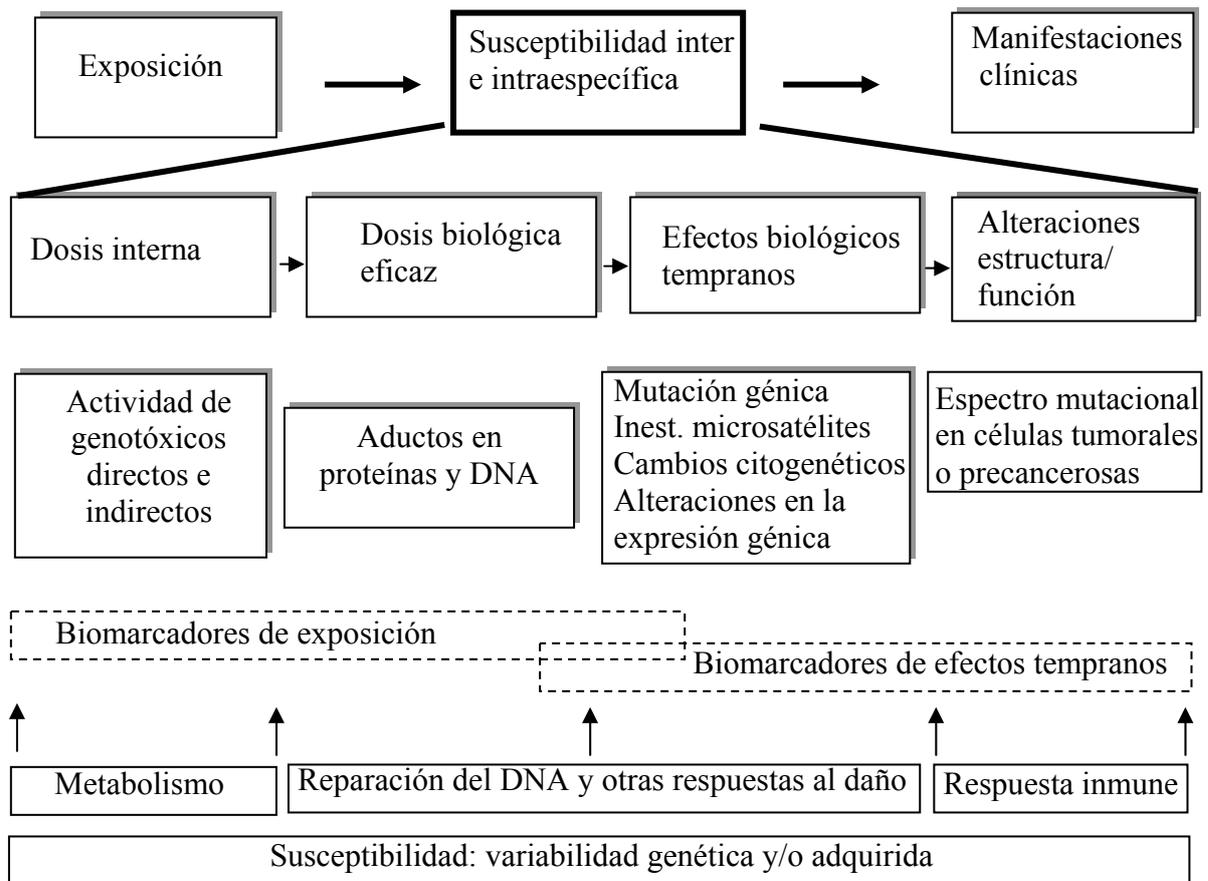


Fig. 5. Modelo de clasificación de los biomarcadores (Kyrtopoulos, 2006).

### 1.6.1.1. Biomarcadores de exposición

Los biomarcadores de exposición pueden ser indicadores de la exposición a un agente específico, en un período reciente o en el pasado. No obstante, por definición se refieren a la detección de xenobióticos, de sus metabolitos o de los productos de la interacción de estos xenobióticos con el organismo (formación de aductos en el DNA, en proteínas, etc.) que pueden ser medidos por su presencia en tejidos, fluidos y excreciones (sangre, orina, heces, leche). Estas medidas podrán ofrecer información sobre la concentración o dosis interna de un agente específico que se ha absorbido y distribuido en el cuerpo, y permitir que se establezcan correlaciones dosis-respuesta. Además de utilizar biomarcadores de exposición exógenos, también se pueden utilizar biomarcadores de exposición endógenos como, por ejemplo, la detección de la inducción de daño oxidativo y roturas en el DNA

utilizando ensayos citogenéticos específicos como el de SCE y el ensayo del Cometa (Wang *et al.* 2001). Cabe destacar que la estabilidad de los biomarcadores respecto al momento de la exposición debe ser uno de los aspectos más importantes a considerar en los estudios de biomonitorización (Wang *et al.*, 2001; Bonassi y Au, 2002).

Comúnmente, se utilizan como biomarcadores de exposición al arsénico sus niveles en pelo, uñas y sangre, así como la identificación y cuantificación del compuesto y de sus metabolitos en orina. Los niveles de arsénico en el pelo y en las uñas sirven como indicadores de exposiciones pasadas, mientras que los niveles en sangre y orina se utilizan como indicadores de exposición reciente o de exposición crónica a altos niveles (Basu *et al.*, 2001; Morgan, 2001; Hughes, 2006).

#### **1.6.1.2. Biomarcadores de efecto**

De manera general, los biomarcadores de efecto representan cambios a niveles subcelulares, particularmente cromosómicos o moleculares. Entre los eventos cromosómicos, se pueden observar alteraciones estructurales y numéricas. Durante décadas, los ensayos citogenéticos han sido muy utilizados en la evaluación de trabajadores expuestos a mutágenos y/o carcinógenos. Las técnicas citogenéticas asociadas a técnicas moleculares, permiten detectar de forma más precisa las alteraciones producidas en el DNA. Estas alteraciones, además de ser utilizadas para definir consecuencias, a veces pueden ser empleadas como medidas de exposición (Albertini *et al.*, 1996).

Los ensayos de aberraciones cromosómicas (CA) y el de MN pueden ser destacados como biomarcadores de efecto biológico temprano, así como los ensayos de mutación somática en genes específicos como, por ejemplo, el ensayo de mutación somática en el gen HPRT.

Por otro lado, parece existir una buena correlación entre el aumento de la frecuencia de los daños cromosómicos producidos por una determinada exposición y el incremento del riesgo cancerígeno. Así, se ha propuesto que los biomarcadores citogenéticos pueden servir también como indicadores tempranos de riesgo de cáncer (Carrano y Natarajan, 1988; Kyrtopoulos, 2006).

En los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas al arsénico se suelen utilizar como biomarcadores de efecto el ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica, en mucosa bucal y en células epiteliales de vejiga (Hughes, 2006); así como las

aberraciones cromosómicas (Mahata *et al.*, 2003) y las mutaciones puntuales en el gen HPRT (Harrington-Brock *et al.*, 1999). En algunos estudios, también se ha utilizado el ensayo de SCE como medida de daño citogenético (Lerda, 1994; Seoane *et al.*, 1998; Mahata *et al.*, 2003).

#### **1.6.1.2.1. El ensayo de micronúcleos**

Los MN se pueden observar en células interfásicas y se presentan como pequeños núcleos, con membrana definida y apariencia morfológica similar a la del núcleo principal de la célula. Pueden originarse de forma espontánea o como respuesta a agentes clastogénicos o aneugénicos y consisten en fragmentos cromosómicos acéntricos y/o cromosomas enteros, que durante la división celular no se han podido incorporar al núcleo de las células hijas (Fenech y Morley, 1985).

La utilización del ensayo de MN para cuantificar daño cromosómico data de 1959, cuando Evans y colaboradores demostraron que las radiaciones ionizantes provocaban en las células vegetales un efecto con una clara relación dosis-respuesta. El uso del ensayo como medida de genotoxicidad se propuso por primera vez por Countryman y Heddle en 1976 (Countryman y Heddle, 1976); desde entonces viene siendo realizado con diferentes tipos celulares y ha experimentado distintas modificaciones metodológicas. En 1985, Fenech y Morley desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis mediante el uso de la citocalasina B (Cyt-B), un extracto del hongo *Helminthosporium dematioideum* que actúa específicamente bloqueando la citocinesis, sin afectar la cariocinesis. De este modo, el núcleo se divide y el citoplasma permanece intacto, siendo posible identificar fácilmente las células que han sufrido una única división celular por su aspecto binucleado, de las que han experimentado más de una división, por presentar 3 o más núcleos (Fenech, 1993; Kirsch-Volders *et al.*, 2000).

El ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis permite evaluar la inducción de MN y también analizar la tasa de división celular. Además, el ensayo de MN complementado con metodologías de citogenética molecular (hibridación *in situ* con sondas pancentroméricas, por ejemplo) permite distinguir el origen citogenético de los MN, posibilitando evaluar agentes con capacidad aneugénica y/o clastogénica (Fenech, 2000).

En 1999, a través del desarrollo de un proyecto a escala mundial (Programa Internacional de Micronúcleos Humanos - *Human Micronucleus Project*) dirigido por M. Fenech y S. Bonassi, se llevó a cabo la validación del ensayo de MN como un biomarcador eficaz de daño en el DNA. La validación del ensayo consistió básicamente en identificar las fuentes y niveles de variabilidad en la frecuencia basal de los MN y definir un protocolo estándar para la técnica. Los criterios de selección para el recuento de las células binucleadas y para el análisis de los MN se estandarizaron; y entre los posibles factores relacionados con la variabilidad en la frecuencia basal de los MN, parece ser que el sexo, la edad y el consumo de alcohol son de los más importantes (Zalacaín *et al.*, 2005).

Actualmente, el ensayo de MN se viene utilizando como una de las pruebas de mayor aceptación en la evaluación del riesgo por exposición a potenciales mutágenos y carcinógenos ocupacionales y ambientales (Natarajan *et al.*, 1994 a; Kirsch-Volders *et al.*, 2000).

#### **1.6.1.2.1.1. El uso de linfocitos de sangre periférica**

Los linfocitos de sangre periférica son células sanguíneas frecuentemente utilizadas con el objetivo de detectar el efecto biológico de una exposición. En general, estas células ofrecen un gran número de ventajas, visto que son muy fáciles de obtener, tienen un ciclo celular corto y bien conocido, representan una población relativamente sincrónica y las técnicas de cultivo están bien establecidas. Además, se pueden considerar como indicadores de exposición general (persisten durante años en el torrente sanguíneo) y, como presentan un metabolismo relativamente bajo, no poseen un mecanismo de reparación tan eficiente, lo que, en cierta manera, es una garantía del mantenimiento del registro de exposición (Carrano y Natarajan, 1988).

En general, la mayoría de linfocitos se encuentran en estado no proliferativo (Go) y, por lo tanto, necesitan ser estimulados para que puedan dividirse y, consecuentemente, manifestar los efectos del daño genotóxico en forma de MNs. El ciclo de división de los linfocitos en cultivo es bastante conocido y, por consiguiente, pueden ser fácilmente estimulados a entrar en división celular en presencia de fitohemaglutinina (PHA). Cabe destacar que sucesivas divisiones celulares pueden llevar a una pérdida de los MN formados y, para evitar una subestima del daño genotóxico inducido, sólo se evalúan las células que después de expuestas hayan sufrido una sola división celular.

El ensayo de MN como medida de genotoxicidad fue inicialmente desarrollado utilizando linfocitos humanos en cultivo. Sin embargo, actualmente la técnica se viene aplicando a distintos tipos celulares y se emplea como medida de genotoxicidad, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

#### **1.6.1.2.1.2. El uso de células de mucosa bucal**

Otros tipos celulares como las células epiteliales de la mucosa bucal y nasal, y las células uroteliales, a pesar de sus limitaciones también pueden ser útiles en la detección del daño genético en función del tipo de exposición estudiado. La elección de una metodología de estudio adecuada garantiza resultados más relevantes en la caracterización y prevención del riesgo genotóxico (Salama *et al.*, 1999; Au, 2007).

Las principales ventajas del uso de los tejidos epiteliales de descamación consisten en que proliferan muy rápidamente y están en constante contacto con el medio de exposición. Además, considerando que el 90% de los cánceres tienen un origen en células epiteliales, el uso de células de descamación del epitelio adquiere un importante papel desde el punto de vista epidemiológico (Cairns, 1975).

El ensayo de MN en células de mucosa bucal fue desarrollado por (Stich *et al.*, 1985) y, desde entonces, viene utilizándose con éxito en una amplia variedad de células de descamación. El proceso de formación de los MN es común en todas las células; sin embargo, la detección del daño genético ocurrido en la capa basal se realiza a medida en que las células se van exfoliando y alcanzan la superficie. En general, debido al alto grado de renovación celular, el máximo índice de formación de los MN se encuentra entre 1 y 3 semanas después de la exposición. Por otro lado, una vez finalizada la exposición estos valores disminuyen (Titenko-Holland *et al.*, 1998; Fenech *et al.*, 1999).

El ensayo de MN en células epiteliales de descamación, además de caracterizarse por ser un método no invasivo, rápido y sencillo, también se ha revelado como una medida muy sensible a los efectos inducidos por genotóxicos ambientales y/o ocupacionales (Tian *et al.*, 2001; Vuyyuri *et al.*, 2006; Lewinska *et al.*, 2007).

Cabe destacar que los inconvenientes que puede presentar el ensayo de MN en células de descamación siguen siendo, como en linfocitos, la gran variabilidad intra e interindividual

existente, la influencia de factores de confusión y la diversidad en los criterios de evaluación de los MN (Stich *et al.*, 1985).

#### **1.6.1.2.2. El ensayo de intercambios entre cromátidas hermanas**

Los intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) consisten en la manifestación citológica de la rotura de doble cadena del DNA y la reunión en sitios aparentemente homólogos entre cromátidas de un mismo cromosoma, fácilmente visualizables en cromosomas metafásicos (Natarajan *et al.*, 1994 b).

Los SCE fueron inicialmente observados por McClintock en 1938, al comprobar la dificultad de los cromosomas en anillo para separarse (véase la revisión de Natarajan *et al.*, 1994 b). Veinte años más tarde (1958), fueron demostrados por Taylor (revisado por Perry y Evans, 1975), llevando a cabo estudios con cromosomas de plantas expuestas a isótopos radioactivos. Posteriormente, se han desarrollado técnicas para distinguir las cromátidas hermanas sin el uso de radioisótopos y, con la aparición de la técnica de tinción diferencial de las cromátidas hermanas basada en la incorporación de un análogo de la timina, la 5-bromodeoxiuridina (BrdU) se simplificó la detección de los SCE en cromosomas metafásicos (Perry y Wolff, 1974). Desde entonces, el análisis de los SCE pasó a ser considerado como un ensayo rápido, sensible y cuantitativo de daño genético, pudiendo ser realizado con cualquier tipo de célula capaz de replicarse o cuya división pueda ser estimulada.

Con el objetivo de evaluar la respuesta citogenética frente a la exposición a un agente genotóxico, se viene utilizando este ensayo en estudios *in vitro* con diferentes cultivos y líneas celulares, así como en estudios *in vivo* con animales de laboratorio y en la biomonitorización de poblaciones humanas (Perry y Wolff, 1974; Latt *et al.*, 1980). Además, se ha observado que el ensayo ofrece excelentes correlaciones dosis-respuesta para cientos de compuestos, evaluados en una gran variedad de experimentos *in vivo* e *in vitro* (Tucker *et al.*, 1993).

La principal ventaja del ensayo de SCE es que presenta una alta sensibilidad frente a los agentes que se unen covalentemente al DNA, siendo capaz de detectar efectos a concentraciones a las que otros ensayos citogenéticos no detectan ninguna respuesta genotóxica. Sin embargo, todavía no se conocen con exactitud los mecanismos que

producen los SCE, ni tampoco las consecuencias que pueden ocasionar en la célula (Natarajan *et al.*, 1994 b). Parece ser que el mecanismo de formación de los SCE es consecuencia de errores en la replicación del DNA, posiblemente en la propia horquilla de replicación (Painter, 1980) y que los SCE no tienen consecuencias biológicas, ni ejercen ningún efecto letal para las células.

A pesar de las limitaciones mencionadas, el ensayo de SCE que actualmente se considera como un biomarcador de exposición, sigue aplicándose en la evaluación de la capacidad de los compuestos para inducir daño genético (Mahata *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Ergene *et al.*, 2007). En algunos casos, puede presentar una sensibilidad mayor que la del ensayo de aberraciones cromosómicas estructurales en la detección de efectos genotóxicos (Natarajan *et al.*, 1994 b; Tucker y Preston, 1996).

Cabe resaltar que la frecuencia basal de SCE varía de forma considerable entre individuos y tipos celulares y suele oscilar entre un rango de  $10 \pm 5$  SCE/célula (Latt *et al.*, 1983). Así, para evitar que distintos factores externos puedan influir en la frecuencia de SCE, los ensayos deben realizarse en condiciones de cultivo homogéneas (Latt, 1981). Algunas variables como el sexo, el consumo de tabaco y la edad deben ser consideradas como posibles moduladores de la frecuencia basal de SCE. Se asume que estos factores pueden explicar entre un 20-30% de la variabilidad interindividual en la frecuencia basal de SCE, mientras que los factores genéticos serían responsables de aproximadamente un 30% de esta variabilidad (Bender *et al.*, 1992; Hirsch *et al.*, 1992; Lazutka *et al.*, 1994). Por lo tanto, en los estudios de biomonitorización en los cuales se utiliza el ensayo de SCE como indicador de daño genético, hay que tener presente tanto las limitaciones del ensayo como el conjunto de variables capaces de influir en la frecuencia de SCE.

#### **1.6.1.3. Biomarcadores de susceptibilidad**

Los biomarcadores de susceptibilidad consisten en medidas que revelen las diferencias interindividuales de respuesta frente a una determinada exposición. Este concepto se basa en que las poblaciones humanas son genéticamente heterogéneas, formadas por individuos genéticamente distintos y que, por lo tanto, presentan mayor o menor susceptibilidad o resistencia frente a la acción de los agentes genotóxicos (Albertini *et al.*, 1996; Au, 2007).

Los polimorfismos en genes involucrados en el metabolismo (bioactivación, destoxicación y excreción de xenobióticos) y en los procesos de reparación (mantenimiento de la integridad del genoma) están siendo ampliamente utilizados como biomarcadores de susceptibilidad. También empiezan a emplearse, aunque en menor escala, genes asociados a funciones del sistema inmune y del control del ciclo celular (Kyrtopoulos, 2006). Las diferencias en estos genes pueden tener un papel de gran importancia en la comprensión de los efectos específicos de una exposición y de la variabilidad interindividual de la respuesta a los agentes genotóxicos.

Asimismo, los biomarcadores de susceptibilidad también incluyen la identificación de mutaciones en genes implicados en el metabolismo y en la reparación, así como la caracterización de variantes polimórficas que llevan a la pérdida o alteraciones importantes de funciones celulares y/o de reparación (Albertini *et al.*, 1996). Por otro lado, factores genéticos, fisiológicos y ambientales como, por ejemplo, la edad, el estado de salud, los hábitos y la dieta (aspectos nutricionales, ingestión de alcohol, consumo de tabaco, entre otros) también contribuyen de forma relevante a los mecanismos de respuesta frente a una determinada exposición potencialmente genotóxica (Albertini *et al.*, 1996; Wogan *et al.*, 2004).

### **1.7. Efectos de la exposición al arsénico en la especie humana**

La exposición al arsénico, por ingestión o por inhalación, se ha asociado a una amplia variedad de efectos adversos para la salud humana. El arsénico puede afectar a diferentes órganos y sistemas, incluyendo la piel y los sistemas respiratorio, cardiovascular, inmune, reproductivo, gastrointestinal y nervioso. Los efectos de toxicidad aguda pueden ser muy severos e incluso llevar a la muerte, mientras que los efectos de una exposición crónica se relacionan con la aparición de enfermedades vasculares y cáncer, entre otras (Morgan, 2001; Tapio y Grosche, 2006). Actualmente, son millones las personas que están expuestas a los efectos tóxicos del arsénico, debido a exposiciones ambientales (contaminación de aguas subterráneas y alimentos, por las características hidrogeológicas del medio), o debido a diversas actividades antropogénicas.

En la literatura están ampliamente reportados los efectos de las exposiciones crónicas al arsénico. Generalmente, éstos consisten en hiperqueratosis palmo-plantar, dermatitis alérgicas, presencia de estrías blancas en las uñas, manifestaciones cardiovasculares,

síndrome de Raynaud, hipertensión, disfunciones pulmonares y enfermedad del pie negro (enfermedad vascular periférica), entre otras. Además, existe una clara correlación entre la exposición crónica y el incremento de las tasas de distintos tipos de cáncer, especialmente los de piel, pulmón, vejiga, hígado y riñón (Basu *et al.*, 2001; Morgan, 2001; Hughes, 2002; Tapio y Grosche, 2006).

Los estudios epidemiológicos también aportan muchas evidencias sobre la relación existente entre la exposición laboral al arsénico y el aumento del riesgo de cáncer. En general, los estudios con trabajadores de fundición, mineros y agricultores expuestos al arsénico, fundamentalmente por inhalación, muestran un aumento en la incidencia de cáncer de pulmón. En estos estudios, además de poner en evidencia las relaciones dosis-respuesta, también se ha demostrado una correlación entre el hábito de fumar y el aumento del riesgo de cáncer en los individuos expuestos (Morgan, 2001; Tapio y Grosche, 2006).

A pesar de los efectos tóxicos, genotóxicos y carcinogénicos del arsénico, algunos de sus compuestos vienen siendo utilizados en la terapia contra el cáncer. Así, el trióxido de arsénico (ATO) resulta ser bastante eficaz en el tratamiento de diversos tumores y de la leucemia mieloide aguda (McCollum *et al.*, 2005).

Aunque contradictorios, los efectos del arsénico son bastante bien conocidos. Sin embargo, continúa siendo necesario determinar sus mecanismos de acción. Hasta el momento, se han sugerido distintas posibilidades, incluyendo la capacidad de alterar procesos de señalización y reparación celular, de producir cambios en el ciclo celular (parada mitótica), de inducir estrés oxidativo, apoptosis y anomalías cromosómicas, entre otras (Tapio y Grosche, 2006).

### **1.7.1. Influencia del metabolismo en los efectos inducidos por el arsénico**

Como se ha indicado en los apartados anteriores, la toxicidad y la genotoxicidad del arsénico están intrínsecamente relacionadas con su metabolismo. La biotransformación del arsénico mediante los procesos de reducción y de metilación transforma el arsénico inorgánico en compuestos metilados fácilmente excretables pero, a la vez, origina metabolitos trivalente metilados, considerados las formas más tóxicas. Además, durante las reacciones de reducción se generan especies reactivas de oxígeno que pueden causar indirectamente daño en el DNA.

La capacidad de metabolización del arsénico inorgánico difiere significativamente entre humanos, existiendo una gran variabilidad en los patrones individuales de excreción. Se supone que aquellos individuos que tienen una capacidad de metabolización alterada podrían presentar una mayor o menor susceptibilidad a los efectos adversos del arsénico. Siendo así, los individuos con una alta capacidad de excretar DMA en orina presentarían el perfil de metabolizadores más eficientes, mientras que los individuos que excretan un mayor nivel de arsénico inorgánico o MMA serían metabolizadores menos eficientes y, por lo tanto, más susceptibles a los efectos nocivos de la exposición al arsénico.

En la literatura existen trabajos que muestran que pequeñas diferencias en el patrón de excreción del arsénico están asociadas a diferencias significativas de toxicidad. Algunos estudios indican que un ligero incremento del porcentaje de MMA en orina, incluso inferior a un 5%, estaría implicado en un aumento del daño inducido, como por ejemplo lesiones cutáneas y efectos citogenéticos (Del Razo *et al.*, 1997; Maki-Paakkanen *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000).

Parece ser que los individuos que presentan mayores niveles de MMA en orina tendrían una mayor retención de arsénico, al compararlos con los que presentan niveles más bajos y, consecuentemente, presentarían una mayor susceptibilidad al daño. En un estudio comparativo analizando los niveles de arsénico encontrados en la sangre de indígenas atacameños (bajos niveles de MMA) y de una población norteamericana expuesta (niveles normales, alrededor del 10 al 20 %) se observó que el patrón de excreción del arsénico total disminuye con el incremento de arsénico inorgánico y MMA en sangre, mientras que se incrementa cuando aumenta el porcentaje de DMA (Vahter, 2002). Es interesante destacar que los mamíferos incapaces de metilar el arsénico presentan una tasa de excreción más rápida y parecen ser menos susceptibles a los efectos del arsénico, en comparación con la especie humana.

Recientemente se ha publicado un estudio caso-control realizado en Taiwán, en el cual se ha observado, en individuos expuestos a niveles muy bajos de arsénico, la existencia de correlación entre un perfil desfavorable de excreción del arsénico e incrementos de cáncer urotelial (Pu *et al.*, 2007). Estos resultados, además de corroborar una asociación positiva entre diferencias en el perfil de excreción, el consumo de tabaco y los efectos carcinogénicos del arsénico, ponen de manifiesto que la exposición a niveles muy bajos también puede contribuir de forma significativa al aumento del riesgo.

Sin duda, el metabolismo ejerce un importante papel en la genotoxicidad, carcinogenicidad y efectos terapéuticos del arsénico. Así, las correlaciones entre las diferencias en el perfil de excreción de los individuos expuestos (sean debidas a factores ambientales o genéticos) y la susceptibilidad al daño inducido pueden ser factores de gran importancia en la estima del riesgo cancerígeno del arsénico en los estudios de biomonitorización.

### **1.7.2. Estudios de riesgo genotóxico en poblaciones expuestas al arsénico**

Como se ha explicado en apartados anteriores, los mecanismos involucrados en los efectos genotóxicos y carcinogénicos del arsénico todavía no están totalmente dilucidados. No obstante, se están realizando numerosos estudios en poblaciones humanas expuestas de forma crónica al arsénico y frecuentemente se emplean marcadores citogenéticos en la evaluación del riesgo genotóxico (Moore *et al.*, 1996; Mahata *et al.*, 2003; Vuyyuri *et al.*, 2006; Iarmarcovai *et al.*, 2007).

En general, el ensayo de CA está bien establecido como un biomarcador de gran relevancia para la evaluación del riesgo carcinogénico (Hagmar *et al.*, 1994), mientras que la frecuencia de MN, tanto en linfocitos de sangre periférica como en células epiteliales de descamación, viene siendo empleada como una medida rápida, sencilla y bastante adecuada en la evaluación del riesgo genotóxico (Surrallés *et al.*, 1992; Fenech, 1993). Por otra parte, en algunos estudios de biomonitorización también se sigue utilizando el ensayo de SCE como indicador de daño genético (Ergene *et al.*, 2007).

La mayoría de los estudios epidemiológicos llevados a cabo en poblaciones humanas expuestas al arsénico, a través del agua de bebida, demuestran una correlación positiva entre la frecuencia de MN y CA y los niveles de exposición (Dulout *et al.*, 1996; Basu *et al.*, 2001, 2002; Martínez *et al.*, 2004; Chakraborty *et al.*, 2006).

A modo de ejemplo podemos señalar que, en un estudio realizado en México, se observó un aumento significativo de la frecuencia de CA en linfocitos, y de MN en células epiteliales de mucosa bucal y en células uroteliales, en individuos expuestos al arsénico (Gonsebatt *et al.*, 1997). También se obtuvieron resultados similares en un estudio de biomonitorización realizado en la India (Basu *et al.*, 2002). En la misma región los individuos expuestos también presentaban un aumento de las tasas de SCE y CA (Mahata *et al.*, 2003).

En contraste con los estudios que analizan CA y MN, pocos estudios de biomonitorización han utilizado los SCE como marcadores de daño y los resultados obtenidos son bastante contradictorios. En un estudio de biomonitorización realizado en una población de Argentina se observó una correlación positiva entre la frecuencia de SCE y los niveles consumidos de arsénico en agua (Lerda, 1994), mientras que en Taiwán se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de SCE y en el índice de proliferación celular, al comparar pacientes con la enfermedad de Bowen, inducida por el arsénico, y controles sanos (Hsu *et al.*, 1997). Sin embargo, en otros estudios llevados a cabo en los EEUU (Vig *et al.*, 1984), Méjico (Ostrosky-Wegman *et al.*, 1991) y Argentina (Dulout *et al.*, 1996) no se detectó ninguna correlación entre las frecuencias de SCE y la exposición al arsénico.

A pesar de la gran cantidad de estudios de biomonitorización realizados en poblaciones humanas expuestas ambientalmente al arsénico, principalmente debido al consumo de agua de bebida contaminada, sólo unos pocos se han realizado en condiciones de exposición laboral. Normalmente, en los estudios relacionados con exposición ocupacional, se observan incrementos en el riesgo de cáncer de pulmón en trabajadores de la industria química y de la fundición (Leonard y Lauwerys, 1980; Morgan, 2001). Resultados obtenidos en algunos estudios de biomonitorización con trabajadores de las áreas de fundición de la industria del cobre indican incrementos significativos en la frecuencia de CA (Beckman *et al.*, 1977; Nordenson *et al.*, 1978). También se han detectado incrementos en las frecuencias de MN y CA en otro estudio llevado a cabo en China (Hu, 1989).

A pesar de que la mayoría de los estudios epidemiológicos encuentran una asociación positiva entre exposición al arsénico y aumento de daño genotóxico, existen algunos estudios que aportan resultados contradictorios, tanto en casos de exposiciones ambientales como ocupacionales (Martínez *et al.*, 2005; Palus *et al.*, 2005; Lewinska *et al.*, 2007). Algunos autores sugieren que los resultados negativos pueden deberse a bajos niveles de exposición o a que el tamaño de las muestras analizadas sea demasiado pequeño, entre otros factores (Basu *et al.*, 2001). No obstante, la variabilidad individual relacionada con las diferencias de susceptibilidad, sea genética y/o adquirida, también podría ser considerada como un factor importante para explicar las diferencias de respuesta frente a la exposición al arsénico (Maki-Paakkanen *et al.*, 1998).

Es evidente que el metabolismo, las diferencias en el patrón de excreción y la variabilidad individual en la respuesta, son factores que están directamente relacionados y actúan como

elementos moduladores de los efectos tóxicos en general y genotóxicos, en particular, del arsénico. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda y validación de biomarcadores de susceptibilidad que, así como los biomarcadores de exposición y de efecto, puedan ser utilizados de forma eficaz en la predicción del daño genético inducido por el arsénico.

### **1.8. Glutation S-transferasas**

Las glutatión-S-transferasas (GSTs) constituyen una superfamilia de enzimas de fase II involucradas en la detoxificación de un gran número de compuestos endógenos y/o en la metabolización de xenobióticos. Son enzimas que catalizan la conjugación del glutatión (GSH) con un amplio número de compuestos eletrofilicos, incluyendo carcinógenos químicos, productos terapéuticos y derivados del estrés oxidativo (Board *et al.*, 2000; Townsend y Tew, 2003; Whitbread *et al.*, 2003). Estas enzimas también actúan como peroxidasas, isomerasas y tiotransferasas y pueden tener funciones no catalíticas, estando implicadas en procesos de señalización celular. Además, las GSTs están involucradas en la detoxificación de productos del estrés oxidativo y en el catabolismo de aminoácidos aromáticos (Frova, 2006). Por lo tanto, las GSTs se constituyen como una gran familia de enzimas que poseen múltiples funciones que van desde la detoxificación hasta la biosíntesis.

De modo general, las GSTs están codificadas por una gran familia multigénica y se clasifican en 3 subfamilias principales: GSTs solubles o citosólicas, GSTs microsomales, conocidas como MAPEG (proteínas asociadas de membrana implicadas en el metabolismo del glutatión y eicosanoides) y GSTs resistentes a la fosmocinina (proteínas FosA y FosB). Cabe destacar que las GSTs Kappa actualmente son consideradas como una nueva subfamilia, clasificada como GSTs mitocondrial (Hayes *et al.*, 2005; Oakley, 2005; Frova, 2006).

Casi todas las GSTs solubles son activas como dímeros, que pueden ser idénticos (homodímeros) o estar formados por unidades distintas (heterodímeros), codificadas por genes independientes. En general, los genes presentan una estructura altamente conservada y cada uno de los dímeros está formado por una estructura interna similar de tres plegamientos. Por otro lado, cada subunidad está compuesta por dos dominios espacialmente distintos: el dominio N-terminal (dominio I), formado por cadenas  $\beta$  y

hélices  $\alpha$ , y el dominio C-terminal (dominio II) que está formado exclusivamente por estructuras de hélices  $\alpha$ .

Las subunidades de las GSTs diméricas son catalíticamente independientes y poseen un sitio activo específico para los ligandos de gran afinidad con el glutation (sitio G) y otro sitio activo para los ligandos que se unen a sustratos hidrofóbicos (sitio H). Los dos sitios juntos forman la unidad catalítica activa de la enzima. El dominio N-terminal está altamente conservado y generalmente está formado por residuos específicos de tirosina o serina, que dan origen a un sitio altamente reactivo para los sustratos eletrofilicos que se conjugan con el glutation (GSH).

Entre las GSTs, la subfamilia más abundante es la de las GSTs citosólicas, que pueden encontrarse en distintos organismos. En mamíferos se han identificado entre 15 y 20 genes distintos y, hasta el momento, se han descrito siete clases de GSTs citosólicas. Las clases Alpha, Mu y Pi son enzimas específicas de mamíferos, mientras que las que pertenecen a las clases Sigma, Theta, Zeta y Omega se han encontrado también en insectos, en plantas (Theta y Zeta) y en bacterias (Theta) (Frova, 2006). Generalmente, los miembros de cada una de las clases presentan una identidad en la secuencia de aminoácidos superior al 40%. Además, las similitudes entre secuencias de aminoácidos de miembros de clases distintas son inferiores al 25 %.

Las funciones de las GSTs están altamente diversificadas, tanto entre las enzimas de distintas clases como entre los miembros de una misma clase. Para dilucidar el papel que tienen las GSTs, tanto en el metabolismo general de xenobióticos como en la detoxificación de agentes carcinógenos, se viene empleando una gran variedad de metodologías, que incluyen la creación y análisis de variantes mutantes y *knockouts*, ensayos bioquímicos y de cinética, utilizando un amplio rango de sustratos y el análisis de la expresión y de la actividad de las GSTs en diferentes tejidos y sustratos, entre otras aproximaciones experimentales.

En poblaciones humanas, las GSTs son las principales enzimas responsables de las reacciones metabólicas de fase II y, por lo tanto, cambios en la actividad de estas enzimas tienen implicaciones clínicas importantes. Se ha observado que aquellas personas que poseen niveles de actividad muy bajos de GSTs tienen mayor riesgo de padecer enfermedades inflamatorias (asma y artritis reumatoide) y de desarrollar cáncer de mama,

pulmón y bucal, entre otros. Por otro lado, los individuos con una actividad elevada de las GSTs suelen ser más resistentes a la quimioterapia, como ocurre, por ejemplo, en el tratamiento con ciclofosfamida.

Las diferencias de actividad de las GSTs pueden estar moduladas por factores genéticos y ambientales (Zhong *et al.*, 2006). Así, numerosos estudios han demostrado que algunos polimorfismos en genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos son posibles candidatos para explicar la variabilidad interindividual en las tasas de metabolización y en el perfil de excreción de fármacos o carcinógenos.

Cabe destacar que las GSTs citosólicas son enzimas altamente polimórficas y varían en las poblaciones humanas dependiendo de la etnia. Así pues, aquellos polimorfismos que lleven a cambios en la expresión y/o actividad de las enzimas, las diferencias étnicas y los factores relacionados con la dieta, el consumo de alcohol y tabaco, entre otros, deben ser tenidos en cuenta a la hora de estimar el riesgo genotóxico asociado a una determinada exposición.

### **1.8.1. La clase Omega**

La clase GST Omega pertenece a la subfamilia de las GSTs citosólicas y ha sido caracterizada recientemente, teniendo dos miembros funcionales, la GSTO1 y la GSTO2. En humanos, los genes que codifican para estas enzimas están localizados en el cromosoma 10q24.3 y separados por 7,5 kb. El gen *GSTO1* tiene 6 exones y codifica una proteína de 27,5 kDa, que se encuentra ampliamente expresada tanto en el núcleo como en el citoplasma en una gran variedad de tejidos (Board *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2001). Por otro lado, el gen *GSTO2* está constituido por 7 exones, siendo el primero y parte del segundo, regiones no codificantes. La proteína codificada tiene aproximadamente unos 28 kDa y comparte un total de 64 % de homología con *GSTO1*. La proteína GSTO2 se ha detectado en una gran variedad de tejidos, incluyendo hígado, riñón, músculo esquelético y próstata, teniendo la máxima expresión en testículos (Whitbread *et al.*, 2003).

Las GSTO1 y GSTO2 poseen características estructurales y propiedades biológicas no compartidas por las otras GSTs. Así, presentan un único dominio N-terminal y un residuo de cisteína en su sitio activo, difiriendo así de los sitios activos comúnmente encontrados en otras GSTs de eucariotas, que están formados por tirosina o serina. Ambas enzimas casi

no poseen ninguna actividad catalítica para aquellos sustratos comunes a todas las GSTs, y se caracterizan por presentar nuevas actividades como deshidroascorbato reductasa, tioltransferasa y MMA<sup>V</sup> reductasa. Las principales características estructurales y funcionales de las GSTO se indican en la tabla 3.

La GSTO1 se identificó previamente como la enzima MMA<sup>V</sup> reductasa en humanos y, por lo tanto, se le consideró como el factor limitante en el proceso de biotransformación del arsénico (Zakharyan *et al.*, 2001; Whitbread *et al.*, 2003). En realidad, esta enzima tiene la capacidad de catalizar todas las reacciones de reducción del arsénico. GSTO2 también presenta actividad arsénico reductasa, a pesar de poseer una menor capacidad DMA<sup>V</sup> reductasa, en comparación con GSTO1 (Schmuck *et al.*, 2005).

Otras funciones de GSTO1 estarían relacionadas con la modulación de los canales receptores de calcio (Yin *et al.*, 2001; Schmuck *et al.*, 2005) y la respuesta inflamatoria, estando también implicada en la activación de la interleucina 1 (Laliberte *et al.*, 2003). Recientemente se ha detectado una nueva actividad metabólica exclusiva de GSTO1, consistente en la biotransformación de las  $\alpha$ -haloacetonas en acetofenonas no tóxicas (Board y Anders, 2007). Por otro lado, GSTO2 presenta una alta actividad deshidroascorbato reductasa, pareciendo indicar que esta sería su principal función biológica (Schmuck *et al.*, 2005).

Ambas, GSTO1 y GSTO2, parecen tener una función relevante en el mantenimiento de la homeostasis celular actuando como un sistema de protección contra el estrés oxidativo. Así, las implicaciones clínicas de estas enzimas en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, el Alzheimer y el Parkinson empiezan a ser estudiadas (Whitbread *et al.*, 2004; Schmuck *et al.*, 2005; Marahatta *et al.*, 2006).

Tabla 3. Características estructurales y funcionales de las GSTO

<b>Estructura funcional</b>	<b>Características</b>
Dominio extra	C-terminal
Estructura cuaternaria	Dímero
Residuo en el sitio activo	Cisteína
Funciones catalíticas	Actividad
GSH transferasa	+/-
Peroxidasa	-
Isomerasa	-
Tiol transferasa	+
Deshidroascorbato reductasa	+
Funciones específicas	Modulación canales de iones; actividad fenacilglutation reductasa

Al igual que las otras GSTs, la clase Omega también presenta variantes polimórficas distribuidas según la etnia (Schmuck *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006). Por lo tanto, aquellos polimorfismos que lleven a cambios funcionales en la actividad de estas enzimas podrían contribuir a explicar las diferencias de toxicidad y de respuesta frente a la exposición a compuestos potencialmente carcinogénicos y, en particular, al arsénico.

## 2. OBJETIVOS

Esta tesis se enmarca dentro de la línea de investigación desarrollada en el Grupo de Mutagénesis de la UAB titulada “Estudios sobre los mecanismos de genotoxicidad de diferentes metales en eucariotas utilizando técnicas citogenéticas y moleculares”, y focaliza su interés sobre los riesgos genotóxicos del arsénico y sus mecanismos de acción. Los objetivos propuestos se pueden desglosar en tres partes diferenciadas.

### **Parte I: Estudios de biomonitorización**

En Chile, y en particular en la región de Antofagasta, la gran actividad laboral en la minería del cobre y los elevados niveles ambientales de arsénico existentes, constituyen importantes fuentes de exposición que implican un riesgo genotóxico potencial. En este contexto, los objetivos de la primera parte de este trabajo han sido:

1. Analizar el nivel de exposición de un grupo de trabajadores chilenos de una explotación minera de cobre, midiendo la cantidad de arsénico y de sus metabolitos en orina.
2. Evaluar la posible asociación entre la exposición al arsénico y los eventuales efectos genotóxicos producidos por tal exposición, mediante los ensayos de SCE y de MN en linfocitos de sangre periférica y el de MN en células de la mucosa bucal.

### **Parte II: Caracterización de las variantes polimórficas *GSTO1* y *GSTO2***

La existencia de una gran variabilidad interindividual en el perfil de excreción y en la susceptibilidad frente al daño inducido por el arsénico parece indicar la existencia de una base genética en el metabolismo del arsénico. Por lo tanto, polimorfismos en los genes *GSTO1* y *GSTO2*, que codifican enzimas limitantes en la biotransformación del arsénico, podrían ser una posible explicación para las diferencias en las respuestas observadas entre grupos e individuos de una misma población expuesta. Los objetivos de este apartado han sido:

1. Determinar nuevos polimorfismos en los genes *GSTO1/ GSTO2* y analizar las diferencias de frecuencias de las variantes polimórficas encontradas entre atacameños, chilenos y europeos.

2. Caracterizar el papel de algunas de estas variantes polimórficas en el metabolismo del arsénico, mediante análisis de las asociaciones entre perfiles de excreción y variantes alélicas.

**Parte III: Estudios *in vitro***

GSTO1 es una de las enzimas responsables de la reducción del arsénico, por lo que se le considera como el factor limitante en este proceso. Así, dado el importante papel del metabolismo sobre la toxicidad del arsénico, los objetivos propuestos han sido:

1. Estudiar los niveles de expresión y la regulación de la proteína GSTO1.
2. Buscar modelos adecuados para averiguar el papel de GSTO1 en el metabolismo del arsénico.
3. Establecer la posible relación existente entre la expresión de GSTO1 y la toxicidad de distintos compuestos de arsénico.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Parte I: Estudios de biomonitorización**

##### **3.1.1. Caracterización de la población estudiada**

Como se ha indicado anteriormente, en la región de Antofagasta, situada en el norte de Chile, existe una elevada exposición al arsénico debido a fenómenos naturales y antropogénicos, principalmente relacionados con la explotación minera del cobre. En paralelo al desarrollo de la actividad minera, se ha empezado a tener datos de salud pública en la región, relativos a intoxicaciones por arsénico y al aumento de la tasa de mortalidad por algunos tipos de cáncer, como el de pulmón, piel y vejiga. Estudios epidemiológicos realizados con trabajadores de las áreas de fundición de distintas minerías han relacionado la exposición al arsénico, por inhalación, con una mayor incidencia de mortalidad por cáncer broncopulmonar (Biondi, 1995). Este conjunto de factores hace que la región de Antofagasta sea un marco muy apropiado para llevar a cabo estudios sobre los posibles efectos genotóxicos del arsénico.

El presente trabajo se ha efectuado estudiando una muestra de 206 hombres (105 expuestos y 101 controles) de una industria minera de la región de Antofagasta. Los individuos expuestos son trabajadores del área de fundición de la mina, mientras que los controles pertenecen a dos grupos distintos: 53 controles que trabajan en puestos administrativos de la misma minería (control interno) y 48 que trabajan en otra minería sin niveles importantes de arsénico en el material extraído (control externo).

##### **3.1.2. Obtención de las muestras**

Las muestras biológicas se obtuvieron en el lugar de trabajo. Todos los participantes en el estudio lo fueron de manera voluntaria y dieron el correspondiente consentimiento por escrito, una vez informados del objetivo del estudio. Tras ser cumplimentada la encuesta, se tomaron las siguientes muestras:

- 1 - Sangre en tubos con heparina - aprox. 3 mL
- 2- Sangre en tubos con EDTA - aprox. 7 mL
- 3 - Orina - aprox. 125 mL

#### 4 - Células de mucosa bucal

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa, utilizando *vacutainers* heparinizados y *vacutainers* conteniendo EDTA. Cada tubo se había identificado previamente con un código para cada uno de los individuos muestreados. Una vez obtenidas las muestras, éstas se enviaron por vía aérea a los laboratorios del Grupo de Mutagénesis del Departamento de Genética y de Microbiología de la UAB, donde se realizaron los cultivos y la extracción del DNA.

Las muestras de mucosa bucal se obtuvieron mediante el raspado de la mucosa bucal con un cepillo de dientes nuevo, previamente humedecido con agua. Una vez obtenidas, las muestras se sumergieron inmediatamente en tubos de 50 mL codificados, conteniendo 20 mL de solución salina fosfatada (PBS). Todas las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta ser procesadas en nuestro laboratorio.

Las muestras de orina, también codificadas, se recogieron en vasos de plástico estériles conteniendo 0,01 M de  $\text{NaN}_3$ . Todas las muestras se mantuvieron refrigeradas y seguidamente se enviaron a Tokio (al *National Institute of Health Sciences*) donde se congelaron y posteriormente se analizaron. Los análisis consistieron en determinar los niveles de As total, As inorgánico, MMA y DMA mediante HPLC-ICP/MS.

### 3.1.3. Metodologías aplicadas

#### 3.1.3.1. Encuesta

En los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas hay que tener en cuenta los posibles factores de confusión; para ello se ha de obtener información sobre hábitos, estilo de vida, actividad laboral e historial médico/familiar del individuo o de la población estudiada. En general, las encuestas son una herramienta bastante útil para obtener este tipo de información. Habitualmente, se intenta averiguar la incidencia de cáncer familiar, los defectos en el desarrollo y desórdenes genéticos conocidos; aspectos de salud general incluyendo tabaquismo, consumo de alcohol, uso de medicamentos y drogas; conocimiento o sospecha de exposición a agentes químicos y/o físicos en el trabajo, en el hogar o en actividades de ocio; características de la dieta, principalmente sobre el consumo de bebidas con cafeína, teína y edulcorantes, entre otros (Carrano y Natarajan, 1988). En este estudio, hemos utilizado un amplio cuestionario con preguntas objetivas, que sirvió para determinar

el tiempo/duración de la exposición y los factores de confusión citados anteriormente. Como se trata de una exposición al arsénico, en el apartado relacionado con la dieta se incluyeron preguntas sobre el consumo de pescado y marisco, en especial durante la semana anterior a la recogida de las muestras (véase el cuestionario del anexo I).

### **3.1.3.2. Cultivo de linfocitos**

Los cultivos de linfocitos se realizaron según el protocolo establecido en nuestro laboratorio, añadiendo 0,5 mL de sangre total a 4,5 mL de medio completo constituido por RPMI 1640, 15 % de suero bovino fetal inactivado, 1 % de antibióticos (penicilina y estreptomicina) y 1 % de L-glutamina. Para la estimulación de los linfocitos se añadió un 1 % de fitohemaglutinina al medio de cultivo.

Se realizaron en paralelo 2 cultivos por individuo, que se incubaron en la oscuridad a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub>, por un período de 72 h.

#### **3.1.3.2.1. Protocolo del ensayo de SCE**

Para la detección de los SCE se añadieron 20 µL de BrdU, a la concentración de 8 µg/mL ( $\cong$  26,05 µM), al inicio de los cultivos. Las células cultivadas en presencia de BrdU incorporan este análogo en lugar de la timina en el DNA sintetizado de nuevo y, después de 2 ciclos celulares, la diferencia en el contenido de BrdU entre cromátidas hermanas puede detectarse mediante una tinción específica. Para evitar los SCE inducidos por la fotólisis de la BrdU, los tubos de cultivo se envuelven en papel de aluminio y, posteriormente, se incuban durante 70 h. Transcurrido este tiempo, se añaden 0,05 mL de Colcemid (0,1 µg/mL) para detener la división celular y obtener células en metafase, lo que permitirá una mejor visualización de los cromosomas. Los cultivos se incuban 2 h más y, al completar las 72 h, se finaliza la fase de cultivo. La etapa siguiente consiste en la fijación de las células. En el primer paso se centrifugan las células a 1000 rpm (200xg), durante 8 min. Después, el sobrenadante se elimina por aspiración, el botón celular se resuspende en aproximadamente 5 mL de una solución acuosa de cloruro potásico (0,075 M) y se incuba en un baño térmico durante 20-25 min a 37 °C. Pasado este tiempo, se realiza una nueva centrifugación, se aspira el sobrenadante y se realiza la fijación de los cultivos en una solución de Carnoy fría (metanol/ácido acético, 3:1 en volumen). Este procedimiento se repitió 3 veces, a fin de conseguir un sobrenadante limpio. La suspensión

celular obtenida se almacenó a 4 °C durante un mínimo de 18 h para asegurar la fijación completa y, transcurrido este tiempo, los linfocitos fijados se centrifugan y resuspenden en una pequeña cantidad de Carnoy. Posteriormente, esta suspensión se gotea desde una cierta altura, en portaobjetos previamente limpios y desengrasados (mantenidos en alcohol a -20 °C). Para cada individuo y réplica se han realizado un total de 3 preparaciones (6 portas/individuo), que se han secado al aire, a temperatura ambiente y protegido de la luz durante un período igual o superior a 3 días, antes de que se realizara el proceso de tinción.

Para llevar a cabo la tinción, se ha utilizado una adaptación de la técnica de fluorescencia más Giemsa (FPG), propuesta por (Perry y Wolff, 1974). Al principio, las preparaciones se sumergen en una cubeta con una solución (1,8 µg/mL) del colorante fluorescente Hoescht 33258 durante 20 min, en la oscuridad y a temperatura ambiente. Después se lavan con abundante agua corriente, se colocan horizontalmente en cubetas de vidrio, cubiertas con una solución de KCl (0,075 M) y se exponen a luz negra (a una distancia de 17 cm) durante 2 h. En este paso ocurre la fotodegradación del fluorocromo Hoescht y de la BrdU, de manera que el tiempo de exposición a la luz debe ser bastante exacto. Se lavan enseguida las preparaciones y se incuban en una solución salina 2x SSC a 45 °C. Después de 15 min, se lavan de nuevo y se dejan secar al aire. Cuando están secas, se tiñen con una solución de Giemsa/tampón fosfato (1:9) durante 10 min. Finalmente, se lavan por última vez y se dejan secar al aire. A continuación, las preparaciones se montan utilizando 3 gotas de Entellan y cubreobjetos. Pasadas 3 h, ya se pueden observar al microscopio.

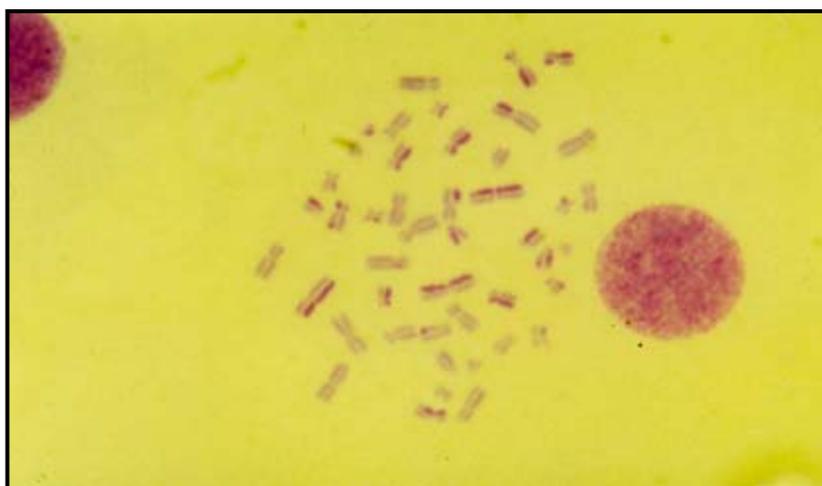
El análisis de los SCE (2 réplicas por cada individuo) se hizo utilizando un microscopio óptico (Leitz Aristoplan) con un aumento de 1.000 x. Se estudiaron 100 metafases (50 por cada réplica) para determinar la frecuencia de metafases de 1ª, 2ª y 3ª generación (MI, MII y MIII, respectivamente); para ello, las células se distinguen según las diferencias en la coloración de las cromátidas hermanas (ver fig. 6).



Metafase de 1ª división



Metafase de 2ª división, con SCE



Metafase de 3ª división

Fig. 6. Tinción diferencial FPG en metafases humanas de 1ª, 2ª y 3ª división.

A partir de estos datos se ha calculado el índice de proliferación celular (PRI), que es un parámetro empleado como criterio de citotoxicidad. Para el cálculo del PRI se ha utilizado la siguiente fórmula (Lamberti *et al.*, 1983):

$$\text{PRI} = (\text{MI} + 2 \text{MII} + 3 \text{MIII}) / \text{N}^{\circ} \text{ total de metafases}$$

Para determinar la frecuencia de SCE, se estudiaron un total de 50 metafases de 2ª división/individuo. Se buscó que las metafases poseyeran calidad suficiente y un número de cromosomas  $2n = 46 \pm 1$ . Además, se calculó la proporción de células que presentaban una alta frecuencia de SCE (*High frequency cells*- HFC). Para ello, se han considerado como HFCs aquellas células cuya frecuencia de SCE es superior al percentil 95% de la distribución total, conforme a lo sugerido por Hirsch *et al.* (1992) y Ponzanelli *et al.* (1997), entre otros.

### **3.1.3.2.2. Protocolo del ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica**

Para llevar a cabo el ensayo de MN, transcurridas 44 h desde el inicio de los cultivos se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de Citocalasina B (Cyt B - Sigma) a una concentración final de 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con el objetivo de bloquear la citocinesis. La fase de cultivo se termina cuando transcurren las 72 h de incubación. En el paso siguiente, los cultivos se centrifugan a 120 x g por 8 min. Una vez aspirado el sobrenadante, se hace un lavado con medio RPMI 1640 seguido de un choque hipotónico con una solución de KCl a 4 °C durante 2-3 min. La etapa posterior consiste en la fijación de los cultivos y, después de centrifugados, se elimina el sobrenadante y las células se fijan en una solución fría de metanol/ ácido acético (3:1 v/v). Este procedimiento se repitió dos o tres veces hasta obtener un sobrenadante limpio. La solución celular obtenida se resuspende en una pequeña cantidad de fijador y posteriormente se gotea en portaobjetos previamente limpios. Para cada individuo, se han realizado un mínimo de 2 o más preparaciones, que se secan a temperatura ambiente. Una vez secas, las preparaciones se tiñen con una solución al 10 % Giemsa en tampón fosfato (pH = 6,8) durante 10 min. Después de lavadas y secadas al aire, las preparaciones se sellan utilizando 3 gotas de Entellan y cubreobjetos. La etapa final consiste en codificar todas las preparaciones y realizar el recuento de los MN al microscopio.

Para determinar la frecuencia de células binucleadas con MN (BNMN), así como el número total de MN de cada célula, se analizaron un total de 1.000 células binucleadas con el citoplasma bien conservado (500 por cada réplica) por cada individuo (fig.7).

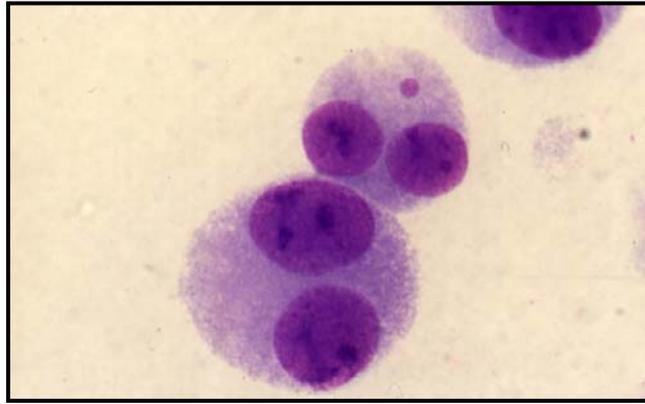


Fig. 7. Célula BNMN – linfocitos de sangre periférica.

También se hizo la estima del índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis (CBPI) utilizando la fórmula propuesta por Surrallés et al. (1995):

$$\text{CPBI} = [\text{MI} + 2 \text{MII} + 3 (\text{MIII} + \text{MIV})] / \text{N}^{\circ} \text{ total de células}$$

Para ello, se analizaron un total de 500 células, donde MI a MIV corresponden a células con 1 hasta 4 núcleos, respectivamente. Cabe destacar que las células con 3 y 4 núcleos se consideran como equivalentes y correspondientes a la 3ª división mitótica. El CPBI, así como el PRI en el caso de los SCE, también se considera como una medida de citotoxicidad.

### 3.1.3.3. Protocolo del ensayo de MN en células de mucosa bucal

Las muestras de mucosa bucal se centrifugaron durante 10 min a 400 x g. El sobrenadante se eliminó por aspiración y el botón celular se resuspendió en aproximadamente 20 mL de tampón (0,1 M EDTA, 0,01 M Tris-HCl, 0,02 M NaCl, pH = 7). Este proceso se repitió hasta un total de 3 lavados. Después del tercer lavado, seguido de una centrifugación, se aspiró el sobrenadante hasta obtener una concentración adecuada de células. Para comprobar que la concentración celular era la correcta, se gotearon 50 µL de muestra por cada donante. Las preparaciones se dejaron secar sobre una placa caliente (aproximadamente a 55 °C) durante 15 min con el objetivo de conseguir un secado más

rápido y una mejor extensión celular. Posteriormente se fijaron en metanol al 80 % (0-20 °C) durante 5 min. Cuando están secas, se observan en el microscopio óptico de contraste de fase para determinar la densidad celular. Al obtener la concentración celular deseada, se gotean todos los portas. Se dejan 15 min sobre una placa caliente, y 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se introducen en metanol a 0 °C durante 30 min. Finalmente, se dejan secar a temperatura ambiente durante toda una noche. Las muestras se guardan en cajas herméticas a -20 °C hasta su utilización.

En el momento de su recuento, las preparaciones se descongelan y se tiñen con 1µg/mL de DAPI (4'6-diamino-2-fenilindol diclorhidrato). Una vez selladas, se observan en el microscopio de fluorescencia (Olympus, BX50) y, posteriormente, se mantienen a 4 °C en cajas opacas (fig. 8).

Se realizó el análisis de un total de 2.000 células por individuo, con el objetivo de estimar la frecuencia de las células de mucosa bucal con MN (BCMN). Los criterios seguidos para la evaluación de los MN han sido propuestos por Titenko-Holland *et al.* (1998).

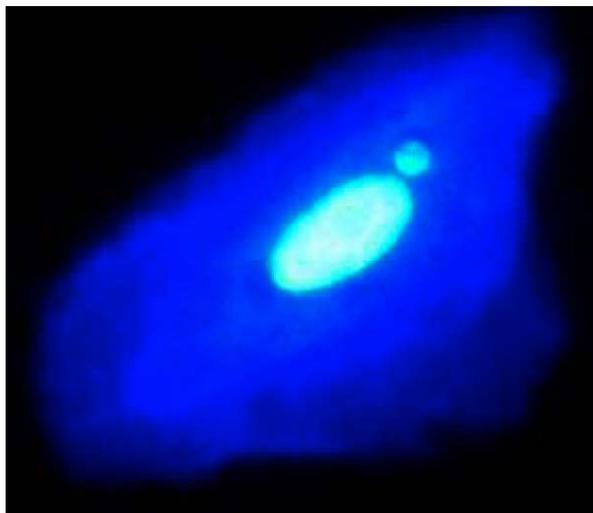


Fig. 8. Célula de mucosa bucal con MN – tinción DAPI.

#### **3.1.3.4. Cuantificación del arsénico en orina**

Las determinaciones de los niveles de arsénico inorgánico y de sus metabolitos en la orina de los trabajadores se hicieron mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con fuente de plasma (HPLC-ICP/MS, *High performance liquid chromatography-inductive coupled plasma mass spectrometer*). Todas las muestras se

analizaron de forma aleatoria. Las condiciones del análisis, incluyendo los reactivos, instrumentos y procedimientos realizados están detalladamente descritos en Marcos *et al.* (2006).

De forma resumida, el protocolo seguido fue el siguiente: después de descongeladas, 20  $\mu$ L de cada muestra de orina se inyectaron en una columna de HPLC (10 mM de tampón fosfato pH = 6,0; tasa de flujo de 1 mL/min; 35 °C temperatura), con la salida de la columna de separación conectada a un sistema de ICP/MS utilizando un tubo de polietileno de 0,3 mm de diámetro interior. Los productos de la elución se midieron cada 8 min. Las cantidades de arsénico total y de sus metabolitos se calcularon de acuerdo con las curvas de calibración preparadas con 0, 25 y 100 ppb de las respectivas especies de arsénico a analizar.

### **3.1.3.5. Análisis estadístico**

El primer paso fue elaborar una extensa base de datos que incluyera los datos obtenidos en la encuesta, los resultados de la cuantificación de arsénico en orina y los resultados de la evaluación de daño citogenético. A continuación, estos datos se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS (versión 11.5). Cabe destacar que, previo al análisis de los datos, los valores de SCE/ célula se corrigieron para aquellas metafases que poseían sólo 45 cromosomas.

Se verificó la normalidad de todos los datos y, en los casos en que estos no se ajustaban a la distribución normal, se han aplicado tests no paramétricos. La única excepción han sido los datos de SCE y BCMN que se transformaron mediante la raíz cuadrada, para que cumplieren los requerimientos necesarios para la realización de una prueba paramétrica (normalidad y homogeneidad de varianzas, entre otros).

Además, el programa SPSS posibilitó que se realizase un análisis conjunto con diversas variables; de este modo, se ha podido investigar el efecto de las diferentes variables consideradas sobre la variable dependiente del estudio (en este caso, SCE, PRI, BNMN o BCMN).

Para obtener esta información se efectuó un análisis de la varianza univariante basado en la construcción de modelos, en los cuales se restan los efectos de las covariables (variables independientes) y de los posibles factores, a los valores de la variable dependiente. Para

ello se usó la suma de cuadrados de tipo III, que considera los factores o covariables de forma independiente, eliminando los efectos del resto de covariables y factores incluidos en el análisis. Así, los resultados obtenidos revelan de forma más precisa la influencia de cada factor o covariable sobre la variable dependiente que está siendo estudiada.

De modo general, las diferencias entre medias observadas en los tres grupos se han analizado a través de tests paramétricos (*t*-Student y ANOVA) y no paramétricos (prueba de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis), mientras que las diferencias entre frecuencias lo han sido mediante el test de Chi-cuadrado.

Las diferencias observadas entre los tres grupos se consideraron estadísticamente significativas cuándo presentaban valores de  $P < 0,05$ .

## **Parte II: Caracterización de las variantes polimórficas de *GSTO1* y *GSTO2***

### **3.2.1. Poblaciones estudiadas**

La región de Antofagasta presenta la particularidad de estar habitada por población indígena atacameña. Los atacameños han estado expuestos durante miles de años a altos contenidos de arsénico, principalmente a través del agua de consumo y, de alguna manera, podrían haberse adaptado a la exposición al arsénico. El resto de la población chilena está formada mayoritariamente por los descendientes de emigrantes europeos, que comparten un fondo genético con atacameños y europeos.

En el contexto de este estudio se reclutó una población compuesta por 2 grupos étnicos distintos: atacameños originarios de la región de Antofagasta y chilenos residentes en la ciudad de Concepción, localizada al sur de Chile. Los individuos de etnia atacameña fueron un total de 46 (9 hombres y 37 mujeres), mientras que el grupo chileno estaba compuesto por 111 individuos (42 hombres y 69 mujeres). Además, un tercer grupo formado por un total de 124 individuos europeos (43 hombres y 81 mujeres, todos del área de Barcelona), fue incluido en el estudio.

Cabe destacar que el genotipado de algunos de los polimorfismos de *GSTO1* y de una variante de *GSTO2* se amplió a la población de los 207 trabajadores de la minería

anteriormente mencionada (véase apartado 3.1.1). Todos los individuos fueron debidamente informados del objetivo del estudio y dieron su consentimiento previo por escrito para participar en el estudio. Las muestras de sangre se obtuvieron y manipularon según criterios éticos, así como se hizo con los datos referentes a la etnia y al historial médico obtenidos a partir de la encuesta (anexo I).

### 3.2.2. Extracción del DNA

La extracción del DNA genómico utilizado en el estudio se realizó a partir de linfocitos aislados de sangre periférica. Todas las muestras se obtuvieron mediante punción venosa utilizando *vacutainers* con EDTA (BD Vacutainer Systems, UK) previamente identificados con el código de cada donante. Las muestras obtenidas en Chile se enviaron por vía aérea al laboratorio del Grupo de Mutagénesis del Departamento de Genética y de Microbiología de la UAB, donde fueron procesadas.

La extracción del DNA se hizo según el protocolo estándar de extracción con cloroformo-fenol, consistiendo básicamente en 3 fases distintas: aislamiento de linfocitos, digestión de proteínas y precipitación del DNA.

En la primera fase a 4 mL de sangre completa se le añaden 6 mL de solución salina fisiológica. Se centrifuga a 4 °C durante 8 min (1000 x g) y, una vez que se retira el sobrenadante, la etapa siguiente es la lisis de los eritrocitos utilizando TLE. Se agita suavemente hasta deshacer el sedimento celular y se deja en hielo. Después de 5 min, se centrifugan los tubos (1400 x g) a 4 °C, durante 15 min. Se retira el sobrenadante y se repite el proceso de lavado con TLE hasta 4 veces. En esta fase, los linfocitos sedimentados se pueden congelar (de -20 °C a -80 °C).

La fase de digestión proteica consiste en añadir a los linfocitos aislados 3 mL de solución de lisis de leucocitos (TLL), 0,2 mL de SDS 10 % y 0,5 mL de solución de proteinasa K (2 mg/mL). Se mezclan los tubos con el vortex y se incuban a 37 °C durante toda la noche (máximo 18 h).

La precipitación del DNA se hace agregando 1 mL de solución saturada de NaCl (5 M). Se agita con el vortex 15-20 s hasta obtener una emulsión que se centrifuga (2000 x g) a 4 °C durante 15 min. Se decanta el sobrenadante a otro tubo de 10 mL y se vuelve a centrifugar (2000 x g) a 4 °C otros 15 min para eliminar definitivamente el exceso de sales. Se añade a

las muestras igual volumen de cloroformo y se agita manualmente hasta obtener una emulsión homogénea y de color blanco. Se centrifuga (2000 x g) durante 15 min a 4 °C. Se traspa cuidadosamente con una pipeta pasteur la fase superior de las muestras y se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA. Para obtener una mejor precipitación, se puede dejar a -20 °C durante toda la noche. Se separa el DNA con una pipeta pasteur, con la punta cerrada, que se pasa a un Eppendorf conteniendo 1 mL de etanol absoluto al 100 %. Se centrifuga (1200 x g) durante 5 min y se hace un segundo lavado con etanol al 70 %. A continuación se hace otro paso de centrifugado, se decanta y se deja secar el DNA a temperatura ambiente. Una vez seco, se disuelve en TE (Tris 10 mM/ EDTA 0,2 mM, pH = 7,5) y se mantiene a -20 °C hasta su uso.

### **3.2.3. Secuenciación y análisis de los polimorfismos**

La primera parte del estudio consistió en el genotipado de 6 polimorfismos y de una nueva variante (Glu50Gly) de *GSTO1*, en los tres grupos étnicos previamente descritos. De manera breve, en este estudio de genotipado todas las reacciones de PCR consistieron en amplificar 1 µL de DNA en un volumen de 25 µL que contenía 0,2 µM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x PCR Buffer, 1 U de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI) y 0,25 µM de cada cebador. Las PCRs consistieron de un paso inicial de desnaturalización de 3 min a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 50-62 °C, 30 s a 72 °C (35 ciclos de 40 s a 95 °C, 40 s a 62 °C, 40 s a 72 °C, en el caso del exón/ intron 1) y un paso final de extensión de 40 s a 72 °C. Los cebadores y las condiciones específicas de amplificación, así como las enzimas utilizadas y los patrones de bandas esperados están descritos en la tabla 4.

El análisis de las variantes Glu50Gly, Ser86Cys, Ala140Asp y Ala236Val se realizó a través de la técnica de RFLPs. Los productos de PCR de cada región (5 µL) se digirieron a 37 °C, durante toda la noche, con 2 U de cada enzima específica (todas las enzimas fueron de New England Biolabs, UK) en un volumen de reacción total de 20 µL. Los productos digeridos se separaron en geles de acrilamida al 10 o 12 %, teñidos con SYBR Gold (Invitrogen, USA) y visualizados con luz ultravioleta (fig. 9).

Tabla 4: Cebadores y condiciones específicas de amplificación para los polimorfismos de *GSTO1* analizados

Polimorfismo/ región analizada	Secuencia de cebadores 5' - 3'	Condiciones específicas de amplificación y análisis	Fragmentos Wt = alelo normal; V= alelo variante
ggc del/ Intrón 1	O1ex1 F: GCAGGCACCTTTTGAGCTAAGG O1ex1 R: GGAGAAAGCGAAGGGGATTAC	62 °C temperatura de hibridación; 3 $\mu$ Ci [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dATP; gel de poliacrilamida al 6 % (5 h a 90 W); autoradiografía	Wt/Wt = 344 bp Wt/V = 344/341 bp V/V = 341 bp
Ser86Cys/ Exón 3	Ex3 F: TGGAAGGAATCTAGGCAGAC* Ex3 R: TCTCTCCCAAATCACTGAAACC *	62 °C temperatura de hibridación; Digestión toda la noche a 37 °C con MlyI; gel de poliacrilamida al 12 %	Wt/Wt = 198/167bp Wt/V = 365,198, 167 bp V/V = 365 bp
Glu50Gly/ Exón 3	Ex3 F: TGGAAGGAATCTAGGCAGAC* Poli3R: GCAGCACTGATTTTCGCTT	58 °C temperatura de hibridación; Digestión toda la noche a 37 °C con HinfI; gel de poliacrilamida al 12 %	Wt/Wt = 221, 179, 18 bp Wt/V = 221, 179, 117, 104, 18 bp V/V = 179, 117, 104, 18 bp
Ala140Asp/ Exón 4	Poli4 F: TCTAGGTGCCATCCTTG ** Poli4 R: TGATAGCTAGGAGAAATAATTACCTC **	58 °C temperatura de hibridación; Digestión toda la noche a 37 °C con CAC8I; gel de poliacrilamida al 12 %	Wt/Wt = 68/59 bp Wt/V = 127, 68, 59 bp V/V = 127 bp
Glu155del/ Exón 4	Poli4 F: TCTAGGTGCCATCCTTG Poli4 R: TGATAGCTAGGAGAAATAATTACCTC	58 °C temperatura de hibridación; 3 $\mu$ Ci [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dATP; gel de poliacrilamida al 6 % (2,5 h a 90W); autoradiografía	Wt/Wt = 127bp Wt/V = 127/124 bp V/V = 124 bp
Glu208Lys/ Exón 6	Ex6 wtF: GGCAGCCATGAAG + GAAG Ex6 m F: GGCAGCCATGAAG + AAAG Ex6 R: AAGATGATCCCATGCAACCT	60 °C temperatura de hibridación; 2,0 mM MgCl <sub>2</sub> ; PCR Alelo específica; gel de agarosa al 2 %	Wt/Wt = 227 bp (ceb. F wt) Wt/V = 227 bp (ceb.F wt / V) V/V = 227bp (ceb F V)
Ala236Val/ Exón 6	Ex6 F: CTGTGATGTCATCCTAGTTG* Ex6 R: CATGCAACCTGAACCTTGGT *	50 °C temperatura de hibridación; Digestión toda la noche a 37 °C con StuI; gel de poliacrilamida al 10 %	Wt/Wt = 192/116 bp Wt/V = 308, 192, 116 bp V/V = 308 bp

\* Marnell *et al.* (2003) y \*\* Whitbread *et al.* (2003).

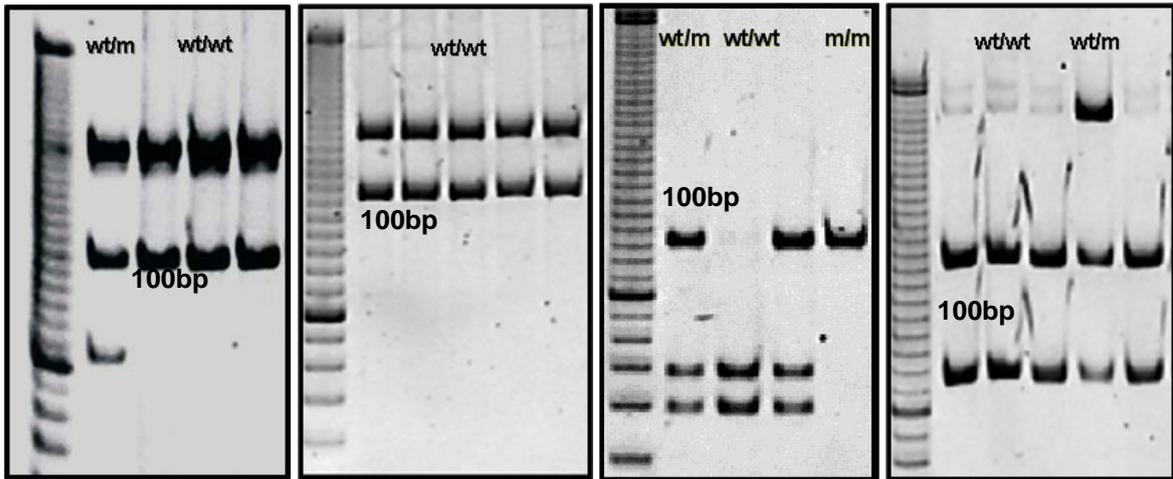


Fig. 9. Geles correspondientes al análisis por RFLPs de los cambios Glu50Gly, Ser86Cys, Ala140Asp y Ala236Val, respectivamente. El marcador de peso molecular utilizado ha sido el correspondiente a 330 bp.

Para analizar las frecuencias de las deleciones fue necesario llevar a cabo PCR radioactivas utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente, con la adición de 3  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -33P] dATP a cada reacción. Los fragmentos amplificados, con el isótopo radioactivo incorporado correspondiente a la región del exón/ intrón 1 y del exón 4, se separaron en un gel de acrilamida al 6 %, a 90 W entre 2,5-5 h. Posteriormente se autoradiografiaron y analizaron (fig. 10).

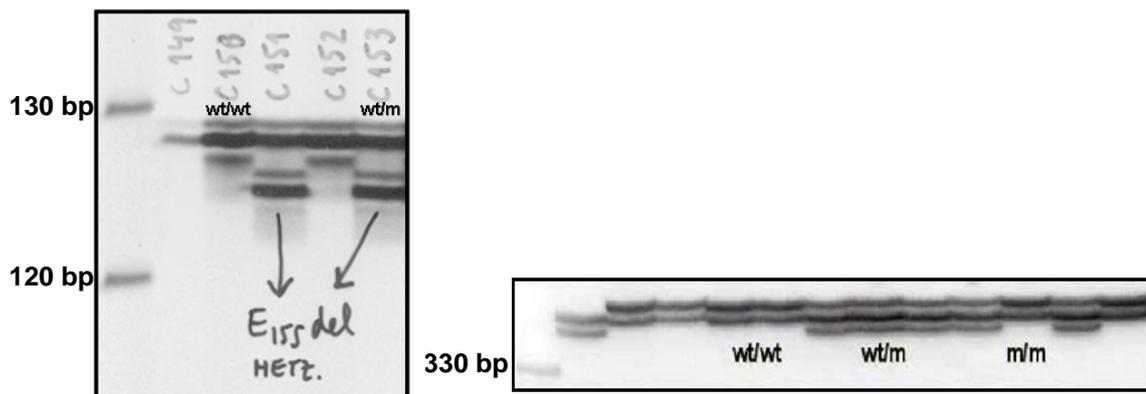


Fig. 10. Patrones de bandas obtenidos por autoradiografía para las deleciones Glu155 y GGC, respectivamente.

El cambio Glu208Lys se analizó mediante una reacción de PCR específica de alelo en tiempo real, con cebadores TrueSNP y detección por SYBR Green en LightCycler. Los tres cebadores utilizados se diseñaron y obtuvieron en Proligo, Francia ([www.proligo.com](http://www.proligo.com)). Consistían de un reverso común y dos directos, con un nucleótido modificado (LNA) en el extremo 3' (Proligo Sigma, USA), que a su vez difieren únicamente en la base de ese extremo, siendo uno específico para el alelo salvaje y el otro para la variante (tabla 4). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el *kit* LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

El programa de PCR se introduce en un ordenador acoplado al Light Cycler y se basa en cuatro fases distintas que corresponden a desnaturalización, amplificación, disociación y enfriamiento. Por cada muestra se realizan dos reacciones de PCR, siendo cada una específica para cada pareja de cebadores. El programa de PCR que se ha utilizado para el análisis del genotipo Glu208Lys está brevemente descrito en la tabla 5.

Tabla 5. Programa de PCR utilizando en el *Light Cycler*

Programa (nº ciclos)	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	T transición (°C/s)	Detección fluorescencia
<b>Desnaturalización (1 ciclo)</b>	1	95	600	20	Ninguna
<b>Amplificación (45 ciclos)</b>	1 (desnat.)	95	10	20	Ninguna
	2 (hibrid.)	60	10	20	Ninguna
	3 (ext.)	72	12	20	<b>Única</b>
<b>Curva de disociación (1 ciclo)</b>	1	95	0	20	Ninguna
	2	55	15	20	Ninguna
	3	90	0	0.1	<b>Continua</b>
<b>Enfriamiento (1 ciclo)</b>	1	40	30	20	Ninguna

El genotipado de cada muestra se hizo a partir del análisis de las curvas de disociación de las reacciones para cada alelo. Las muestras de los homocigotos salvajes o mutantes sólo amplificaron en una única reacción (uno de los alelos), mientras que las muestras de los heterocigotos amplificaron en las dos reacciones (correspondiente al alelo normal y al mutante), generando picos dobles a igual temperatura (60 °C). El 10 % de los productos

obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 2 %, con el objetivo de comprobar la inexistencia de errores en el genotipado (fig. 11).

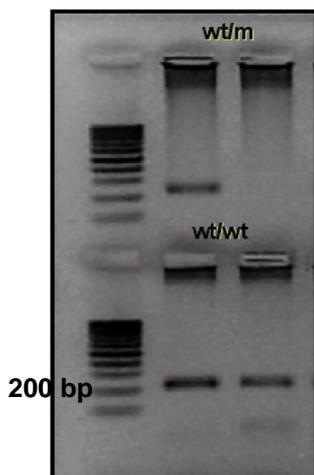


Fig. 11. Análisis del polimorfismo Glu208Lys. Resultados de la RT alelo específica (comprobación de los productos de la amplificación en gel de agarosa).

Finalmente, las frecuencias de las variantes Glu50Gly, Ala140Asp, E155del, Glu208Lys y Ala236Val también se analizaron en los 206 trabajadores de la industria del cobre, sumando así un total de 488 individuos genotipados para estos cambios. Con el objetivo de relacionar el perfil de excreción de estos 206 individuos con la actividad enzimática de las variantes polimórficas, cuya actividad difería de la observada para la proteína normal, se amplificaron los exones 4 y 6 del gen *GSTO1* y se enviaron a secuenciar al servicio de MACROGEN Inc. (Corea del Sur). Los cebadores utilizados para la secuenciación del exón 6 fueron los mismos que los utilizados para el análisis del polimorfismo Ala236Val, mientras que la secuenciación del exón 4 se llevó a cabo amplificando, a una temperatura de hibridación de 55 °C, un fragmento de 312 bp con los cebadores 5'CTAGAACACCTTGACACCAG3' y 5'CCTTAAAGTGACTTGGAAAGTGG 3'. Por otro lado, el análisis de la frecuencia de Glu50Gly se hizo mediante la técnica de RFLPs.

La segunda parte del estudio consistió en un cribado del gen *GSTO2* y posterior genotipado de una de las variantes. Los exones y partes flanqueantes de *GSTO2* se secuenciaron utilizando DNA genómico de 20 atacameños y 20 europeos. Los cebadores y las condiciones específicas de amplificación se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Cebadores y condiciones de amplificación para diferentes regiones de *GSTO2*

Región estudiada	Secuencia de cebadores 5' a 3'	Condiciones de amplificación	Fragmentos
Exón 1	Ex1O2 F: CCAGAGCGCAGCTGTTTCT Ex1O2 R: CCCAGATCCCAAGATGGCT	58 °C hibridación	330 bp
Exón 2	Ex2O2 F: ACAGCCATCTTGGGATCTG Ex2O2 R: GCCCCTTGTA AAAAGCTGAG	58 °C hibridación	306 bp
Exón 3	Ex3O2 F: GCTTCTGCTTTCAAGAAGAG Ex3O2 R: TCCTGAGGATCACATGGTAT	58 °C hibridación	428 bp
Exón 4	Ex4O2 F: CCTACTGAGAACCGGAACCA Ex4O2 R: TGCCTAGCTTCCTCCACTGT	60 °C hibridación	330 bp
Exón 5	Ex5O2 F: GTTCTCCCTCTCTGGGAATT Ex5O2 R: GGCATGCAGACCATCTTAAC	58 °C hibridación	284 bp
Exón 6	Ex6O2 F: CCCCTTTCCTGATGCCTAC Ex6O2 R: AAGCAGCAGTAGCAGCAGC	60 °C hibridación	405 bp

Las PCRs se llevaron a cabo con un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 40 s, 58-60 °C por 40 s, 72 °C por 40 s y un paso de extensión final a 72 °C durante 3 min. Los productos se purificaron utilizando el kit NucleoSpin (Macherey-Nagel, Alemania) y se enviaron a secuenciar a MACROGEN Inc. (Corea del Sur).

El genotipado de la variante Asn142Asp en los tres grupos étnicos se hizo mediante PCR-RFLP. Se amplificó un fragmento de 185 bp utilizando los cebadores (F: 5' AGGCAGAACAGGAACTGGAA 3' y R: 5' GAGGGACCCCTTTTGTACC 3') descritos por Mahatta *et al.* (2006). El producto de PCR (5 µL) se digirió toda la noche a 37 °C con 2 U de MBOI (New England Biolabs, UK) en un volumen de 20 µL, se separó por electroforesis en un gel de acrilamida al 12 %, teñido con SYBR Gold (Invitrogen) y se fotografió con luz ultravioleta. En el caso de los homocigotos normales se esperaba el producto de 185 bp sin digerir, mientras que se esperaba un patrón de bandas de 122 y 63 bp en los homocigotos mutantes, y fragmentos de 185, 122 y 63 bp, en los individuos

heterocigotos. Además, también se genotiparon los 207 trabajadores mineros para este mismo cambio.

#### **3.2.4. Análisis estadístico**

Las frecuencias genotípicas, las frecuencias alélicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg se calcularon usando el programa estadístico HELIXTree para Windows (Golden Helix INC, USA, <http://www.goldenhelix.com>) y/o el SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPStats/>). La frecuencia de los haplotipos se analizó mediante el algoritmo EM (expectación-maximización), aplicando un intervalo de confianza del 99 %. El desequilibrio de ligamiento (LD) se calculó utilizando el parámetro R de correlación entre los dos marcadores estudiados.

Para comparar las diferencias de frecuencias (alélicas y genotípicas), así como la distribución de los haplotipos entre los grupos, se utilizó el programa estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, versión 14.0).

Las asociaciones entre genotipos, haplotipos y el perfil de excreción de arsénico en orina se analizaron mediante regresión lineal utilizando el programa SNPstats. También se llevaron a cabo análisis de regresión lineal ajustados a la edad.

En todos los análisis estadísticos se escogió un intervalo de confianza del 95 %. Las diferencias observadas entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuándo presentaban valores de  $P < 0,05$ .

#### **3.2.5. Mutagénesis dirigida**

En este estudio, se obtuvieron cDNAs codificantes para las enzimas GSTO1 (variantes 236V y 50Gli) mediante mutagénesis dirigida, utilizando el QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA). Los productos mutados se comprobaron mediante secuenciación.

El principio de la técnica utilizada consiste en tener un vector de doble cadena conteniendo el inserto de interés y una pareja de cebadores complementaria a las cadenas opuestas del vector con el cambio de base deseado (cambio de aminoácido, delección o inserción). Una vez que se tiene el DNA molde con el inserto de interés, el paso siguiente es realizar una

PCR utilizando cebadores que contengan la mutación deseada. Cabe destacar que ambas parejas de cebadores (aproximadamente entre 25 y 45 pares de bases) deben contener la mutación deseada y tener la misma secuencia en cadenas opuestas. Utilizando una DNA polimerasa con una alta fidelidad de replicación (*Pfu Turbo* DNA polimerasa), se garantiza que se amplifiquen los oligonucleótidos mutantes sin errores por desplazamiento.

La incorporación de los oligonucleótidos mutantes de los cebadores genera un plásmido con la mutación deseada. El producto de PCR obtenido se digiere con una endonucleasa específica para DNA metilado o hemimetilado (Dpn I), eliminando así el DNA parental no mutado. Una vez que el DNA sintetizado con la mutación de interés se ha seleccionado, el paso siguiente consistió en la transformación en células competentes.

Se realizaron cultivos celulares, extracción del DNA plasmídico (*minipreps*) y posterior verificación del inserto a través de secuenciación. Una vez comprobado que el inserto de interés contenía la mutación deseada, el paso siguiente ha sido la expresión y purificación de la proteína.

### **3.2.6. Expresión y purificación de proteínas**

La expresión de la proteína normal y de la variante 50Gly se llevó a cabo utilizando el plásmido pQE30 (Qiagen, Hilden, Alemania), transfectado en la cepa M15-rep4 de *E. coli*. Este vector genera una proteína recombinante con 6 residuos de histidina en la posición N-terminal. Por otro lado, la expresión de la variante 236Val se ha realizado a través del plásmido pHUE transfectado en la cepa de *E. coli* BL21(DE3). Esta variante tiene una fusión N-terminal con una ubiquitina marcada con un dominio de poli-histidina, lo que facilita la posterior etapa de purificación. El paso siguiente fue eliminar el dominio de la ubiquitina a través de una ubiquitinasa.

Los cultivos de *E. coli* crecieron a 37 °C durante toda la noche en medio *Luria Broth* (LB), suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 30 µg/mL de kanamicina. Se usó una dilución 1:100 del cultivo de noche para inocular 2 L de cultivos, que crecían a 37 °C durante 2 h, tiempo aproximado en el cual los cultivos celulares alcanzan una densidad óptica (OD) de 600 nm, que es el punto en que se tiene la mayor tasa de proliferación bacteriana.

La expresión de las proteínas se induce mediante la adición de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido) a una concentración final de 0,1 mM. Después de 3 h, se finaliza el crecimiento celular centrifugando los cultivos (7 °C, 20 min, 5000 rpm) y congelando el sedimento celular. El paso siguiente es el de la lisis celular y purificación de las proteínas utilizando una matriz específica de níquel-agarosa.

El principio de esta técnica de purificación es que existe una interacción entre la cola terminal de histidina, que tiene nuestra proteína, y la matriz de agarosa Ni - NTA (níquel - ácido nitrilo acético), que es un agente quelante. El NTA ocupa 4 de los 6 sitios que se ligan al ión de Ni, dejando así dos de los sitios libres, que a su vez interaccionan con la región N-terminal de 6 histidinas. La interacción de los iones de este agente quelante es muy estable en una gran variedad de condiciones, incluso en condiciones de lavados astringentes. Se utiliza una columna de purificación por gravedad de flujo, con una capacidad de unión de 5 a 10 mg/mL. Cabe destacar que bajas concentraciones de imidazol (10-20 mM) en los tampones de lisis y lavados minimizan las interacciones inespecíficas y reducen la cantidad de proteínas contaminantes. El imidazol es una parte de la estructura de la histidina y, por lo tanto, a bajas concentraciones posee una alta afinidad con los 6 residuos de histidina, permitiendo así una unión eficiente con la cola de histidina presente en la región N-terminal de la proteína a ser purificada, y evitando así uniones con proteínas inespecíficas.

El proceso de lisis se inicia resuspendiendo los sedimentos celulares en tampón A (tampón fosfato, NaCl, imidazol) a 4 °C y realizando un tratamiento durante 1 h con lisoenzima (en hielo). Posteriormente, las células se sonicán y los restos celulares se remueven por centrifugación (10.000 x g) a 4 °C, durante 15 min. La etapa de purificación se inicia con la incubación del lisado celular con una matriz de Ni, agarosa y etanol, previamente equilibrada con tampón A durante toda la noche. Los pasos siguientes se realizan a temperatura ambiente y consisten en sucesivos lavados con tampón A (para eliminar proteínas endógenas que puedan interaccionar con la matriz de Ni), seguidos por la recuperación de la matriz de Ni-agarosa a través de centrifugación y posteriores lavados con el buffer de elución (imidazol, pH y EDTA), que es capaz de disociar la interacción que existe entre la proteína y la matriz de Ni.

El paso siguiente es reunir todas las fracciones resultantes de cada uno de los lavados con el buffer de elución (extractos proteicos ya purificados) en una bolsa de plástico específica

para la diálisis. El proceso de diálisis consiste en sumergir la bolsa sellada en un buffer conteniendo Tris/ HCl 20 mM, NaCl 60 mM, con pH = 8,0 a 4 °C. Después del segundo día de incubación, las proteínas ya pueden almacenarse y/o utilizarse en los ensayos enzimáticos. Las diferencias en las etapas de expresión y purificación de la variante 236Val se encuentran descritas de forma detallada en Baker *et al.* (2005).

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo por el método de Lowry. Las proteínas se diluyeron o concentraron hasta llegar a alcanzar una concentración de 0,5 mg/ mL. Posteriormente se hicieron alícuotas que se mantuvieron a -20 °C.

### 3.2.7. Ensayos enzimáticos

La actividad de las variantes se evaluó para un amplio rango de sustratos y también se analizó el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. Todos los ensayos enzimáticos se realizaron con réplicas. Se compararon los resultados obtenidos para cada variante ensayada con los correspondientes a los de la proteína normal. Ambas formas, proteína normal y variante, se expresaron, purificaron y ensayaron de forma simultánea. Se ensayó la actividad de estas proteínas para las funciones tioltransferasa y deshidroascorbato reductasa, que son compartidas por todas las GSTs, y para la actividad MMA<sup>V</sup> reductasa, DMA<sup>V</sup> reductasa y fenacilglutation reductasa, que son actividades específicas de GSTO1.

De manera general, los ensayos enzimáticos requieren de un periodo previo de incubación, en el cual se forma un complejo entre el sustrato (HEADS, MMA<sup>V</sup> o DMA<sup>V</sup>) y la GSH, que, de forma espontánea, se unen por un puente disulfuro. La reacción enzimática empieza cuando se añade la proteína a ensayar, que a su vez, oxida el glutation y modifica el sustrato. El glutation oxidado vuelve a su estado reducido vía glutation reductasa, utilizando el poder reductor del NADPH. En realidad, el principio de los ensayos se basa en medir mediante un espectrofotómetro el coeficiente de extinción del NADPH, al pasar de un estado reducido a oxidado.

De forma más específica, la reducción enzimática del MMA<sup>V</sup> (metilarsenato disódico, Chem Service West Chester PA, USA) y del DMA<sup>V</sup> (cacodilato de sodio, BDH Chemical Poole, England) se midió utilizando un volumen final de reacción de 1 mL, conteniendo Bis-Tris 0,1 M pH 5,5, GSH 10 mM, NADPH 0,3 mM, EDTA 5 mM, 4 unidades de

glutation reductasa,  $As^V$ ,  $MMA^V$  o  $DMA^V$  a una concentración final de 10 mM como sustrato. La reacción se preincuba durante 10 min a 30 °C. Una vez añadida la proteína a ensayar, las reacciones se miden durante 3 min y los valores obtenidos en el primer minuto de reacción son los utilizados en el cálculo de la actividad.

Para el análisis de la actividad tiol transferasa se ha utilizando HEDS (2-hidroxietyl disulfuro) como sustrato. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 1 mL conteniendo 0,3 mM NADPH, 1 mM GSH, 4 unidades de glutacion reductasa, 0,1 mg/mL BSA, 1,5 mM EDTA, 0,75 mM HEDS y 0,1 M Tris HCl pH 8,0. Después de 3 min de incubación a 30 °C, se inicia la reacción con la adición de 25 µg de proteína. La actividad tiol transferasa y también la actividad arsénico reductasa ( $As^V$ ,  $MMA^V$  y  $DMA^V$ ) se midieron a una longitud de onda de 340 nm, utilizando un coeficiente de extinción del NADPH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Los ensayos utilizados para la medida de la actividad deshidroascorbato reductasa se llevaron a cabo en reacciones conteniendo 200 mM de fosfato de sodio; 3 mM de GSH; 1,5 mM de deshidroascorbato, pH 6,85 (DHA), en un volumen final de 1 mL. Para cada reacción se utiliza entre 1,5 y 4 µg de proteína, y las reacciones se inician añadiendo el DHA. La tasa de cambio de la absorbancia a 265 nm se mide a 30 °C por 2 min. Los ensayos se realizan por triplicado y el valor de la tasa de absorción en ausencia de proteína se sustrae de las medidas sucesivas. Cabe resaltar que el DHA se prepara inmediatamente antes de su uso y se utiliza durante un período máximo de 3 h, de acuerdo con el protocolo anteriormente descrito. La actividad DHA es calcula utilizando un coeficiente de extinción de  $14,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

La última actividad enzimática en ensayarse fue la fenacilglutation reductasa, que ha sido recientemente descrita como específica para GSTO1. Esta actividad se determinó con un espectrofotómetro utilizando S-(fenacil)glutation, S-(2',4'-diclorofenacil)glutation y S-(4'-nitrofenacil)glutation como sustratos, a longitudes de onda de 271, 276 y 305 nm, respectivamente. Las reacciones estaban compuestas de 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,5 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol y 0,5 mM de fenacilglutation como sustrato. Las tasas de absorbancia (mM) utilizadas para los cálculos de las actividades S-(fenacil)glutation, S-(2',4'-diclorofenacil)glutation y S-(4'-nitrofenacil)glutation fueron -1,89 OD, -1,48 OD y -1,12 OD, respectivamente. Los sustratos S-(fenacil)glutation y S-(2',4'-diclorofenacil)

glutathion se prepararon según la metodología descrita (Board *et al.*, 2007). El S-(4'-nitrofenacil)glutathion se preparó de forma similar, a partir de 2-bromo-4'-nitroacetofenona (Aldrich). Para la determinación de las constantes de cinética, las tasas se midieron por triplicado utilizando 5 concentraciones de S-(4'-nitrofenacil) glutathion, comprendidas entre 0,04 y 0,4 mM. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menton utilizando el programa MacCurveFit 1.5 (Kevin Raner Software, Mt Waverly, Australia). Cabe destacar que los resultados obtenidos para la variante Glu50Gly no incluyen el análisis de la actividad fenacilglutathion reductasa, ya que esta capacidad catalítica ha sido descubierta después de la caracterización enzimática de esta variante.

Finalmente, la estabilidad de la variante Glu50Gly se midió a través de la pérdida de actividad tioltransferasa después de someterse a un choque térmico de 60 °C durante 45 min. Por otro lado, la estabilidad de la variante Ala236Val se analizó para la actividad S-(4'-nitrofenacil)glutathion, incubándose a 45 °C hasta el tiempo máximo de 1 h. En este ensayo, las muestras se colocan en hielo después del tratamiento de calor y, antes de realizar los ensayos, se centrifugan para evitar que la proteína esté precipitada. Los resultados corresponden a una media de al menos tres experimentos, con una variación inferior a 10 %.

### **Parte III: Estudios *in vitro***

#### **3.3.1. Cultivos celulares y compuestos utilizados**

Todos los ensayos se llevaron a cabo con líneas celulares obtenidas de fibroblastos humanos. Las células MRC5, fibroblastos de pulmón inmortalizados con SV40, se cultivaron en medio RPM1 1640 (Gibco-BRL, USA), suplementado con 1 % de antibióticos (penicilina y estreptomicina) y 15 % de suero bovino fetal inactivado (FCS).

Las células de vejiga SW800 y RT4, los fibroblastos 293T (células de riñón de embrión humano inmortalizadas por la incorporación del gen ADE1A del adenovirus 5) y los hepatocitos HepG2, crecieron en medio *Dulbecco modified Eagle* (DMEM)-F12 suplementado con 10 % de FCS y 1 % de antibióticos a 37 °C en un incubador con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad. Las líneas celulares SW800 y RT4 se obtuvieron del Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona.

Los compuestos químicos utilizados en el estudio fueron suministrados por Sigma (St Louis, MO, USA): arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ; AsIII); arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; As<sup>V</sup>); trióxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ; ATO); ácido monomethylarsónico ( $\text{CH}_3\text{AsO}_3 \cdot \text{Na}$ ; MMA<sup>V</sup>); ácido dimethylarsínico ( $(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}$ ; DMA<sup>V</sup>), *N*-Acetil-L-cisteína (NAC), actinomicina D (ACTD), cicloheximida (CHX) y timidina (T). Todas las soluciones de trabajo se prepararon inmediatamente antes de su uso.

### 3.3.2. Ensayos de toxicidad

Las pruebas de toxicidad se llevaron a cabo utilizando el ensayo de proliferación celular XTT (Cell Proliferation Kit II, Roche, Basel, Switzerland). Este ensayo se trata de un método colorimétrico, no radiactivo, que posibilita una cuantificación espectrofotométrica del crecimiento y de la viabilidad celular, y se usa tanto como una medida de proliferación celular como de citotoxicidad. El principio del ensayo se basa en la metabolización del XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5sulfenil)-2H-tetrazolio-5-carboxianilida], a cristales de formazán, por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de células metabólicamente activas. Utilizando un lector de placas ELISA se puede cuantificar la formación del formazán a través de las medidas de absorbancia e indirectamente, calcular el porcentaje de células viables en los tratamientos, en comparación con los resultados obtenidos en los controles.

Se sembraron los cultivos celulares en crecimiento exponencial en placas de 96 pocillos (1.000 células/pocillo para MRC5 y 2.000 células/pocillo, cuando se trataba de las demás líneas celulares) en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo por pocillo. Antes de tratarse con los diferentes compuestos de arsénico, las células se incubaron durante un período de 24 h con y sin inhibidor de oxidación (NAC). En este último caso, una vez sembradas las placas, se espera un período 4 h antes de efectuar el pre-tratamiento con 5 mM de NAC. Pasadas 24 h, se realizaron los tratamientos con arsénico y 20 h después, se añadió el reactivo XTT en cada pocillo a una concentración final de 0,3 mg/mL durante 4 h, siguiendo las instrucciones del ensayo.

En el paso siguiente, se efectúa la lectura de las placas utilizando un microlector de placas ELISA. Los valores de densidad óptica se midieron a 450 nm utilizando la longitud de 650 nm como referencia. Se realizaron gráficas con los valores de absorbancia vs concentración, llevando a cabo un análisis de regresión. El parámetro de citotoxicidad  $\text{CI}_{50}$

se calculó a partir de la ecuación de regresión y se consideraron válidos los experimentos con un coeficiente  $r \geq 0,8$ .

Al menos se llevaron a cabo 3 experimentos independientes para cada concentración y compuesto evaluado. En cada experimento se ha medido, al menos, la absorbancia de 8 pocillos por concentración. Todas las comparaciones se hicieron entre células controles y tratadas de una misma placa.

### **3.3.3. Bloqueo del ciclo celular, de la transcripción y de la traducción**

El bloqueo del ciclo celular se hizo mediante doble tratamiento con timidina (T) a una concentración final de 2 mM. Así, cultivos celulares de MRC5 con aproximadamente 40% de confluencia se trataron durante 19 h. El medio de cultivo se elimina y las células se lavan con PBS 1X. Se adiciona nuevo medio y se mantienen las células por un tiempo de 9 h. Se realiza un segundo tratamiento (también a una concentración final de 2 mM) durante un período de 16 h y, pasado este tiempo, se remueve el tratamiento lavando las células con PBS 1X y añadiendo nuevo medio de cultivo. Las células, que ya están sincronizadas en fase G1 se colectan en el tiempo 0 (fin del tratamiento), y después de transcurridas 4, 8, 12 y 24 h.

El bloqueo de la transcripción se hizo tratando las células con actinomicina D (ACTD), un inhibidor de la RNA polimerasa II, a una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por otro lado, el bloqueo de la traducción se hizo tratando las células con ciclohexamida (CHX) a una concentración final de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las células se colectaron en el tiempo 0 y en las siguientes 2, 4, 8 y 24 h del inicio de los tratamientos. También se hicieron tratamientos simultáneos con ACTD/ CHX, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Se comprobaron los cambios de expresión (durante las distintas fases del ciclo celular) y las vías de regulación de GSTO1, sometiendo todos los extractos celulares a la técnica de *Western Blot*.

### **3.3.4. Extracción de proteínas y *Western Blot***

Los cultivos se lavaron 3 veces con PBS frío y se resuspendieron en un tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 % Triton X-100; 1 mM fenil metilsulfonil

fluoruro, 1 mg/ mL de leupeptina, pepstatina y antipaína (inhibidores de proteasas; Complete Mini EDTA-free, Roche, Alemania), 1 mM de ortovanadato de sodio.

La concentración de proteínas se midió utilizando el método de *Coomassie Blue* de Bradford. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 1 mL, utilizando 0,2 mL del reactivo de Bradford (Bio-RAD *protein assay*, Alemania). Las muestras se analizaron con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y la cantidad de proteína de cada muestra se midió teniendo en cuenta los valores obtenidos de una recta patrón calculada a partir de concentraciones conocidas de BSA.

### **Western Blot**

Se desnaturalizaron las proteínas de cada lisado celular (50 mg) utilizando un tampón de carga conteniendo 10 % SDS y 1 %  $\beta$ -mercaptoetanol, y después se hirvieron a 100 °C durante 5 min. A continuación se separaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8 %, en condiciones desnaturalizantes, mediante electroforesis a 150 V.

La transferencia se hizo a una membrana de nitrocelulosa (*Trans-Blot Transfer Medium - Pure Nitrocellulose Membrane*, Bio-RAD), durante 2 h a 100 V. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó utilizando 5 % de leche desnatada en polvo y se hizo la incubación con los anticuerpos primarios durante toda la noche.

Los anticuerpos primarios utilizados en el estudio fueron anti-GAPDH (1:200) y anti-PARP (1:500), suministrados por Santa Cruz Biotechnology Inc., California, EEUU, y GSTO1 y GSTO2 (1:500) gentilmente cedidos por el Dr. P. Board (John Curtin School of Medical Research, Canberra, Australia).

La detección de los anticuerpos primarios se hizo utilizando anticuerpos secundarios anti-conejo (1:5000) o anti-ratón (1:2500) conjugados con peroxidasa (Sigma), y posteriormente se visualizaron por autoradiografía utilizando un sistema de quimioluminiscencia (Chemiluminescence kit Immun-Star HRP, BioRAD).

Las membranas se reutilizaron retirando los anticuerpos mediante incubación, después de un lavado previo, a 50 °C, durante 30 min en 40 mL de tampón conteniendo 62,5 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 2 % SDS y 280  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. El procedimiento siguiente consistió en dos lavados, un nuevo bloqueo e incubación con diferentes anticuerpos

primarios, incluyendo anti-GADPH (Santa Cruz) o anti  $\beta$ -actina (Oncogene Science), como controles de carga.

### 3.3.5. RNA de interferencia

El protocolo que utiliza RNA de interferencia es un proceso por lo cual un RNA de simple o doble cadena induce una degradación postranscripcional de sus transcritos homólogos. El método consiste en exponer las células a secuencias específicas de RNA de cadena simple o doble, a través de agentes de transfección. Los agentes de transfección consisten en soluciones optimizadas que permiten que las moléculas de DNA o RNA sean absorbidas por células en cultivo.

Cuando se trata de sistemas celulares de mamíferos, las secuencias de RNA se procesan en transcritos de 21-23 bp conocidos como RNAs interferentes cortos (siRNA). Estos transcritos forman un complejo silenciador (RISC- *RNA induced silencing complex*), cuyas funciones son la degradación de sus secuencias homólogas y, consecuentemente, la pérdida de la expresión de la proteína correspondiente.

Se diseñaron tres diferentes siRNAs que correspondían a secuencias homólogas de los genes *GSTO1* y *GSTO2* (Sigma- Proligo, Francia):

UGCAGUGGUGCAAUCAUGGdTdT;

CAUGGCUCACUGCAACCUdTdT;

GCCACUGUACUCCAGUCUGdTdT.

Ninguna de las tres secuencias presentó homologías significativas con otras regiones codificantes del genoma. Cumpliendo estos mismos criterios de selección, se diseñó una secuencia de RNA aleatoria (scRNA) que se usó como control negativo de las transfecciones. Las transfecciones se llevaron a cabo con células MRC5 (60-70 % de confluencia), en un medio de cultivo libre de suero, utilizando *Lipoaffectamine 2000* (Invitrogen). La cuantificación de la reducción de la expresión de los genes *GSTO1* y *GSTO2* se hizo mediante *Western Blot*.

Las condiciones experimentales que llevaron a una mayor tasa de reducción de la expresión de *GSTO1*, resultaron ser transfecciones dobles en intervalos de tiempo de 24 h, utilizando una concentración final de la mezcla conteniendo las tres secuencias de siRNAs

homólogas a los genes *GSTO1* y *GSTO2* y, en el caso de los controles, con 50 ng/mL de scRNA. Una vez establecidas estas condiciones, el paso siguiente fue ensayar el efecto de esta reducción sobre la toxicidad de diferentes compuestos de arsénico.

Se sembraron placas de 96 pocillos con células MRC5, con 1.000 células por cada pocillo en un volumen de 100  $\mu$ L y, después de un período de 24 h de incubación, se dio inicio al protocolo de transfección. Posteriormente a la segunda transfección, y una vez reemplazado el medio completo a las células, se realizaron los ensayos de toxicidad utilizando dos concentraciones de cada uno de los compuestos ensayados (tabla 7). Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo según la metodología descrita anteriormente.

Tabla 7. Protocolo utilizado para los ensayos de toxicidad en células controles y tratadas con RNAi

1° día	2° día	3° día	4° día
Las células se siembran en placas de 96 pocillos	1° transfección: 50 ng/mL de siRNAs/ scRNA; restablecimiento del medio de cultivo completo	2° transfección: 50 ng/mL de siRNAs/ scRNA; restablecimiento del medio de cultivo completo y tratamiento con arsénico	Ensayo de toxicidad (XTT)

## 4. RESULTADOS

### Parte I. Estudios de biomonitorización

#### 4.1. Descriptiva de las poblaciones de trabajadores expuestos al arsénico

El análisis descriptivo de la población estudiada se realizó a partir de los datos obtenidos en las encuestas. En este análisis, se evaluaron los posibles factores que pueden ejercer alguna influencia en la inducción de daño genético y los resultados obtenidos se compararon entre los tres grupos. Como posibles factores de confusión a tener en cuenta se consideraron los siguientes: la edad, los años de exposición al arsénico, el consumo de alcohol, té, café y el hábito de fumar. Además, también se consideró la incidencia de cáncer en la familia, por ser un posible factor de susceptibilidad al daño genético inducido por la exposición a agentes genotóxicos. Por otro lado, las variables referentes al consumo de pescado y de marisco, aunque teóricamente son importantes factores de confusión en la evaluación de los niveles de arsénico, finalmente se descartaron del análisis, debido a que tal consumo (recogido en la encuesta) es poco relevante en el caso de nuestro estudio. En la tabla 8, se resume esta información.

Tabla 8. Análisis descriptivo de las poblaciones

	Expuestos (a)	Control interno (b)	Control externo (c)
Nº de individuos	105	52	50
As total en orina ( $\mu\text{g/L}$ )	136,01 $\pm$ 10,18 *** <sup>b,c</sup>	63,30 $\pm$ 4,97 *** <sup>a,c</sup>	23,65 $\pm$ 3,45
Años de exposición $\pm$ EE	16,96 $\pm$ 0,69 *** <sup>b,c</sup>	24,94 $\pm$ 1,04 *** <sup>a,c</sup>	14,03 $\pm$ 1,32
Edad $\pm$ EE	46,20 $\pm$ 0,60 *** <sup>b,c</sup>	51,85 $\pm$ 0,92 *** <sup>c</sup>	40,74 $\pm$ 1,32
Alcohol (g/sem)	72,91 $\pm$ 7,86 * <sup>b,c</sup>	50,33 $\pm$ 7,55	43,57 $\pm$ 6,15
No fumadores (%)	38,1	50,0	38,0
Ex fumadores (%)	14,3	36,5	18,0
Fumadores (%)	47,6 *** <sup>b</sup>	13,5 *** <sup>a,c</sup>	44,0
Nº de cigarrillos/ día $\pm$ EE	6,15 $\pm$ 0,64	3,67 $\pm$ 0,99	7,36 $\pm$ 1,47
Tazas té/ día $\pm$ EE	1,96 $\pm$ 0,12	2,15 $\pm$ 0,28	1,80 $\pm$ 0,22
Tazas café/ día $\pm$ EE	0,60 $\pm$ 0,14 *** <sup>c</sup>	0,50 $\pm$ 0,11 * <sup>c</sup>	1,10 $\pm$ 0,22
Familiares con cáncer (%)	38,6	39,2	55,1

EE: error estándar; g/sem: gramos/semana; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ;

Prueba de Mann-Whitney: As total en orina, años de exposición, consumo de alcohol, té, café y nº cigarrillos; t-test: edad; Chi-cuadrado: nº fumadores y casos de familiares con cáncer.

El grupo de expuestos con un total de 105 individuos posee un tamaño muestral equivalente al del grupo control (101 individuos), que a su vez está dividido en dos subgrupos (52 controles internos y 50 controles externos). Se observa que entre los tres grupos evaluados existen diferencias significativas en cuanto a la media de edad, los años de exposición, el número de individuos fumadores y el consumo de café y alcohol, mientras que no existen diferencias significativas en cuanto al consumo de té y a la frecuencia de familiares directos con cáncer.

Con relación a la edad, se constata que los controles internos tienen la media más alta, mientras que los controles externos tienen la media de edad más baja. Para todas las comparaciones realizadas se encuentran diferencias significativas ( $p < 0,001$ ).

Por otro lado, se observa que el menor porcentaje de fumadores se encuentra en el grupo de los controles internos, diferenciándose estadísticamente de ambos grupos controles ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, la media más alta de consumo de tabaco es inferior a 8 cigarrillos/día y, además, no existen diferencias significativas entre los grupos con relación a esta variable.

En lo que se refiere al consumo de alcohol, los individuos expuestos presentaron la media de consumo de alcohol más alta, seguidos de los controles internos y de los controles externos. No obstante, sólo se detectó una débil diferencia significativa entre el grupo de los expuestos y controles ( $p < 0,05$ ).

Los controles externos beben mayor cantidad de café, en comparación con los otros dos grupos ( $p < 0,05$  respecto a los controles internos, y  $p < 0,001$  en comparación con los expuestos). A pesar de que estas diferencias son significativas, la media del consumo de café es muy baja, incluso en el grupo de los controles externos (prácticamente 1 taza/día). Por otro lado, no hay diferencias significativas con relación al consumo de té entre los tres grupos, observándose un consumo medio de aproximadamente 2 tazas/día.

En cuanto a la frecuencia de familiares directos con cáncer, se observó que los controles externos presentan el mayor porcentaje (más del 50% de los individuos evaluados tienen casos de cáncer en la familia), aunque esta frecuencia no llega a ser estadísticamente diferente de la observada en los familiares de los individuos de los controles internos, ni tampoco de la frecuencia observada en el grupo de los expuestos.

Los años de exposición ha sido el último de los factores de confusión analizado y ha sido considerado como los años trabajados por cada grupo. Los controles internos son los que presentan la media referente al tiempo de exposición más alta, seguidos de los expuestos y de los controles internos. Se observaron diferencias estadísticas ( $p < 0,001$ ) en todas las comparaciones realizadas.

Con el objetivo de evaluar si los posibles factores de confusión están de alguna manera relacionados con la incidencia del daño (frecuencia de MN y/o SCE), se aplicaron algunos modelos estadísticos que se comentarán en los apartados correspondientes a los biomarcadores de daño citogenético.

#### 4.1.1. Biomarcadores de exposición: niveles de arsénico y de sus metabolitos en orina

En la tabla 9 se indican los niveles de arsénico determinados en orina. En general, los niveles de arsénico en orina, considerados como medida de exposición laboral al arsénico, se ajustan a lo esperado: son muy bajos en el grupo del control externo, mientras que en el grupo de los trabajadores del área de fundición (expuestos) los niveles son casi 6 veces superiores. Los trabajadores del control interno presentan un valor intermedio.

Tabla 9. Cuantificación del arsénico en orina

* Niveles de As	Expuestos	Controles internos	Controles externos
As total ( $\mu\text{g/L}$ )	136,01 $\pm$ 10,18 *** <sup>b,c</sup>	63,30 $\pm$ 4,97 *** <sup>a,c</sup>	23,65 $\pm$ 3,45
As-i (%)	19,11 $\pm$ 1,46	16,95 $\pm$ 1,49	13,44 $\pm$ 1,25
As org (%)	80,89 $\pm$ 1,46	83,05 $\pm$ 1,49	86,56 $\pm$ 1,25
% As <sup>V</sup>	5,22 $\pm$ 0,44 ** <sup>b</sup> , *** <sup>c</sup>	8,84 $\pm$ 1,03 ** <sup>a</sup> , *** <sup>c</sup>	1,30 $\pm$ 0,25
% As <sup>III</sup>	13,89 $\pm$ 1,54 ** <sup>c</sup>	8,10 $\pm$ 1,10 *** <sup>c</sup>	12,13 $\pm$ 1,21
% MMA	12,85 $\pm$ 0,62 *** <sup>b</sup> , * <sup>c</sup>	16,55 $\pm$ 0,88 *** <sup>a,c</sup>	10,33 $\pm$ 1,42
% DMA	68,04 $\pm$ 1,32 *** <sup>c</sup>	66,50 $\pm$ 1,58 *** <sup>c</sup>	76,23 $\pm$ 2,20
MMA/DMA	0,20 $\pm$ 0,01 *** <sup>b</sup> , ** <sup>c</sup>	0,26 $\pm$ 0,02 *** <sup>a,c</sup>	0,25 $\pm$ 0,10

\* Media  $\pm$  EE (error estándar); a- expuestos; b- control interno; c- control externo  
Prueba de Mann-Whitney; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

En general, los niveles normales de arsénico excretados en orina varían entre 40-50  $\mu\text{g}/\text{día}$  (Farmer y Johnson, 1990; Hughes, 2006). Teniendo en cuenta estos valores de referencia, se observa que sólo los controles externos presentan niveles de arsénico dentro de este rango considerado normal, demostrando así que los controles internos, aunque trabajan en el área administrativa, también están expuestos a concentraciones considerables de arsénico. Al analizar los niveles de arsénico total en los tres grupos evaluados, se puede detectar que existen diferencias claramente significativas ( $p < 0,001$ ) para todas las comparaciones realizadas.

La mayor parte del arsénico total se encuentra en forma orgánica, siendo la proporción relativa de este valor, inversa a la exposición total. De este modo, los controles externos poseen la mayor proporción de arsénico orgánico y los expuestos la menor proporción; siendo así que los mayores niveles de arsénico inorgánico se encuentran en los individuos expuestos. No obstante, las diferencias observadas no son muy grandes y no llegan a alcanzar significación estadística.

Al clasificar el arsénico inorgánico en las especies tri- y pentavalentes, se observa que los individuos expuestos presentan niveles porcentuales más elevados de  $\text{As}^{\text{III}}$ , mientras que se observan niveles más bajos entre los controles externos e internos, según este orden. Las diferencias observadas entre los expuestos, por lo que respecta a la forma inorgánica trivalente, son significativas en comparación con los otros dos grupos ( $p < 0,001$  en relación a los controles internos y  $p < 0,01$  cuando se comparan con los controles externos). En relación al patrón de excreción del  $\text{As}^{\text{V}}$ , se detectaron diferencias en los porcentajes excretados entre todos los grupos ( $p < 0,001$  en todas las comparaciones con los controles externos y  $p < 0,01$ , entre expuestos y controles internos).

Cuando se analizan los niveles de arsénico orgánico, teniendo en cuentas las formas metiladas (MMA y DMA), se detectan diferencias significativas entre los niveles de MMA en todos los grupos ( $p < 0,001$  entre los dos controles y entre el grupo expuesto respecto al control interno;  $p < 0,05$  entre expuestos respecto a controles externos). También se pudo confirmar que el DMA, producto final del metabolismo, ha sido la forma excretada de arsénico más abundante en todos los grupos, presentando valores considerados normales (60-80 %). El análisis de este parámetro, sólo reveló la existencia de diferencias en las comparaciones realizadas entre los controles externos y los otros dos grupos ( $p < 0,001$ ).

Por lo general, los niveles de arsénico inorgánico en orina se consideran como el reflejo de la parte no metabolizada de la dosis de arsénico ingerida o inhalada, mientras que las proporciones de MMA y DMA representan la primera y la segunda fase del proceso de metilación, respectivamente. Asimismo, para evaluar la capacidad de metabolización y de excreción del arsénico, se utiliza comúnmente el cociente MMA/DMA como un parámetro adicional en el análisis de exposición al arsénico.

Se observan diferencias significativas del cociente MMA/DMA tanto entre ambos controles ( $p < 0,001$ ), como entre el grupo expuesto respecto a los controles interno ( $p < 0,001$ ) y externo ( $p = 0,002$ ). Los controles internos presentan el valor MMA/DMA más alto, mientras que los controles externos tienen un valor intermedio, siendo los expuestos los que presentan el valor más bajo. Estos resultados indican que, en este estudio, parece no existir ninguna relación entre el nivel de exposición y la tasa de metabolización.

Cabe destacar que en este apartado y en el anterior (descriptiva de la población) se presentan los datos referentes a los individuos evaluados en el ensayo de MN. Los resultados descriptivos de la población, así como los niveles de arsénico en orina de los individuos evaluados en el ensayo de SCE son prácticamente los mismos, aunque se pueden observar pequeñas diferencias entre los valores de los parámetros analizados debido a la incorporación de un individuo más en el grupo de los controles internos (53) y a la ausencia de dos individuos en el grupo de los controles externos (48). A pesar de ello, las diferencias estadísticas se mantienen entre todos los parámetros y comparaciones realizadas.

#### **4.1.2. Biomarcadores de daño citogenético**

En el presente trabajo, la inducción de daño genético causada por la exposición laboral al arsénico se ha estimado mediante los ensayos de SCE y de MN en linfocitos y en células de la mucosa bucal. En general, aunque los mecanismos de formación de los SCE no estén todavía totalmente dilucidados, se obtienen correlaciones positivas entre los niveles de exposición a muchos genotóxicos químicos y el incremento de la frecuencia de SCE. En este contexto, los SCE vienen siendo utilizados tanto como biomarcadores de exposición como de daño genético.

La utilización de los ensayos de MN y de SCE constituye una herramienta muy útil en los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas. Así, además de caracterizarse por

ser técnicas relativamente simples y fiables, permiten obtener buenas correlaciones entre exposición y daño.

#### 4.1.2.1. Ensayo de SCE

Los resultados correspondientes a la frecuencia de SCE, de HFC y al PRI obtenidos en este estudio, para cada uno de los tres grupos, se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Daño genético en los tres grupos analizados

	Expuestos (a)	Controles internos (b)	Controles externos (c)
Media SCE $\pm$ EE	6,28 $\pm$ 0,09 ** <sup>c</sup>	6,21 $\pm$ 0,23	5,84 $\pm$ 0,14
Media HFC $\pm$ EE	2,21 $\pm$ 0,20 ** <sup>b,c</sup>	1,30 $\pm$ 0,24	1,20 $\pm$ 0,23
Media PRI $\pm$ EE	1,97 $\pm$ 0,02	1,92 $\pm$ 0,03 * <sup>c</sup>	2,05 $\pm$ 0,03

EE: error estándar; SCE y PRI: *t*-test; HFC: Prueba de Mann-Whitney;  
\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

La media de SCE en los tres grupos analizados oscila alrededor de 6 SCE/célula. A pesar de que estos valores medios de SCE se pueden considerar como normales, se ha podido verificar la existencia de una diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) entre la media de SCE del grupo de individuos expuestos y la del grupo de controles externos.

Por otro lado, a partir del análisis de la frecuencia de HFC se ha podido observar que existen diferencias significativas entre la frecuencia de HFC en el grupo de los expuestos y los dos controles. Los expuestos presentan los valores de HFC más elevados, siendo estadísticamente significativos en comparación con la frecuencia observada en los controles interno y externo ( $p = 0,008$  y  $p = 0,002$ ), respectivamente.

Otro parámetro que normalmente se utiliza en el análisis del daño citogenético es el PRI, que suele emplearse en la evaluación del ciclo celular y como medida de citotoxicidad (cuanto menor es el índice de proliferación, mayor es la citotoxicidad). En este estudio, se puede observar que el valor del PRI más pequeño corresponde a los controles internos, siendo estadísticamente distinto del valor presentado por los controles externos ( $p = 0,006$ ), que son los que presentan el valor más grande. El grupo de los individuos expuestos

presenta un valor de PRI intermedio, que no alcanza a ser estadísticamente distinto de los valores obtenidos en los dos controles.

Por lo tanto, la evaluación del daño genético a través del ensayo de SCE indica que los individuos más expuestos al arsénico (trabajadores del área de fundición) poseen un mayor incremento de la frecuencia de SCE y de HFC. Tal incremento podría revelar un potencial riesgo genotóxico debido a la exposición laboral al arsénico. No obstante, parece no haber ninguna correlación significativa entre el incremento del daño y los niveles totales de arsénico en orina (ver anexo 2.1).

Asimismo, para evaluar una posible correlación entre el daño y las diferencias en el perfil de excreción del arsénico, se analizaron las frecuencias de SCE y HFC, de acuerdo con este parámetro. Los individuos de cada uno de los grupos con patrones anormales de excreción de los principales metabolitos de arsénico en orina, se subdividieron entre los que presentaban patrones de excreción anormales, favorables o no. Cuando se compararon las frecuencias de SCE entre los individuos del grupo de los expuestos con distintos patrones de excreción, sólo hubo diferencias estadísticas entre los que presentaban un mayor porcentaje de MMA en orina (>20%) y aquellos con porcentajes de MMA inferiores al 10% ( $p < 0,05$ ). Para las frecuencias de HFC, sólo se encontraron diferencias entre los subgrupos de excreción de MMA ( $\chi^2 = 6,46$ ;  $p = 0,04$ ). En el grupo de los controles internos no se ha observado ninguna asociación significativa entre los perfiles de excreción y las frecuencias de SCE o HFC, mientras que en el grupo de los controles externos se detectó que los individuos con menor porcentaje de DMA (< 60%) en orina tenían menos SCE que los que excretaban niveles superiores al 80% ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar que, en ninguno de estos casos, los individuos del subgrupo que presentaba el perfil anormal de excreción desfavorable eran los que tenían un incremento de daño citogenético.

En la tabla 11 se describen los niveles de los metabolitos de arsénico obtenidos en cada uno de los subgrupos, así como las comparaciones entre medias de SCE y HFC entre los grupos con patrones similares de excreción. Prácticamente no se encuentran diferencias significativas entre las frecuencias de SCE y HFC, analizadas de acuerdo con patrones de excreción específicos. En el caso de los SCE, la única excepción ha sido en el caso de los individuos con un menor porcentaje de excreción de DMA (< 60%). En este subgrupo, los expuestos y los controles internos presentan una mayor frecuencia de SCE con relación a los controles externos ( $p < 0,001$  y  $p < 0,05$ , respectivamente). La frecuencia de HFC

también varió entre los grupos con un patrón de excreción de DMA inferior al 60% y entre los que presentaban un porcentaje de MMA inferior al 10% ( $p < 0,05$ ). A pesar de la variabilidad existente en el perfil de excreción del arsénico entre grupos e, incluso entre individuos de un mismo grupo, sólo se detectó una correlación positiva entre un perfil desfavorable de excreción y el incremento de la frecuencia de SCE o HFCs en las comparaciones realizadas entre grupos con patrón reducido de excreción de DMA.

Finalmente, y con el objetivo de evaluar el efecto que podrían ejercer los posibles factores de confusión sobre las frecuencias de SCE y de PRI (variables dependientes), se realizó un análisis de la varianza univariante. Cabe destacar que la frecuencia de HFCs no se pudo utilizar como variable dependiente en este análisis, por no cumplir los requisitos necesarios, ni poder adecuarse a los mismos (todas las tentativas de transformación de los datos fueron ineficaces). En otros estudios, en los cuales se analizó la distribución de los valores de las HFCs, también se observó un comportamiento similar (Hirsch *et al.*, 1992; Lazutka *et al.*, 1994).

En principio, los posibles factores de confusión se seleccionaron mediante las pruebas de los efectos entre sujetos, que demuestran la influencia que ejercen sobre la variable dependiente del estudio. Se partió de un análisis inicial en el que se incluyeron todos los factores y covariables obtenidos en la encuesta (edad, consumo de alcohol, tabaco, té y café, exposición al arsénico, años de exposición, familiares directos con cáncer, niveles de arsénico, cociente MMA/DMA) y se fueron eliminando los que estaban correlacionados entre sí y los que tenían una influencia despreciable.

Existen factores, como por ejemplo el total de individuos fumadores en los tres grupos, el consumo de tabaco (nº cigarrillos al día) y los años de fumador, que están muy correlacionados y, como explican el mismo efecto (consumo de tabaco) sólo se consideró uno de estos factores. En este caso fue la frecuencia de fumadores, por ser la variable que presentaba el nivel de significación más alto. Asimismo, se descartó la variable referente a los años de exposición y se utilizó únicamente la de la exposición. Por otro lado, para evitar los errores generados por el alto grado de correlación entre las variables referentes a los niveles de arsénico en orina, se hicieron análisis en los que se consideró separadamente cada una de ellas. De este modo, en el primer análisis se consideró a los SCE como variable dependiente y se incluyeron como covariables todos los factores, con excepción de los niveles de arsénico.

Tabla 11. Correlaciones entre perfil anormal de excreción del arsénico y frecuencias de SCE y HFCs

	% As-i			% MMA			% DMA		
	< 10%	> 30%	< 10%	> 20%	> 80%	< 60%			
Expuestos (a)									
N° individuos (%)	26,70	18,10	41,90	15,20	16,20	22,90			
SCE (media ± EE)	6,13 ± 0,17	6,75 ± 0,21	6,53 ± 0,14	5,84 ± 0,21	6,14 ± 0,22	6,67 ± 0,18 ***c			
HFCs (media ± EE)	2,15 ± 0,40	2,53 ± 0,49	2,63 ± 0,31 *	1,25 ± 0,35	2,41 ± 0,51	2,54 ± 0,41 *			
Controles internos (b)									
N° individuos (%)	< 10%	> 30%	< 10%	> 20%	> 80%	< 60%			
SCE (media ± EE)	21,20	9,60	13,50	26,90	11,50	25,00			
HFCs (media ± EE)	6,09 ± 0,20	5,93 ± 0,32	6,08 ± 0,34	5,69 ± 0,25	6,30 ± 0,30	6,10 ± 0,26 *c			
Controles externos (c)									
N° individuos (%)	0,71 ± 0,36	1,00 ± 0,71	1,25 ± 0,95	1,20 ± 0,39	1,50 ± 0,96	1,33 ± 0,28			
SCE (media ± EE)	< 10%	> 30%	< 10%	> 20%	> 80%	< 60%			
HFCs (media ± EE)	29,20	2,10	56,30	14,60	43,80	10,40			
SCE (media ± EE)	6,13 ± 0,23	5,38 ± 0,0	6,04 ± 0,18	5,51 ± 0,38	6,15 ± 0,18	4,98 ± 0,43			
HFCs (media ± EE)	1,33 ± 0,35	1,00 ± 0,0	1,54 ± 0,39	0,57 ± 0,20	1,28 ± 0,33	0,25 ± 0,25			

EE: error estándar; ANOVA: SCE; Prueba de Kruskal-Wallis:HFCs; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

\*En negrita, patrones desfavorables de excreción; todas las comparaciones están realizadas entre grupos con patrones similares de excreción.

En el análisis previo, el consumo de alcohol, la edad y el tabaco no influyeron de modo significativo sobre los valores de SCE. No obstante, teniendo en cuenta que la media de edad y el consumo de tabaco se consideran factores de confusión con relevancia estadística en el análisis de los SCE, éstos se incluyeron en el modelo final, visto que las medias de ambos factores de confusión diferían entre los tres grupos estudiados (Hertz-Picciotto *et al.*, 1992; Hirsch *et al.*, 1992; Lazutka *et al.*, 1994).

Por otro lado, el consumo de té y de café, a pesar de poder ejercer una influencia significativa en la frecuencia de SCE, en nuestro caso se eliminó del análisis final, debido a que su consumo es muy bajo. La asociación entre el consumo de café y el aumento de la frecuencia de SCE, por ejemplo, se ha sugerido en estudios anteriores, pero en individuos que consumían más de 5 tazas diarias (Reidy *et al.*, 1988; Hirsch *et al.*, 1992).

Como cabía esperar, también se han obtenido resultados significativos para la exposición y para el cociente MMA/DMA. Por otro lado, a pesar de no excluir la posible influencia de factores genéticos en la frecuencia de SCE, los resultados del análisis de los familiares directos con cáncer demostraron que este factor no parece ejercer influencia sobre los valores de SCE, al menos en nuestro estudio.

Una vez establecidas las variables que entrarían en el modelo final, el paso siguiente fue incluir en el análisis los niveles de arsénico. Así, se mantenían los factores relativos a la edad y a la frecuencia de fumadores, la variable exposición y el cociente MMA/DMA y se añadía al análisis una nueva variable indicativa de los niveles de exposición al arsénico.

De esta manera se pudo detectar que los niveles de arsénico total, % As<sup>V</sup>, % MMA y % DMA daban valores sin ninguna significación y, por lo tanto, se puede considerar que no ejercen influencia sobre la incidencia de SCE, mientras que los niveles de As org (%), As-i (%) y % As<sup>III</sup> daban valores estadísticamente significativos.

Basándonos en el hecho de que los niveles de arsénico están altamente correlacionados, y que los valores de arsénico inorgánico (%) eran inversamente proporcionales a los de arsénico orgánico (%), se incluyó en el análisis el porcentaje de As<sup>III</sup>.

Finalmente, se verificó que los datos cumplían con los requisitos necesarios para llevar a cabo este test paramétrico (normalidad de los residuos, residuos estandarizados independientes entre ellos, homogeneidad de varianzas) y se llevó a cabo el análisis final

evaluando los efectos de la exposición, del tabaco, del cociente MMA/DMA y de los niveles de As<sup>III</sup> sobre la frecuencia de SCE. En relación al análisis de la varianza correspondiente a la variable dependiente PRI, se observó que ninguno de los factores evaluados tenía influencia sobre esta variable, excepto la edad ( $p < 0,001$ ).

En la tabla 12 se presenta el resultado final del análisis de la varianza univariante para las variables dependientes SCE y PRI.

Tabla 12. Análisis de varianza univariante: SCE y PRI

	$\beta$	P	R <sup>2</sup>
<b>SCE</b> (variable dependiente)			0,120
Edad	0,002	0,500	
% As <sup>III</sup>	0,003	0,008 **	
MMA/DMA	-0,095	0,030 *	
Tabaco	---	0,740	
No fumadores	0,036	0,611	
Ex fumadores	-0,027	0,761	
Fumadores	0	---	
Exposición	---	0,126	
Expuestos	0,102	0,082	
Control interno	0,251	0,010 **	
Control externo	0	---	
No fumadores * control interno	-2,75	0,018 *	
<b>PRI</b> (variable dependiente)			0,108
Edad	-0,009	0,000 ***	

$\beta$ : coeficiente no estandarizado;

P: nivel de significación (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ );

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación.

Los resultados de este análisis revelaron que, de todas las variables analizadas, únicamente el porcentaje de As<sup>III</sup> estaría directamente relacionado con el incremento de la frecuencia de SCE de manera significativa ( $p < 0,01$ ), mientras que la tasa de metabolización ejercería un efecto inverso sobre dicha frecuencia ( $p < 0,05$ ).

Al comparar el efecto de la variable exposición sobre la frecuencia de SCE sólo se han observado diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) en relación al grupo de los controles internos. Estos resultados no ponen de manifiesto ninguna correlación entre niveles de exposición y el aumento de SCE y, por lo tanto, otros factores independientes del arsénico deben estar modulando de forma significativa la frecuencia de SCE en los individuos de este grupo.

Con relación a la relación MMA/DMA, considerada como un buen parámetro para la valoración del proceso de metabolización del arsénico, se observa un efecto negativo sobre la frecuencia de SCE. En este caso, cuanto más alto es valor del cociente MMA/DMA (que implica una tasa de metabolización más baja), menor es el efecto sobre la frecuencia de SCE. Este resultado concuerda con la hipótesis de que el proceso de metabolización del arsénico no consiste simplemente en un mecanismo de detoxificación propiamente dicho.

Por otro lado, considerando los resultados obtenidos en el análisis de la varianza, no se puede descartar el efecto citotóxico y genotóxico de las especies trivalentes metiladas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos resultados sólo podrían explicar parcialmente los resultados de la frecuencia de SCE obtenidos en el estudio (ver anexo 2.2). Otros factores, además de la exposición al arsénico, parece que estarían modulando el incremento en la frecuencia de SCE observado en el grupo de los trabajadores expuestos.

Cuando en el análisis de varianza univariante se considera al PRI como variable dependiente, se ve que sólo la edad resulta ser un factor importante en la modulación de este índice. Se observa la existencia de una relación inversa ( $B = -0,009$ ), lo que indica que al aumentar la edad, disminuye el PRI. De hecho, el grupo de los controles internos es el que presenta la media de edad más alta y el valor del PRI más bajo, siendo estadísticamente distinto del grupo de control externo que tiene la media de edad más baja y un mayor valor del PRI. Cabe destacar que algunos estudios sugieren que el PRI parece reflejar más aspectos fisiológicos que exposiciones ocupacionales y/ o genotóxicas (Lazutka *et al.*, 1994).

Hay que señalar que la mayor parte de los resultados obtenidos al ensayo de SCE han sido previamente publicados (ver anexo 3.1).

#### 4.1.2.2. Ensayo de MN en linfocitos y en células de la mucosa bucal

Los resultados del análisis del daño citogenético medido a través del ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica y en células de mucosa bucal están descritos en la tabla 13.

Tabla 13. Daño genético observado en la población estudiada

	Expuestos (a)	Controles internos (b)	Controles externos (c)
Nº de individuos	105	52	50
BNMN (media ± EE)	8,08 ± 0,55	9,96 ± 0,79	8,50 ± 0,78
CBPI (media ± EE)	1,51 ± 0,01*** <sup>b</sup>	1,43 ± 0,02 *** <sup>a,c</sup>	1,52 ± 0,01
BCMN (media ± EE)	14,11 ± 1,16 *** <sup>b,** c</sup>	23,15 ± 2,76 *** <sup>a,c</sup>	8,34 ± 0,99

EE: error estándar; ANOVA: BNMN, BCMN, CBPI; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

La media de BNMN es ligeramente superior en los grupos controles, cuando se compara con el valor obtenido en el grupo de los expuestos. Ahora bien, las diferencias observadas no son significativas. En relación al CPBI, se ha observado que los expuestos y los controles externos presentan valores muy parecidos, mientras que los controles internos son los que tienen el menor índice, difiriendo estadísticamente de los valores observados en los otros dos grupos ( $p < 0,001$ ).

Por otro lado, la frecuencia de BCMN varía de forma significativa entre los grupos. El mayor incremento de la frecuencia de BCMN se ha detectado en el grupo de los controles internos y estos valores se encuentran reducidos más de 2 veces en el grupo de los controles externos. Siendo así, se observa que la frecuencia de BCMN en el grupo de los controles internos es significativamente superior a la observada en los otros dos grupos ( $p < 0,001$ ), mientras que las diferencias observadas entre los expuestos y los controles externos presentan un menor nivel de significación ( $p < 0,01$ ).

En contraste con los resultados esperados, las frecuencias más altas de BNMN y BCMN se han observado en el grupo de los controles internos, así como el menor índice de CPBI, que indirectamente puede ser considerado como una medida citotoxicidad. En principio, estos resultados sugieren la falta de correlación entre los niveles de exposición al arsénico y el incremento del daño citogenético medido con el ensayo de MN. No obstante, con el objetivo de averiguar de forma más detallada una posible asociación entre la incidencia de

MN y diferencias en el perfil de excreción, se llevó a cabo un análisis similar al descrito anteriormente en el apartado de SCE.

No se han detectado efectos en la frecuencia de BNMN y BCMN con respecto al patrón de excreción, ni en el grupo de los expuestos ni en el grupo de los controles externos. Así, en estos dos grupos, la existencia de un patrón alterado de excreción de arsénico no ejerce ningún efecto sobre la frecuencia de MN. Por lo que respecta al grupo de los controles internos, la única diferencia observada ha sido un incremento de BCMN entre los individuos considerados como buenos metabolizadores (excreción de DMA superior al 80 %), cuando se comparan con los que excretan niveles inferiores al 60 % ( $p = 0,020$ ).

Por último, las diferencias en las frecuencias de MN detectadas entre los grupos también se han analizado de acuerdo con los patrones anormales de excreción de arsénico (tabla 14). Sin embargo, no se han observado diferencias en la frecuencia de BNMN en las comparaciones entre grupos con patrones específicos de excreción. Tampoco se observaron diferencias en la frecuencia de BCMN en los grupos que presentaban un patrón desfavorable de metabolización. En este análisis, las únicas diferencias observadas fueron las relacionadas con la frecuencia de BCMN entre individuos con patrones favorables de excreción. En todos los casos, los individuos del grupo del control interno tenían las frecuencias más altas de BCMN, mientras que las del control externo eran más bajas. Estos valores diferían en casi todas las comparaciones realizadas, excepto entre expuestos y controles internos con patrones de excreción del As-i inferiores al 10 %.

Por lo tanto, a pesar de las diferencias observadas en el perfil de excreción del arsénico, no se ha detectado ninguna asociación entre un patrón de excreción de arsénico desfavorable y un incremento en las frecuencias de BNMN y BCMN.

Para determinar los factores de confusión que podrían modular las frecuencias de BCMN y de BNMN, así como del CPBI, se llevó a cabo un análisis de la varianza univariante incluyendo como variables dependientes estos factores. Como ya se ha explicado anteriormente, una vez descartadas las covariables que estaban altamente correlacionadas entre sí, y/o que no ejercían ninguna influencia significativa sobre las variables dependientes estudiadas, se llegó a un modelo final para cada una de las variables dependientes analizadas (tabla 15).

Al considerar la frecuencia de MN en linfocitos o en mucosa bucal como variable dependiente, se analizaron los efectos de la edad, consumo de alcohol y tabaco, así como los años de exposición y los niveles de arsénico total en orina. La edad, el alcohol y el tabaco están descritos como posibles factores de confusión en los análisis de MN, mientras que los años de exposición y los niveles de arsénico total en orina fueron las variables seleccionadas con el objetivo de analizar el efecto potencial de la exposición al arsénico sobre ambas variables de estudio (BNMN y BCMN). A partir de los resultados, se puede concluir que la edad es el único factor que parece ejercer un efecto directo en el incremento de la frecuencia de MN, tanto en linfocitos como en células de mucosa bucal. Se obtuvieron resultados similares cuando se consideró el CBPI como variable dependiente, y la edad ha sido el único factor correlacionado, en este caso de forma inversa, con este índice.

De modo general, los resultados obtenidos en este estudio de biomonitorización (resumidos en el artículo presentado en el anexo 3.2) revelan la inexistencia de correlación entre los niveles de exposición al arsénico y el daño citogenético evaluado a través del ensayo de MN. Asimismo, en el otro estudio llevado a cabo en esta misma población, tampoco se ha detectado ninguna asociación relevante entre los niveles de arsénico y la frecuencia de SCE.

Por lo tanto, a pesar de las diferencias significativas observadas en los niveles de exposición ocupacional al arsénico, otros factores parecen estar influenciando el incremento del daño citogenético observado en los grupos de trabajadores mineros evaluados en este estudio.

Tabla 14. Correlaciones entre los perfiles anormales de excreción del arsénico y frecuencias de BNMN y de BCMN

Expuestos (a)	% As-i			% MMA			% DMA		
	< 10%	> 30%	< 10%	> 20%	> 80%	< 60%			
Nº de individuos (%)	26,70	18,10	41,90	15,20	16,20	22,90			
BNMN (media ± EE)	7,86 ± 1,23	7,05 ± 1,10	8,00 ± 0,77	7,75 ± 1,65	8,18 ± 1,41	6,96 ± 0,95			
BCMN (media ± EE)	16,89 ± 2,23 ***c	11,37 ± 3,49	10,72 ± 1,33 ***b	18,19 ± 2,77	13,24 ± 2,51 ***b	11,21 ± 2,90			
Controles Internos (b)									
Nº de individuos (%)	% As-i			% MMA			% DMA		
	< 10%	> 30%	< 10%	> 20%	> 80%	< 60%			
Nº de individuos (%)	21,20	9,60	13,50	26,90	11,50	25,00			
BNMN (media ± EE)	9,70 ± 1,37	9,50 ± 3,01	9,50 ± 1,65	9,64 ± 1,85	11,00 ± 1,45	9,83 ± 1,07			
BCMN (media ± EE)	38,82 ± 9,72 **c	17,0 ± 2,59	30,71 ± 6,72 ***a,c	23,50 ± 6,01	43,67 ± 11,96 ***a,c	16,00 ± 2,93			
Controles Externos (c)									
Nº de individuos (%)	% As-i			% MMA			% DMA		
	< 10%	> 30%	< 10%	> 20%	> 80%	< 60%			
Nº de individuos (%)	29,20	2,10	56,30	14,60	43,80	10,40			
BNMN (media ± EE)	8,93 ± 1,52	18,00 ± 0,0	8,07 ± 1,15	8,14 ± 2,02	9,14 ± 1,56	8,40 ± 2,87			
BCMN (media ± EE)	6,36 ± 7,46	4,00 ± 0,0	9,37 ± 1,41	7,57 ± 3,36	8,67 ± 1,61	5,60 ± 0,93			

EE: error estándar; ANOVA: BNMN y BCMN; \* p &lt; 0,05; \*\* p &lt; 0,01; \*\*\* p &lt; 0,001

\* En negrita, patrones desfavorables de excreción; comparaciones realizadas entre grupos con patrones similares de excreción.

Tabla 15. Análisis de varianza univariante: BNMN, BCMN y PRI

	$\beta$	$R^2$	$P$
BNMN		0,236	
Edad	0,260		0,002 **
Años de exposición	0,033		0,664
As total en orina	- 0,007		0,057
Consumo de alcohol	- 0,007		0,157
Tabaco (hábito)			0,101
No fumadores	- 0,237		
Ex fumadores	1,785		
Fumadores	0		
BCMN		0,088	
Edad	0,058		0,023 *
Años de exposición	- 0,022		0,342
As total en orina	0,001		0,319
Consumo de alcohol	- 0,003		0,123
Tabaco (hábito)			0,082
No fumadores	0,574		
Ex fumadores	0,235		
Fumadores	0		
CBPI		0,119	
Edad	-0,005		0,000 ***

$\beta$ : coeficiente estandarizado;  $R^2$ : coeficiente de determinación.

P: nivel de significación (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## Parte II. Caracterización de variantes polimórficas en *GSTO1* y *GSTO2*

La clase GSTO ha sido recientemente caracterizada y se ha observado que los dos miembros funcionales de la misma exhiben nuevas propiedades biológicas, no compartidas con las otras GSTs. A pesar de que *GSTO1* es el gen que codifica para la enzima limitante en el proceso de biotransformación del arsénico, el producto de *GSTO2* también presenta el potencial de participar en las reacciones de reducción del arsénico en humanos, requeridas para que el proceso de metilación pueda ocurrir.

Por lo tanto, considerando el papel fundamental que ambos miembros de la clase *GSTO* ejercen en la biotransformación del arsénico, es importante que las variantes genéticas de *GSTO1* y *GSTO2* sean identificadas y caracterizadas. Es coherente pensar que aquellas alteraciones genéticas que conduzcan a cambios en la actividad de estas enzimas pueden tener implicaciones importantes, tanto en la variabilidad con relación al patrón de excreción como en la respuesta frente al daño genético inducido por el arsénico.

Consecuentemente, estas variaciones serán importantes en la evaluación del riesgo de las poblaciones humanas expuestas a este carcinógeno.

#### **4.2.1. Glutation S-transferasa Omega 1 (*GSTO1*)**

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se secuenciaron muestras de DNA de 20 individuos chilenos con distintos perfiles de excreción de arsénico, para el gen *GSTO1*. Los resultados de este análisis permitieron confirmar algunos de los polimorfismos previamente descritos e identificar un cambio de aminoácido nuevo que daba lugar a la variante Glu50Gly.

Así, la primera etapa de este estudio consistió en investigar la frecuencia de la nueva variante polimórfica y de 6 de los polimorfismos ya descritos de *GSTO1* en tres grupos étnicos distintos (chilenos, atacameños y españoles). A continuación, se hizo la caracterización enzimática de dos variantes polimórficas (Glu50Gly y Ala236Val) con relación al metabolismo del arsénico y, con el objetivo de establecer posibles correlaciones entre polimorfismos de *GSTO1*, diferencias en el patrón de excreción del arsénico y daño genético, se amplió el estudio de genotipado a la población de 207 individuos, anteriormente evaluados en el estudio de biomonitorización. La mayoría de los resultados obtenidos están descritos en el artículo correspondiente al anexo 3.3.

##### **4.2.1.1. Análisis de los polimorfismos del gen *GSTO1*: diferencias interétnicas**

Los genes que codifican las GSTs son altamente polimórficos y la distribución de sus frecuencias suele variar geográficamente y entre grupos étnicos. En este estudio, se genotiparon individuos de tres grupos étnicos distintos, formados por atacameños, chilenos y europeos. Una descripción detallada de las 7 variantes genéticas de *GSTO1* analizadas, así como las frecuencias observadas en cada uno de los grupos se presenta en la tabla 16. Cabe destacar que en un análisis preliminar se comprobó que la distribución de cada genotipo en la población total y en cada uno de los grupos por separado, era independiente del género.

El primer polimorfismo analizado ha sido la delección GGC, localizada en el intrón 1. La distribución de este genotipo difiere de forma significativa entre las tres poblaciones estudiadas ( $\chi^2 : (gl\ 4) = 47,08, p < 0,001$ ), encontrándose la mayor frecuencia del alelo variante entre los europeos. La menor frecuencia alélica de este polimorfismo se ha

observado en los atacameños, siendo 6,32 veces inferior a la frecuencia observada en el grupo de los europeos.

Con relación al cambio Glu50Gly, no se ha encontrado ningún individuo que lo presentara, y lo mismo ocurrió con el polimorfismo correspondiente al cambio Ser86Cys, previamente descrito en una población mejicana (Marnell *et al.*, 2003). Por otro lado, la sustitución C>A en el exón 4, que lleva al cambio Ala140Asp, ha sido identificada en todos los grupos estudiados. Las frecuencias alélicas observadas para este cambio han sido similares a las obtenidas para la delección del intrón 1, encontrándose diferencias significativas en la distribución de los genotipos entre los grupos ( $\chi^2$  : (gl 4) = 50,16,  $p < 0,001$ ). En concordancia con lo encontrado en otros estudios, se han identificado individuos mutantes dobles para Ala140Asp y GGC del y, en nuestro estudio, su distribución varía de forma significativa entre grupos ( $\chi^2$  : (gl 2) = 39,05;  $p = 0,001$ ), encontrándose con una alta frecuencia entre europeos (58,9 %) y chilenos (37,8 %). Por otro lado, sólo el 6,5 % de los atacameños presentó ambos alelos variantes. Asimismo, se ha confirmado la existencia de un desequilibrio de ligamiento (LD) entre el cambio Ala140Asp y la delección GGC en todos los grupos analizados: coeficiente R (LD) = 0,59 en atacameños ( $p < 0,00007$ ), R = 0,835 en europeos ( $p < 0,0001$ ) y R = 0,93 en chilenos ( $p < 0,00001$ ). El coeficiente R varía de 0 a 1, correspondiendo el valor 1 a la correlación máxima, que indica que los alelos se segregan de forma dependiente.

En el exón 4 también está localizada una delección en la posición 155 de tres pares de bases (AGG) que, juntamente con el cambio Glu208Lys en el exón 6, sólo se han encontrado en chilenos y europeos. A pesar de eso, la distribución de ambos genotipos no difiere de manera significativa entre los 3 grupos. Se encontraron individuos doble mutantes para la delección AGG y el cambio Glu208Lys tanto en el grupo de los chilenos como en el de los europeos. En el grupo de los europeos, 4 de los 5 individuos heterocigotos para la delección también eran heterocigotos para el cambio en la posición 208. Entre los chilenos, se han identificado 3 individuos heterocigotos para la delección y uno de ellos presentaba el genotipo doble mutante (Glu155del/ Glu208Lys). Como era de esperar, se ha observado la existencia de un desequilibrio de ligamiento entre estas dos variante en el grupo de los europeos (LD, R = 0,795,  $p < 0,0001$ ) y también entre los chilenos (R = 0,575,  $p < 0,00001$ ).

El último polimorfismo analizado ha sido una transición C>T en el exón 6 (Ala236Val) que sólo se observó en atacameños y chilenos. La distribución de los genotipos ha variado de forma significativa entre los grupos ( $\chi^2 : (gl\ 2) = 8,17, p = 0,017$ ), siendo este cambio el único de los polimorfismos estudiados de la GSTO1 que se ha encontrado con mayor frecuencia en atacameños.

La distribución genotípica de todos los polimorfismos está de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto en el caso de la distribución entre atacameños de la delección del intrón 1, que presenta una tendencia al desequilibrio ( $p = 0,052$ ). En general, estos resultados demuestran la existencia de grandes diferencias en la distribución de los polimorfismos de GSTO1 entre atacameños, chilenos y europeos, siendo los atacameños los individuos menos polimórficos.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de los haplotipos de *GSTO1*, confirmando que los europeos, seguidos de los chilenos, presentan una mayor diversidad de formas alélicas cuando se comparan con los atacameños. Los resultados obtenidos en este análisis estimaron un total de 16 haplotipos para los europeos, 12 para los chilenos y sólo 5 para los atacameños. De los 16 haplotipos predichos sólo se detectaron 13, en al menos un individuo de la población total analizada, observándose 6 de estos haplotipos en al menos 2 de los 3 grupos estudiados. Una descripción de los haplotipos más frecuentes, el número de individuos observados para cada una de las formas, así como las frecuencias estimadas se indican en la tabla 17.

La distribución de los haplotipos 1, 3 y 4 difiere de forma significativa entre los grupos estudiados: haplotipo 1:  $\chi^2 : (gl\ 2) = 39,73, p < 0,001$ ; haplotipo 3:  $\chi^2 : (gl\ 2) = 10,53, p = 0,005$ ; haplotipo 4:  $\chi^2 : (gl\ 2) = 35,70, p < 0,001$ . Además, el haplotipo 3, que viene definido por la variante Ala236Val, ha sido la única forma alélica no detectada entre los europeos. Considerando, de forma arbitraria, que los haplotipos relativamente comunes presentan una frecuencia mínima de 0,10 (Tishkoff *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003), los atacameños vienen definidos por el haplotipo 1, mientras que los europeos están caracterizados por los haplotipos 1, 2, 4 y 5. Los chilenos estarían representados por los haplotipos 1 y 4.

Tabla 16. Variantes genéticas de *GSTO1* analizadas en atacameños, chilenos y europeos

Región	5' secuencia 3'	Efectos en la proteína	Grupos analizados	Frecuencias n (%)			Frecuencia del alelo mutante
				wt/wt	wt/v	v/v	
Intrón 1	CCCGGC <b>ggc</b> /- TG TTC	No codificante	atacameños	41 (89,1)	4 (8,7)	1 (2,2)	0,065
			chilenos	69 (62,2)	37 (33,3)	5 (4,5)	0,212
			europeos	44 (35,5)	58 (46,8)	22 (17,7)	0,411
Exón 3	ACGAGT <b>c/g</b> TGCCAT	Ser86Cys /	atacameños	46 (100)	0	0	0
	GGCATG <b>a/g</b> AGTCAT	Glu50Gly	chilenos	111 (100)	0	0	0
			europeos	124 (100)	0	0	0
Exón 4	ACTATG <b>c/a</b> TGGCCT	Ala140Asp	atacameños	42 (91,3)	4 (8,7)	0	0,043
			chilenos	67 (60,4)	40 (36,0)	4 (3,6)	0,216
			europeos	45 (36,3)	59 (47,6)	20 (16,1)	0,399
	TAGAGG <b>gag</b> /- AATTA	Glu155del	atacameños	46 (100)	0	0	0
			chilenos	108 (97,3)	3 (2,7)	0	0,013
			europeos	119 (96,0)	5 (4,0)	0	0,020
Exón 6	ATGAAG <b>g/a</b> AAGATC	Glu208Lys	atacameños	46 (100)	0	0	0
			chilenos	110 (99,1)	1 (0,9)	0	0,004
			europeos	119 (96)	5 (4,0)	0	0,020
	CTGAGG <b>c/t</b> CTGTGA	Ala236Val	atacameños	43 (93,5)	3 (6,5)	0	0,033
			chilenos	109 (98,2)	2 (1,8)	0	0,009
			europeos	124 (100)	0	0	0

Tabla 17. Haplotipos y frecuencias observadas entre los grupos

Descripción de los haplotipos encontrados entre los grupos	N° individuos observados para cada haplotipo (EM - IC 99%)		
	atacameños	chilenos	europeos
1. GGC/ Ser86/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236	37 (0,88)	64 (0,67)	37 (0,44)
2. GGCdel/ Ser86/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236	2 (0,04)	0 (0,01)	6 (0,14)
3. GGC/ Ser86/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ 236Val	3 (0,03)	1 (0,01)	0 (0,00)
4. GGCdel/ Ser86/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236	3 (0,02)	41 (0,12)	70 (0,26)
5. GGC/ Ser86/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236	1 (0,02)	1 (0,09)	5 (0,13)
6. GGC/ Ser86/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236	0 (0,00)	1 (0,00)	1 (0,00)

EM: frecuencias estimadas mediante el algoritmo esperanza-maximización.

#### 4.2.1.2. Caracterización de las variantes polimórficas Ala236Val y Glu50Gly: resultados del ensayo enzimático

La segunda parte referente a la caracterización de las variantes polimórficas de *GSTO1* se hizo mediante la expresión en *E. coli* de las isoformas a probar y la posterior comparación de las propiedades catalíticas de estas variantes con las de la isoforma más común de *GSTO1*. Todos los ensayos enzimáticos se realizaron efectuando réplicas y de forma simultánea. La actividad enzimática de las isoformas variantes se ensayó para algunas de las funciones catalíticas compartidas por todas las GSTs, así como para actividades específicas de *GSTO1*.

La primera variante ensayada fue Glu50Gly, detectada en un individuo de la población chilena. Los resultados obtenidos revelaron que la isoforma con el cambio 50Gly, en comparación con la variante normal, presenta un incremento de la actividad tioltransferasa y una pequeña reducción de la actividad deshidroascorbato reductasa. Por otro lado, en los ensayos específicos para la actividad arsénico reductasa, se ha observado que la forma variante presenta una mayor actividad MMA<sup>V</sup> y DMA<sup>V</sup> reductasa. Los resultados de la tabla 18 presentan los valores medios con las desviaciones estándar (DE) de, como mínimo, tres experimentos independientes.

Tabla 18. Actividad específica de las isoformas 50Glu y 50Gly variantes de la GSTO1 para los diferentes sustratos ensayados

Actividad /Sustrato	50Glu (normal)	50Gly (variante)
<b>Tioltransferasa /</b> Hidroxietil disulfito	1,4 ± 0,45	2,24 ± 0,43
<b>Deshidroascorbato reductasa/</b> Deshidroascorbato	0,273 ± 0,05	0,235 ± 0,03
<b>Metilarsonato reductasa/</b> Monometil arsonato (V) Dimetil arsínico (V)	0,479 ± 0,06 0,355 ± 0,00	0,765 ± 0,23 0,432 ± 0,05

Todos los valores están expresados como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  a  $37\text{ }^\circ\text{C} \pm \text{DE}$ .

Con el objetivo de medir la estabilidad de la isoforma variante, también se ha evaluado la pérdida de actividad tioltransferasa después de someterla a un choque térmico de  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , en diferentes periodos de tiempo (hasta 45 min). La forma mutante 50Gly ha demostrado ser extremadamente inestable y, a los 15 min del choque térmico, ya no se pudo detectar ninguna actividad enzimática (fig. 12).

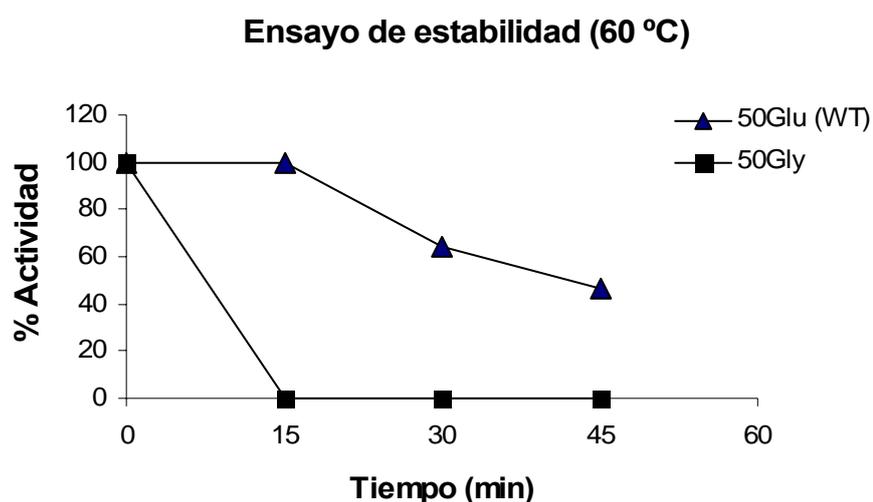


Fig. 12. Estabilidad de la variante Glu50Gly sometida a un choque térmico de  $60\text{ }^\circ\text{C}$ .

La segunda variante polimórfica ensayada ha sido la Ala236Val. El efecto de este cambio detectado en atacameños y chilenos, así como el Glu50Gly, no había sido estudiado anteriormente. De modo general, los resultados obtenidos a partir de los ensayos enzimáticos revelan que la variante 236Val presenta una menor actividad sobre la mayoría de los sustratos ensayados (tabla 19). Además, en el caso de esta variante también se ha analizado la actividad fenacil glutation reductasa, utilizando tres sustratos distintos. Ambas isoformas (la normal y la variante) presentan una alta actividad fenacil reductasa, especialmente cuando se utiliza S-(4-nitrofenacil)glutation como sustrato. En este caso, la actividad fenacil reductasa detectada para la variante normal ha sido hasta 500 veces superior a la actividad monometil arsonato reductasa previamente ensayada. La isoforma variante, a pesar de presentar también una elevada actividad fenacil reductasa, posee una menor capacidad catalítica (tabla 19). Durante las etapas de preparación y purificación de estas proteínas se ha observado que la variante 236Val perdía su actividad muy rápidamente. Para cuantificar esa aparente inestabilidad, se evaluó la pérdida de la actividad fenacil reductasa durante el período de una hora, al someterlas a un choque térmico de 45 °C (fig. 13).

Tabla 19. Actividad específica de las isoformas 236Ala y 236Val, variantes de GSTO1, para los diferentes sustratos ensayados

<b>Actividad /Sustrato</b>	<b>236Ala (normal)</b>	<b>236Val (variante)</b>
<b>Tioltransferasa /</b> Hidroxietil bisulfito	2,8 ± 0,04	0,32 ± 0,00
<b>Deshidroascorbato reductasa/</b> deshidroascorbato	0,22 ± 0,02	0,08 ± 0,02
<b>Metilarsonato reductasa/</b> Monometil arsonato (V) Dimetil arsínico (V)	0,32 ± 0,03 0,16 ± 0,25	0,10 ± 0,01 0,03 ± 0,01
<b>Fenacil glutation reductasa/</b> S-(fenacil glutation) S- (2,4-diclorofenacil)glutation S- (4-nitrofenacil)glutation	15,6 ± 0,37 12,1 ± 0,50 168,6 ± 6,3	2,6 ± 0,09 2,5 ± 0,23 28,7 ± 0,58

Media ± DE obtenidos de un mínimo de 3 experimentos independientes.  
Todos los valores están expresados como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  a 37 °C ± DE.

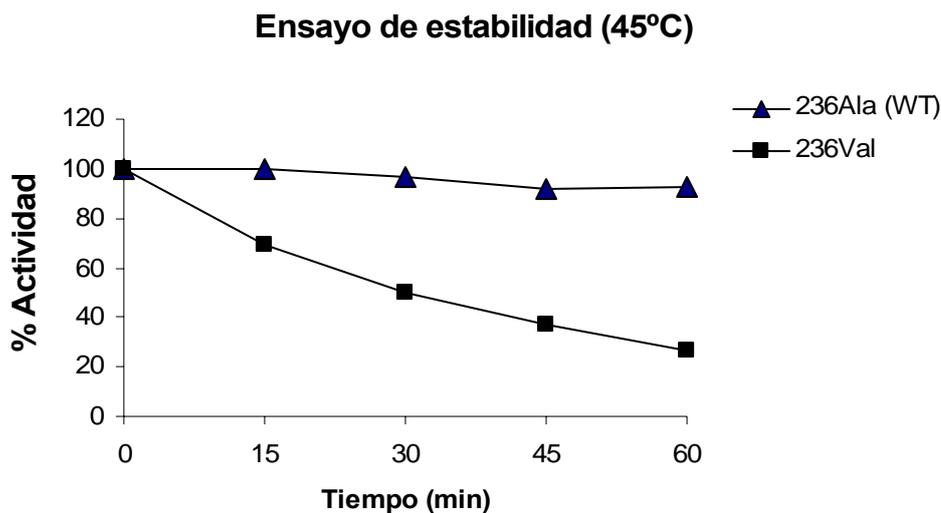


Fig. 13. Estabilidad de la variante Ala236Val sometida a un choque térmico de 45 °C.

Los resultados obtenidos evidencian una marcada pérdida de actividad de la variante 236Val. Así, al final de los 60 min, la isoforma normal presentó una actividad alrededor del 93 %, mientras que la variante sólo de un 26,7 %.

#### 4.2.1.3. Análisis de los polimorfismos del gen *GSTO1*

En esta parte del estudio, los 207 chilenos que habían sido evaluados en el estudio de biomonitorización (parte I), se genotiparon para las variantes Glu50Gly, Ala140Asp, Glu155del, Glu208Lys y Ala236Val. Para poder llevar a cabo los análisis de correlación entre genotipos, diferencias en el patrón de excreción del arsénico y daño citogenético, estos individuos que anteriormente estaban subdivididos en tres grupos, se consideraron en conjunto como una única población de individuos expuestos a distintos niveles de arsénico.

Cabe destacar que los 20 individuos cuyas muestras de DNA fueron utilizadas en la secuenciación del gen *GSTO1*, pertenecían también a esta población. En la tabla 20 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 20. Frecuencias de algunas variantes de *GSTO1* en la población de 207 chilenos

SNPs analizados	Frecuencias genotípicas n° individuos (%)			Frecuencia del alelo mutante
	wt/wt	wt/v	v/v	
Glu50Gly	206 (99,5)	1 (0,5)	0	0,00
Ala140Asp	143 (69,4)	55 (26,7)	8 (9,3)	0,17
Glu155del/ Glu208Lys	197 (95,6)	9 (4,4)	0	0,02
Ala236Val	203 (98,1)	4 (1,9)	0	0,01

El análisis de los genotipos de *GSTO1* no reveló ningún otro individuo que presentara el alelo variante del cambio Glu50Gly. De modo general, las frecuencias observadas para las otras variantes polimórficas fueron similares a las obtenidas en la población de 111 chilenos (ver tabla 16). No obstante, la frecuencia observada para el cambio Glu208Lys en esta población de trabajadores fue 5 veces superior a la descrita anteriormente. Además, todos los individuos heterocigotos para la delección Glu155, también presentaron heterocigosis para el cambio Glu208Lys (LD:  $R = 0,9968$ ,  $p < 2 \times 10^{-16}$ ). La distribución de las frecuencias genotípicas de las 5 variantes analizadas en esta población cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

#### 4.2.1.3.1. Asociación con el patrón de excreción de arsénico en orina

El perfil de excreción observado en la población total de 207 individuos está descrito en la tabla 21. Los porcentajes de arsénico inorgánico y orgánico (MMA y DMA) detectados en este estudio se encuentran dentro del rango considerado como normal en el patrón de excreción de arsénico en orina.

Tabla 21. Perfil de excreción de arsénico en la población estudiada

	As-i	As <sup>V</sup>	As <sup>III</sup>	As org	MMA	DMA
Media As (%)	22,24	4,93	17,31	77,76	13,03	64,73
Estándar (%)	10 - 30	ND	ND	60 - 80	10 - 20	60 - 80

ND: valores no determinados

No obstante, también se observaron individuos con perfiles de excreción distintos del patrón normal (tabla 22). Como se puede observar, el 25,9 % de la población evaluada excreta una gran cantidad de arsénico inorgánico, mientras que el 20,5 % presenta valores medios de excreción del DMA inferior a los esperados. También se detectaron individuos con patrones anormales de excreción del MMA, de los cuales el 18 % excretan niveles superiores a la media estándar.

Tabla 22. Individuos con patrones anormales de excreción del arsénico

	% As-i		% MMA		% DMA	
	Nº individuos = 63		Nº individuos = 115		Nº individuos = 86	
	> 10 %	< <b>30 %</b>	> 10 %	< <b>20 %</b>	< 80 %	> <b>60 %</b>
Individuos por subgrupo (%)	25 (12,2)	38 (25,9)	78 (38,0)	37 (18,0)	44 (21,5)	42 (20,5)
Media As ( %)	6,63	47,56	5,92	24,96	85,56	48,30
Min - Máx	0 - 9,95	34,87 - 74,01	0 - 9,95	20,19 - 37,03	80,78 - 100	7,14 - 59,85

\* En negrita se señalan los perfiles de excreción desfavorables.

Las diferencias observadas en el perfil de excreción del arsénico inorgánico y de sus metabolitos reflejan, en parte, diferencias en los niveles de exposición al arsénico y la existencia de una gran variabilidad interindividual en la biotransformación del arsénico. Variantes polimórficas en genes involucrados en este proceso podrían explicar las diferencias en la susceptibilidad individual al daño inducido por el arsénico. En este contexto, se ha investigado la existencia de una posible asociación entre los genotipos de *GSTO1* y el perfil de excreción del arsénico.

En un análisis previo se comprobó que los porcentajes de As-i, MMA y DMA excretados en orina no se encuentran significativamente correlacionados con los niveles de arsénico total, excepto en el caso del DMA ( $R = -0,022$ ,  $p = 0,751$ ;  $R = -0,022$ ,  $p = 0,749$ ;  $R = -0,235$ ,  $p = 0,001$ , respectivamente). Además, se ha observado que la distribución del As-i y del DMA es bimodal (fig. 14), pudiendo estar potencialmente modulada por la existencia de variantes polimórficas en genes implicados en el metabolismo del arsénico.

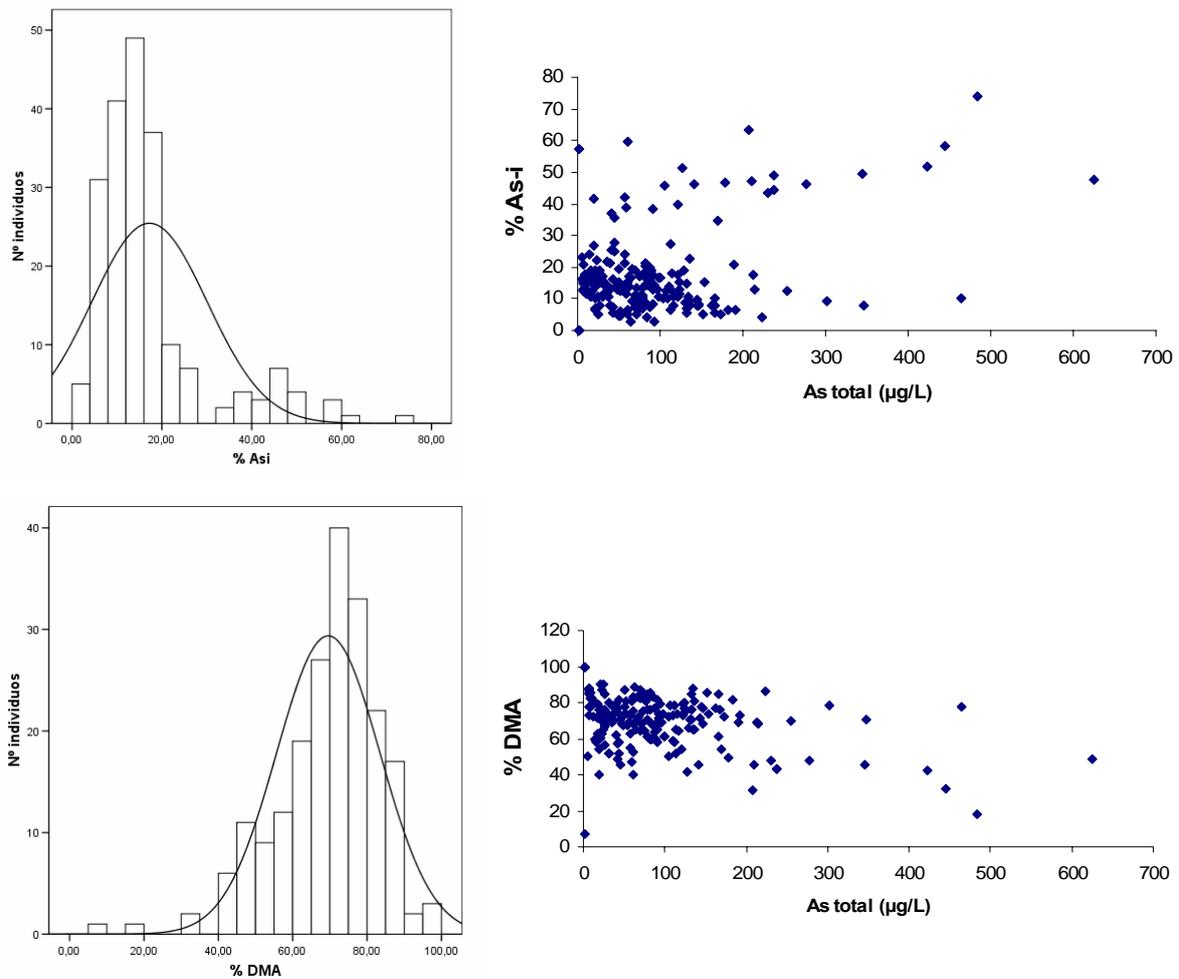


Fig. 14. Distribución de los niveles porcentuales excretados de As-i y DMA.

Para determinar si las variantes de GSTO1 contribuyen de forma significativa al patrón anormal de excreción del arsénico, se han comparado gráficamente los porcentajes de excreción de As-i *versus* arsénico total entre individuos portadores de alelos normales y variantes para los cambios Ala140Asp, Glu255del/ Glu208Lys y Ala236Val. Dado que se detectó una correlación significativa entre el nivel de DMA y el arsénico total, todos los análisis gráficos se llevaron a cabo utilizando los porcentajes de excreción del As-i como referencia. Los individuos de la población se dividieron en dos grupos, caracterizados por excretar niveles medios de As-i inferiores o superiores al 30 % ( $13,1 \pm 5,5$  % y  $47,5 \pm 9,3$  %). En ninguno de los casos se ha observado que algún alelo estuviese segregado específicamente con uno u otro grupo (fig. 15).

Asimismo, en la tabla 23 se especifican los niveles porcentuales de los metabolitos de arsénico excretados, teniendo en cuenta el genotipo de los individuos. Los individuos heterocigotos para la variante Ala236Val excretan una menor proporción de DMA, mientras que el heterocigoto para el cambio Glu50Gly excreta un mayor nivel de MMA.

El efecto modulador de los genotipos sobre el perfil de excreción de los individuos se ha evaluado mediante un análisis de regresión lineal ajustado a la edad. Asimismo, este análisis también se ha aplicado considerando el efecto de los haplotipos inferidos mediante el coeficiente EM. En todos los análisis, los haplotipos con frecuencias inferiores a 0,01 se agruparon en la categoría de raros.

En general, los resultados de regresión no revelaron la existencia de ninguna relación significativa entre las variantes polimórficas estudiadas y los patrones porcentuales de excreción del As-i y de los metabolitos As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup> y MMA. La única excepción ha sido con relación a los niveles de excreción de DMA (tabla 24), donde los individuos heterocigotos para el cambio A236Val presentan una disminución del porcentaje de DMA excretado ( $p = 0,045$ ). Sin embargo, la frecuencia de esta variante en la población es extremadamente baja y los porcentajes de DMA obtenidos se encuentran casi en el límite de la significación estadística.

También se ha analizado el posible efecto de la combinación de las variantes de *GSTO1* sobre la variabilidad en la excreción del arsénico. Los resultados correspondientes a la interacción entre los haplotipos y el perfil de excreción del arsénico se resumen en las tablas 25 y 26. De la inferencia de los haplotipos se ha identificado un total de 3 formas con frecuencias superiores al 0,01. Los análisis de regresión indican que los individuos con el haplotipo 3, caracterizado por la doble variante Glu155del y 208Lys, tendrían aproximadamente un 3 % más de As-i y As<sup>III</sup> en orina, cuando se comparan con los individuos no portadores del haplotipo de referencia ( $p < 0,0001$ , en ambos casos). Asimismo, este haplotipo también estaría asociado con la reducción de un 3% en la excreción de DMA. Los haplotipos raros, incluyendo la forma variante 236Val, también estarían correlacionados de forma significativa ( $p < 0,0001$ ) con el incremento de los niveles de As<sup>V</sup>, As<sup>III</sup> y MMA y con la reducción del DMA.

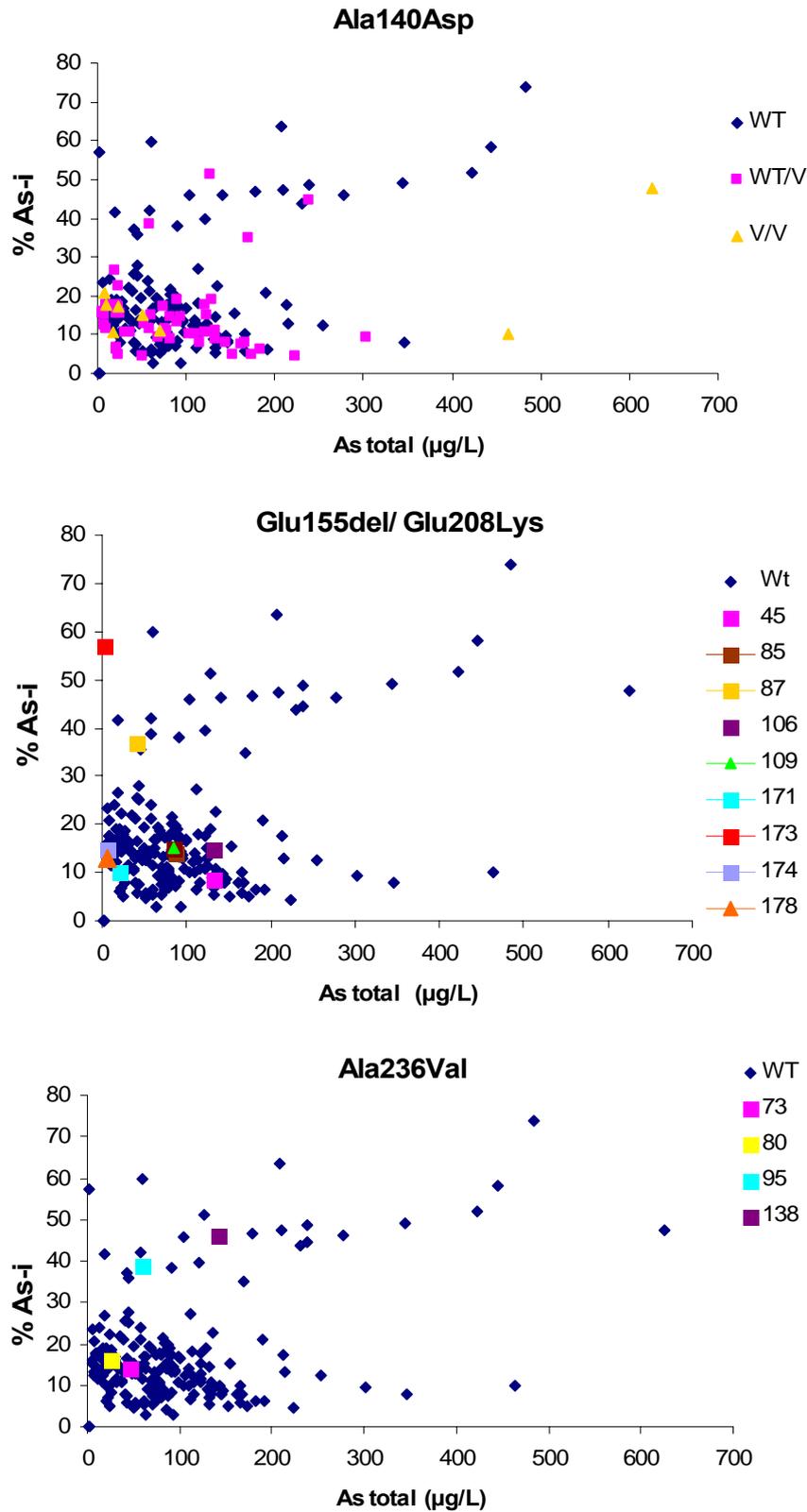


Fig. 15. Niveles de excreción de As-i *versus* arsénico total: individuos normales y variantes para los SNPs de GSTO1.

Tabla 23. Perfil de excreción de acuerdo con los genotipos

Niveles As en orina*	Glu50Gly		Ala140Asp		Glu155del/ Glu208Lys		Ala236Val		
	wt/wt	wt/v	wt/wt	wt/v	wt/wt	v/v	wt/wt	wt/v	
% As-i	17,27 ± 0,90	10,03 ± 0	18,28 ± 1,17	14,48 ± 1,28	18,79 ± 4,32	17,15 ± 0,91	20,47 ± 5,35	17,01 ± 0,90	28,64 ± 8,10
% As org	82,73 ± 0,90	89,97 ± 0	81,72 ± 1,17	85,52 ± 1,28	81,21 ± 4,32	82,85 ± 0,91	79,53 ± 5,35	82,99 ± 0,90	71,36 ± 8,10
% As <sup>v</sup>	5,23 ± 0,40	4,17 ± 0	5,35 ± 0,45	5,12 ± 0,91	4,29 ± 1,00	5,25 ± 0,40	5,28 ± 2,31	5,11 ± 0,39	10,99 ± 5,03
% As <sup>III</sup>	12,04 ± 0,90	5,86 ± 0	12,93 ± 1,19	9,36 ± 1,05	14,51 ± 4,93	11,90 ± 0,91	15,20 ± 5,38	11,90 ± 0,90	17,65 ± 8,77
% MMA	13,12 ± 0,53	<b>28,88 ± 0</b>	13,68 ± 0,67	12,20 ± 0,88	11,55 ± 3,02	13,19 ± 0,53	13,50 ± 4,19	13,13 ± 0,54	16,35 ± 4,09
% DMA	69,61 ± 0,98	61,09 ± 0	68,04 ± 1,26	73,32 ± 1,42	69,65 ± 3,81	69,66 ± 0,95	66,02 ± 8,60	69,86 ± 0,97	<b>55,01 ± 5,70</b>

\* Media ± EE (error estándar). Se señalan en **negrita** los patrones de excreción anormales y desfavorables.

Tabla 24. Interacción entre A236Val y el porcentaje de DMA excretado en orina

Variante	Genotipo	% DMA	OR (IC 95%)	P
Ala236Val	C/C	69,86 ± 0,97	0,00	-
	C/T	55,01 ± 5,7	<b>- 14,26 (-28,11 - -0,41)</b>	<b>0,045</b>

OR: *Odds ratio* ajustada a la edad; IC: intervalo de confianza; p: nivel de significación.  
Se señalan en **negrita** los valores de  $p < 0,05$ .

Tabla 25. Interacción entre haplotipos de *GSTO1* y el perfil de excreción de especies de arsénico inorgánicas

Haplo	% As <sup>-i</sup>		% As <sup>V</sup>		% As <sup>III</sup>	
	Frec	OD (IC 95%)	Frec	OD (IC 95%)	Frec	OD (IC 95%)
Haplo 1	0,79	0,00 -	0,79	0,00 -	0,79	0,00 -
Haplo 2	0,17	-1,94 (-5,13 - 1,24) P = 0,23	0,17	-0,4 (-1,82 - 1,02) p = 0,58	0,17	-1,55 (4,74 - 1,64) p = 0,34
Haplo 3	0,02	<b>3,07 (2,84 - 3,29)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,02	0,05 (-3,74 - 3,84) p = 0,98	0,02	<b>3 (2,78 - 3,23)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>
Raros	0,01	8,22 (8,11 - 8,33) p < 0,0001	0,01	<b>4,58 (4,42 - 4,73)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,01	<b>3,7 (3,6 - 3,79)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>

Haplo: Haplotipos; Frec: Frecuencias; OD: *Odds ratio*;

IC: Intervalo de confianza; p: grado de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236; 2. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236;

**3. Glu50/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236; 4. Raros.**

Se señalan en negrita los valores de  $p < 0.05$ .

Tabla 26. Interacción entre haplotipos de *GSTO1* y el perfil de excreción de especies de arsénico orgánico

Haplo	% MMA		%DMA	
	Frec	OD (IC 95%)	Frec	OD (IC 95%)
Haplo 1	0,794	0,00 -	0,795	0,00 -
Haplo 2	0,171	-1,25 (-3,14 - 0,63) p = 0,19	0,171	3,2 (-0,22 - 6,62) p = 0,068
Haplo 3	0,022	0,1 (-0,04 - 0,23) p = 0,16	0,022	<b>-3,16 (-3,41 - -2,92)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>
Raros	0,012	<b>3,27 (3,21 - 3,32)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,012	<b>-11,42 (-11,54 - -11,31)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>

Haplo: Haplotipos; Frec: Frecuencias; OD: *Odds ratio*;

IC: Intervalo de confianza; p: grado de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Ala236; 2. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236;

**3. Glu50/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236; 4. Raros.**

Se señalan en negrita los valores de  $p < 0.05$ .

Finalmente, se ha evaluado si alguna de las variantes de *GSTO1* estudiadas ejercía algún papel modulador en los patrones anormales de excreción del arsénico. Todos los análisis de regresión se ajustaron a la edad y se evaluó la distribución de los genotipos entre grupos con patrones de excreción inferiores o superiores a la media estándar (subdivididos según se observa en la tabla 22).

En general, tampoco se observan correlaciones significativas entre la distribución de los genotipos y los dos patrones extremos de excreción. Al analizar la distribución de los genotipos entre individuos con patrones favorables de excreción (As-i y MMA < 10%; DMA > 80%), incluso se pudieron detectar diferencias entre las cantidades de arsénico excretadas por individuos portadores de alelos normales o variantes, aunque en ninguno de los casos estas diferencias alcanzaron significación estadística. Cabe destacar que no se ha podido averiguar la interacción entre el genotipo A236Val y los perfiles anormales de excreción del As-i y del DMA, ya que en uno de los grupos sólo se ha detectado la presencia de individuos portadores de alelos normales.

En los análisis de regresión llevados a cabo entre individuos pertenecientes al grupo de los que presentan perfiles desfavorables de excreción, sólo se ha observado algún tipo de interacción entre genotipos y el porcentaje del DMA excretado (tabla 27).

Tabla 27. Asociaciones entre genotipos y porcentajes anormales de excreción del DMA

Variante	Genotipo	N	% DMA	OR (IC 95%)	P
<b>Glu155del</b>	Glu155/ Glu155 Glu208/ Glu208	40	49,32 ± 1,41	0,00	-
<b>Glu208Lys</b>	Glu155/ Glu155del Glu208/ Lys208	2	27,91 ± 20,77	<b>- 21,39 (-35,45 - -7,33)</b>	<b>0,00049</b>

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: grado significación.  
Se señalan en negrita los valores de  $p < 0.05$ .

Ya que todos los individuos heterocigotos para la delección en la posición 155 también eran heterocigotos para el cambio Glu208Lys, los resultados de los análisis de regresión son idénticos para los dos genotipos. Estos resultados indican que los doble heterocigotos (Glu155del y Glu208Lys) con niveles de excreción del DMA inferiores al 60 %, presentan alrededor de 20 % menos DMA en orina cuando se comparan con los individuos de este mismo grupo portadores de alelos normales. Por lo tanto, la condición de doble

heterocigosis incrementa aún más la situación de eliminación desfavorable del arsénico en orina.

#### 4.2.1.3.2. Asociación con el daño citogenético

Para determinar si la distribución de los genotipos de *GSTO1* está de alguna forma asociada a la frecuencia del daño genético medido a través de los ensayos de MN y SCE, se ha evaluado si los genotipos normales o variantes de *GSTO1* estaban correlacionados con el incremento o disminución de los MN (en linfocitos y en mucosa bucal) y de los SCE. Para ello, la población total de 207 individuos se ha dividido de acuerdo con la distribución de los genotipos de las variantes de *GSTO1* y las frecuencias de MN y SCE se compararon en cada uno de los casos (tabla 28).

Las frecuencias de BNMN, BCMN y SCE observadas entre individuos normales o heterocigotos para los cambios Glu50Gly, Glu155del/ Glu208Lys y Ala236Val se compararon utilizando el *t*-test, mientras que las frecuencias observadas según los genotipos normales, heterocigotos o mutantes para el cambio Ala140Asp se evaluaron utilizando el test Anova. No se detectaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas.

Tabla 28. Frecuencia de daño genético de acuerdo con la distribución de los genotipos de *GSTO1*

	Glu50Gly		Ala140Asp			Glu155del/ Glu208Lys		Ala236Val	
	wt/wt	wt/v	wt/wt	wt/v	m/v	wt/wt	wt/v	wt/wt	wt/v
BNMN	8,65 ± 0,39	6,0 ± 0	8,37 ± 0,43	9,44 ± 0,89	7,38 ± 2,44	7,67 ± 1,91	8,66 ± 0,40	8,61 ± 0,40	9,75 ± 1,93
BCMN	14,94 ± 1,01	25 ± 0	14,69 ± 1,21	15,63 ± 2,04	17,25 ± 4,05	14,94 ± 1,04	17,22 ± 4,04	15,01 ± 1,02	13,75 ± 7,39
SCE	6,16 ± 0,08	5,72 ± 0	6,16 ± 1,02	6,15 ± 1,46	6,10 ± 1,12	6,16 ± 1,17	6,14 ± 0,17	6,16 ± 0,08	5,82 ± 0,34

Media ± EE (error estándar).

Asimismo, también se evaluó el posible papel modulador de los distintos genotipos y haplotipos sobre el daño genético (frecuencia de MN y SCE), mediante un análisis de regresión logística ajustado a la edad y a la exposición. Para evaluar el papel de la

exposición como factor de confusión, se categorizó la población total en tres grupos, según los niveles de arsénico total en orina (altamente expuestos: arsénico total > 70 µg/L; expuestos: arsénico total = 40-70 µg/L, no expuestos: arsénico total < 40 µg/L) y se consideró el efecto de esta variable en el análisis de regresión. En ninguno de los casos se ha observado ninguna interacción significativa entre la distribución de genotipos y las respuestas analizadas. En los análisis llevados a cabo con los haplotipos, sólo se ha detectado una asociación significativa entre dos de las combinaciones y la frecuencia de BCMN (tabla 29).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este análisis, los individuos doble heterocigotos para la delección Glu155 y el cambio Glu208Lys (haplotipo 3), presentan un incremento en la frecuencia de BCMN del orden de cuatro veces ( $p < 0,0001$ ) al compararlos con los individuos portadores de los alelos normales para todas las variantes de *GSTO1*. Por otro lado, la combinación de los haplotipos raros (frecuencia inferior a 0,01) estaría asociada con una disminución de la frecuencia de BCMN.

Tabla 29. Asociación entre haplotipos de *GSTO1* y frecuencia de BCMN según la exposición

Haplotipos	Frecuencias de BCMN (ajustadas a la edad y la exposición)		
	Frecuencias	OD (IC 95%)	P
Haplo 1	0,796	0,00	-
Haplo 2	0,170	1,99 (-1,35 – 5,33)	0,24
Haplo 3	0,022	<b>4,36 (4,11 - 4,6)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
Raros	0,012	<b>- 4,11 (- 4,11 - -3,99)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>

OD: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: grado de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Ala236; 2. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236;

**3. Glu50/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236; 4. Raros.**

Se señalan en negrita los valores de  $p < 0,05$ .

Teniendo en cuenta que las diferencias en el patrón de excreción del arsénico podrían estar relacionadas con un mayor incremento del daño genotóxico, se llevaron a cabo análisis de regresión ajustados a los niveles de excreción de cada uno de los metabolitos específicos del arsénico (As-i, MMA y DMA). En este caso, los individuos se clasificaron teniendo en cuenta el patrón de excreción normal y los extremos (inferior y superior) de la media estándar. Estos análisis se ajustaron a la edad.

Los resultados revelan que la frecuencia de SCE no se encuentra modulada por la distribución de los genotipos o haplotipos de *GSTO1*, cuando los análisis de regresión se ajustan a los perfiles de excreción del As-i, MMA y DMA. Se obtuvieron resultados similares para la frecuencia de BNMN, a pesar de que, en algunos casos, se detectara variabilidad interindividual en la frecuencia de MN entre individuos de un mismo grupo, portadores de diferentes alelos.

En el caso de la frecuencia de BCMN, los resultados revelan una asociación significativa entre la combinación de los genotipos y la distribución de los MN, según el perfil de excreción de los individuos analizados. Las frecuencias de los haplotipos inferidos fueron casi idénticas en los tres análisis de regresión ajustados al perfil de excreción del As-i, del MMA o del DMA. Se ha observado un incremento en la frecuencia de BCMN entre individuos portadores del haplotipo 3 (Glu155del/ Glu208Lys) cuando se estratificaron según los patrones de excreción de arsénico y se compararon con los individuos portadores del haplotipo de referencia. Por otro lado, los haplotipos raros estarían asociados a la reducción de la frecuencia de BCMN en los análisis de regresión ajustados al perfil de excreción del MMA y del DMA (tabla 30).

Por último, los análisis de correlación entre la distribución de los genotipos y la frecuencia de MN o de SCE se realizaron ajustados a la edad y teniendo en cuenta sólo los individuos que presentaban perfiles anormales de excreción del arsénico. Cabe destacar que, como ya se ha mencionado anteriormente, no se pudo averiguar la interacción entre el genotipo Ala236Val y la frecuencia del daño genético (MN o SCE) en los análisis estratificados según los perfiles anormales de excreción del As-i inferior al 10 % y del DMA superior al 80 %, dado que no se han encontrado individuos portadores del alelo variante en estos grupos.

Tabla 30. Asociaciones entre haplotipos y frecuencia de BCMN, en función del perfil de excreción

Frecuencia de BCMN (ajustadas a la edad y perfil de excreción)						
Haplo	Frec	% As-i OD (IC 95 %)	Frec	% MMA OD (IC 95 %)	Frec	% DMA OD (IC 95 %)
Haplo 1	0,796	0,00 -	0,796	0,00 -	0,796	0,00 -
Haplo 2	0,169	1,69 (-1,77 - 5,16) p = 0,34	0,169	1,82 (-1,63 - 5,27) p = 0,30	0,169	1,13 (-2,29 - 4,56) p = 0,52
Haplo 3	0,022	<b>3,96 (3,85 - 4,07)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,022	<b>3,3 (3,17 - 3,44)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,022	<b>3,46 (3,34 - 3,57)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>
Raros	0,012	-0,07 (-0,15 - 0,01) p = 0,093	0,012	<b>-2,56 (-2,63 - -2,49)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,012	<b>-0,54 (-0,62 - 0,47)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>

Haplo: Haplotipos; Frec: Frecuencias;

OD: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: grado de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236; 2. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236;

**3. Glu50/ Ala140/ Glu155del / 208Lys/ Ala236;**

**4. Raros.** Se señalan en negrita los valores de  $p < 0,05$ .

En los resultados del análisis de regresión, considerando los SCE como la variable de respuesta, no se detecta ninguna interacción entre la distribución de los genotipos de *GSTO1* y las frecuencias de SCE observadas en los individuos que presentan patrones de excreción del arsénico anormales, aunque favorables ( $As-i < 10\%$ ;  $MMA < 10\%$  o  $DMA > 80\%$ ). Se obtuvieron resultados similares al analizar las frecuencias de MN en linfocitos y en mucosa bucal teniendo en cuenta la distribución de los distintos genotipos entre estos grupos. La única excepción observada ha sido la correlación existente entre el incremento de la frecuencia de BNMN y los individuos portadores de los alelos variantes para el cambio Ala140Asp, detectada en el grupo de los que excretan porcentajes de MMA inferiores al 10% (tabla 31). En este caso, los individuos heterocigotos y homocigotos mutantes presentan casi tres veces más células bucales con MN que aquellos individuos portadores de los alelos normales.

Tabla 31. Asociación entre el genotipo Ala140Asp y la frecuencia de BNMN

Frecuencia de BNMN ajustada a la edad: individuos con perfil de excreción de MMA < 10 %					
Modelo de herencia	Genotipo	Nº de individuos	Media ± EE	OR (IC 95%)	P
Dominante	Ala/Ala	52	7,15 ± 0,52	0,00	<b>0,014</b>
	Ala/Asp; Asp/Asp	25	10,2 ± 1,45	<b>2,87 (0,64 - 5,11)</b>	

EE: Error estándar; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: grado significación. Se señalan en negrita los valores de  $p < 0,05$ .

Por otro lado, cuando se analiza la frecuencia de SCE en el grupo de individuos con perfil anormal desfavorable de excreción del arsénico ( $As-i > 30\%$ ,  $MMA > 20\%$  o  $DMA < 60\%$ ), se observa que la distribución del genotipo Ala140Asp está asociado con la disminución de la frecuencia de SCE (tabla 32).

Tabla 32. Asociación entre el genotipo Ala140Asp y la frecuencia de SCE

Frecuencia de SCE ajustada a la edad: individuos con perfil de excreción del As-i > 30 %					
Modelo de herencia	Genotipo	Nº de individuos	Media ± EE	OR (IC 95%)	P
Dominante	Ala/Ala	19	6,78 ± 0,20	0,00	<b>0,022</b>
	Ala/Asp; Asp/Asp	5	5,71 ± 0,35	<b>- 1,07 (-1,92 - -0,54)</b>	

EE: Error estándar; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: grado significación. Se señalan en negrita los valores de  $p < 0,05$ .

Los análisis de regresión llevados a cabo en este mismo grupo (individuos con patrón desfavorable de excreción del arsénico), considerando los MN como variable de respuesta, revelan interacciones significativas entre algunos de los genotipos estudiados y el incremento de las frecuencias de MN en linfocitos y en mucosa bucal.

En un primer análisis se observó que el genotipo Ala140Asp estaba correlacionado con el aumento de la frecuencia de BCMN, tanto en el grupo de los individuos que excretan altos

niveles de As-i como en el grupo de los que excretan niveles anormales de DMA. Ambos patrones de excreción se caracterizan por ser desfavorables a la eliminación del arsénico. En las dos situaciones, los individuos heterocigotos y homocigotos mutantes para el cambio Ala140Asp presentan una frecuencia media de BCMN más de diez veces superior a la observada en los individuos que poseen el alelo normal Ala/Ala (tabla 33).

Tabla 33. Asociación entre el genotipo Ala140Asp y la frecuencia de BCMN según perfil de excreción

Frecuencia de BCMN ajustada a la edad: individuos con perfil de excreción del As-i >30 %					
Modelo de herencia	Genotipo	N	Media ± EE	OR (IC 95%)	P
Dominante	Ala/Ala	20	9,40 ± 1,61	0,00	<b>0,042</b>
	Ala/Asp; Asp/Asp	5	23,4 ± 11,66	<b>14,00 (1,28 - 26,71)</b>	
Frecuencia de BCMN ajustada a la edad: individuos con perfil de excreción del DMA < 60 %					
Modelo de herencia	Genotipo	N	Media ± EE	OR (IC 95%)	P
Dominante	Ala/Ala	37	10,49 ± 1,49	0,00	<b>0,030</b>
	Ala/Asp; Asp/Asp	5	23,40 ± 11,66	<b>12,90 (1,64 – 24,17)</b>	

EE: Error estándar; N: N° de individuos; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; P: grado significación. Se señalan en negrita los valores de  $p < 0.05$ .

Finalmente, los resultados del análisis de regresión que presentaron una correlación significativa entre la frecuencia de BNMN y los genotipos de la GSTO1 analizados se presentan en la tabla 34.

Tabla 34. Asociación entre los genotipos Glu155del/ Glu208Lys y la frecuencia de BNMN

Frecuencia de BNMN ajustada a la edad: individuos con perfil de excreción del DMA < 60 %					
Variante	Genotipo	N	Media ± EE	OR (IC 95%)	P
<b>Glu155del o Glu208Lys</b>	Glu155/ Glu155 Glu208/ Glu208	39	7,67 ± 0,72	0,00	<b>0,041</b>
	Glu155/ Glu155del Glu208/ Lys208	2	14,00 ± 4,00	<b>6,30 (0,46 - 12,14)</b>	

EE: Error estándar; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: nivel de significación.

Los individuos que presentan un porcentaje de excreción de DMA inferior al 60 % y son doble heterocigotos para estos cambios poseen seis veces más BNMN en comparación con los individuos de este mismo grupo con ambos alelos normales.

De acuerdo con estos resultados, se ha buscado la posible interacción entre los polimorfismos de *GSTO1* y el incremento del daño genotóxico (BCMn o BNMN) observado en aquellos individuos con perfiles anormales y desfavorables de excreción. Los resultados de los análisis de regresión indican la existencia de una asociación significativa entre haplotipos y daño genotóxico pero sólo entre aquellos individuos con un perfil de excreción del As-i superior al 30% (tabla 35). En este caso, se ha observado que la variante D140 (haplotipo 2) estaría correlacionada con el aumento de las BCMN, confirmando así los resultados obtenidos anteriormente.

Tabla 35. Asociación entre haplotipos de *GSTO1* y frecuencia de BCMN, según el perfil anormal de excreción de As-i

Haplotipos	Frecuencia de BCMN analizada según perfil de excreción del As-i > 30 %		
	Frecuencias	OD (IC 95%)	P
Haplo 1	0,818	0,00	-
Haplo 2	0,102	<b>12,17 (1,32 - 23,02)</b>	<b>0,039</b>
Haplo 3	0,040	2,42 (-17,19 - 22,04)	0,81
Haplo 4	0,022	-2,48 (-28,69 - 23,73)	0,85
Haplo 5	0,018	1,42 (-27,12 - 29,97)	0,92

OD: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: grado de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236; **2. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236**;  
3. Glu50/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236; 4. Glu50/ Ala140/ Glu155/ 208Lys/ 236Val  
5. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ 208Lys/ 236Val. Se señalan en negrita los valores de  $p < 0,05$ .

#### **4.2.2. Glutation S-transferasa Omega 2 (*GSTO2*)**

La primera parte de la investigación realizada con este gen consistió en la realización de un rastreo de las regiones codificantes del gen *GSTO2* entre individuos de origen atacameño y europeo. El paso siguiente consistió en el genotipado de las variantes de *GSTO2* encontradas en los tres grupos étnicos previamente analizados para las variantes de *GSTO1*. Finalmente, el estudio se amplió a los 207 individuos, que mostraban una gran variabilidad en los patrones de excreción del arsénico en orina y distintos niveles de daño, medidos por la frecuencia de SCE y MN.

##### **4.2.2.1. Caracterización del gen *GSTO2*: secuenciación de las regiones codificantes**

Los exones codificantes del gen *GSTO2* y parte de sus regiones flanqueantes se secuenciaron utilizando muestras de DNA de 20 individuos atacameños y 20 europeos. Los atacameños se incluyeron en este estudio inicial al considerar que, al haber estado esta población expuesta crónicamente al arsénico durante numerosas generaciones, la presencia de polimorfismos entre estos individuos podría ser importante para explicar la variabilidad de respuesta frente al daño inducido por el arsénico. No obstante, todos los polimorfismos detectados tanto entre los atacameños como entre los europeos ya habían sido previamente descritos en la literatura.

Así, se ha confirmado la existencia de 3 cambios en estas dos poblaciones, todos con frecuencias superiores al 2 %. La descripción de estos cambios, así como las frecuencias de los alelos variantes se recogen en la tabla 35.

Los resultados obtenidos revelan que los tres polimorfismos encontrados, a pesar de presentarse en frecuencias distintas, están presentes tanto en atacameños como en europeos. Se encontraron dos polimorfismos en regiones codificantes del gen *GSTO2*, aunque sólo el correspondiente a la transición A < G en la posición 142 lleva a un cambio de aminoácido no funcional.

Tabla 35. Polimorfismos de *GSTO2* detectados entre los atacameños y europeos

Región	5' Secuencia 3'	Efectos en la proteína	Frecuencias de los alelos variantes		Descripción anterior (bdSNP)
			atacameños	europeos	
Intrón 4	atttaaaaag <b>t/c</b> cactcacact	No codificante	0,05	0,47	rs # 157077
Exón 5	agaatgcact <b>a/g</b> atctgaaggc	Asn (142) Asp	0,08	0,38	rs # 156697
Exón 7	tgagccacac <b>g/t</b> ccagccctgc	Thr (197) Thr	0,08	0,02	rs # 3758572

Cabe destacar que en un estudio llevado a cabo por Mukherjee y colaboradores se detectaron numerosos polimorfismos para *GSTO2* en poblaciones de distintas etnias, aunque sólo 6 de ellos estaban localizados en regiones codificantes del gen. Entre los individuos caucásicos, se detectaron 3 de estos 6 polimorfismos, incluyendo el cambio Asn142Asp (Mukherjee *et al.*, 2006).

#### 4.2.2.2. Análisis de la frecuencia de la variante Asn142Asp: diferencias interétnicas

Los individuos pertenecientes a los tres grupos étnicos: atacameños, chilenos y europeos, fueron genotipados para el cambio Asn142Asp. La distribución de los genotipos y la descripción de las frecuencias observadas se muestran en la tabla 36. En un análisis previo se comprobó que la distribución de cada genotipo, tanto en la población total como en cada uno de los grupos, estaba de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg y era independiente del sexo.

Tabla 36. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas para Asn142Asp

Grupos analizados (nº individuos)	Distribución de los genotipos (%)			Frecuencia del alelo mutante
	wt/wt	wt/v	v/v	
atacameños (46)	91,3	8,7	0	0,04
chilenos (111)	61,3	35,1	3,6	0,21
europeos (124)	33,9	47,6	18,5	0,42

Diferencias entre grupos:  $\chi^2$ : (4 gl) = 55,15, p = 0,000.

Los genotipos heterocigotos y mutantes están más representados en los europeos, en comparación con las distribuciones observadas en chilenos y atacameños. Asimismo, la frecuencia de homocigotos mutantes en los chilenos es aproximadamente cinco veces inferior a la observada entre europeos, mientras que en los atacameños no se ha detectado ningún individuo homocigoto mutante.

Estos resultados indican que, análogamente a lo observado para las variantes de *GSTO1*, los atacameños son menos polimórficos para el gen *GSTO2* en comparación con los otros dos grupos. Como era de esperarse, la frecuencia de los genotipos alcanza diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,001$ ).

#### **4.2.2.3. Papel de la variante Asn142Asp**

A pesar del gran número de variantes de *GSTO2* citadas en la literatura, el cambio Asn142Asp ha sido el único localizado en una región codificante del gen y encontrado en todas las poblaciones estudiadas. Es por esto que, los polimorfismos en el gen *GSTO2* que lleven a cambios que alteren la actividad de la proteína pueden tener importantes implicaciones toxicológicas, en la terapia contra el cáncer, y en la evaluación del riesgo de poblaciones humanas expuestas a genotóxicos en general y, en especial, al arsénico.

En este contexto, los 207 individuos chilenos que habían sido genotipados para las variantes de *GSTO1*, también se genotiparon para este cambio.

Los resultados revelan que el alelo mutante (142Asp) tiene una frecuencia de 0,22. El 61,7 % de los individuos son portadores del genotipo normal, mientras que el 33,5 % son heterocigotos y el 4,9 % homocigotos mutantes. Esta distribución genotípica está de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Considerando que la combinación de los genotipos de *GSTO1* y *GSTO2* podría estar implicada en la variabilidad individual de los patrones de excreción del arsénico y, por lo tanto, tener consecuencias en la susceptibilidad al daño genotóxico observado en la población de trabajadores estudiados, se hizo una estima de los posibles haplotipos y de sus frecuencias mediante el algoritmo EM. En la tabla 37 se presenta la descripción de los haplotipos más comunes y de las frecuencias observadas.

Tabla 37. Haplotipos y frecuencias observadas

Estima de los haplotipos (n = 207): EM - IC 99%							
Haplotipos	Glu50Gly	Ala140Asp	Glu155del	Glu208Lys	Ala236Val	Asn142Asp	Frecuencias
1	Glu50	Ala140	Glu155	Glu208	Ala236	Asn142	0,7624
2	Glu50	140Asp	Glu155	Glu208	Ala236	142Asp	0,1619
3	Glu50	Ala140	Glu155	Glu208	Ala236	142Asp	0,0319
4	Glu50	Ala140	Glu155del	208Lys	Ala236	142Asp	0,0218
5	Glu50	140Asp	Glu155	Glu208	Ala236	Asn142	0,0100
6	Glu50	Ala140	Glu155	Glu208	236Val	Asn142	0,0092
7	50Gly	Ala140	Glu155	Glu208	Ala236	Asn142	0,0024
8	Glu50	140Asp	Glu155	Glu208	236Val	142Asp	5 e <sup>-04</sup>

EM: Frecuencias estimadas mediante el algoritmo de esperanza-maximización;  
 IC: intervalo de confianza 99%.

Los resultados revelan la existencia de un total de 8 haplotipos, presentando 3 de ellos frecuencias inferiores al 1 %. Dos de los haplotipos de baja frecuencia se caracterizan por presentar la forma variante 236Val, mientras que la variante 50Gly es la que caracteriza el último de los 3 haplotipos raros detectado.

Como era de esperar, se ha observado un desequilibrio de ligamiento entre Glu155del y Glu208Lys (coeficiente  $R = 0,997$ ;  $p < 2 \times 10^{-10}$ ). Al analizar la correlación existente entre el polimorfismo Asn142Asp y las formas Glu155del y Glu208Lys, también se observa la existencia de una correlación significativa ( $R = 0,284$ ;  $p < 8,83 \times 10^{-10}$ ) entre los mismos, llegando a alcanzar valores de  $D' = 0,996$ . Los valores de  $D$  representan la desviación entre la frecuencia de haplotipos esperada (con la premisa de no asociación) y la frecuencia observada, mientras que los valores de  $D'$  corresponden a los valores de  $D$  en un rango entre -1 y 1, correspondiendo el valor 1 al desequilibrio máximo.

Por otra parte, también se encontró la existencia de una elevada correlación entre Ala140Asp y Asn142Asp ( $R = 0.803$ ;  $p < p < 2e^{-10}$ ), indicando que ambos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento ( $D' = 0,924$ ).

#### 4.2.2.3.1. Asociación con el patrón de excreción de arsénico en orina

Como se ha explicado anteriormente, en los análisis de correlación entre genotipos, diferencias en el patrón de excreción del arsénico y daño citogenético, los individuos que antes estaban subdivididos en distintos grupos de exposición se consideraron como una única población.

De modo general, a pesar de las diferencias observadas en el patrón de excreción del arsénico entre los individuos analizados, los análisis no demostraron ninguna correlación entre la distribución bimodal del As-i y las variantes de *GSTO1* analizadas. Cuando se compararon gráficamente los porcentajes de excreción del As-i respecto del arsénico total, entre individuos portadores de alelos normales y variantes para el cambio N142D, tampoco se observó ninguna correlación (fig. 16).

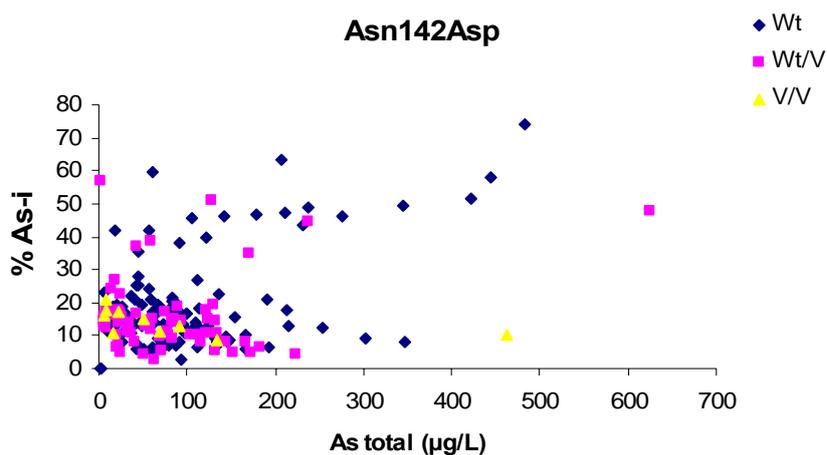


Fig.16. Niveles de excreción de As-i frente a arsénico total: individuos normales o variantes para el cambio Asn142Asp.

Como se puede observar, la distribución bimodal del As-i no parece estar modulada por la variante Asn142Asp. Si consideramos que los porcentajes de As-i no están fuertemente correlacionados con los niveles de arsénico total, otros factores deben estar influyendo sobre esta variabilidad.

En la tabla 38 se detallan los niveles de As-i y de arsénico orgánico, incluyendo las especies inorgánicas pentavalentes y trivalentes y las formas metiladas MMA y DMA, teniendo en cuenta el genotipo de los individuos.

Tabla 38. Perfil de excreción de acuerdo con el genotipo Asn142Asp

Niveles de As en orina (media $\pm$ EE)	Asn142Asp		
	wt/wt	wt/v	v/v
% As-i	18,47 $\pm$ 1,26	15,63 $\pm$ 1,34	14,07 $\pm$ 1,25
% As org	81,52 $\pm$ 1,26	84,37 $\pm$ 1,34	85,93 $\pm$ 1,25
% As <sup>V</sup>	5,40 $\pm$ 0,48	5,10 $\pm$ 0,78	4,39 $\pm$ 0,97
% As <sup>III</sup>	13,08 $\pm$ 1,29	10,53 $\pm$ 1,22	9,68 $\pm$ 1,80
% MMA	13,61 $\pm$ 0,68	12,39 $\pm$ 0,92	13,76 $\pm$ 2,63
% DMA	67,92 $\pm$ 1,27*	71,98 $\pm$ 1,68	72,16 $\pm$ 2,08

EE: Error estándar; Prueba de Kruskal-Wallis: \*  $p < 0,05$ .

Excepto para los porcentajes de DMA ( $\chi^2$ : (2 gl) = 6,46,  $p = 0,039$ ), no se detectaron diferencias entre los niveles de los distintos metabolitos de arsénico excretados en orina entre los individuos portadores de alelos normales o variantes para el polimorfismo Asn142Asp.

Un análisis más detallado del posible efecto modulador del genotipo Asn142Asp sobre el perfil de excreción del arsénico y de sus metabolitos se hizo mediante un análisis de regresión lineal ajustada a la edad (tabla 39). La única asociación significativa observada ha sido entre el genotipo Asn142Asp y los porcentajes de DMA excretados. Confirmando los resultados obtenidos anteriormente, se observó que los individuos heterocigotos y homocigotos mutantes para este cambio excretan casi un 4 % más DMA, en comparación con los individuos con el genotipo normal. Estos resultados sugieren que la variante Asp142 ejerce un efecto positivo en el proceso de metabolización y excreción del arsénico.

Tabla 39. Interacción entre Asn142Asp y el porcentaje de DMA excretado en orina

Modelo de herencia	Variante Asn142Asp	Nº individuos	% DMA $\pm$ EE	OR (IC 95%)	P
Dominante	Asn/Asn	125	67,92 $\pm$ 1,27	0,00	<b>0,05</b>
	Asn/Asp Asp/Asp	79	72,00 $\pm$ 2,08	<b>3,95 (0,03 - 7,86)</b>	

EE: Error estándar; OR: *Odds ratio* ajustada a la edad; IC: Intervalo de confianza; p: grado significación. Se señalan en negrita los valores con una  $p < 0,05$ .

Asimismo, se llevó a cabo un análisis de regresión considerando el efecto de la combinación de las variantes de *GSTO1* y de *GSTO2* estudiadas sobre la variabilidad en el perfil de excreción del arsénico. Los haplotipos se infirieron mediante el algoritmo EM y se identificaron un total de 4 formas representativas, con frecuencias superiores al 2 %. Las frecuencias de los haplotipos inferidos que incluyen las formas variantes 50Gly o la variante 236Val presentan frecuencias muy bajas, inferiores al 1 %, y por lo tanto, se agruparon en la categoría de haplotipos raros. Los resultados de interacción entre los haplotipos y el perfil de excreción del arsénico inorgánico y del arsénico orgánico están descritos en las tablas 40 y 41, respectivamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que los individuos que poseen la forma variante Asp142 (haplotipo 3) presentan una reducción significativa de los porcentajes de arsénico trivalente inorgánico excretados, al compararlos con los individuos portadores del haplotipo de referencia (forma más frecuente). Por otro lado, la forma variante Asp142, cuando segrega juntamente con la doble variante Glu155del/208Lys (haplotipo 4), pasa a ser incluida en una combinación de genotipos de riesgo. En este caso, los individuos portadores del haplotipo 4 presentan un perfil desfavorable de excreción del As-i, que estaría asociado con una mayor susceptibilidad al daño inducido por el arsénico. Los haplotipos raros también estarían asociados a un incremento de los niveles de ambas formas de As-i ( $As^V$  y  $As^{III}$ ) y, por lo tanto, a un patrón desfavorable de excreción. Por otro lado, no se observaron interacciones significativas entre ninguno de los haplotipos y los niveles de excreción de la forma orgánica MMA. En contraste, los haplotipos 2 y 3 estarían asociados con el incremento del porcentaje de DMA excretado (patrón favorable de excreción), mientras que el haplotipo 4 y la combinación de los haplotipos raros estarían relacionados con el patrón desfavorable de excreción del DMA.

Tabla 40. Interacción entre los haplotipos de *GSTO1* y *GSTO2* y el perfil de excreción de especies de arsénico inorgánicas

Haplo	% As-i		% As <sup>V</sup>		% As <sup>III</sup>	
	Frec.	OD (IC 95%)	Frec.	OD (IC 95%)	Frec.	OD (IC 95%)
Haplo 1	0,763	0,00 -	0,763	0,00 -	0,762	0,00 -
Haplo 2	0,163	-2,6 (-5,84 - 0,65) p = 0,12	0,163	-0,33 (-1,81 - 1,14) p = 0,66	0,164	-2,26 (-5,55 - 0,98) p = 0,17
Haplo 3	0,032	<b>-5,28 (-5,58 - -4,98)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,032	-1,44 (-4,65 - 1,76) p = 0,38	0,032	<b>-3,84 (-4,14 - -3,53)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>
Haplo 4	0,022	<b>2,67 (2,46 - 2,89)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,022	-0,09 (-3,9 - 3,71) p = 0,96	0,022	<b>2,76 (2,54 - 2,97)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>
Raros	0,020	<b>6,96 (6,83 - 7,1)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,02	<b>1,2 (0,74 - 1,66)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,020	<b>5,82 (5,7 - 5,94)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>

Haplo: Haplotipos; Frec: Frecuencias; OD: *Odds ratio*;

IC: Intervalo de confianza; p: nivel de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ Asn142;

2. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp;

3. **Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp**;

4. **Glu50/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236/ 142Asp**;

5. **Raros**. Se señalan en negrita los valores de  $p < 0,05$ .

Por último se ha averiguado si la distribución del genotipo Asn142Asp podía estar involucrada en los patrones anormales de excreción del arsénico. Todos los análisis de regresión se ajustaron a la edad y se evaluó la distribución de la forma normal (Asn142) y de la variante (142Asp) entre grupos con patrones de excreción inferiores o superiores a la media estándar (subdivididos según la tabla 22). Los resultados revelan la falta de correlación significativa entre la distribución del genotipo Asn142Asp y los dos patrones extremos de excreción, favorables o no al proceso de biotransformación y excreción del arsénico.

Tabla 41. Interacción entre los haplotipos de *GSTO1* y *GSTO2* y el perfil de excreción de especies de arsénico orgánico

Haplotipos	% MMA		% DMA	
	Frec.	OD (IC 95%)	Frec.	OD (IC 95%)
Haplo 1	0,763	0,00 -	0,763	0,00 -
Haplo 2	0,163	-1,04 (-2,98 - 0,91) p = 0,30	0,163	<b>3,65 (0,12 - 7,18)</b> <b>p = 0,043</b>
Haplo 3	0,032	1,16 (-3,02 - 5,34) p = 0,59	0,032	<b>4,13 (3,80 - 4,46)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>
Haplo 4	0,022	0,16 (-0,63 - 0,95) p = 0,69	0,022	<b>-2,83 (-3,07 - -2,59)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>
Raros	0,020	0,01 (-0,43 - 0,44) p = 0,98	0,020	<b>-6,91 (-7,08 - -6,74)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>

Frec: Frecuencias; OD: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: grado de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ Asn142;
2. **Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp;**
3. **Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp;**
4. **Glu50/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236/ 142Asp;**
5. **Raros.** Se señalan en negrita los valores con una  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2.3.2. Asociación con el daño citogenético

Con el objetivo de averiguar si el cambio Asn142Asp podía estar asociado de alguna manera con el daño citogenético, se ha analizado la frecuencia de SCE y de MN (en linfocitos y en células de mucosa bucal) de acuerdo con la distribución de las frecuencias genotípicas observadas en los 207 trabajadores chilenos (tabla 42). Como se puede observar, no se detectaron diferencias entre las frecuencias de SCE y de MN relacionadas con la segregación del alelo mutante o del normal.

También se investigó mediante un análisis más detallado el efecto del genotipo Asn142Asp o de la combinación de los genotipos de *GSTO1* y *GSTO2* sobre la frecuencia de SCE y de MN. Los individuos se estratificaron según los niveles de arsénico total detectados en orina ( $> 70 \mu\text{g/L}$ ;  $40 - 70 \mu\text{g/L}$ ;  $< 40 \mu\text{g/L}$ ) y se llevó a cabo un análisis de regresión logística ajustado a la edad y a la exposición. Sólo se observó una correlación significativa entre algunos de los haplotipos inferidos y la frecuencia de BCMN (tabla 43).

Tabla 42. Frecuencia del daño genotóxico de acuerdo con el genotipo Asn142Asp

	Asn142Asp		
	wt/wt	wt/v	v/v
BNMN (media ± EE)	9,16 ± 0,77	8,40 ± 0,46	7,70 ± 2,04
BCMN (media ± EE)	14,97 ± 1,67	14,91 ± 1,33	17,10 ± 4,15
SCE (media ± EE)	6,15 ± 0,17	6,17 ± 0,09	6,04 ± 0,30

EE: Error estándar; ANOVA: BNMN; BCMN; SCE.

No hay diferencias significativas entre las medias.

Los resultados revelan que los individuos portadores de los haplotipos 4 y 5 presentan un incremento en la frecuencia de BCMN, cuando se comparan con los individuos que presentan el haplotipo de referencia (haplotipo 1). Por otro lado, tanto el haplotipo 3 como los haplotipos agrupados en la categoría de raros (frecuencia inferior al 1%), estarían asociados a una disminución de la frecuencia de BCMN, contribuyendo de forma significativa a una reducción del daño genotóxico medido a través del ensayo de MN en células de mucosa bucal.

Tabla 43. Asociación entre haplotipos de *GSTO1* y *GSTO2* y la frecuencia de BCMN estratificado por exposición

Haplotipos	Frecuencia de BCMN (ajustadas por edad y exposición)		
	Frec	OD (IC 95%)	P
Haplo 1	0,791	0,00	-
Haplo 2	0,160	1,84 (-1,59 - 5,26)	0,29
Haplo 3	0,034	<b>-3,21 (-3,52 - -2,89)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
Haplo 4	0,022	<b>4,05 (3,82 - 4,28)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
Haplo 5	0,010	<b>2,55 (2,43 - 2,68)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
Raros	0,012	<b>- 4,40 (- 4,53 - -4,27)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>

Frec: Frecuencias; OD: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: grado de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ Asn142;

2. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp;

3. **Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp;**

4. **Glu50/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236/ 142Asp;**

5. **Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ Asn142;**

6. **Raros.** Se señalan en negrita los valores con una  $p < 0,05$ .

Asimismo, considerando que la variabilidad observada en el patrón de excreción del arsénico está relacionada de forma directa con las diferencias de susceptibilidad al daño genotóxico inducido, se ha realizado un análisis de regresión ajustado a la edad y a los perfiles de excreción de As-i, MMA y DMA, con el objetivo de averiguar si existía alguna asociación entre la distribución de los genotipos del cambio Asn142Asp y/o de los haplotipos *GSTO1* y *GSTO2* y las frecuencias de SCE y de MN observadas entre individuos con perfiles normales o anormales de excreción.

Los resultados indican que las frecuencias de SCE y de BNMN no se encuentran moduladas por el genotipo Asn142Asp, ni tampoco por la combinación de los genotipos *GSTO1* y *GSTO2*, cuando se llevan a cabo los análisis de regresión estratificados según el patrón de excreción del arsénico y de sus metabolitos, normal o relacionado con los extremos (inferior y superior) a la media estándar.

A pesar de no haberse detectado ninguna correlación entre el genotipo Asn142Asp y la frecuencia de BCMN, se identificaron asociaciones entre frecuencias y haplotipos de *GSTO1* y *GSTO2* en todas las comparaciones realizadas (tabla 44). Los resultados obtenidos revelan frecuencias idénticas para los haplotipos inferidos en los tres análisis de regresión ajustados al perfil de excreción del As-i, del MMA o del DMA. Se ha observado un incremento en la frecuencia de BCMN entre individuos portadores del haplotipo 4 (Glu155del/ Glu208Lys/ 142Asp) cuando se estratifican según cualquiera de los patrones de excreción de arsénico y se comparan con los individuos portadores del haplotipo de referencia. En contraste, los individuos portadores del haplotipo 3 (caracterizado por la variante 142Asp) o de alguno de los haplotipos raros presentan una reducción de las frecuencias de BCMN en cualquiera de los análisis de regresión realizados. Una vez más se confirma que el genotipo variante 142Asp parece estar implicado en una reducción del daño genotóxico.

Tabla 44. Asociación entre haplotipos de *GSTO1* y *GSTO2* y la frecuencia de BCMN, estratificados de acuerdo con los patrones de excreción del arsénico

Frecuencias de BCMN (ajustadas a la edad y al perfil de excreción)						
Haplo	% As-i		% MMA		% DMA	
	Frec	OD (IC 95%)	Frec	OD (IC 95%)	Frec	OD (IC 95%)
Haplo 1	0,791	0,00 -	0,791	0,00 -	0,791	0,00 -
Haplo 2	0,162	1,74 (-1,80 - 5,28) p = 0,34	0,162	1,85 (-1,69 - 5,38) p = 0,31	0,162	1,14 (-2,35 - 4,64) p = 0,52
Haplo 3	0,035	<b>-5,2 (-5,31 - -5,1)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,035	<b>-4,5 (-4,59 - -4,4)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,035	<b>-5,09 (-5,19 - -4,99)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>
Haplo 4	0,022	<b>3,54 (3,43 - 3,65)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,022	<b>2,93 (2,79 - 3,06)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,022	<b>3,03 (2,91 - 3,14)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>
Raros	0,020	<b>-1,4 (-1,47 - -1,34)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,020	<b>-2,4 (-2,46 - -2,34)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,020	<b>-1,59 (-1,67 - -1,51)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>

Haplo: Haplotipos; Frec: Frecuencias; OD: *Odds ratio*;

IC: Intervalo de confianza; p: grado de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ Asn142;

2. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp;

3. **Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp**;

4. **Glu50/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236/ 142Asp**;

5. **Raros**. Se señalan en negrita los valores con una  $p < 0,05$ .

Además, se ha averiguado el papel de la distribución del genotipo Asn412Asp sobre la frecuencia de SCE y de MN entre individuos que presentaban patrones extremos de excreción, favorables o no. No se detectó ninguna correlación entre el genotipo y las frecuencias de SCE o de MN observadas en los individuos con patrones favorables de excreción del As (As-i < 10 %; MMA < 10 % y DMA > 80 %).

Por otro lado, se ha observado que los individuos heterocigotos para Asn142Asp, con un perfil de excreción del DMA inferior al 60 %, presentaban una ligera disminución de la frecuencia de BCMN cuando se comparaban con los individuos portadores del genotipo normal (tabla 45). Cabe destacar que no se ha identificado ningún individuo doble mutante entre los grupos con patrones de excreción desfavorables para As-i o DMA. No se ha

observado ninguna otra asociación entre la distribución del genotipo Asn142Asp, los perfiles extremos de excreción y las frecuencias de SCE o de MN.

Tabla 45. Asociación entre el genotipo Asn142Asp y la frecuencia de BCMN

Frecuencia de BCMN ajustada a la edad: individuos con perfil de excreción del DMA < 60 %

Genotipo	Nº individuos	Media ± EE	OR (IC 95%)	P
Asp/Asp	32	6,49 ± 0,18	0,00	
Asp/Ala	9	5,63 ± 0,29	<b>- 0,84 (- 1,60 - -0,07)</b>	<b>0,039</b>

EE: Error Estándar; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: nivel de significación. Se señalan en negrita los valores con una  $p < 0,05$ .

Asimismo, se realizó un análisis de regresión estratificado según los patrones desfavorables de excreción de As-i, MMA y DMA, con el fin de investigar el posible efecto de los haplotipos de *GSTO1* y *GSTO2* en las frecuencias de SCE y MN.

En el caso de los análisis efectuados teniendo en cuenta la excreción de As-i superior al 30 %, se ha verificado una asociación entre uno de los haplotipos y la frecuencia de SCE (tabla 46). Los individuos portadores de los alelos variantes 140Asp y 142D (haplotipo 2) presentan una disminución en la frecuencia de SCE al compararlos con los que poseen los alelos normales (haplotipo 1).

Tabla 46. Asociación entre los haplotipos de *GSTO1* y *GSTO2* y la frecuencia de SCE, estratificada de acuerdo con los patrones de excreción del As-i > 30%

Haplotipos	Frecuencia de SCE (estratificada según patrón de excreción del As-i > 30 %)		
	Frec	OD (IC 95 %)	P
Haplo 1	0,810	0,00	-
Haplo 2	0,086	<b>- 1,54 (-2,51 - -0,57)</b>	<b>0,0058</b>
Haplo 3	0,042	-1,12 (-2,3 - 0,06)	0,777
Haplo 4	0,023	- 0,08 (-1,62 - 1,46)	0,920
Haplo 5	0,021	1,66 (-0,15 - 3,46)	0,088
Haplo 6	0,018	- 1,42 (- 3,13 - 0,29)	0,120

Frec: Frecuencias; OD: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: nivel de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ Asn142;
  2. **Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp;**
  3. Glu50/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236/ 142Asp;
  4. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ 236Val/ Asn142;
  5. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ Asn142;
  6. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/ 236Val/ 142Asp.
- Se señalan en negrita los valores con una  $p < 0,05$ .

Por otro lado, los análisis llevados a cabo considerando los patrones de excreción desfavorables de MMA y de DMA, indican la existencia de correlaciones significativas entre haplotipos y frecuencias de BCMN (tabla 47). En esta tabla, las formas de los haplotipos están descritas siguiendo el orden de frecuencias observadas en los análisis ajustados al perfil anormal de excreción del DMA.

Los resultados indican que, en el grupo de los individuos con perfil de excreción de MMA superior al 20 %, hay una disminución significativa de la frecuencia de las BCMN entre los individuos caracterizados por el haplotipo 3, en comparación con la media de la frecuencia de los portadores del haplotipo de referencia.

Cuando se trata de los análisis estratificados según el patrón de excreción de DMA inferior al 60 %, se ha encontrado que los individuos que poseen las formas alélicas variantes 140Asp/142Asp (haplotipo 2) presentan un incremento significativo en la frecuencia de BCMN. Estos resultados sugieren que la variante 142Asp, al segregar juntamente con la variante 140Asp, confiere un mayor riesgo de daño genotóxico medido según la frecuencia de BCMN, mientras que, al segregar con la variante 236Val, representa una mayor

protección frente al daño. Cabe señalar que estos resultados se obtuvieron en los análisis estratificados según los perfiles anormales y desfavorables de excreción del arsénico.

Tabla 47. Asociación entre los haplotipos de *GSTO1* y *GSTO2* y la frecuencia de BCMN estratificado de acuerdo con los patrones desfavorables de excreción de MMA y de DMA

Haplotipos	MMA > 20 %		DMA < 60 %	
	Frec	OD (IC 95 %)	Frec	OD (IC 95 %)
Haplo 1	0,784	0,00 -	0,855	0,00 -
Haplo 2	0,135	4,44 (-6,5 - 15,39) p = 0,43	0,048	<b>15,22 (3,33 - 27,1)</b> <b>p = 0,016</b>
Haplo 3	0,013	<b>-16,82 (-18,62 - -15,03)</b> <b>p &lt; 0,0001</b>	0,025	-7,02 (-24,36 - 10,32) p = 0,43
Haplo 4	0,027	0,16 (-0,63 - 0,95) p = 0,69	0,025	-6,20 (-23,33 - 10,93) p = 0,48
Haplo 5	0,040	5,03 (-14,54 - 9,73) p = 0,25	0,024	0,85 (-16,69 - 18,38) p = 0,93
Haplo 6	-	-	0,013	1,54 (-2,93 - 6,01) p = 0,50
Haplo 7	-	-	0,011	-0,15 (-2,28 - 1,97) p = 0,89

Frec: Frecuencias; OD: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; p: nivel de significación.

1. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ Asn142;
2. **Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp;**
3. **Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ 236Val/ Asn142;**
4. Glu50/ Ala140/ Glu155/ Glu208/ Ala236/ 142Asp;
5. Glu50/ Ala140/ Glu155del/ 208Lys/ Ala236/ 142Asp;
6. Glu50/ 140Asp/ Glu155/ Glu208/Ala236/ Asn142;
7. Glu50/ 140Asp/ Glu155del/ 208Lys/ 236Val/ 142Asp.

Se señalan en negrita los valores con p < 0,05.

### **Parte III. Estudios *in vitro***

#### **4.3. Posible relación entre *GSTO1* y los efectos causados por el arsénico**

Las GSTO constituyen la última clase de GSTs caracterizadas y se ha sugerido que los dos miembros que constituyen esta clase (*GSTO1* y *GSTO2*) poseen un papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis celular, actuando como limitantes en la vía de reducción del arsénico (Whitbread *et al.*, 2003; Schmuck *et al.*, 2005). Hasta el momento, la mayoría de los estudios relacionados con las GSTOs se han centrado en la identificación de nuevas formas variantes de estas enzimas, así como en su expresión y en los aspectos farmacocinéticos. No obstante, los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de estas enzimas y en la función que desempeñan en el proceso de metabolización de los compuestos xenobióticos, y en particular del arsénico, todavía son objeto de estudio y de discusión. En esta parte del estudio, se ha buscado una mejor caracterización de la expresión y regulación de *GSTO1*, así como establecer el papel de esta enzima en el metabolismo y en la toxicidad del arsénico. Algunos de los resultados obtenidos están descritos en el manuscrito del anexo 3.4.

##### **4.3.1. Caracterización de *GSTO1***

La caracterización de la enzima *GSTO1* llevada a cabo ha consistido en evaluar su expresión en distintos tipos celulares humanos, todas ellas provenientes de órganos afectados de modo preferente por el arsénico. Así, la línea celular MRC5 tiene su origen en fibroblastos de pulmón, las células 293FT son células embrionarias de riñón, y las HepG2 son células hepáticas, mientras que RT4 y SW800 son líneas celulares de cáncer de vejiga. Además, se ha comprobado la regulación de la expresión y las vías de regulación a que está sometida esta enzima.

###### **4.3.1.1. Expresión de *GSTO1* y *GSTO2* en diferentes líneas celulares**

Los extractos proteicos de las líneas celulares anteriormente descritas se evaluaron mediante *Western Blotting*. Los resultados revelaron que los niveles de expresión basal de *GSTO1* son altos y relativamente constantes en tres de las cinco líneas estudiadas. Las excepciones fueron las líneas HepG2 y SW800. En la primera, se detectaron niveles de expresión de *GSTO1* extremadamente altos, mientras que en la SW800 se observaron niveles basales de expresión muy bajos. Una vez eliminados los primeros anticuerpos, la

membrana de hibridación se volvió a utilizar con los anticuerpos de GSTO2, y también con los de anti  $\beta$ -actina, que fue utilizada como control de carga (fig. 17a). Los niveles de GSTO2 son más o menos constantes en todas las líneas, aunque inferiores a los niveles de GSTO1 observados. La normalización de las señales se hizo teniendo en cuenta los niveles de  $\beta$ -actina (fig. 17b). En general, todas las líneas celulares expresan niveles moderados de GSTO2, mientras que los niveles de GSTO1 difieren en las células SW800 y HepG2.

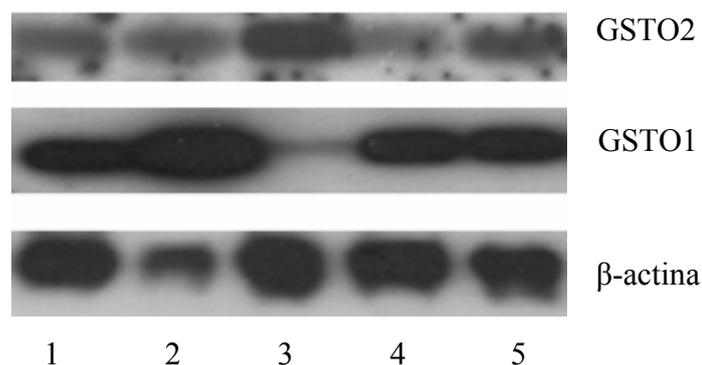


Fig. 17 a. Niveles basales de expresión de GSTO1 y GSTO2 en diferentes líneas celulares (carril 1: 293FT; carril 2: HepG2; carril 3: SW800; carril 4: RT4; carril 5: MRC5).

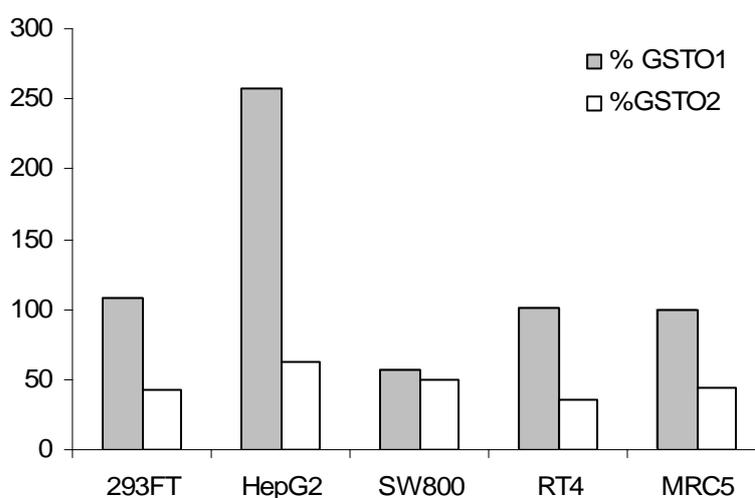


Fig. 17 b. Normalización de los niveles de expresión de GSTO1 y GSTO2 respecto a la  $\beta$ -actina.

#### 4.3.1.2 Regulación de la expresión de GSTO1

Para evaluar si la expresión de GSTO1 se encontraba regulada en las distintas fases del ciclo celular, se sincronizaron cultivos de la línea MRC5 mediante tratamiento con timidina. Una vez sincronizados en fase G1, los extractos celulares se colectaron en el tiempo 0 (coincidiendo con el final del tratamiento con timidina) y posteriormente a las 4, 8, 12 y 24 h.

Los resultados obtenidos mediante la metodología de *Western Blotting* se muestran en la fig. 18. Como control de carga, la membrana fue reincubada con GAPDH. Se puede observar que la expresión de GSTO1 es constante a lo largo de todo el ciclo celular.

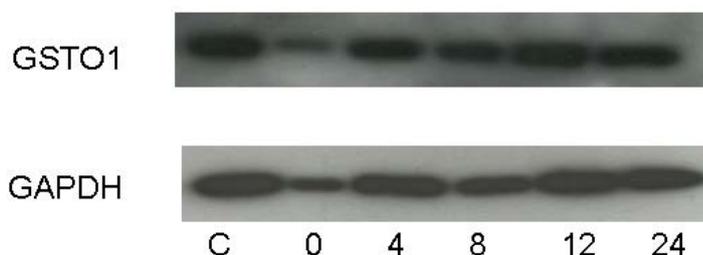


Fig. 18. Niveles de expresión de GSTO1 a lo largo del ciclo celular (C: células sin tratamiento; tiempos en horas, de 0 a 24, desde el final del bloqueo con timidina).

#### 4.3.1.3. Vías de regulación post-transcripcional y traduccional de GSTO1

El bloqueo de la transcripción se hizo tratando las células con actinomicina D (ACT), mientras que el bloqueo de la traducción se realizó con cicloheximida (CHX). También se realizaron tratamientos simultáneos con ambos agentes inhibidores (ACT/CHX). Los extractos celulares colectados en el tiempo 0 y a las 2, 4, 8 y 24 h después del inicio de los tratamientos se sometieron a la técnica de *Western Blotting*. En este caso, GAPDH también fue el control de carga utilizado (fig. 19). De nuevo, se confirma que la expresión de GSTO1 es muy constante y que no hay cambios de expresión debido a los mecanismos de transcripción y de traducción.

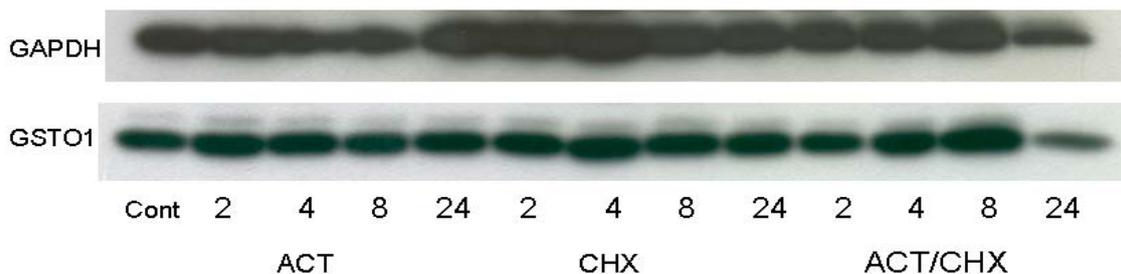


Fig. 19. Regulación de la expresión de GSTO1. Células controles sin tratamiento: Cont.; Bloqueo de la transcripción: tratamientos con ACT; Bloqueo de la traducción: tratamientos con CHX; Bloqueo simultáneo: ACT/CHX. Duración de los tratamientos: 2, 4, 8 y 24 h.

#### 4.3.2. Detección de los efectos inducidos por distintos compuestos de arsénico: ensayos de toxicidad

Considerando la capacidad que tienen las enzimas GSTO1 y GSTO2 de catalizar todas las reducciones en la vía clásica de metabolización del arsénico, se ha investigado si los niveles de expresión de estas dos enzimas podrían estar relacionados con diferencias en la respuesta a la toxicidad inducida por los compuestos pentavalentes del arsénico. Teóricamente, la toxicidad de los compuestos trivalentes no debería ser dependiente de los niveles de expresión de GSTO.

En los ensayos de toxicidad se utilizaron las líneas celulares MRC5 y SW800, previamente caracterizadas, por presentar diferencias importantes en los niveles basales de GSTO1. Como se ha indicado anteriormente, a pesar de que los niveles de expresión de GSTO2 en las dos líneas celulares son bastante parecidos, ambas enzimas son capaces de catalizar las reacciones de reducción del arsénico y, por lo tanto, niveles reducidos en la expresión de GSTO1 podrían llevar a una sustitución de funciones por parte de GSTO2.

En este contexto, se trataron células MRC5 y SW800 con diferentes compuestos de arsénico y se evaluó la inhibición de la proliferación celular mediante el ensayo de XTT (fig. 20).

Como era de esperar, los compuestos orgánicos MMA<sup>V</sup> y DMA<sup>V</sup> son menos tóxicos que los compuestos inorgánicos y el trióxido de arsénico y, consecuentemente, en los ensayos de toxicidad se utilizaron dosis en el rango de milimolar (mM), mientras que las concentraciones ensayadas para los otros tres compuestos eran del orden de micromolar ( $\mu$ M).

Los resultados indican que los compuestos pentavalentes As<sup>V</sup> y MMA<sup>V</sup> presentan una mayor citotoxicidad en las células MRC5 que en las SW800, mientras que los efectos de los tratamientos con As<sup>III</sup> o con el trióxido inorgánico casi no difieren entre ambas líneas celulares. Se ha observado una respuesta parecida en los tratamientos con DMA<sup>V</sup>, que es el metabolito final del proceso de biotransformación del arsénico. No obstante, excepto en los tratamientos con las dosis más altas, no encontramos diferencias significativas en la respuesta, con relación a la toxicidad inducida por los diferentes compuestos de arsénico, en las comparaciones realizadas entre las dos líneas. Estos resultados indican que el patrón general de toxicidad de los compuestos trivalentes y pentavalentes de arsénico orgánico e inorgánico no parece estar modulado por la existencia de diferentes niveles de expresión de GSTO1.

#### **4.3.3. Papel del gen *GSTO1* en la toxicidad del arsénico**

Se ha propuesto que GSTO1 es la principal enzima encargada de catalizar las reacciones de reducción del arsénico y, consecuentemente, se la considera como el factor limitante en el metabolismo del arsénico. Por otro lado, aunque GSTO2 presenta una menor capacidad DMA<sup>V</sup> reductasa, en comparación con GSTO1, también presenta la capacidad enzimática de llevar a cabo las funciones de reducción del arsénico. Por lo tanto, ambas enzimas parecen tener un papel importante en el metabolismo del arsénico y en el mantenimiento de la homeostasis celular, actuando como un sistema antioxidante en la protección contra el estrés oxidativo.

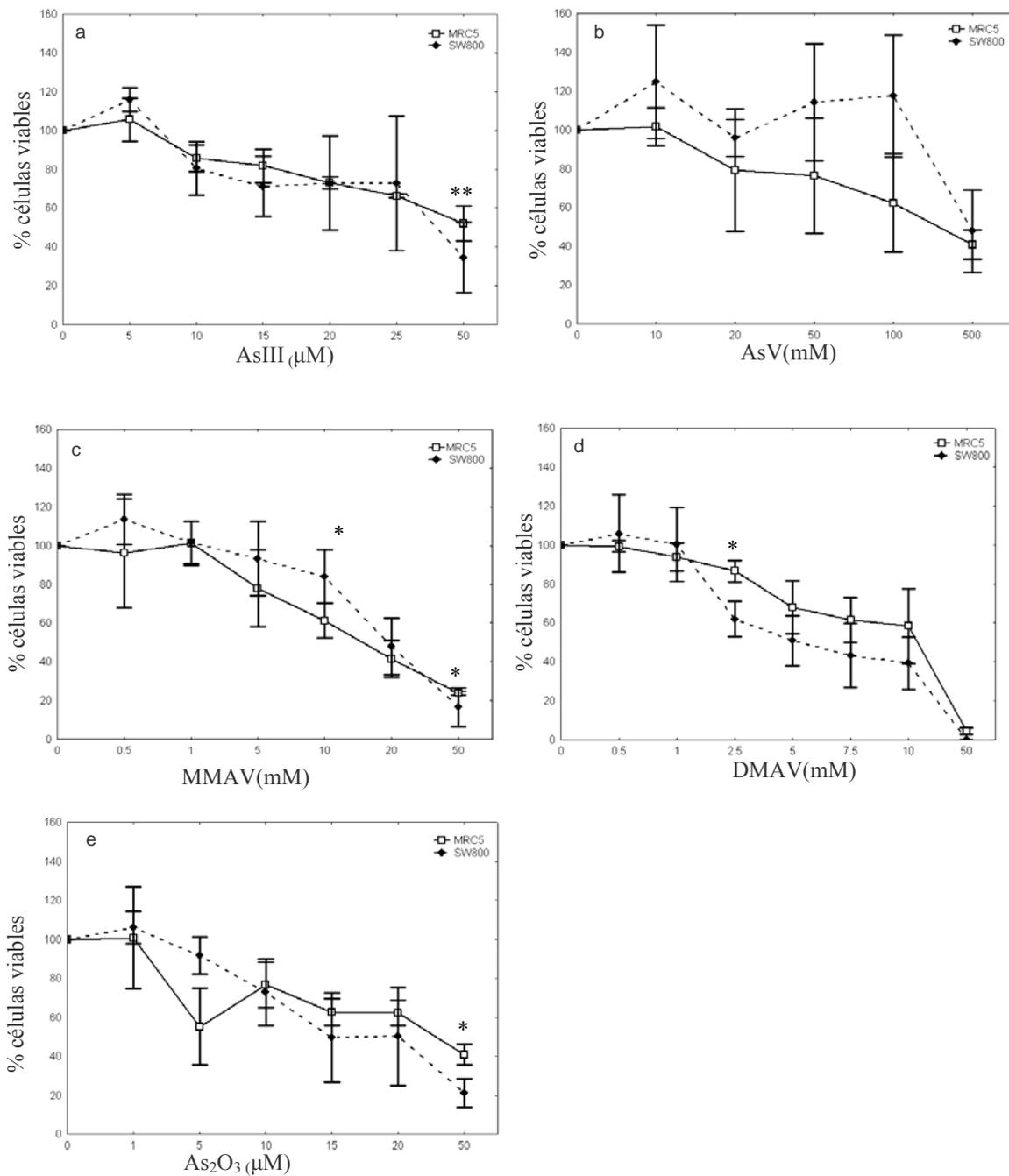


Fig. 20. Efecto de la inhibición de la proliferación celular después de 24 h de tratamiento con distintos compuestos de arsénico. Todos los datos representan el porcentaje de inhibición en comparación con las células controles. Cada uno de los puntos representa la media de valores obtenida en al menos 3 experimentos distintos, con la desviación típica indicada por las barras. Los asteriscos representan diferencias significativas entre células controles y tratadas (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### **4.3.3.1. Respuesta de las líneas celulares MRC5 y SW800 frente al daño causado por compuestos de arsénico inorgánicos y orgánicos: citotoxicidad y daño oxidativo**

Tal como se ha reflejado en la introducción, el arsénico es capaz de actuar de forma indirecta produciendo daño oxidativo y, por lo tanto, hemos investigado el efecto del estrés oxidativo en la citotoxicidad inducida por el arsénico en las dos líneas celulares (MRC5 y SW800). Las células se trataron con un inhibidor de oxidación (NAC) y, posteriormente, se evaluaron las diferencias de respuesta frente al daño inducido por compuestos de arsénico trivalentes y pentavalentes inorgánicos y por las especies orgánicas pentavalentes.

Los resultados indican que el tratamiento con el inhibidor de oxidación no produce toxicidad en ninguna de las dos líneas, incluso cuando se tratan con concentraciones de 10 mM. Las células MRC5 y SW800 se trataron con cada uno de los 5 compuestos de arsénico, utilizando un amplio rango de concentraciones, en presencia y en ausencia de 5mM de NAC (fig. 21 y 22).

De modo general, con excepción del DMA<sup>V</sup>, todos los compuestos de arsénico ensayados demostraron que, a bajas concentraciones, hay un solapamiento entre el daño inducido vía estrés oxidativo y la citotoxicidad, indicando que en las células pueden estar actuando dos mecanismos de respuesta distintos, dependiendo de la concentración de arsénico. Cabe destacar que, en casi todos los casos, se ha podido identificar la existencia de una dosis puntual a la cual los dos efectos dejan de solaparse.

Los resultados obtenidos para cada una de las dos líneas celulares tratadas sugieren un mecanismo de respuesta frente al daño bastante similar con relación a los compuestos trivalentes de arsénico y al DMA<sup>V</sup>. Además, las concentraciones de los tratamientos en los que se pueden observar exclusivamente los efectos inducidos por el estrés oxidativo son prácticamente idénticas en ambas líneas (5µM para As<sup>III</sup>; 1µM para As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; y de 1 a 10 mM para DMA).

Por otro lado, las diferencias de respuesta en los tratamientos con los compuestos pentavalentes de As<sup>V</sup> y MMA<sup>V</sup>, entre las dos líneas, son claramente significativas. En ambos casos, SW800 parece ser más resistente que MRC5. Asimismo, se observa que los efectos del daño oxidativo y de la citotoxicidad se solapan hasta concentraciones más elevadas en las células SW800. En el caso de MRC5, el solapamiento de los efectos

inducidos finaliza a concentraciones a partir de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{As}^{\text{V}}$  o de 2,5 mM de  $\text{MMA}^{\text{V}}$ , mientras que para SW800 sólo se pudo detectar un efecto similar a las concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{As}^{\text{V}}$  o de 10 mM de  $\text{MMA}^{\text{V}}$ .

En resumen, estos últimos resultados indican que la reducción de los niveles de expresión de GSTO1 parecen influir en la respuesta al daño oxidativo inducido por los compuestos de  $\text{As}^{\text{V}}$  y MMA. Como era de esperar, los dos compuestos de arsénico trivalentes ensayados en este trabajo presentan una gran capacidad para producir estrés oxidativo, mientras que el DMA no parece tener un potencial demasiado elevado para producir este tipo de daño.

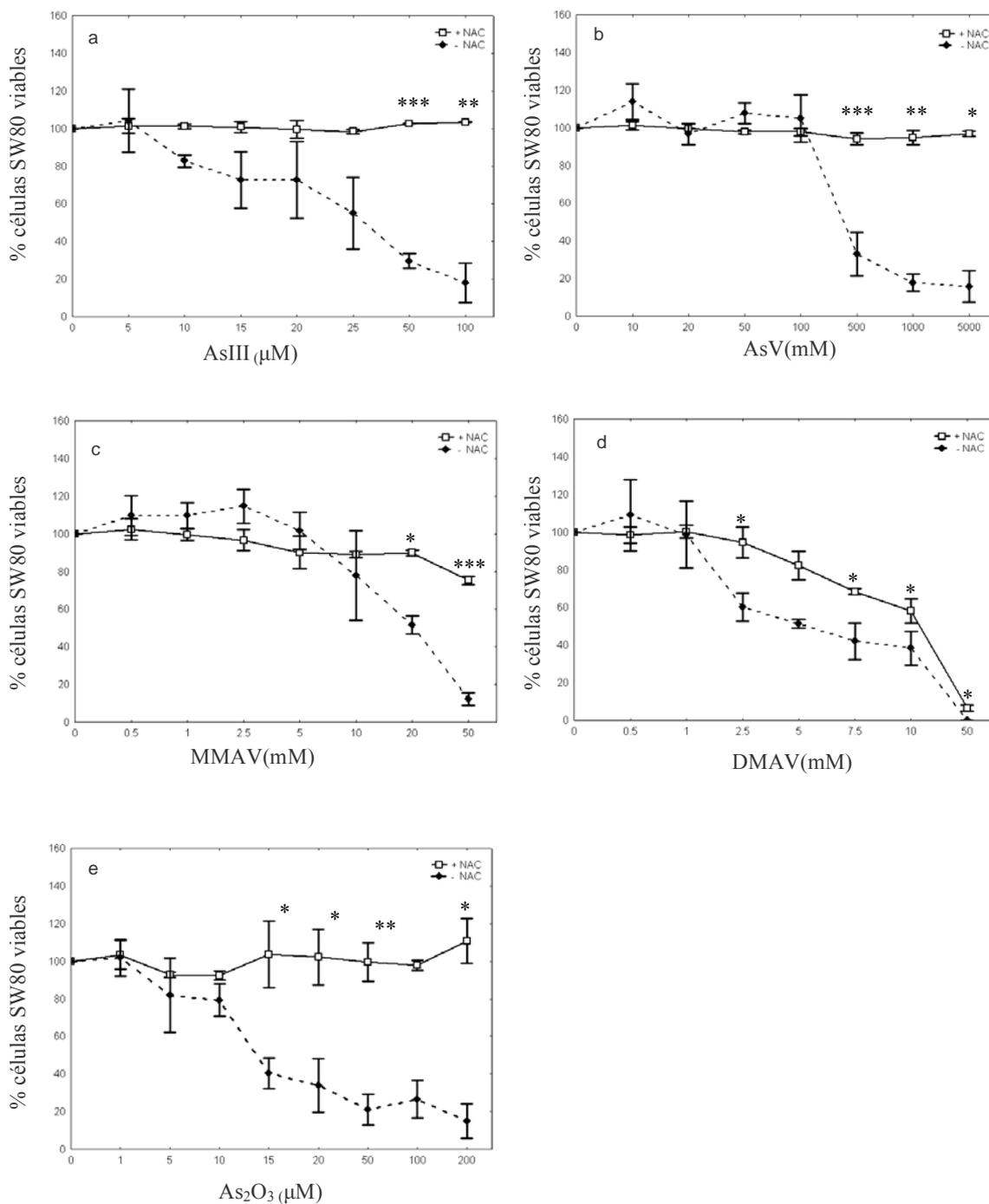


Fig. 21. Daño oxidativo inducido en células SW800 tratadas con distintas concentraciones de  $As^{III}$  (a),  $As^V$  (b),  $MMA^V$  (c),  $DMA^V$  (d) o  $As_2O_3$  (e). Tratamientos de 24 h en presencia o ausencia del inhibidor de oxidación (NAC). Cada uno de los puntos representa la media de valores obtenida en al menos 3 experimentos distintos, estando desviación típica indicada por las barras. Los asteriscos representan diferencias significativas entre células controles y tratadas (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

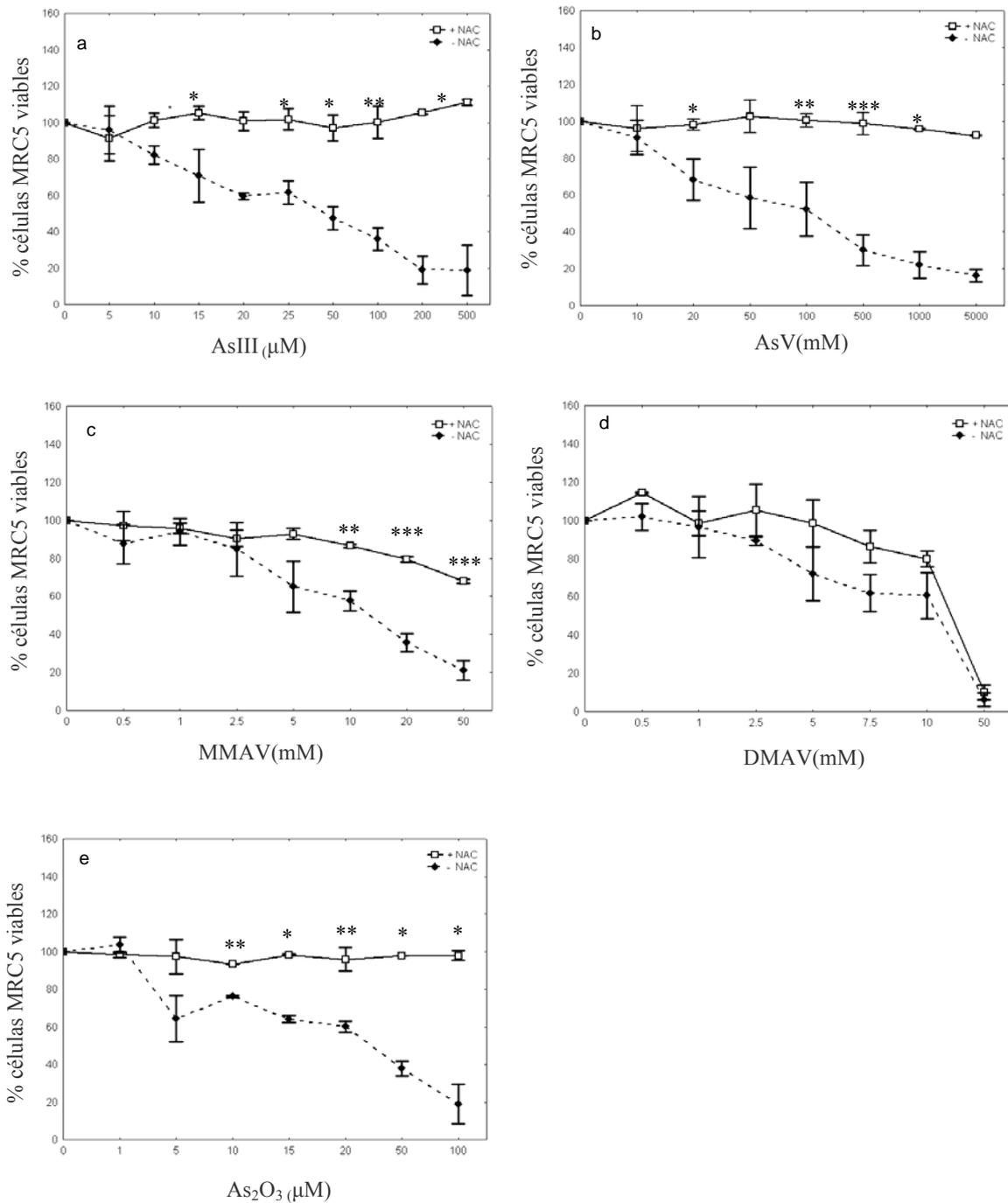


Fig. 22. Daño oxidativo inducido en células MRC5 tratadas con distintas concentraciones de As<sup>III</sup> (a), As<sup>V</sup> (b), MMA<sup>V</sup> (c), DMA<sup>V</sup> (d) o As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (e). Tratamientos de 24 h en presencia o ausencia del inhibidor de oxidación (NAC). Cada uno de los puntos representa la media de valores obtenida en al menos 3 experimentos distintos, estando la desviación típica indicada por las barras. Los asteriscos representan diferencias significativas entre células controles y tratadas (\* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001).

#### 4.3.3.2. Reducción de la expresión del gen *GSTO1*: diferencias de respuesta frente a los efectos causados por arsénico

Hemos obtenido información adicional sobre el papel que *GSTO1* y *GSTO2* ejercen en la toxicidad del arsénico a partir de experimentos realizados con la metodología del RNA de interferencia. La reducción de los niveles de estas enzimas se llevó a cabo en células MRC5. Se diseñaron tres secuencias de oligonucleótidos de RNA homólogas a ambos genes e, inicialmente, las transfecciones se realizaron en uno o dos días y los niveles de expresión de RNA y de proteína se evaluaron uno o dos días después de que ocurriera la transfección (fig. 23).

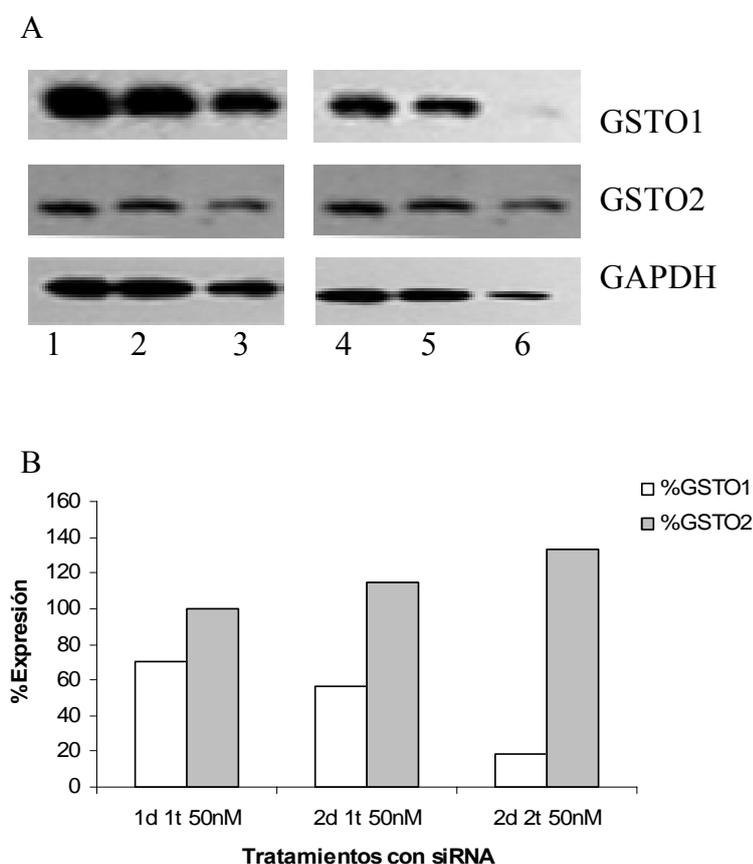


Fig. 23. Resultados de la reducción de expresión de *GSTO1* y *GSTO2* mediante RNAi. Células MRC5 transfectadas dos veces con RNAi control (scRNA) o con siRNA homólogo a *GSTO1* y *GSTO2*. Los niveles de reducción de proteína se siguieron mediante WB (A). Carril 1: 1 transfección (1 transf) scRNAi/ 1 día de tratamiento (1 trat); carril 2: 1 transf scRNAi / 2 trat; carril 3: 2 transf. scRNAi / 2 trat.; carril 4: 1 transf. siRNAi / 1 trat; carril 5: 1 transf. siRNAi / 2 trat; carril 6: 2 transf. siRNAi / 2 trat. (B) Niveles de las proteínas *GSTO1* y *GSTO2* normalizados según la expresión de GAPDH.

Los resultados del *Western Blotting* (WB) revelan que las muestras de células transfectadas dos veces y colectadas después de la segunda transfección (día 2) presentan una reducción de GSTO1 de aproximadamente el 80 %. No obstante, también se ha observado un pequeño incremento (alrededor del 30 %) en los niveles de expresión de GSTO2.

Teniendo en cuenta estos resultados previos, la reducción de la expresión de GSTO1 se realizó utilizando el protocolo de 2 días de transfección. La etapa siguiente consistió en que, una vez alcanzada la reducción de los niveles de expresión, las células se trataban con dos concentraciones distintas de diferentes compuestos de arsénico y, posteriormente, se procedía a la evaluación de su toxicidad mediante el ensayo XTT.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 24, revelando la inexistencia de diferencias de respuesta frente al daño inducido por los compuestos de arsénico al tratar las células, tanto con niveles de expresión de GSTO1 normales como reducidos. En las condiciones de nuestro estudio, no parece que GSTO1 tenga un papel importante en relación con la toxicidad del arsénico. Estos resultados concuerdan con los observados en los ensayos de toxicidad realizados anteriormente con MRC5 (niveles normales de expresión) y con SW800 (niveles de expresión de GSTO1 reducidos).

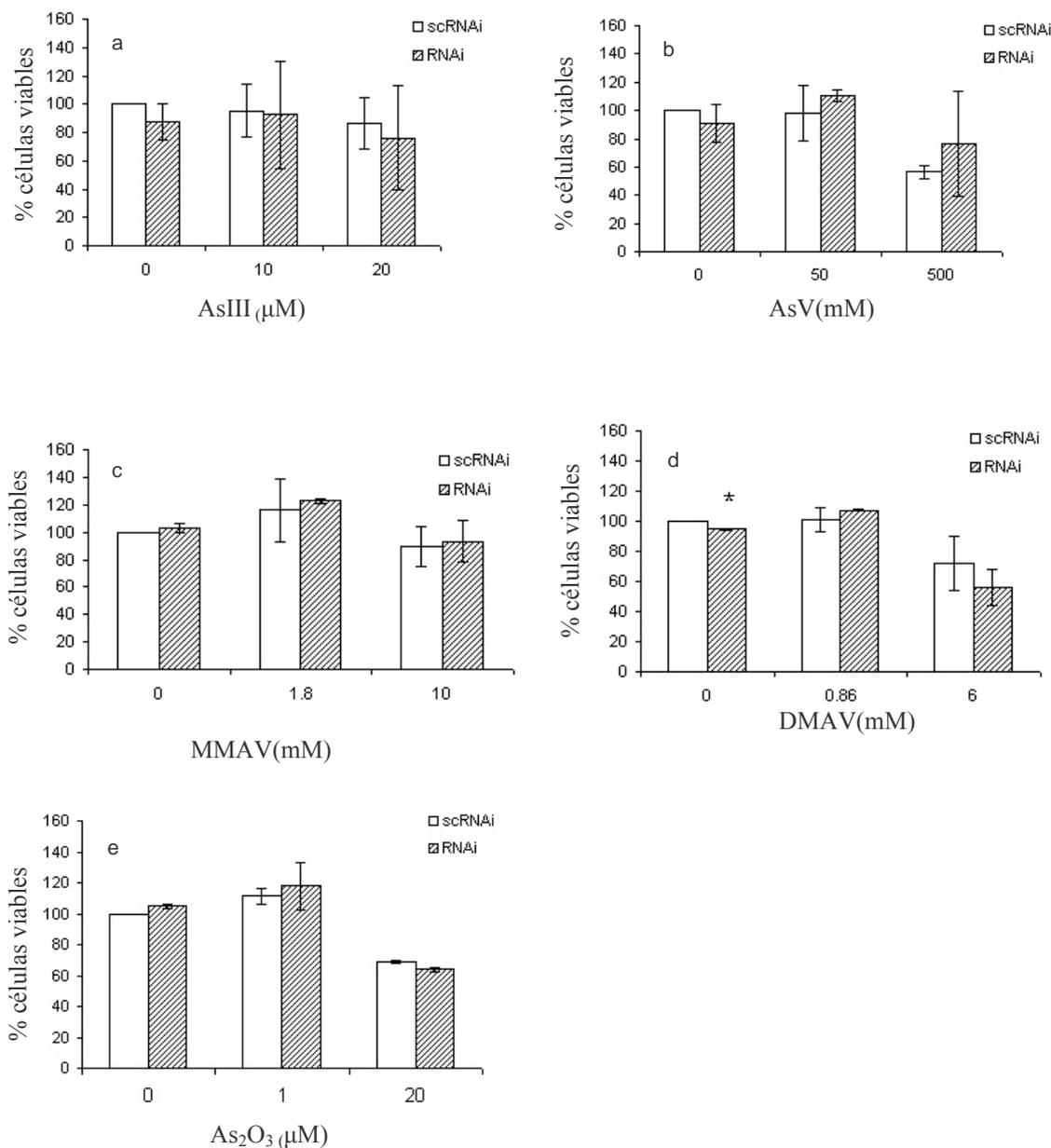


Fig. 24. Efecto de la reducción de la expresión de GSTO1 en la proliferación celular después de los tratamientos con arsénico. Las células MRC5 se trataron durante 24 h con distintas concentraciones de As<sup>III</sup> (a), As<sup>V</sup> (b), MMA<sup>V</sup> (c), DMA<sup>V</sup> (d) o As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (e), después de la 2ª transfección con scRNAi (control) o siRNA (GSTO1/2). Los datos representan el porcentaje de inhibición de la proliferación celular en células controles al compararlas con las tratadas. Cada uno de los puntos representa la media de valores obtenida en al menos 3 experimentos distintos, con la desviación típica indicada por las barras. Los asteriscos representan diferencias significativas entre células controles y tratadas (\* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001).

## 5. DISCUSIÓN

El presente trabajo se centra en la evaluación de los efectos genotóxicos inducidos por el arsénico; para ello, se han utilizado tanto estudios *in vivo* como *in vitro*. La primera parte del trabajo ha consistido en un estudio de biomonitorización de una población de trabajadores chilenos de una explotación minera de cobre, expuestos al arsénico. En dicho estudio, se ha utilizado como biomarcadores de exposición los niveles de arsénico y de sus metabolitos en orina; como biomarcadores del daño citogenético inducido por la exposición, se han empleado los ensayos de SCE y de MN. Este tipo de estudios *in vivo*, y en la especie humana, son los mejores para llevar a cabo estimas de riesgo.

La segunda parte del trabajo se ha dirigido a investigar la existencia de diferentes polimorfismos de los genes *GSTO1* y *GSTO2* en tres grupos étnicos distintos, así como en la caracterización enzimática de dos de estas variantes; es decir, el objetivo ha sido utilizar en el estudio biomarcadores de susceptibilidad individual. Además, los polimorfismos de *GSTO1* y de *GSTO2* también se han analizado en la población de trabajadores expuestos, anteriormente estudiada. Así pues, la primera y la segunda parte del trabajo de Tesis se han enfocado a establecer las posibles correlaciones entre genotipos, patrones de excreción y daño genético.

Finalmente, la tercera parte del trabajo ha consistido en llevar a cabo estudios *in vitro* con el objetivo de dilucidar el papel de la enzima *GSTO1* en el metabolismo y en la toxicidad del arsénico. En cierto modo, estos estudios mecanísticos tratan de reforzar los realizados en las dos primeras partes de la Tesis.

### 5.1. Parte I. Estudios de biomonitorización

En diferentes regiones de Sudamérica se pueden encontrar altas concentraciones ambientales de arsénico como sucede, por ejemplo, en el norte de Chile y de Argentina, y en el sur de Perú y de Bolivia. En el caso de Chile, y más específicamente en la región de Antofagasta, la presencia de arsénico en el medio ambiente obedece tanto a causas naturales (características hidrogeológicas de la región), como antropogénicas (asociadas al desarrollo de la actividad minera). Esta contaminación por arsénico se encuentra también en diversas zonas de Asia, e incluso de Europa.

En algunas poblaciones que habitan las zonas afectadas por elevadas concentraciones de arsénico, se han descrito diversas patologías asociadas a la exposición crónica al arsénico, incluyendo, entre otras, el incremento de diversos tipos de cáncer. A pesar de estar clasificado por la IARC, desde 1987, como carcinógeno en humanos, los mecanismos de acción del arsénico y/o de sus metabolitos no están todavía completamente dilucidados.

Por otro lado, de la información que se posee, es evidente que el riesgo para la salud de las poblaciones expuestas a altos niveles de arsénico está asociado a la especie química en que éste se encuentre, a su concentración y a la duración y tipo de exposición. De modo general, el arsénico se encuentra en el ambiente en forma de compuestos inorgánicos, que una vez absorbidos o ingeridos por el hombre son rápidamente metabolizados a sus formas metiladas, MMA y DMA. Actualmente, la visión del proceso de metabolización del arsénico como un mecanismo de detoxificación está siendo cuestionado, dado que en numerosos estudios se ha comprobado que las especies trivalentes metiladas son mucho más tóxicas, citotóxicas y genotóxicas que las especies parentales trivalentes inorgánicas.

La mayoría de los estudios de bimonitorización de poblaciones humanas expuestas al arsénico se han llevado a cabo en situaciones de exposiciones ambientales. Sólo unos pocos se han realizado en colectivos expuestos ocupacionalmente al arsénico. Por ello, el presente trabajo tiene un gran interés al evaluar, a través de los ensayos de SCE y de MN, los efectos genotóxicos inducidos por el arsénico en una población de 207 trabajadores chilenos. El tamaño de la población estudiada es mucho mayor que el utilizado en los trabajos citados en la literatura y, además, nuestro estudio caracteriza perfectamente los niveles de exposición de los trabajadores estudiados.

#### **5.1.1. Biomarcadores de exposición: niveles de arsénico en orina**

La población expuesta analizada en el presente estudio estaba compuesta por 105 trabajadores de la sección de la fundición de una mina de cobre, de una región con gran contenido de arsénico en el suelo; consecuentemente, esta actividad laboral supone una elevada exposición al arsénico. Como control de referencia, se utilizaron dos grupos diferentes: un control interno de la misma industria, pero compuesto por trabajadores de las oficinas, y un control externo, constituido por mineros implicados en actividades de extracción, pero de otra región de Chile, donde sólo existían niveles traza de arsénico en el suelo.

En un principio, se ha podido observar la existencia de una correlación directa entre la supuesta exposición en el lugar de trabajo y los niveles de arsénico en orina, en los tres grupos estudiados. Así, los individuos más expuestos poseían los valores más altos, tanto de arsénico inorgánico como de sus metabolitos, en orina. Al analizar los valores de arsénico en orina, teniendo en cuenta su especiación, se observa que los individuos más expuestos son los que presentan un mayor porcentaje de arsénico inorgánico y, consecuentemente, menor porcentaje de arsénico orgánico. Lo mismo sucede en los controles internos, en relación a los externos.

Estos resultados están de acuerdo con lo esperado, dado que los individuos expuestos y los controles internos trabajan en una zona minera que presenta altos niveles de arsénico en el subsuelo. Por el contrario, y como ya se ha comentado, los controles externos son trabajadores de otra zona minera con escasa presencia de arsénico en el subsuelo. Además, se ha podido observar que los controles internos, aunque no estén directamente expuestos al arsénico por trabajar en el área de finanzas, presentan unos niveles de arsénico total en orina superiores a los considerados normales, indicando que, en realidad, también están expuestos a concentraciones considerables de arsénico, debido a su lugar de trabajo.

De un modo general, los porcentajes de arsénico inorgánico y de arsénico orgánico detectados en los tres grupos están de acuerdo con los valores considerados dentro del rango normal de excreción, concordando así nuestros resultados con los aportados previamente por otros estudios (Hopenhayn-Rich *et al.*, 1993; Vahter y Concha, 2001). Asimismo, se ha podido observar una buena capacidad de metabolización del arsénico en los tres grupos evaluados, detectándose una mayor proporción de arsénico orgánico, superior al 80 % en todos los casos.

De acuerdo con algunos resultados publicados en la literatura, los individuos expuestos a altos niveles de arsénico presentan una mayor capacidad metabólica (que se refleja en valores más bajos de la tasa MMA/DMA), cuando se comparan con individuos menos expuestos. Así, Hopenhayn-Rich y colaboradores, por ejemplo, observaron que, a altos niveles de exposición, la proporción de arsénico inorgánico en orina tiende a ser menor, mientras que la forma orgánica dimetilada (DMA) suele ser mayor (Hopenhayn-Rich *et al.*, 1996). Asimismo, también se ha puesto de manifiesto que, en caso de exposiciones elevadas, se podría llegar a una saturación del proceso de metilación. Así, en un estudio realizado en Méjico, se ha demostrado la inhibición de la segunda etapa de la metilación,

observándose un incremento en la tasa MMA/DMA asociado al aumento de la exposición (Del Razo *et al.*, 1997); sin embargo, en otros estudios no se ha podido confirmar esta hipótesis (Hopenhayn-Rich *et al.*, 1993; Kurttio *et al.*, 1998).

Cuando se analiza el cociente MMA/DMA en los tres grupos estudiados, a pesar de observarse diferencias significativas entre los valores encontrados, no parece que exista ninguna relación directa entre este cociente y los niveles de exposición. Los controles internos, que son los que presentan niveles intermedios de exposición, son los individuos que poseen la menor tasa de metabolización. Por otro lado, a pesar de que los individuos expuestos sean los que presentan la tasa de metabolización más alta, según el cociente MMA/DMA, también son los que presentan el mayor porcentaje de arsénico inorgánico excretado.

Del análisis de los niveles de arsénico excretados en orina también hay que destacar la gran variabilidad inter- e intraindividual observada en el proceso de metabolización del arsénico en los tres grupos estudiados. En general, el patrón de excreción del arsénico y de sus metabolitos en orina es relativamente constante, aunque también se han citado diferencias en el perfil de excreción entre grupos, e incluso entre individuos de un mismo grupo (Vahter, 2002). No obstante, y a pesar de esta variabilidad, la mayoría de los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas, expuestas de forma crónica al arsénico, suelen obtener buenas correlaciones entre los niveles de exposición y las cantidades de arsénico excretadas en orina (Biggs *et al.*, 1997; Chiou *et al.*, 1997; Kurttio *et al.*, 1998; Hammer, 2002; Mahata *et al.*, 2003).

Además de la correlación existente entre la exposición crónica y los niveles de arsénico en orina, numerosos estudios de biomonitorización ponen en evidencia la asociación entre niveles altos de excreción de arsénico en orina y la existencia de daño genético o alteraciones clínicas. Así, por ejemplo, en un estudio realizado en Chile con personas altamente expuestas al arsénico (concentraciones superiores a 670 µg/L) a través del agua de consumo, se observó una correlación directa entre el contenido de arsénico total en orina y la incidencia de MN en células uroteliales. Además, también se observó la existencia de una buena asociación entre la incidencia de MN y los niveles de arsénico inorgánico, MMA y DMA (Biggs *et al.*, 1997). En el mismo sentido, en un estudio realizado en Bangladesh se detectó que el 78 % de los individuos muestreados (expuestos a concentraciones de arsénico en agua superiores a 50 µg/L), que poseían un valor medio de

495 µg/L de arsénico en orina, presentaban lesiones cutáneas arsenicales (Chowdhury *et al.*, 1999).

Como resumen, podemos decir que en el presente trabajo se ha encontrado una buena correlación entre la exposición laboral al arsénico y los niveles de excreción de arsénico total en orina en los trabajadores evaluados. Las posibles asociaciones entre la exposición al arsénico y el incremento del daño genotóxico se discutirán en el apartado siguiente. Las posibles correlaciones entre la variabilidad en el perfil de excreción del arsénico y la existencia de diferencias en la respuesta al daño genotóxico inducido por el arsénico también se discutirán posteriormente.

### **5.1.2. Biomarcadores de daño citogenético: ensayos de SCE y de MN**

Actualmente se viene percibiendo una preocupación creciente en relación con el riesgo genético potencial asociado a determinadas exposiciones ocupacionales, por su relación directa con el riesgo de cáncer. Esta preocupación hace que, una vez detectada una exposición que implica un riesgo, se deban dictar normas sobre la utilización de medidas de prevención y de protección cada vez más estrictas y eficaces.

De manera general, en la mayoría de estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a carcinógenos y, más específicamente expuestas al arsénico, se observan correlaciones positivas entre los niveles de exposición y los incrementos de la frecuencia de CA y de MN (Dulout *et al.*, 1996; Basu *et al.*, 2001; Chakraborty *et al.*, 2006), indicando que el arsénico es un agente con efectos aneugénicos y clastogénicos. En contraste, los estudios de biomonitorización llevados a cabo mediante el ensayo de SCE presentan resultados tanto positivos (Lerda, 1994; Hsu *et al.*, 1997; Mahata *et al.*, 2003), como negativos (Vig *et al.*, 1984; Dulout *et al.*, 1996). En la misma dirección apuntan los resultados obtenidos en estudios *in vitro*, en los que el arsénico no se comporta como un potente inductor de SCE, excepto cuando se trata de las especies trivalentes metiladas (Gómez-Arroyo *et al.*, 1997; Dopp *et al.*, 2004; Mouron *et al.*, 2005).

En nuestro estudio, el ensayo de SCE ha sido uno de los biomarcadores utilizados para evaluar los posibles efectos genotóxicos del arsénico en una situación de exposición ocupacional. Los resultados obtenidos revelan que la media de la frecuencia de SCE observada en los tres grupos de trabajadores cae dentro de los valores considerados

normales, incluso en el grupo de los trabajadores más expuestos. No obstante, en este grupo se detecta un pequeño incremento de la frecuencia de SCE, que llega a alcanzar significación estadística al compararlo con el control externo.

Por otro lado, el análisis de la frecuencia de células HFC es un método complementario para comparar la incidencia de SCE, y parece ser una medida del daño genético inducido más sensible y eficaz que la simple comparación de las frecuencias de SCE (Hirsch *et al.*, 1992). Este hecho se ha visto confirmado en los resultados obtenidos en este estudio. Se considera que las HFC representan una subpoblación de linfocitos deficientes en reparación o una subpoblación de linfocitos longevos, que han ido acumulando un gran número de lesiones durante la fase G<sub>0</sub> (Ponzanelli *et al.*, 1997). Aunque la naturaleza real de las HFC todavía no esté totalmente dilucidada, se pueden considerar como un biomarcador válido, representando células normales que acumulan daño genético a lo largo del tiempo (Bender *et al.*, 1992; Ponzanelli *et al.*, 1997).

Cuando se han analizado las frecuencias de HFC, se han observado diferencias significativas entre el grupo expuesto y el control externo (al igual que lo observado en el análisis de la frecuencia de SCE); pero, además, también se han observado diferencias entre los expuestos y el control interno. De este modo, el análisis de las HFC ha demostrado ser un biomarcador de daño genético más sensible que los SCE, al menos en las condiciones de este estudio. Sin embargo, el análisis estadístico de este parámetro es poco potente, dado que los datos generalmente no se adecuan a los requisitos necesarios para la realización de tests paramétricos. En el estudio de posibles asociaciones, se ha encontrado que el PRI sólo está influenciado por la edad. Por lo tanto, no parece ser una buena herramienta en la evaluación del daño genotóxico ligado a la exposición, en particular del arsénico.

En general, los resultados obtenidos en el ensayo de SCE son concordantes con los datos publicados en la literatura, que sugieren que el arsénico no es un gran inductor de SCE. Así, los resultados obtenidos en la evaluación de los trabajadores chilenos expuestos al arsénico mediante el ensayo de SCE no revelan ninguna asociación dosis-respuesta entre los niveles de exposición al arsénico y las frecuencias de SCE y/o de HFC. Es por esto que el pequeño incremento de estos dos parámetros, detectado en el grupo de los trabajadores expuestos, no parece tener relación directa con la exposición crónica al arsénico. Por lo tanto, otros factores deben estar contribuyendo de forma significativa a generar estas

diferencias observadas en las frecuencias de SCE y de HFC entre el grupo expuesto y los dos controles.

También se han obtenido resultados similares al utilizar el ensayo de MN, tanto en linfocitos de sangre periférica como en células de mucosa bucal. Así, no se ha detectado ningún incremento de la frecuencia de MN en linfocitos en ninguno de los grupos estudiados, aunque se ha observado un incremento de la frecuencia de MN en células de mucosa bucal en el grupo del control interno. Esto nos lleva a concluir que, a pesar de las evidencias de exposición crónica al arsénico en los trabajadores de la minería de Antofagasta, las diferencias observadas en las frecuencias de MN no están asociadas a tal exposición.

En general, se considera al CBPI como una medida indirecta de citotoxicidad, al posibilitar la estima de los ciclos celulares y detectar la existencia de retrasos mitóticos (Surrallés *et al.*, 1995). No obstante, el análisis de los valores de CBPI entre grupos tampoco revela correlación alguna con la exposición al arsénico. Solamente se ha observado una ligera disminución del CBPI en el caso de los controles internos.

En resumen, los resultados obtenidos en la evaluación de los efectos genotóxicos inducidos por la exposición al arsénico en una población de trabajadores de la industria del cobre revelan la inexistencia de una correlación dosis-respuesta entre la exposición al arsénico y aumento del daño genético en linfocitos o en células de mucosa bucal. La falta de correlación entre daño y niveles de exposición no puede ser atribuida a la ausencia de exposición, ya que, tanto los individuos expuestos como los controles internos, presentan niveles de arsénico total en orina muy superiores a los 50 µg/L, que es el valor de referencia en la población general (ACCGIH, 2000). Asimismo, la utilización de dos biomarcadores de exposición (SCE y MN), y el uso de linfocitos y células de mucosa bucal, refuerzan la bondad de los resultados obtenidos.

En contraste con los posibles inconvenientes que pueda tener el ensayo de SCE, la utilización del ensayo de MN en los estudios de evaluación del daño genotóxico ha sido ampliamente aceptada y validada. Por lo tanto, este ensayo, además de presentar un conjunto de ventajas, posee un gran valor predictivo en la estimación del riesgo genotóxico, pudiendo utilizar diversos tipos celulares, en especial, linfocitos y células epiteliales de descamación.

Los linfocitos de sangre periférica son el material empleado en la mayoría de los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a carcinógenos ya que se les considera como un blanco de exposición general. Por otro lado, a las células de la mucosa bucal se las considera como representativas de las células epiteliales y, considerando que el 90% de todos los tipos de cáncer tienen un origen epitelial, el empleo de este tipo celular va creciendo de forma significativa en los estudios biomonitorización (Surrallés *et al.*, 1997; Cavallo *et al.*, 2006, 2007; Speit *et al.*, 2007).

A pesar de que en la mayoría de los estudios epidemiológicos se observa una asociación positiva entre la exposición al arsénico y la inducción de daño genotóxico, también se encuentran datos contradictorios referentes a exposiciones ambientales o laborales al arsénico (Basu *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2005; Palus *et al.*, 2005; Lewinska *et al.*, 2007). En este contexto, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que otros factores genéticos y/o ambientales pueden estar contribuyendo a los incrementos de las frecuencias de SCE y de MN encontrados por otros autores.

#### **5.1.2.1. Análisis de los factores de confusión**

En los estudios de biomonitorización es fundamental la utilización conjunta de biomarcadores de exposición y de efecto, a fin de que la evaluación del riesgo genético sea más precisa. Se observa una gran variabilidad en los valores de las frecuencias de SCE y de MN citados en la literatura, entre poblaciones, entre diferentes estudios e, incluso, entre individuos (Titenko-Holland *et al.*, 1998; Fenech *et al.*, 1999; Fenech, 2000). Existen factores que pueden contribuir de forma significativa a esta variabilidad, como pueden ser las diferencias en los protocolos experimentales, los criterios del recuento, el número de individuos analizados, y la influencia de los posibles factores de confusión.

Hay que destacar que los resultados obtenidos en nuestro estudio son bastante fiables debido, principalmente, al gran número de individuos evaluados (207) y a la cantidad de células analizadas para cada uno de ellos. Aunque, en general, los protocolos del ensayo de MN recomiendan que el porcentaje de MN se analice en un total de 500 células viables (Zalacaín *et al.*, 2005), en este estudio se han analizado 1.000 células BNMN y 2.000 BCMN por individuo. Para el cálculo del CBPI se han contado 500 células. En los estudios de biomonitorización en los que se utiliza el ensayo de SCE como herramienta para la evaluación del daño genotóxico, se recomienda un tamaño de muestra de entre 20 y 50

individuos y el análisis de un mínimo de 25 células por persona (Carrano y Natarajan, 1988). En nuestro caso, para el análisis de la frecuencia de SCE se han evaluado 50 metafases por individuo, mientras que para el cálculo del PRI, se han contabilizado 100 células. Además, los posibles factores de confusión que podrían modular la frecuencia de SCE y de MN, tales como la dieta, el consumo de alcohol, té, café, tabaco y la edad, entre otros, se han tenido en cuenta en todos los análisis realizados.

En este estudio, en particular, como se trata de evaluar los posibles efectos genotóxicos de la exposición al arsénico, se consideró que la dieta podría ejercer un papel importante sobre los niveles detectados de arsénico en orina. Se sabe que el consumo de marisco, así como el de animales de granja alimentados con piensos que contienen restos de pescado, puede incrementar de forma significativa los niveles de arsénico en orina (Francesconi *et al.*, 2002; Jones, 2007). No obstante, debido a la situación geográfica de los lugares donde viven los individuos analizados, no hay un consumo significativo de pescado y de marisco. Asimismo, la técnica de HPLC utilizada para la medición de las cantidades de arsénico total y de los metabolitos en orina, posibilitaba la cuantificación de la arsenobetaina y de la arsenocolina (compuestos orgánicos de arsénico encontrados en la dieta) que, a su vez, no fueron consideradas en los niveles de arsénico total.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una correlación positiva entre el consumo de tabaco y la inducción de diversos tipos de cáncer, principalmente el de pulmón. Además, algunos estudios apuntan a que las personas fumadoras presentan mayores niveles de daño genético, incluyendo un incremento de la frecuencia de MN y de SCE (Hirsch *et al.*, 1992; Burgaz *et al.*, 1999; Baier *et al.*, 2002; Carere *et al.*, 2002). Sin embargo, en este estudio el análisis de la variable relacionada con el consumo de tabaco no ha mostrado ejercer ningún efecto significativo ni sobre la frecuencia de SCE ni sobre la de MN. En este punto conviene señalar que ninguno de los tres grupos evaluados presentaba un consumo medio superior a 10 cigarrillos/día, lo que no se puede considerar como un consumo muy alto.

El posible efecto del consumo de bebidas alcohólicas sobre el daño genotóxico parece ser contradictorio, visto que en la literatura se encuentran citadas tanto correlaciones positivas (Kassie *et al.*, 2001) como negativas (Surrallés *et al.*, 1997; Bloching *et al.*, 2000). En nuestro estudio, el consumo de alcohol tampoco ha ejercido ninguna influencia sobre las frecuencias de SCE y de MN. Aunque algunos estudios apuntan a que el consumo de té o

de café podría estar relacionado con un incremento de daño genotóxico, en estudios de biomonitorización llevados a cabo en poblaciones expuestas al arsénico, por ejemplo, no se ha detectado que el consumo de café fuera un factor de confusión (Ostrosky-Wegman *et al.*, 1991; Gonsebatt *et al.*, 1997). Considerando que el consumo de té y de café era muy bajo en los tres grupos estudiados, ambas variables se descartaron de los análisis finales.

De hecho, de los posibles factores de confusión analizados, sólo la edad parece tener un efecto significativo sobre el incremento de la frecuencia de SCE y de MN en mucosa bucal y en linfocitos. Así, los individuos de mayor edad presentan una mayor frecuencia de daño citogenético. Además, la edad también está relacionada con el CBPI y con el PRI; en estos casos, inversamente. Desde siempre, la edad viene siendo uno de los principales factores de confusión a tener en cuenta y numerosos estudios confirman la asociación positiva de la edad con el incremento de la frecuencia de MN y de SCE (Fenech y Morley, 1985; Lazutka *et al.*, 1994; Surrallés *et al.*, 1996; Pastor *et al.*, 2003).

Los niveles de cada una de las especies de arsénico detectadas en orina (% As<sup>V</sup>, % As<sup>III</sup>, % MMA y % DMA), así como los años de exposición y el cociente de metabolización (MMA/DMA) se incluyeron en los análisis de los posibles factores que pudieran ejercer un efecto significativo sobre el incremento de los SCE y de los MN. Sin embargo, ninguno de estos factores mostró ejercer un papel significativo sobre la frecuencia de MN en linfocitos o en células de la mucosa bucal. Por otro lado, los niveles porcentuales de As<sup>III</sup> parecen estar correlacionados positivamente con el incremento de SCE, mientras que una menor tasa de metabolización (representada por un mayor índice de MMA/DMA) estaría asociada a una menor frecuencia de SCE. Estos resultados deberían considerarse sólo como una tendencia, ya que, al comparar los efectos que ejercía la variable exposición sobre la frecuencia de SCE, únicamente se ha detectado correlación positiva en el grupo de los controles internos.

### **5.1.3. Asociaciones entre daño genotóxico y perfil de excreción del arsénico**

En general, la mayoría de los individuos poseen un patrón de excreción de arsénico en orina dentro del rango considerado como normal (10-30 % As-i; 10-20 % MMA y 60-80 % DMA). No obstante, se ha detectado la existencia de una gran variabilidad en el proceso de metabolización del arsénico debido a diversos factores ambientales y/o genéticos. Así, existen numerosas evidencias que indican que el metabolismo ejerce un papel importante

en la toxicidad del arsénico y, por lo tanto, que las diferencias en el modo de excreción del arsénico se pueden asociar con la variabilidad en el daño genotóxico inducido frente a una misma exposición. En general, se considera que un 20 % de la variabilidad observada en el proceso de metabolización del arsénico es causada por factores ambientales (Hopenhayn-Rich *et al.*, 1996). Asimismo, desde que se propuso una base genética para el proceso de biotransformación del arsénico, las diferencias genéticas interindividuales han pasado a ser consideradas como los factores más importantes para explicar la variabilidad existente (Chiou *et al.*, 1997; Engstrom *et al.*, 2007; Pu *et al.*, 2007).

Para investigar esta posible correlación, hemos analizado los niveles de SCE, HFC, BNMN y BCMN, teniendo en cuenta las diferencias del patrón de excreción del arsénico detectadas entre individuos de un mismo grupo de exposición, o entre individuos de grupos distintos con patrones similares de excreción. El objetivo del primer análisis ha sido verificar la existencia de alguna correlación entre el incremento del daño genético y un perfil desfavorable de excreción ( $As-i > 30\%$ ,  $MMA > 20\%$ , o  $DMA < 60\%$ ). Con el segundo análisis se pretendía averiguar si los diferentes niveles de exposición estaban o no asociados al daño detectado en individuos con perfiles anormales de excreción.

Para llevar a cabo estos análisis, los individuos de cada grupo se distribuyeron según los patrones de excreción de arsénico que presentaban, considerándose únicamente aquellos que se caracterizaban por poseer patrones extremos de excreción. En el grupo de los expuestos, entre un 15 % y un 23 % de los individuos poseían patrones desfavorables de excreción, mientras que en el grupo de los controles externos este porcentaje osciló alrededor del 15 %. El grupo de los controles internos ha sido el que ha presentado mayor variabilidad en relación con los porcentajes de arsénico excretados y hasta un 25 % de los individuos presentaron niveles de excreción de MMA superiores al 20 % y de DMA inferiores al 60 %. No obstante, y a pesar de la variabilidad entre los individuos de un mismo grupo, no se ha detectado ninguna asociación entre el incremento de las frecuencias de SCE o de MN entre los individuos que presentaban patrones desfavorables de excreción.

Cuando los análisis se realizaron entre los individuos con patrones similares de excreción, aunque expuestos a diferentes niveles de arsénico, tampoco se encontró ninguna asociación entre un patrón desfavorable de excreción de arsénico y las frecuencias de MN en linfocitos o en células de la mucosa bucal. Por otro lado, se ha observado una asociación

positiva entre los niveles de exposición y las frecuencias de SCE y de HFC en individuos que excretaban niveles de DMA inferiores al 60 %. También se ha detectado una relación directa entre el aumento de la exposición y el incremento de la frecuencia de HFC, en el caso de los individuos con perfiles de excreción de MMA superiores al 20 %. El MMA es el metabolito resultante de la primera etapa de metilación, mientras que el DMA es el metabolito final excretado en la orina. Numerosos estudios indican que el incremento del % de MMA y la disminución del % de DMA están asociados con una mayor retención de arsénico en el organismo y un aumento de sus efectos tóxicos (Del Razo *et al.*, 1997; Maki-Paakkanen *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000; Vahter, 2002; Engstrom *et al.*, 2007).

## **5.2. Parte II. Caracterización de las variantes polimórficas de *GSTO1* y *GSTO2***

Las GSTs son enzimas involucradas en el metabolismo y en la detoxificación de una gran variedad de carcinógenos y productos resultantes del estrés oxidativo (Parl, 2005), teniendo así un papel relevante en la defensa celular y en la protección contra el daño genotóxico inducido por compuestos endógenos o exógenos.

La clase GSTO ha sido recientemente caracterizada y presenta propiedades únicas como, por ejemplo, actividad tioltransferasa y deshidroascorbato reductasa, así como el potencial de participar en todas las reacciones de reducción involucradas en el proceso de metabolización del arsénico (Whitbread *et al.*, 2003). La clase Omega está formada por dos miembros funcionales, que son *GSTO1* y *GSTO2*. Ambas enzimas, además de presentar propiedades no compartidas con las otras GSTs, también presentan funciones específicas. Así, *GSTO1* está implicada en la modulación de canales de iones (Yin *et al.*, 2001; Schmuck *et al.*, 2005) y posee actividad fenacilglutation reductasa (Board y Anders, 2007), mientras que *GSTO2* parece tener un papel esencial en la protección contra el daño inducido por los radicales libres y las especies libres de oxígeno (Schmuck *et al.*, 2005).

### **5.2.1. Análisis de los polimorfismos de los genes *GSTO1* y *GSTO2*: diferencias interétnicas**

La caracterización genotípica de las posibles variantes de las GSTs ha contribuido de forma significativa a la dilucidación del origen de la variabilidad observada en los procesos de metabolización, así como de los mecanismos de respuesta frente a fármacos y carcinógenos, que son sustratos sobre los que actúan las GSTs (Evans *et al.*, 2001; Xie *et*

*al.*, 2001; Chowbay *et al.*, 2005). Las clases de GSTs más conocidas y estudiadas son las GST citosólicas y, entre ellas, cabe destacar GSTM1, GSTT1 y GSTP1. Los genotipos nulos para *GSTM1* y *GSTT1*, por ejemplo, se han caracterizado en distintas poblaciones y se ha constatado la ausencia de expresión de estas enzimas entre un 10-65 % y un 30-60 % de los individuos, respectivamente (Cotton *et al.*, 2000). Estos genotipos nulos se han asociado con distintos tipos de cáncer (Strange y Fryer, 1999), con resistencia a la quimioterapia (Tew, 1994; Ban *et al.*, 1996) y se ha visto que están implicados en distintos factores de susceptibilidad frente a diversas enfermedades.

De un modo general, se puede afirmar que las GSTs son enzimas altamente polimórficas y que la distribución de los genotipos varía de forma significativa entre las poblaciones estudiadas, según la etnia. Sin embargo, a pesar de que las variantes más comunes de las GSTs están ampliamente caracterizadas en poblaciones europeas y asiáticas, existe muy poca información sobre la distribución de estas variantes en poblaciones indígenas o mestizas americanas. De manera similar a lo que sucede con las otras GSTs, las frecuencias de los polimorfismos de *GSTO1* y de *GSTO2* descritos hasta el momento también varían en función de los diferentes grupos étnicos (Lynn *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2003; Schmuck *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006).

Hasta el momento se han descrito un total de 6 SNPs (Cys32Tyr; Ser86Cys; Ala140Asp; Glu155del; Glu208Lys; Ala236Val) encontrados en regiones codificantes del gen *GSTO1*, que conducen a cambios no sinónimos o a una pérdida de aminoácidos (Marnell *et al.*, 2003; Whitbread *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2006). Recientemente, en un estudio de cribado realizado en una población argentina expuesta de forma crónica al arsénico, se ha encontrado una nueva variante de *GSTO1* (T2562C). De un total de 37 individuos analizados, se identificó 1 heterocigoto para este cambio. Con el objetivo de identificar posibles variantes genéticas que pudieran estar correlacionadas con el patrón de excreción del arsénico, este estudio se amplió a una población de 147 individuos. No obstante, la nueva variante de *GSTO1* no se incluyó en el estudio de genotipado que se hizo *a posteriori* y, por lo tanto, no existen datos adicionales sobre este nuevo cambio (Engstrom *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, se ha investigado la frecuencia de 5 de las 6 variantes anteriormente descritas por otros autores, en tres grupos étnicos distintos: atacameños, chilenos y europeos. Además, también se ha llevado a cabo el genotipado de la delección de 3 pares de

bases (GGC), localizada en el intrón 1, y que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el cambio Ala140Asp. Para concluir esta parte del estudio, también se hizo el genotipado de la variante Glu50Gly, encontrada en un estudio previo de cribado del gen *GSTO1*, realizado en nuestro laboratorio, en una muestra de 20 individuos chilenos. Por otro lado, la variante Cys32Tyr, que sólo se había descrito en un trabajo (Mukherjee *et al.*, 2006) en una población de europeos americanos, y que presentaba una frecuencia alélica muy baja (0,009) no ha sido incluida en nuestro estudio.

Los resultados obtenidos revelan la inexistencia de individuos portadores de las variantes 50Gly y 86Cys en cualquiera de los grupos estudiados. Cabe resaltar que el cambio Ser86Cys, previamente citado en el estudio de Marnell y colaboradores (2003), no se ha detectado en ninguna otra población estudiada.

Con relación a los otros cambios de *GSTO1*, se observa que los europeos son los que presentan las frecuencias alélicas más altas para todas las variantes, seguidos de los chilenos. La única excepción ha sido el cambio Ala236Val, que ha sido el único no detectado entre los europeos. En este caso, los atacameños presentan la mayor frecuencia alélica (0,033), mientras que los chilenos presentan un valor intermedio (0,009). En contraste, la delección del exón 4 (Glu155del) y el cambio Glu208Lys se encuentran presentes entre los atacameños.

De todas las variantes de *GSTO1* estudiadas, el cambio Ala140Asp ha sido el más frecuente en los tres grupos étnicos estudiados, siendo uno de los polimorfismos de *GSTO1* más estudiado (Marnell *et al.*, 2003; Tanaka-Kagawa *et al.*, 2003; Whitbread *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003; Arning *et al.*, 2004; Marahatta *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006). Asimismo, y como se ha observado en otros estudios, nuestros resultados confirman el desequilibrio de ligamiento entre el cambio Ala140Asp y la delección del intrón 1, así como entre la delección Glu155del y el cambio Glu208Lys (Marnell *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2006).

En general, en nuestro trabajo se ha podido observar una gran diferencia en la distribución genotípica de todas las variantes de *GSTO1* estudiadas entre los tres grupos étnicos, siendo los atacameños los menos polimórficos. Las frecuencias alélicas obtenidas para la población europea son similares a las citadas en estudios previos (Marnell *et al.*, 2003; Yu

*et al.*, 2003), lo que indicaría que las frecuencias de las variantes de *GSTO1* observadas en atacameños, probablemente están relacionadas con las características étnicas.

Con relación al gen *GSTO2*, a pesar del gran número de variaciones genéticas encontradas entre distintos grupos étnicos, sólo 6 de estas variantes se han encontrado en una región codificante del gen (Mukherjee *et al.*, 2006). En un estudio previo de secuenciación de *GSTO2* que realizamos en atacameños y en europeos, no se detectó ninguna variante nueva para el gen *GSTO2*, y la variante Asn142Asp detectada fue la única que, además de estar localizada en una región codificante, lleva a un cambio de aminoácido funcional. Este estudio inicial se amplió genotipando la variante Asn142Asp en los tres grupos étnicos. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados para los polimorfismos de *GSTO1*, ya que los europeos presentaron la frecuencia más alta del alelo mutante (0,42), mientras que los atacameños mostraron una frecuencia 10 veces inferior (0,04).

Según los datos de otros estudios, la frecuencia del alelo 142Asp es extremadamente variable. En un estudio llevado a cabo por investigadores australianos, las frecuencias más altas para este alelo variante se observaron entre los africanos (0,855) y la más baja entre individuos chinos (0,270) (Whitbread *et al.*, 2003). Por otro lado, en otro estudio, las frecuencias más altas se detectaron entre chinos (0,783), mientras que las más bajas (0,233) se observaron entre africanos (Mukherjee *et al.*, 2006). Cabe destacar que, incluso considerando los resultados obtenidos por otros investigadores, los atacameños siguen siendo los individuos menos polimórficos tanto para *GSTO1* como para *GSTO2*. La única excepción observada a esta regla ha sido para la variante A236Val de *GSTO1*.

De un modo general, los resultados que hemos obtenido confirman la existencia de una gran diferencia entre las frecuencias de los polimorfismos estudiados entre los tres grupos étnicos. Así, los atacameños presentan un perfil genético que difiere claramente de los de las otras dos poblaciones estudiadas (chilenos y europeos), siendo los menos polimórficos tanto para *GSTO1* como para *GSTO2*.

Considerando las características funcionales particulares de *GSTO1* y de *GSTO2*, las variaciones genéticas que lleven a cambios en la actividad enzimática podrían tener implicaciones clínicas relevantes y, en este sentido, los estudios de caracterización de las variantes polimórficas de la clase Omega vienen adquiriendo especial importancia. Se empieza a investigar el papel de las variantes polimórficas de *GSTO1* y de *GSTO2* en

relación con la susceptibilidad a enfermedades neurodegenerativas y a diferentes tipos de cáncer. Así, por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Marahatta y colaboradores se ha observado una asociación entre la variante Ala140Asp del gen *GSTO1* y la predisposición a hepatocarcinomas, carcinomas de colon y cáncer de mama, mientras que no se detectó ninguna correlación para la variante Ala142Asp del gen *GSTO2* (Marahatta *et al.*, 2006). Asimismo, otros autores han sugerido que la variante de *GSTO2* podría estar asociada con un incremento del cáncer de ovario (Pongstaporn *et al.*, 2006).

Además, se ha visto que *GSTO1* está implicada en la activación de las interleucinas, más específicamente de la IL-1 $\beta$ . De esta manera, variaciones en esta enzima podrían estar modulando los procesos de la respuesta inflamatoria (Laliberte *et al.*, 2003). Los procesos inflamatorios parecen contribuir a la etiología de los desórdenes neurodegenerativos, como son el Parkinson y el Alzheimer y, actualmente, en la mayoría de los estudios realizados se están obteniendo correlaciones positivas entre polimorfismos de *GSTO* y estas enfermedades (Li *et al.*, 2003, 2006; Kolsch *et al.*, 2004; Wahner *et al.*, 2007). En el estudio más reciente, Wahner y colaboradores sugieren la existencia de un efecto neuroprotector, resultante de la correlación entre los polimorfismos de *GSTO1* y *GSTO2*, el consumo de tabaco y la modulación de la respuesta neuroinflamatoria. En contraste, también se encuentran estudios que no hallan ninguna asociación entre las GSTOs y la enfermedad de Huntington (Arning *et al.*, 2004) y el Alzheimer (Nishimura *et al.*, 2004; Ozturk *et al.*, 2005).

Hay que recordar que las GSTs son enzimas que tienen funciones primarias relacionadas con el proceso de detoxificación de compuestos exógenos y/o endógenos que se solapan entre sí y, por lo tanto, se debería considerar la combinación de los distintos genotipos en los estudios de prevención del riesgo genotóxico, de susceptibilidad a enfermedades y de diferencias en las respuestas frente a carcinógenos.

### **5.2.2. Caracterización enzimática de las variantes polimórficas**

La gran variabilidad individual en el patrón de excreción del arsénico en orina parece estar asociada a las diferencias de susceptibilidad frente al daño genotóxico inducido por la exposición ambiental, ocupacional o terapéutica al arsénico. Los resultados obtenidos en los estudios de biomonitorización sugieren la existencia de una base molecular involucrada en el proceso de metabolización del arsénico (Vahter, 2000, 2002; Chung *et al.*, 2002). Por

otro lado, también se ha citado la existencia de graves reacciones adversas, incluyendo la muerte, asociadas al tratamiento de la leucemia mieloide aguda con el trióxido de arsénico (Westervelt *et al.*, 2001).

A la enzima GSTO1 se la ha considerado como la responsable del paso limitante en el mecanismo de metilación oxidativa para la biotransformación del arsénico en humanos (Zakharyan y Aposhian, 1999). Por consiguiente, es importante evaluar el impacto que tiene la diversidad genética del gen que codifica esta enzima. En este contexto, se ha llevado a cabo la caracterización enzimática de las dos variantes de *GSTO1*, 236Val y 50Gly.

En estudios previos se encontró que algunas de las variantes genéticas de *GSTO1* parecían ejercer un impacto en la funcionalidad de estas enzimas y en el proceso de metabolización del arsénico (Marnell *et al.*, 2003; Whitbread *et al.*, 2003; Schmuck *et al.*, 2005). Las variantes caracterizadas por la delección Glu155 y por la sustitución Glu208Lys, por ejemplo, generan enzimas con una alta inestabilidad. Además, la delección Glu155 causa un incremento en la actividad enzimática en todos los sustratos ensayados, mientras que la sustitución Glu208Lys no parece alterar la actividad enzimática (Schmuck *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la delección Glu155del, que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el cambio Glu208Lys, estaría asociada a un patrón inusual de excreción del arsénico en los individuos de una población mejicana expuesta crónicamente a través del agua de bebida (Marnell *et al.*, 2003).

Por otro lado, resultados de caracterización de la variante Ala140Asp sugieren que la actividad catalítica de la forma variante parece no diferir de la observada para la forma normal, excepto en relación a la actividad tioltransferasa (Tanaka-Kagawa *et al.*, 2003). Otros autores confirman que la variante 140Asp presenta funciones enzimáticas similares a la forma normal (Whitbread *et al.*, 2003; Schmuck *et al.*, 2005).

Con relación a las variantes de arsénico, sólo se ha evaluado la funcionalidad enzimática del cambio Asn142Asp, que funcionalmente no difiere de la forma normal. Esta enzima posee actividad catalítica para los mismos sustratos que la enzima GSTO1, pero al compararse con ella, se observa que GSTO2 posee alrededor de 70 a 100 veces más actividad deshidroascorbato reductasa. Estos resultados sugieren que GSTO2 puede tener un papel significativo en la protección contra el daño oxidativo (Schmuck *et al.*, 2005).

Como se ha comentado anteriormente, la primera variante ensayada (50Gly) corresponde al nuevo cambio de *GSTO1*, encontrado en el estudio de genotipado llevado a cabo en el grupo de 20 chilenos con patrones anormales de excreción del arsénico. Así, el individuo heterocigoto para este cambio presentaba un patrón de excreción de MMA superior al rango normal (10-20 %).

Los resultados indican que la forma variante 50Gly presenta un incremento de la actividad tioltransferasa y una ligera disminución de la actividad deshidroascorbato reductasa. También se ha observado un aumento significativo de la actividad MMA<sup>V</sup> reductasa y de la actividad DMA<sup>V</sup> reductasa. Además, la forma variante presenta una alta inestabilidad y, cuando se somete a un choque térmico de 60 °C, pierde su capacidad catalítica de una manera extremadamente rápida, en los primeros 15 min del ensayo. En condiciones experimentales similares, la variante Glu155del/ 208Lys, a este mismo tiempo, sigue presentando alrededor del 20 % de su actividad tioltransferasa, llegando al límite de inactividad a los 30 min del choque térmico. Las formas con los alelos normales, al final del ensayo (45 min) todavía presentan entre un 40 y un 60 % de actividad catalítica (Schmuck *et al.*, 2005).

La sustitución que lleva al cambio Ala236Val ha sido la segunda variante de *GSTO1* estudiada. La frecuencia más alta de esta variante se encontró en la población atacameña aunque también se encuentra, pero con una frecuencia más baja, en chilenos. La ausencia de este cambio en los europeos y su presencia en chilenos se debe, probablemente, al resultado de la mezcla resultante del período de la colonización. Si consideramos que los atacameños han estado expuestos crónicamente al arsénico durante miles de años, y que se caracterizan por presentar un patrón favorable de excreción del arsénico (% MMA inferior a los valores estándar), los estudios funcionales con esta variante tienen un interés especial.

Los resultados enzimáticos revelan que la variante 236Val presenta una menor actividad catalítica en todos los sustratos probados. Cabe destacar que esta variante se ha ensayado recientemente, determinándose también su actividad fenacil-glutation reductasa. Esta actividad se ha evaluado dado que se ha descrito que tal actividad es específica de las *GSTO1* (Board y Anders, 2007), siendo esta actividad muy superior a la actividad arsénico reductasa.

La estabilidad de la variante 236Val se ha evaluado midiendo la actividad fenacil reductasa después de someterla a un choque térmico de 45 °C. La forma variante 236Val, además de presentar una funcionalidad reducida, también ha mostrado ser muy inestable. Teniendo en cuenta la forma estructural de *GSTO1* anteriormente predicha (Whitbread *et al.*, 2003), el cambio 236Val parece alterar las interacciones existentes entre los dominios N y C-terminal. El papel que ejercen ambos dominios todavía no está dilucidado, aunque los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que estas regiones podrían estar implicadas tanto en la estabilidad como en la función de *GSTO1*.

Considerando la baja actividad catalítica y la gran inestabilidad que presenta la variante 236Val, se puede asumir que este cambio en homocigosis podría llevar a una gran deficiencia de *GSTO1*. Asimismo, sería lógico suponer que, en una situación de heterocigosis, este cambio también podría estar asociado a una pérdida parcial de la función de esta enzima.

Se puede concluir, por tanto, que las dos nuevas variantes de *GSTO1* ensayadas, además de ser muy inestables presentan actividades catalíticas distintas de las formas normales. No obstante, las consecuencias biológicas de estas diferencias funcionales todavía necesitan ser objeto de investigación.

Cabe resaltar que en un estudio reciente se ha visto que los ratones *knockout* para *GSTO1* parecen ser viables en las condiciones normales de laboratorio (Chowdhury *et al.*, 2006) y, por lo tanto, es poco probable que algún cambio genético de *GSTO1*, aunque sea en homocigosis, pueda tener una influencia deletérea en humanos. Aunque no se haya detectado ningún individuo homocigoto para ninguna de las dos variantes polimórficas estudiadas, se mantiene el equilibrio de Hardy-Weinberg para la distribución de estos alelos variantes, lo que es un factor adicional de soporte a la consideración de que las mutaciones en *GSTO1* son poco relevantes.

### **5.2.3. Asociaciones entre los polimorfismos de *GSTO1* y *GSTO2* y los patrones de excreción del arsénico**

Las enzimas de fase I y II son responsables de la transformación de los metabolitos intermediarios en formas más solubles que son posteriormente excretadas. Es probable que una actividad enzimática alterada, o inexistente, pueda estar correlacionada con las diferencias de susceptibilidad y/o con el incremento del riesgo de enfermedades asociadas

con la exposición a compuestos xenobióticos o debidas al daño inducido de forma endógena, durante el proceso de metabolización.

Tal como se ha discutido anteriormente, numerosos estudios sugieren la existencia de una base genética para el metabolismo del arsénico y, por lo tanto, los genes involucrados en este proceso son posibles candidatos para explicar la gran variabilidad en el patrón de excreción del arsénico, observado entre poblaciones e, incluso entre individuos de una misma población, sometidos a niveles similares de exposición.

Las enzimas GSTO1 y GSTO2 están implicadas en las reducciones de las formas de arsénico pentavalentes o de sus metabolitos a las formas trivalentes, necesarias para que ocurra el proceso de metilación. Por lo tanto, polimorfismos en los genes que codifican estas enzimas podrían contribuir de forma importante a explicar la variabilidad de respuesta observada frente a la exposición al arsénico (Marnell *et al.*, 2003; Whitbread *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003). Hay que destacar que las diferencias en el patrón de excreción están directamente asociadas con la capacidad de metabolización. Así, una capacidad de metilación reducida, por ejemplo, que lleva a una mayor excreción de MMA y a una reducción de los niveles de DMA, estaría asociada con el incremento de lesiones en la piel, enfermedades vasculares, aberraciones cromosómicas y distintos tipos de cáncer, entre los cuales destacan el de piel y vejiga (Tseng, 2007).

Por otra parte, varios estudios *in vitro* sugieren que las especies metiladas de arsénico trivalente (MMA<sup>III</sup> y DMA<sup>III</sup>) son metabolitos intermediarios generados por la reducción de los compuestos pentavalentes a través del proceso de metilación oxidativa. Como se ha comentado anteriormente, estas especies orgánicas trivalentes son más citotóxicas y genotóxicas que las inorgánicas parentales (Thomas *et al.*, 2001; Hughes, 2002; Kligerman *et al.*, 2003; Kumagai y Sumi, 2007). Por lo tanto, una deficiencia genética en *GSTO1* que reduzca la actividad de esta enzima en el proceso de biotransformación del arsénico podría ser una ventaja en ambientes con altos niveles de arsénico. En contraste, esta deficiencia podría ser una desventaja para los individuos sometidos a terapias contra el cáncer con el uso del trióxido de arsénico. Teniendo en cuenta que GSTO2 también presenta potencial arsénico reductasa, polimorfismos en este gen podrían estar modulando el proceso de metabolización del arsénico y, por lo tanto, tener consecuencias tanto a nivel de excreción como de daño. Es por esto que, además de caracterizar enzimáticamente dos variantes de *GSTO1* que todavía no estaban estudiadas (Glu50Gly y Ala236Val), también llevamos a

cabo un estudio de genotipado de estos dos cambios en la población de 205 individuos chilenos expuestos a diferentes niveles de exposición ocupacional al arsénico. Finalmente, este estudio se ha complementado con el genotipado de tres variantes más de *GSTO1* (Ala140Asp, Glu155del y Glu208Lys) y de una variante de *GSTO2* (Asn142Asp). Nuestros resultados confirman lo obtenido en estudios previos que indicaban que los cambios Glu155del y Glu208Lys se encuentran en desequilibrio de ligamiento. Además, el cambio N142D también lo presenta, segregándose asociado a tres de las variantes de *GSTO1* analizadas (Ala140Asp, Glu155del y Glu208Lys).

En el caso de la variante 236Val, de los 205 chilenos estudiados, sólo se han detectado 4 individuos heterocigotos y, por lo tanto, los análisis de correlación entre esta variante alélica y los perfiles de excreción del arsénico son poco relevantes. Lo mismo ha ocurrido con la variante 50Gly, que sólo se ha detectado en heterocigosis en un solo individuo.

Resultados enzimáticos similares a los obtenidos para la variante 50Gly ya se habían descrito para la doble variante Glu155del/ 208Lys. Además, al igual que para la variante 236Val, la doble variante también presentaba una gran inestabilidad. Entre los 205 individuos chilenos estudiados, se han identificado 9 heterocigotos para la los alelos variantes combinados Glu155del y Lys208. En este caso, el número de individuos heterocigotos también ha sido relativamente bajo y tampoco se ha encontrado correlación alguna entre la segregación de los alelos mutantes y el patrón de excreción del arsénico. Probablemente, en el estudio llevado a cabo por Marnell y colaboradores, la asociación encontrada entre este genotipo y la excreción del arsénico inorgánico en dos de los individuos estudiados puede ser aleatoria. Los dos individuos portadores de los alelos variantes eran parientes y, por lo tanto, es bastante probable que otra variante genética pudiera estar contribuyendo al incremento del arsénico inorgánico observado.

El cambio Ala140Asp ha sido el más común de todas las variantes de *GSTO1* estudiadas. No obstante, según los resultados obtenidos en otros estudios (Whitbread *et al.*, 2003), la actividad de la enzima variante no difiere de la actividad normal. Aunque este SNP pudiera estar potencialmente ligado a otro SNP funcional que, a su vez, tuviera algún papel regulador de *GSTO1*, los resultados sugieren que tampoco está asociado con las diferencias en el patrón de excreción del arsénico.

Los resultados obtenidos en cuanto a la frecuencia del cambio Asn142Asp, de *GSTO2*, han sido muy parecidos a los observados para Ala140Asp. Asimismo, otros estudios llevados a cabo con la variante 142Asp tampoco encontraron diferencias significativas entre la actividad de esta variante y la proteína normal (Schmuck *et al.*, 2005). Además, los resultados de correlación tampoco revelaron la existencia de asociación entre la segregación del alelo mutante y las diferencias en el patrón de excreción del arsénico inorgánico.

Se ha visto que, en la población estudiada, los niveles porcentuales de arsénico inorgánico y de DMA presentan una distribución bimodal. Teniendo en cuenta que, en el caso del arsénico inorgánico, esta distribución no está correlacionada con los niveles de arsénico total excretados, parecía muy probable que algunas variantes genéticas de *GSTO1* y *GSTO2* pudieran estar implicadas en este patrón variable de excreción. No obstante, nuestros resultados muestran que no parece existir ninguna correlación entre la segregación de las variantes alélicas de *GSTO1* y *GSTO2* y el incremento de los niveles de arsénico inorgánico excretados. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante los análisis de regresión ajustados a la edad revelan una asociación entre la variante 236Val y la disminución del porcentaje de DMA excretado, lo que indicaría un posible efecto desfavorable de esta variante en el patrón de excreción del arsénico. En contraste, se ha visto que la variante 142Asp estaría asociada al incremento de los niveles de DMA y, por lo tanto, asociada a un haplotipo favorable a la metabolización del arsénico.

Cuando se llevaron a cabo los análisis de regresión considerando los genotipos combinados de todas las variantes estudiadas, se ha observado que los individuos portadores del haplotipo con la doble variante Glu155del/ 208Lys presentan un mayor incremento de los porcentajes de arsénico inorgánico y de  $As^{III}$ , y una reducción del porcentaje de DMA excretado, en comparación con los niveles de los individuos portadores del haplotipo de referencia. Al incluir la variante Asn142Asp en estos análisis se ha observado que, cuando el alelo 142Asp es la única forma variante del haplotipo, o cuando segrega conjuntamente con el alelo mutante 140Asp, son haplotipos que confieren un efecto favorable en la metabolización del arsénico (disminución de los porcentajes excretados de arsénico inorgánico,  $As^{III}$ , e incremento del porcentaje de DMA). Por otro lado, no se observa efecto protector de esta variante, cuando está asociada a las formas alélicas Glu155del y

208Lys. En este caso, los resultados obtenidos son similares a los ya descritos para el haplotipo que se caracteriza únicamente por las formas doble mutantes de *GSTO1*.

También se hizo un análisis más detallado con el objetivo de investigar si algunas de las variantes de *GSTO1* y *GSTO2* eran determinantes en las diferencias de los niveles porcentuales de arsénico excretado, en el caso de individuos que poseían patrones anormales de excreción. En general, no se ha visto que ninguna de las variantes presentara un papel modulador en el perfil anormal de excreción. La única excepción fue la relacionada con el genotipo doble heterocigoto para las variantes Glu155del/ 208Lys, que parece incrementar aún más el perfil desfavorable de excreción de DMA.

Las variantes genéticas de *GSTO1* son relativamente raras, siendo la única excepción la variante Ala140Asp. Asimismo, todas las variantes estudiadas que poseen actividad catalítica distinta de la normal, se presentan con frecuencias inferiores al 5 %, lo que puede limitar la importancia de estos resultados por lo que se refiere a los tratamientos con quimioterapia empleando el trióxido de arsénico, o en estudios para estimar el riesgo genotóxico en poblaciones humanas expuestas al arsénico. En estudios previos se ha sugerido que *GSTO1* es la enzima limitante en el proceso de biotransformación del arsénico. No obstante, nuestros resultados sugieren que otros factores parecen tener mayor importancia en la variabilidad en el patrón de excreción del arsénico. Esta hipótesis se ve reforzada por un reciente estudio en el cual no se han observado diferencias en el metabolismo del arsénico en ratones deficientes para *GSTO1* (Chowdhury *et al.*, 2006).

También se ha visto que *GSTO2* es capaz de reducir  $\text{MMA}^{\text{V}}$  a  $\text{MMA}^{\text{III}}$  y, por lo tanto, podría estar implicada en la variabilidad metabólica de la biotransformación del arsénico. No obstante, aunque los polimorfismos de *GSTO2* están siendo investigados, todavía se conoce muy poco para que se pueda excluir del todo un eventual papel modulador en el metabolismo del arsénico. En nuestro estudio, los resultados obtenidos con la variante Asn142Asp parecen indicar un posible efecto protector de la forma alélica variante.

En este punto, hay que considerar que los posibles factores implicados en las diferencias de excreción del arsénico y de sus metabolitos podrían estar ligados, principalmente, a los pasos de metilación. Esta suposición se basaría en lo observado en los resultados obtenidos hasta el momento, que sugieren que estas diferencias no parecen ser únicamente dependientes de *GSTO1* o de *GSTO2*.

Estudios recientes apuntan que la As<sup>III</sup> metiltransferasa (As3MT), que es la principal responsable de los dos pasos de metilación en la biotransformación del arsénico por vía de la metilación oxidativa, podría estar involucrada en la regulación del metabolismo del arsénico. En un estudio preliminar en ratas, se ha visto que la As3MT también podría catalizar los pasos de reducción del arsénico, aunque todavía se necesitan más estudios en esta línea (Thomas *et al.*, 2004). La potencial capacidad metilasa y reductasa de la As3MT puede estar contribuyendo a que el papel de *GSTO1* en el proceso de metabolización del arsénico sea redundante y, por lo tanto, no sea el paso limitante de este proceso, como antes se creía (Zakharyan *et al.*, 2001). Esto podría explicar la falta de asociación significativa entre los polimorfismos de *GSTO1* y los patrones de excreción del arsénico en la población estudiada por nosotros. Siguiendo esta misma línea, tampoco se debería esperar ninguna asociación entre la variante de *GTSO2* y la variabilidad en el proceso de metabolización del arsénico, tal como se ha comprobado en nuestro estudio.

En el caso de la As3MT, se ha detectado la existencia de un gran número de polimorfismos, estando 4 de ellos localizados en regiones codificantes. De estos 4, uno consiste en una repetición, de 1 a 3 copias de 35 o 36 bp, localizada en el exón 1 (Wood *et al.*, 2006). Estudios muy recientes revelan la existencia de una asociación entre el cambio Met287Thr y el porcentaje de excreción de MMA en orina (Hernández *et al.*, 2007; Lindberg *et al.*, 2007). Asimismo, otros estudios sugieren que las enzimas GSTM1, GSTT1 y GSTM1 también parecen estar correlacionadas con la capacidad de metabolizar el arsénico correctamente y, consecuentemente, con la susceptibilidad al arsénico, ya sea debido a una exposición ambiental, ocupacional o terapéutica (Kile *et al.*, 2005; Bernardini *et al.*, 2006; Engstrom *et al.*, 2007; McCarty *et al.*, 2007).

A modo de resumen podríamos decir que el presente estudio, en el cual se investigó el papel de las variantes de *GSTO1* y de *GSTO2* entre chilenos, europeos y atacameños, ha contribuido a una mejor caracterización de la clase GST en estos grupos étnicos. Además, la identificación y caracterización de dos formas variantes inestables de *GSTO1* en una población sudamericana que ha estado expuesta a niveles de arsénico ambientales a lo largo de muchas generaciones, puede tener relevancia en futuras investigaciones sobre el papel de dichas variantes frente a la respuesta al daño genético en poblaciones expuestas al arsénico. Los factores genéticos asociados a las variantes de *GSTO1* estudiadas no parecen explicar la variabilidad encontrada en el patrón de excreción de los individuos analizados.

La variante de *GSTO2* estudiada tampoco parece presentar una asociación clara con el patrón de excreción del arsénico, aunque podría considerarse como un genotipo favorable en el proceso de metabolización del arsénico y, consecuentemente, ligado a una menor susceptibilidad al daño genotóxico inducido.

De momento, todavía no se puede descartar el papel de las GSTO como posibles enzimas involucradas, probablemente de forma parcial, en el proceso de biotransformación del arsénico. Considerando que existe un solapamiento en las funciones de estas enzimas, y con otras GSTs, es muy complicado discernir el papel de cada una de ellas en la variabilidad en el perfil de excreción del arsénico. Los resultados obtenidos parecen indicar que el análisis de los genotipos puede ofrecer una mejor caracterización del papel de las GSTs en el proceso de metabolización del arsénico o en la susceptibilidad frente a la exposición al arsénico. Por lo tanto, son necesarias posteriores investigaciones para dilucidar el papel concreto de cada una de las variantes o de la combinación de sus genotipos en la metabolización de compuestos genotóxicos y /o carcinogénicos y, en especial, del arsénico.

#### **5.2.4. Asociaciones entre los polimorfismos de *GSTO1* y *GSTO2* con el daño genotóxico**

En gran parte de los estudios sobre biomonitorización de poblaciones humanas expuestas de forma crónica al arsénico, se evalúan las correlaciones entre daño genético y exposición (Dulout *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1996; Basu *et al.*, 2001; Mahata *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2004, 2005; Chakraborty *et al.*, 2006) o bien las correlaciones existentes entre genotipos y diferencias en los perfiles de excreción del arsénico (Chiou *et al.*, 1997; Marnell *et al.*, 2003; Marcos *et al.*, 2006; Engstrom *et al.*, 2007).

Tal como se ha discutido en el apartado anterior, existen suficientes evidencias que indican que el proceso de metabolización está implicado en los efectos tóxicos inducidos por el arsénico. Además, algunos estudios parecen corroborar que las diferencias en el patrón de excreción del arsénico probablemente están moduladas por una base genética, lo que explicaría la variabilidad observada en la respuesta frente a una misma exposición. Los primeros trabajos investigaron las posibles correlaciones entre variantes de genes involucrados en el metabolismo, con las diferencias en el patrón de excreción y con la respuesta al daño inducido frente a una exposición (Chiou *et al.*, 1997; McCarty *et al.*, 2007). La mayoría de los estudios de asociación entre perfil de excreción y diferencias de

respuesta al arsénico (incremento de lesiones en la piel, enfermedades vasculares y cáncer) se han llevado a cabo teniendo en cuenta el genotipo de los individuos expuestos para las variantes más frecuentes de las GSTs (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*). Sin embargo, no existen estudios de correlaciones entre genes involucrados directamente en el metabolismo del arsénico, diferencias en el patrón de excreción y la susceptibilidad de respuesta frente a una determinada exposición. Es en este contexto donde nuestro trabajo adquiere especial relevancia.

La primera parte de nuestro estudio consistió en la evaluación del daño genotóxico inducido por la exposición ocupacional al arsénico, utilizando los ensayos de MN y de SCE. Sin embargo, los resultados obtenidos no revelaron ninguna asociación entre los niveles de exposición y el daño genotóxico. Para evaluar si los genotipos de *GSTO1* y *GSTO2*, o su combinación, estaban correlacionados con la frecuencia del daño medido a través de los ensayos de MN o de SCE, se llevaron a cabo análisis de regresión ajustados a la edad y a la exposición, teniendo en cuenta los genotipos y el perfil de excreción de los 205 trabajadores.

Los resultados obtenidos revelan que ninguna de las variantes estudiadas de *GSTO1* o de *GSTO2* parece estar modulando de forma significativa la frecuencia de MN o de SCE. No obstante, y tal como se había detectado anteriormente, algunas combinaciones de haplotipos de *GSTO1* y de *GSTO2* han mostrado estar asociadas a diferencias en el perfil de excreción del arsénico y, en este caso, también a diferencias en el daño observado entre los individuos analizados. Así, los individuos portadores del haplotipo doble variante para Glu155del/208Lys, presentaron un incremento significativo de la frecuencia de BCMN, en comparación con los portadores del haplotipo de referencia.

Se obtuvieron resultados similares para el haplotipo caracterizado por esta doble variante combinada con la forma alélica 142Asp. La combinación entre los genotipos 140Asp y 142Asp también condujo al incremento de la frecuencia de BCMN. Por otro lado, la variante 142Asp, al segregar con las formas alélicas normales de las variantes de *GSTO1*, representa un haplotipo de protección frente al daño genotóxico medido según la frecuencia de BCMN.

Cuando se realizó un análisis de regresión ajustado a la edad y a los perfiles de excreción (% As-i, % MMA o % DMA), no se observó que ninguna de las variantes de *GSTO1* y

*GSTO2* tuviera un papel modulador en la frecuencia de SCE o de MN. Sin embargo, la combinación de algunos genotipos parece influenciar la frecuencia de BCMN. El haplotipo doble mutante (Glu155del/ 208Lys) está asociado al incremento de la frecuencia de BCMN en todos los análisis realizados, incluso cuando estas dos formas variantes están segregadas con el alelo 142Asp. En contraste, el haplotipo caracterizado por esta forma variante se encuentra asociado a la disminución de la frecuencia de BCMN en todas las comparaciones realizadas.

Finalmente, se evaluó el papel de los genotipos de *GSTO1* y de *GSTO2* sobre las frecuencias de SCE y de MN observadas en individuos con perfiles anormales de excreción del arsénico. De los resultados obtenidos, se ha visto que la forma variante 140Asp está asociada con una reducción en la frecuencia de SCE y, a la vez, con un incremento de la frecuencia de BCMN en el grupo de individuos con patrón anormal y desfavorable de excreción del As-i (> 30 %). Entre los individuos que poseían niveles porcentuales de DMA inferiores al 60 % también se ha observado una asociación positiva entre la variante 140Asp y el incremento de BCMN, mientras que la forma variante 142Asp estaba asociada a una reducción de las frecuencias de BCMN observadas. En este mismo grupo, también se ha identificado una asociación significativa entre el incremento de la frecuencia de BCMN y las formas alélicas Glu155del o 208Lys. Los análisis de los haplotipos corroboraron los resultados obtenidos entre el grupo de individuos con perfiles de excreción del As-i superiores al 30 % o de DMA inferiores al 60 %. Asimismo, revelaron que en el grupo de individuos con perfiles desfavorables de excreción del MMA, el haplotipo caracterizado por la variante 142Asp contribuía de forma significativa a la reducción de la frecuencia de BCMN.

De manera general, los resultados de las interacciones entre genotipos, perfil de excreción del arsénico y daño genotóxico, medido a través de los ensayos de MN y de SCE, revelan la existencia de interacciones positivas entre algunas de las variantes de *GSTO1* (Glu155del/ 208Lys; 140Asp), las diferencias en el patrón de excreción del arsénico y la frecuencia de daño genotóxico en los 205 individuos analizados. También se ha podido confirmar que la forma variante 142Asp, cuando segrega con las formas normales de los otros cambios de *GSTO1* estudiados, estaría asociada a un perfil favorable de excreción del arsénico y, además, con una reducción de la frecuencia de BCMN. Aunque se observaron otras interacciones, fueron de menor importancia.

Como era de esperar, los haplotipos de *GSTO1* y de *GSTO2* muestran un papel más relevante en los análisis de correlaciones entre las diferencias en el patrón de excreción del arsénico en orina y los niveles de daño, que el efecto modulador que ejerce cada uno de los genotipos de manera individual.

Además de los factores genéticos, diversos factores ambientales, como por ejemplo la edad, la dieta y el consumo de tabaco, entre otros, también pueden contribuir de forma significativa a las diferencias interindividuales relacionadas con la actividad de las GSTs que, a su vez, se reflejan en la variabilidad de respuesta frente a una determinada exposición.

### **5.3. Parte III. Estudios *in vitro***

#### **5.3.1. Caracterización de GSTO1**

La clase de enzimas GSTO se ha descubierto recientemente y se ha identificado que sus dos miembros funcionales, GSTO1 y GSTO2, están ampliamente distribuidos en un gran número de especies (Board *et al.*, 2000; Whitbread *et al.*, 2005). Asimismo, los genes que codifican para GSTO1 y para GSTO2 ya se han caracterizado, y los niveles de RNA y de proteínas se han identificado en múltiples tejidos (Yin *et al.*, 2001; Whitbread *et al.*, 2003).

Ambas enzimas se han expresado en *E. coli*, se han purificado, y sus estructuras cristalinas han sido caracterizadas, revelando la presencia de un sitio activo de cisteína. Esta conformación estructural difiere de las características observadas en las otras GSTs citosólicas de mamíferos, que poseen los sitios activos con residuos de tirosina o serina. Además de las diferencias estructurales, las GST de la clase Omega presentan propiedades catalíticas y funcionales nuevas, entre las cuales se incluye la capacidad de participar en todas las reducciones del arsénico (Whitbread *et al.*, 2003; Schmuck *et al.*, 2005). Como se ha comentado anteriormente, a la enzima GSTO1 se la considera como el factor limitante en el proceso de reducción del arsénico, y se han identificado y caracterizado variantes polimórficas de los genes que codifican para GSTO1 y para GSTO2 en diferentes grupos étnicos (Whitbread *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2006).

A pesar de los avances significativos en la caracterización de las propiedades catalíticas de estas dos enzimas y de sus variantes genéticas, la función que tienen en el proceso de

metabolización del arsénico y en la protección frente al daño genotóxico inducido por compuestos endógenos o exógenos sigue en discusión.

En nuestro trabajo se han analizado los niveles de expresión de GSTO1 y de GSTO2 en distintas líneas celulares, representativas de órganos diana del arsénico, como son la vejiga y el pulmón. Los resultados indican que los niveles de expresión de GSTO1 son altos y relativamente constantes, comparados con los niveles de GSTO2. Las excepciones se obtuvieron en las células HepG2 y SW800. Como era de esperar, las células HepG2 (hepáticas), caracterizadas por poseer un gran potencial metabólico, presentaron los niveles más altos de expresión de GSTO1 y de GSTO2. En contraste, la línea SW800 presentaba niveles de expresión de GSTO1 muy inferiores a los observados en las demás líneas celulares, incluso cuando se comparaban con los niveles de expresión observados en la línea celular RT4 que, al igual que la SW800, es también originaria de un cáncer de vejiga.

Una vez caracterizados los niveles de expresión de GSTO1 y de GSTO2 en las 5 líneas celulares, se seleccionaron las líneas MRC5 y SW800 para ser utilizadas en los estudios posteriores. Así, SW800 se incluyó en el estudio por presentar niveles de expresión de GSTO1 muy reducidos, mientras que MRC5 se utilizó como una línea celular control, con niveles basales de expresión de GSTO1 y de GSTO2 normales.

Datos previos revelan que GSTO1 es una enzima que se expresa tanto en el núcleo como en el citoplasma de un gran número de tejidos (Yin *et al.*, 2001). Sin embargo, los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de esta enzima no se han investigado. Teniendo en cuenta que los cambios en la expresión de GSTO1 podrían estar implicados en las diferencias observadas en el proceso de metabolización del arsénico, se ha llevado a cabo una caracterización de la expresión de GSTO1 en la línea celular MRC5 durante las distintas fases del ciclo celular, además de averiguar las posibles vías de regulación de su expresión.

Una vez sincronizados en fase G1, los cultivos de la línea MRC5 se fueron colectando a intervalos de tiempo de 0, 4, 8, 12 y 24 h. Considerando que esta línea presenta un ciclo que varía de 16 a 24 h, los resultados obtenidos revelan que GSTO1 se expresa de forma constante en todas las fases del ciclo celular. Además, se llevaron a cabo experimentos adicionales para evaluar si la expresión de GSTO1 se veía regulada por los mecanismos de

transcripción y/o de traducción; no obstante, no se observaron cambios en la expresión de esta enzima debido a estos mecanismos.

En resumen, GSTO1 es una enzima que se encuentra ampliamente distribuida en un gran número de especies y se expresa de forma altamente constante en todas las fases del ciclo celular. Además, su expresión no está modulada por los mecanismos de transcripción o de traducción.

### **5.3.2. Detección de los efectos tóxicos inducidos por distintos compuestos de arsénico**

La exposición al arsénico inorgánico, ya sea ambiental u ocupacional, está asociada al incremento del riesgo de distintos tipos de cáncer (Basu *et al.*, 2001; Mandal y Suzuki, 2002). En general, las poblaciones humanas están expuestas al arsénico inorgánico, el cual, una vez absorbido por el organismo, se transforma rápidamente en sus formas metiladas. Según el proceso de metabolización enzimática del arsénico, los compuestos inorgánicos pasan por sucesivas reducciones y metilaciones, que llevan a la excreción de las especies inorgánicas parentales y de metabolitos orgánicos metilados, como el MMA o el DMA (Vahter, 2002). A pesar de que este proceso de biotransformación del arsénico se conoce desde hace mucho tiempo (Crecelius, 1977), todavía es necesario entender mejor el papel de las enzimas involucradas en la biotransformación del arsénico.

Entre otras enzimas, las GSTs tienen un papel esencial en los procesos de destoxificación, catalizando la conjugación de sus grupos tioles con los centros electrofílicos de compuestos xenobióticos insolubles, ayudando así a su excreción (Boylard y Chasseaud, 1969; Hayes *et al.*, 2005). GSTO1 y GSTO2 son enzimas que se han caracterizado recientemente y que presentan la capacidad de participar en todas las reducciones del arsénico. Asimismo, a GSTO1 se la considera esencial en el proceso de metabolización del arsénico, ya que sería el paso limitante para que ocurra la posterior metilación (Zakharyan *et al.*, 2001; Aposhian y Aposhian, 2006). A pesar de ello, todavía no está dilucidada la importancia de estas enzimas como moduladoras de la toxicidad del arsénico.

Como ya se ha comentado, se viene cuestionando que el proceso de metabolización del arsénico sea un mecanismo de destoxificación, visto que las especies trivalentes orgánicas son más tóxicas que las pentavalentes e, incluso, que las trivalentes inorgánicas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Styblo *et al.*, 2000; Mass *et al.*, 2001; Hirano *et al.*, 2004; Drobna *et*

*al.*, 2005). Teniendo en cuenta que tanto GSTO1 como GSTO2 son capaces de reducir las formas de arsénico pentavalentes a trivalentes (Zakharyan *et al.*, 2001; Whitbread *et al.*, 2003; Schmuck *et al.*, 2005), diferencias en los niveles de expresión de estas enzimas podrían estar asociadas con la variabilidad de respuesta frente a una exposición al arsénico.

En este contexto, se esperaría que aquellas células que expresen niveles bajos de GSTO1 y de GSTO2 presenten una menor citotoxicidad cuando se tratan con los compuestos de arsénico pentavalentes, mientras que la respuesta a los tratamientos con los compuestos trivalentes no debería ser dependiente de los niveles de expresión de las GSTOs.

Para investigar esta hipótesis, se llevaron a cabo pruebas de toxicidad con las líneas celulares SW800 y MRC5, previamente seleccionadas por las diferencias que presentaban en los niveles de expresión de GSTO1. Ambas líneas celulares se trataron con compuestos de arsénico inorgánicos ( $\text{As}^{\text{V}}$  y  $\text{As}^{\text{III}}$ ) y orgánicos ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MMA}^{\text{V}}$  y  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ). Con excepción del  $\text{As}_2\text{O}_3$ , los otros compuestos están presentes en la ruta de biotransformación del arsénico y se excretan como metabolitos, por la orina. El trióxido de arsénico se ha utilizado en este estudio por ser un compuesto utilizado en la terapia contra el cáncer.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio vienen a corroborar que los compuestos inorgánicos y los trivalentes son los más tóxicos, pudiéndose realizar los tratamientos sólo a concentraciones del orden de micromolar, mientras que los tratamientos con los compuestos pentavalentes orgánicos pudieron realizarse utilizando concentraciones del orden de milimolar. Asimismo, se ha visto que la toxicidad de los compuestos trivalentes, incluso la del orgánico, es mayor que la observada para el arsénico pentavalente inorgánico. Las concentraciones de los tratamientos con los compuestos trivalentes se pudieron hacer hasta llegar a la concentración máxima de 50  $\mu\text{M}$ , mientras que la mayor concentración utilizada en los tratamientos con  $\text{As}^{\text{V}}$  fue diez veces mayor (500  $\mu\text{M}$ ).

Es evidente que la toxicidad de los compuestos de arsénico es dependiente de su forma y del estado químico en que se encuentran. La toxicidad de los compuestos trivalentes se debe especialmente al gran potencial que poseen para formar fuertes complejos con los tioles, interaccionando con el grupo sulfidrilo de un gran número de enzimas e inhibiendo así la actividad de las mismas (Styblo *et al.*, 2000; Hughes, 2002; Rossman, 2003). Además, las especies trivalentes presentan una mayor absorción celular en comparación con las especies pentavalentes (Hirano *et al.*, 2003; Dopp *et al.*, 2004, 2005).

Respecto a la capacidad de absorción celular del arsénico, en un estudio en el cual se evaluó el potencial de entrada de los compuestos de As-i utilizando la línea celular humana KB (carcinoma nasofaríngeo), por ejemplo, se observó que el As<sup>III</sup> entra en estas células por difusión pasiva, mientras que las especies con As<sup>V</sup> comparten el sistema de transporte con las moléculas de fosfato (Huang y Lee, 1996). Asimismo, se ha observado que entre los compuestos de arsénico trivalentes, los compuestos orgánicos poseen mayor capacidad para entrar en las células, mientras que en el caso de los compuestos pentavalentes, son los inorgánicos los más fácilmente absorbidos (Dopp *et al.*, 2004). Esto explicaría, en parte, el mayor potencial genotóxico de los compuestos orgánicos trivalentes (Mass *et al.*, 2001; Yamanaka *et al.*, 2004).

En el presente estudio se ha visto que los efectos de los tratamientos con los compuestos trivalentes inorgánicos y orgánicos casi no difieren entre las dos líneas celulares (MRC5 y SW800), confirmando así la hipótesis inicial de que los niveles de expresión de GSTO1 no deberían influir en la respuesta celular frente a los compuestos de arsénico trivalentes. No obstante, a pesar de que MRC5 presenta una mayor citotoxicidad en los tratamientos con los compuestos de arsénico pentavalentes (As<sup>V</sup> y MMA<sup>V</sup>), estas diferencias no son estadísticamente significativas en la mayoría de las concentraciones ensayadas. En el caso de los tratamientos con DMA<sup>V</sup>, los patrones de respuesta de las dos líneas son muy variables. En la ruta de biotransformación del arsénico por metilación oxidativa, el DMA<sup>V</sup> es el metabolito final a excretar y, por lo tanto, los efectos tóxicos del DMA<sup>V</sup> no deberían estar asociados al proceso de metabolización del arsénico.

En general, nuestros resultados sugieren que las diferencias en los niveles de excreción de GSTO1 no parecen modular los efectos tóxicos inducidos por los distintos compuestos de arsénico, en las dos líneas celulares evaluadas.

### **5.3.3. Papel del gen *GSTO1* en la toxicidad del arsénico**

De un modo general, las funciones de las GSTs están relacionadas con el proceso de metabolización de xenobióticos y la protección y mantenimiento de la homeostasis celular. Asimismo, también pueden estar involucradas en la modulación de los mecanismos de proliferación celular y de apoptosis (Mahajan y Atkins, 2005; Sharma *et al.*, 2006).

Como se ha discutido anteriormente, GSTO1 y GSTO2 son los dos miembros funcionales de la recién descubierta clase Omega y ambas enzimas poseen propiedades catalíticas nuevas, que todavía necesitan ser investigadas. Muy recientemente se ha descubierto, por ejemplo, que GSTO1 presenta una gran actividad fenacil reductasa, altamente específica y, por lo tanto, no compartida con GSTO2 (Board y Anders, 2007). Por lo tanto, es muy probable que, además de participar en las reacciones enzimáticas de reducción del arsénico, tanto GSTO1 como GSTO2 puedan tener un importante papel en la respuesta a los efectos tóxicos inducidos. En este contexto, se han investigado las posibles correlaciones existentes entre niveles de expresión de GSTO1 y GSTO2 y los efectos inducidos por los distintos compuestos de arsénico durante el proceso de metabolización.

Los resultados de los experimentos anteriormente comentados indican que los niveles de expresión de GSTO1 no parecen modular los efectos tóxicos inducidos por los compuestos de arsénico evaluados. No obstante, el arsénico también puede provocar efectos tóxicos de forma indirecta, siendo la inducción del daño oxidativo uno de los principales mecanismos relacionados con el potencial del arsénico como comutágeno y como genotóxico indirecto (Vega *et al.*, 2001; Hughes, 2002; Hei y Filipic, 2004; Tapio y Grosche, 2006; Kumagai y Sumi, 2007). Existen numerosos estudios que indican que las especies reactivas de oxígeno están asociadas a la modulación de la transducción de señales y a la regulación de factores de transcripción (Martindale y Holbrook, 2002; Kumagai y Sumi, 2007). Así, eventos celulares importantes como, por ejemplo, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis, están coordinados y mediados por los pasos de la transducción de señales y el arsénico tiene la capacidad de alterar muchos de estos pasos, incluyendo los sistemas de fosforilación de tirosina, activación de proteínas quinasas (MAPKs) y de múltiples factores de transcripción, incluyendo NF- $\kappa$ B y AP-1 (Vega *et al.*, 2001; Tapio y Grosche, 2006).

Los procesos involucrados en la inducción del estrés oxidativo por el arsénico están estrechamente relacionados con las sucesivas reacciones enzimáticas de reducción de las especies pentavalentes a las formas trivalentes y, por lo tanto, diferencias en los niveles de expresión de GSTO1 podrían tener gran importancia, visto que pueden influir tanto en la inducción como en la protección contra el estrés oxidativo asociado al arsénico.

Siguiendo en esta línea de investigación, se han analizado las diferencias en la respuesta de las dos líneas celulares MRC5 y SW800, frente a los efectos inducidos por los compuestos de arsénico; tanto en cultivos pre-tratados con NAC o no. Existen numerosas evidencias

que demuestran que NAC es un potente antioxidante, y que es capaz de reducir los efectos inducidos por el arsénico en diferentes sistemas celulares. En realidad, NAC se incorpora fácilmente en las células e incrementa la síntesis de GSH, ya que consiste en una fuente suplementaria de tioles (Hirano *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Piga *et al.*, 2007; Santra *et al.*, 2007).

En nuestros estudios se observa que los tratamientos con NAC reducen de forma significativa la toxicidad inducida por los compuestos de arsénico, lo que viene a confirmar la inducción de estrés oxidativo. La falta de efecto protector del NAC frente al daño inducido por el DMA<sup>V</sup> sugiere que este compuesto tiene una capacidad relativamente baja para inducir estrés oxidativo y, por lo tanto, los efectos de toxicidad se solapan con los causados por el daño oxidativo.

Los tratamientos con los compuestos de arsénico, con excepción del DMA<sup>V</sup>, han revelado que, a concentraciones bajas, se solapan los efectos inducidos por el estrés oxidativo y la toxicidad de los compuestos *per se*, indicando que al depender de la dosis del tratamiento ambos efectos pueden estar o no asociados. Asimismo, se ha podido averiguar que, en casi todos los tratamientos realizados, existió una dosis puntual en la que los efectos dejan de solaparse. Esta dosis, en el caso de los tratamientos con los compuestos trivalentes, ha sido exactamente igual en las dos líneas celulares estudiadas. Estos resultados sugieren que los diferentes niveles de expresión de GSTO1 no están modulando de forma significativa los mecanismos de respuesta frente a la exposición a los compuestos trivalentes de arsénico, corroborando así la actividad funcional reductora de GSTO1.

En contraposición, los tratamientos con los compuestos pentavalentes (As<sup>V</sup> y MMA<sup>V</sup>) han revelado que las células con los niveles de expresión de GSTO1 más bajos (SW800) parecen ser más resistentes a la inducción del estrés oxidativo, visto que estos efectos se observaron sólo a concentraciones mucho más elevadas. Estos datos sugieren que los niveles reducidos de expresión de GSTO1 pueden estar asociados a una mayor tolerancia a los efectos tóxicos de los compuestos de arsénico causados por el estrés oxidativo. Por lo tanto, personas potencialmente expuestas al arsénico, principalmente en los casos de exposición terapéutica al trióxido de arsénico, pueden presentar diferente riesgo, dependiendo de los niveles de expresión de GSTO1.

En este contexto, aquellos polimorfismos que afecten a la expresión de esta enzima podrían estar asociados a un mayor o menor riesgo frente a los efectos tóxicos inducidos por el arsénico. De los polimorfismos de GSTO1 hasta ahora estudiados, todos los que llevan a cambios en la actividad funcional de esta enzima se presentan en frecuencias relativamente bajas y, por lo tanto, quizás no tengan mucha relevancia en la estima de riesgo. Sin embargo, otros factores también pueden estar influenciando la actividad de las GSTO y, por lo tanto, necesitarían ser mejor investigados.

En nuestro trabajo hemos confirmado que los niveles de expresión de GSTO1 son altamente constantes durante las distintas fases del ciclo celular, incluso en células tratadas con diferentes compuestos de arsénico. No obstante, todavía se hace necesaria una mejor caracterización de la redistribución celular de GSTO1 y de GSTO2, después de los tratamientos con arsénico llevados a cabo con o sin la presencia de NAC. Una vez concluidos estos experimentos, se podrá tener una visión más correcta de la función de estas enzimas en el proceso de biotransformación del arsénico y de su papel frente al estrés oxidativo.

Por otro lado, se ha visto que las células que expresan niveles reducidos de GSTO1 (SW800) tienen una tendencia a presentar una menor respuesta citotóxica frente a los compuestos de  $As^V$  y  $MMA^V$ . No obstante, estos resultados no se han confirmado en los datos obtenidos en los experimentos con RNAi, donde se alcanzó una disminución significativa de los niveles de expresión de GSTO1. En este caso, aunque no se haya observado ninguna reducción en los niveles de expresión de GSTO2, la expresión de GSTO1 se llegó a reducir hasta un 80 %. Por lo tanto, los niveles de expresión de GSTO1 y de GSTO2 alcanzados por la técnica de RNAi han sido similares a los de las líneas celulares MRC5 y SW800.

En general, los niveles de expresión de GSTO1 no parecen ejercer ningún efecto sobre la respuesta citotóxica a los tratamientos con los distintos compuestos de arsénico ensayados. La ausencia de efecto modulador de GSTO1 frente a la exposición al arsénico puede ser debido a que otras GSTs puedan estar sustituyendo las funciones de GSTO1. Las GSTs presentan funciones catalíticas compartidas y, por lo tanto, es muy probable que la reducción de los niveles de GSTO1 pueda estar equilibrada por la expresión de otras enzimas con funciones equivalentes, especialmente la GSTO2.

De hecho, en un estudio publicado recientemente con ratones *knockout* para GSTO1, que simultáneamente presentaban niveles reducidos de expresión de GSTO2 (3 veces menos transcritos de GSTO1 y 2 veces menos transcritos de GSTO2, en comparación con los ratones de genotipo salvaje), seguían presentando actividad arsénico reductasa (Chowdhury *et al.*, 2006). Por lo tanto, estos resultados obtenidos *in vivo* sumados a los citados y discutidos en el presente trabajo, sugieren que otras enzimas, además de GSTO1, parecen estar involucradas en la biotransformación del arsénico. No obstante, es muy probable que GSTO1 tenga un papel modulador importante en los efectos del arsénico asociados a la inducción de daño oxidativo.

#### **5.4. Discusión general de los resultados obtenidos**

Tal como se ha señalado anteriormente, el presente trabajo se ha centrado en el estudio de los efectos genotóxicos inducidos por el arsénico. Dado que en distintas regiones del planeta se encuentran altas concentraciones de arsénico, tanto de forma natural como debido a actividades antropogénicas, los posibles efectos resultado de la exposición crónica al arsénico han adquirido el rango de problema de salud a escala mundial. En algunas regiones de Chile, en particular, los niveles ambientales de arsénico se ven incrementados de manera continuada por la intensa actividad minera.

Desde 1987, el arsénico viene siendo clasificado por la IARC como un compuesto carcinogénico en humanos y los resultados de los estudios epidemiológicos corroboran que en los colectivos expuestos, de forma crónica al arsénico, se observan incrementos significativos en las tasas de distintos tipos de cáncer, especialmente de piel, vejiga, hígado y pulmón. En contraste, el trióxido de arsénico se viene utilizado de manera eficaz y creciente en la terapia contra algunos tipos de cáncer. Por lo tanto, los mecanismos de acción del arsénico todavía necesitan ser mejor conocidos.

A pesar de que los efectos tóxicos causados por la exposición al arsénico y sus metabolitos se conocen desde hace mucho tiempo, se observa una gran variabilidad entre individuos en la respuesta al daño inducido. Esto indica la necesidad de investigar los mecanismos implicados en las diferencias de respuesta observadas entre poblaciones e, incluso, entre individuos de una misma población sometidos a niveles similares de exposición. Asimismo, hay que resaltar que el metabolismo del arsénico está intrínsecamente relacionado con su toxicidad y, al contrario de lo que se creía, el proceso de

biotransformación del arsénico no puede considerarse como un mecanismo de detoxificación ya que las especies de arsénico trivalentes metiladas son más tóxicas, más citotóxicas y más genotóxicas que las especies inorgánicas parentales.

En humanos, el proceso de metabolización enzimática del arsénico está relativamente bien caracterizado y consiste en sucesivas reacciones de reducción y de metilación, lo que lleva a la transformación de los compuestos de arsénico inorgánicos en especies orgánicas metiladas, que son más fácilmente excretadas. No obstante, se ha visto que en las etapas de reducción, además de producir metabolitos trivalentes metilados más reactivos, también se genera la inducción de estrés oxidativo.

Recientemente se ha propuesto un nuevo modelo de biotransformación del arsénico por una vía no enzimática. En este caso, sólo se requiere la actividad de la metiltransferasa para llevar a cabo todo el proceso de metabolización. No obstante, al contrario de lo que ocurre en el proceso clásico de metabolización, los metabolitos intermediarios generados por esta vía de biotransformación alternativa no se han detectado en orina. Sin embargo, teniendo en cuenta la importancia que tiene el metabolismo en la toxicidad del arsénico, es evidente la necesidad de investigar los mecanismos involucrados en este proceso.

Por otro lado, la vía clásica de metilación oxidativa es bien conocida y está corroborada desde hace tiempo. En este caso, para que actúe la metiltransferasa, se requiere una enzima capaz de llevar a cabo la reducción del arsénico pentavalente a las formas trivalentes. En este contexto, se ha identificado y caracterizado una nueva clase de GSTs, la clase Omega. Ésta está formada por dos miembros funcionales, considerándose a uno de ellos (GSTO1) como la enzima responsable de las reducciones del arsénico y siendo, por tanto, el paso limitante en el proceso de biotransformación. Hay que destacar que GSTO2, que es el otro miembro funcional de la clase, también presenta la capacidad arsénico reductasa y potencialmente, podría ser una posible sustituta funcional de GSTO1 en la metabolización del arsénico. Cabe destacar que, a pesar de todos los estudios realizados, aún está sin dilucidar completamente el posible papel modulador de las enzimas involucradas en el proceso de biotransformación y, consecuentemente, queda sin definir el papel de estas enzimas en la toxicidad del arsénico.

En este contexto, en nuestro trabajo se han evaluado los efectos inducidos por la exposición al arsénico desde distintos puntos de vista, utilizando tanto estudios *in vivo*

como *in vitro*. La primera parte del trabajo ha consistido en un estudio clásico de biomonitorización de una población de trabajadores chilenos expuestos de forma ocupacional al arsénico. La principal característica de nuestro estudio es que el tamaño muestral ha sido mucho mayor que el de la mayoría de estudios de biomonitorización llevados a cabo por otros autores. Otra característica de nuestro trabajo es que ha sido realizado en una población expuesta laboralmente, cuando en la mayoría de los estudios se trabaja con poblaciones expuestas ambientalmente al arsénico.

Los biomarcadores utilizados en el estudio, tanto de exposición como de daño genotóxico, han sido marcadores clásicos comúnmente utilizados en los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a genotóxicos y, en especial, al arsénico. A los niveles de arsénico y de sus metabolitos en orina se les considera los mejores biomarcadores de exposición. A pesar de que los niveles de exposición detectados han sido significativamente altos, principalmente en el grupo de los trabajadores expuestos, no se ha detectado ninguna asociación entre los niveles de exposición y los niveles de daño genotóxico.

A los SCE, a pesar de ser biomarcadores que presentan una gran sensibilidad a los efectos genotóxicos de mucho xenobióticos, recientemente se les está considerado únicamente como biomarcadores de exposición. En realidad, todavía no se sabe los mecanismos por los cuales se originan los SCE y estos no parecen tener ningún significado biológico. En nuestro caso, los resultados obtenidos a través del ensayo de SCE han sido equivalentes a los observados en el ensayo de MN, tanto en linfocitos, como en células de mucosa bucal. Hay que remarcar que la utilización de biomarcadores de exposición y de dos tipos distintos de biomarcadores de daño, sumado al gran número de individuos analizados, ha posibilitado una evaluación bastante fiable del riesgo genotóxico inducido por el arsénico, que era la finalidad del primer objetivo. De acuerdo con nuestros resultados, es posible que otros factores, además de la exposición al arsénico, puedan estar implicados en la inducción del daño genotóxico observado en la población estudiada.

De los resultados citados en la literatura, se desprende la existencia de una gran variabilidad interindividual en el perfil de excreción del arsénico. En general, se considera que esta variabilidad puede estar asociada a la susceptibilidad frente al daño inducido por el arsénico. Se ha propuesto la existencia de una base genética en el metabolismo del arsénico y, por lo tanto, polimorfismos en los genes que codifican enzimas implicadas en la

biotransformación del arsénico, son posibles candidatos para explicar las diferencias de respuesta observadas entre grupos o entre individuos de una misma población expuesta.

Los genes que codifican las GSTs son altamente polimórficos y su distribución genotípica varía de acuerdo con los grupos étnicos analizados. Para confirmar esta variabilidad se han evaluado las frecuencias de las variantes de *GSTO1* y de *GSTO2*, presuntamente ligadas al metabolismo del arsénico, llevando a cabo previamente una secuenciación completa de estos genes, y un genotipado de las variantes encontradas (más otras citadas en la literatura) en tres grupos étnicos distintos (atacameños, chilenos y europeos). Cabe recordar que los atacameños son indígenas chilenos de poblaciones que han estado expuestas al arsénico durante muchas generaciones y presentan un patrón de excreción favorable del arsénico, difiriendo de lo que se observa en las demás poblaciones estudiadas.

En general, no se ha detectado ningún polimorfismo nuevo de *GSTO2* y se ha observado que las frecuencias de las variantes de *GSTO1* y de *GSTO2* difieren de forma significativa entre los grupos, siendo el grupo de los atacameños el menos polimórfico. La única excepción observada ha sido para la variante A236Val (de *GSTO1*) que, juntamente con una nueva variante Glu50Gly que había sido detectada en el estudio previo en chilenos, se ha expresado y caracterizado enzimáticamente. Ambas variantes poseen actividades catalíticas distintas de las observadas para la proteína normal, siendo además muy inestables. Resultados similares de inestabilidad ya se habían descrito para la delección Glu155, localizada en el exón 4 del gen *GSTO1*.

Con el objetivo de averiguar las posibles correlaciones entre genotipos de *GSTO1* y de *GSTO2* y las diferencias en el perfil de excreción y en el daño genotóxico, a los trabajadores chilenos incluidos en el estudio de biomonitorización, se les genotipó para las principales variantes de *GSTO1* y *GSTO2*.

De modo general, y salvo algunas excepciones, no se observa una gran asociación entre genotipos y perfil de excreción, ni tampoco entre genotipos y daño. No obstante, los análisis de regresión llevados a cabo teniendo en cuenta los haplotipos de *GSTO1* y de *GSTO2*, revelan asociaciones significativas. Los resultados sugieren que las variantes 236Val y Glu155del/ 208Lys pueden estar asociadas a un patrón desfavorable de excreción y a un aumento del daño, especialmente de la frecuencia de BCMN. En contraste, la

variante de *GSTO2* (142Asp), cuando segrega con los alelos normales de las demás variantes de *GSTO1* estudiadas, está asociada a un perfil favorable de excreción del arsénico y confiere una mayor protección al daño. Hay que considerar que las frecuencias de las variantes de *GSTO1* estudiadas, que llevan a cambios en la actividad enzimática, son relativamente muy bajas y, por lo tanto, estos resultados pueden carecer de un significado biológico importante.

A partir de los análisis de los polimorfismos de *GSTO1* y de *GSTO2*, no se ha podido establecer una correlación directa entre estas enzimas y las diferencias observadas en el proceso de biotransformación del arsénico. Es por esto que, en la tercera parte de este trabajo de Tesis, se ha buscado averiguar, a través de estudios *in vitro*, el papel de la clase Omega en el metabolismo y en la toxicidad del arsénico.

Como se ha discutido anteriormente, la clase Omega ha sido recientemente descubierta, por lo que *GSTO1* y *GSTO2* no están todavía totalmente caracterizadas. En el presente trabajo, se ha investigado los niveles de expresión de *GSTO1* y de *GSTO2* en distintas líneas celulares, así como los mecanismos involucrados en la expresión y regulación de *GSTO1*, que se considera que es la enzima limitante del metabolismo del arsénico vía metilación oxidativa.

El papel de *GSTO1*, como posible moduladora de los efectos tóxicos del arsénico, se ha investigado utilizando dos líneas celulares (MRC5 y SW800) con distintos niveles de expresión de esta enzima y, además, llevando a cabo experimentos con RNAi. Los niveles de expresión de *GSTO1* y de *GSTO2* obtenidos por la técnica de RNAi han sido comparables a los obtenidos en la línea celular SW800 (niveles reducidos de *GSTO1*). Los resultados obtenidos sugieren que los niveles de expresión de *GSTO1* no parecen influir de forma significativa en la respuesta frente a los tratamientos con distintos compuestos de arsénico. Estos resultados corroboran los resultados previos obtenidos con ratones *knockout* para *GSTO1*. Por lo tanto, considerando que las GSTs son enzimas que presentan funciones primarias compartidas y tienen un papel fundamental en el proceso de metabolización de un gran número de xenobióticos, es muy probable que otras enzimas puedan estar compartiendo funciones con *GSTO1* en el proceso de biotransformación del arsénico.

En contraposición, se ha visto que la toxicidad inducida por el arsénico en los distintos tratamientos, se debe también a la inducción de estrés oxidativo. Al depender de la dosis y del compuesto de arsénico utilizado, se han podido distinguir claramente los dos tipos de efectos observables (daño oxidativo y citotoxicidad) o la combinación de ambos. En nuestro caso, se ha visto que los niveles de GSTO1 son capaces de modular las diferencias de respuesta frente al daño oxidativo, principalmente en el caso de los compuestos pentavalentes. La única excepción ha sido la relacionada con los efectos del DMA<sup>V</sup>, que como metabolito final del metabolismo parece no estar modulado por GSTO1.

Los resultados de estos estudios *in vitro* confirman, de forma indirecta, el papel de GSTO1 como enzima reductasa en el metabolismo clásico del arsénico. Además, confirman que la biotransformación de los compuestos de arsénico pentavalentes está asociada a la inducción de estrés oxidativo que, a su vez, puede estar modulado por los niveles de expresión de GSTO1 que, al estar reducidos, pueden conferir una mayor resistencia a la exposición al arsénico.

Finalmente, queremos señalar que estos estudios son los primeros en los cuales se ha intentado caracterizar el papel modulador de las GSTOs en el proceso de metabolización y de toxicidad del arsénico. Es evidente que se trata de un primer paso y que todavía se necesitan estudios adicionales para que se pueda establecer de manera precisa el papel de GSTO1 y de GSTO2 y dilucidar los mecanismos involucrados en la metabolización de arsénico y en la modulación de los efectos tóxicos asociados a este proceso.



## 6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos y el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, se pueden formular las siguientes conclusiones:

1. Los niveles de arsénico en orina son un biomarcador bastante adecuado en la evaluación de la exposición al arsénico, puesto que los valores observados están de acuerdo con los niveles de exposición laboral atribuibles a los individuos analizados.
2. Los niveles de daño detectados mediante los ensayos de SCE y de MN en linfocitos de sangre periférica y en células de la mucosa bucal no se encuentran correlacionados con los niveles de exposición ocupacional observados.
3. Los parámetros PRI y CPBI no reflejan los posibles efectos citotóxicos causados por el arsénico, estando influenciados únicamente por la edad.
4. No se ha observado ninguna correlación entre un perfil desfavorable de excreción de arsénico y las frecuencias de SCE, de HFC y de MN en linfocitos o en células de mucosa bucal.
5. Los análisis de los polimorfismos de *GSTO1* y de *GSTO2* revelan la existencia de diferencias significativas en la distribución de los genotipos entre atacameños, chilenos y europeos, siendo el grupo de los atacameños el menos polimórfico, excepto para la variante Ala236Val.
6. La expresión, purificación y caracterización enzimática de las variantes de *GSTO1*, Glu50Gly y Ala236Val, revelan que ambas isoformas presentan una actividad catalítica distinta de la normal, siendo las dos variantes muy inestables.
7. En general, los genotipos de *GSTO1* estudiados no están asociados a diferencias en el patrón de excreción del arsénico o a la inducción de daño genético medido a través de los ensayos de SCE y de MN. La única asociación observada ha sido entre la variante Ala236Val y la disminución de los niveles de excreción de DMA.

8. La variante Asn142Asp de *GSTO2* tampoco presenta correlación con los niveles de excreción de arsénico en orina y con las frecuencias de SCE o de MN, excepto con relación al incremento del porcentaje de DMA excretado.
9. El análisis de los haplotipos de *GSTO1* o de la combinación de las variantes de *GSTO1* y de *GSTO2*, revela que las variantes 236Val y Glu155del (en desequilibrio de ligamiento con 208Lys) están asociadas a un perfil desfavorable de excreción del arsénico inorgánico o del DMA, así como al incremento de la frecuencia de MN. En contraste, la variante 142Asp parece estar asociada a un efecto protector.
10. Los niveles de expresión de *GSTO1* son constantes en las distintas líneas celulares estudiadas, salvo en las líneas SW800 y HepG2 que presentan niveles reducidos y muy elevados, respectivamente. En contraste, los niveles de expresión de *GSTO2* son constantes en todas las líneas celulares, aunque inferiores a los niveles de *GSTO1*.
11. La expresión de *GSTO1* es muy constante a lo largo del ciclo celular y no está modulada por mecanismos de transcripción o traducción.
12. La reducción de los niveles de expresión de *GSTO1* mediante la técnica de RNAi corrobora los resultados obtenidos con las líneas celulares estudiadas, permitiendo evaluar el papel de esta enzima en la toxicidad del arsénico.
13. Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad sugieren que las diferencias de respuesta frente a los tratamientos con compuestos trivalentes y pentavalentes de arsénico orgánico y orgánico no están modulados por los niveles de excreción de *GSTO1*.
14. En función de la concentración y de la forma del compuesto de arsénico, los efectos citotóxicos se pueden inducir de manera directa o como consecuencia del estrés oxidativo. Excepto en el caso de los tratamientos con DMA<sup>V</sup>, se ha visto que, a una determinada dosis de exposición, estos dos efectos dejan de solaparse siendo posible caracterizar el tipo de daño inducido.

15. Las diferencias en los niveles de expresión de GSTO1 no parecen modular la respuesta celular frente a los tratamientos con los compuestos de arsénico trivalentes ni con el DMA<sup>V</sup>.
  
16. La reducción de los niveles de expresión de GSTO1 parece conferir una mayor resistencia celular frente al daño inducido por el As<sup>V</sup> y el MMA<sup>V</sup>.





## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Albertini RJ (1994). Why use somatic mutations for human biomonitoring? *Environ Mol Mutagen* 23 Suppl 24: 18-22.
- Albertini RJ, Robinson SH (1991). Human population monitoring. En: *Genetic Toxicology*. RH Heflich AP Li (Eds). Boston, CRC Press: 375-420.
- Albertini RJ, Nicklas JA, O'Neill JP (1996). Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 3: 503-510.
- Albores A, Koropatnick J, Cherian MG, Zelazowski AJ (1992). Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production in vivo. *Chem Biol Interact* 85: 127-140.
- Aposhian HV, Aposhian MM (2006). Arsenic toxicology: five questions. *Chem Res Toxicol* 19: 1-15.
- Aposhian HV, Zakharyan RA, Wildfang EK, Healy SM, Gailer J, Radabaugh TR, Bodgan GM, Powell TA, Aposhian MM (1999). How is arsenic detoxified? En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. CO Albernathy, WR Chapell, RL Calderón (Eds). San Diego, Elsevier Science: 289-297.
- Aposhian HV, Gurzau ES, Le XC, Gurzau A, Healy SM, Lu X, Ma M, Yip L, Zakharyan RA, Maiorino RM, Dart RC, Tircus MG, Gonzalez-Ramirez D, Morgan DL, Avram D, Aposhian MM (2000). Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chem Res Toxicol* 13: 693-697.
- Aposhian HV, Zakharyan RA, Avram MD, Kopplin MJ, Wollenberg ML (2003). Oxidation and detoxification of trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol* 193: 1-8.
- Aposhian HV, Zakharyan RA, Avram MD, Sampayo-Reyes A, Wollenberg ML (2004). A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 327-335.

- ATSDR (2000). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Case studies in environmental medicine. Arsenic toxicity. Original date: June, 1990; revision date: October 2000. [www.atsdr.cdc.gov/HEC/CSEM/](http://www.atsdr.cdc.gov/HEC/CSEM/).
- ATSDR (2005). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for arsenic (Draft for Public Comment). Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA: U.S.
- Au WW (2007). Usefulness of biomarkers in population studies: from exposure to susceptibility and to prediction of cancer. *Int J Hyg Environ Health* 210: 239-246.
- Au WW, Cajas-Salazar N, Salama S (1998). Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. *Mutat Res* 400: 467-478.
- Baker RT, Catanzariti AM, Karunasekara Y, Soboleva TA, Sharwood R, Whitney S, Board PG (2005). Using deubiquitylating enzymes as research tools. *Methods Enzymol* 398: 540-554.
- Basu A, Mahata J, Gupta S, Giri AK (2001). Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat Res* 488: 171-194.
- Basu A, Mahata J, Roy AK, Sarkar JN, Poddar G, Nandy AK, Sarkar PK, Dutta PK, Banerjee A, Das M, Ray K, Roychaudhury S, Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK (2002). Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat Res* 516: 29-40.
- Beckman G, Beckman L, Nordenson I (1977). Chromosome aberrations in workers exposed to arsenic. *Environ Health Perspect* 19: 145-146.
- Bender MA, Preston RJ, Leonard RC, Pyatt BE, Gooch PC (1992). On the distribution of spontaneous SCE in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 281: 227-232.
- Bertolero F, Pozzi G, Sabbioni E, Saffiotti U (1987). Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis* 8: 803-808.

- Biondi R, Corco L, Cohen R, Martínez M, Torrico R (1995). Arsénico: Impacto sobre el hombre y su entorno. II Región de Chile (Antofagasta). Programa Ambiente 02 (1992 -1993). Centro de Investigaciones Ecobiológicas y Médicas de Altura C.I.E.M.A. División Chuquicamata - CODELCO, Chile.
- Board PG, Anders MW (2007). Glutathione transferase omega 1 catalyzes the reduction of S-(phenacyl)glutathiones to acetophenones. *Chem Res Toxicol* 20: 149-154.
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Eastal S, Jermin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem* 275: 24798-24806.
- Bonassi S, Au WW (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res* 511: 73-86.
- Brima EI, Haris PI, Jenkins RO, Polya DA, Gault AG, Harrington CF (2006). Understanding arsenic metabolism through a comparative study of arsenic levels in the urine, hair and fingernails of healthy volunteers from three unexposed ethnic groups in the United Kingdom. *Toxicol Appl Pharmacol* 216: 122-130.
- Cairns J (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 255: 197-200.
- Carrano AV, Natarajan AT (1988). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication n° 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204: 379-406.
- Chakraborty T, Das U, Poddar S, Sengupta B, 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.
- Chen CJ, Hsu LI, Wang CH, Shih WL, Hsu YH, Tseng MP, Lin YC, Chou WL, Chen CY, Lee CY, Wang LH, Cheng YC, Chen CL, Chen SY, Wang YH, Hsueh YM, Chiou

- HY, Wu MM (2005). Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility of arsenic-induced health hazards in Taiwan. *Toxicol Appl Pharmacol* 206: 198-206.
- Chiou HY, Hsueh YM, Hsieh LL, Hsu LI, Hsu YH, Hsieh FI, Wei ML, Chen HC, Yang HT, Leu LC, Chu TH, Chen-Wu C, Yang MH, Chen CJ (1997). Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. *Mutat Res* 386: 197-207.
- Chung JS, Kalman DA, Moore LE, Kosnett MJ, Arroyo AP, Beeris M, Mazumder DN, Hernandez AL, Smith AH (2002). Family correlations of arsenic methylation patterns in children and parents exposed to high concentrations of arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* 110: 729-733.
- Concha G, Nermell B, Vahter MV (1998). Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. *Environ Health Perspect* 106: 355-359.
- Countryman PI, Heddle JA (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41: 321-332.
- Creelius EA (1977). Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environ Health Perspect* 19: 147-150.
- Creus A (2002a). Genotoxicidad, mutagénesis, y carcinogénesis. En: *Genética Toxicológica y Carcinogénesis*. C Paz y Miño *et al.* (Eds). Quito, Ecuador, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Fundación para la Ciencia y Tecnología.: 17-18.
- Creus A (2002b). Biomonitorización de poblaciones humanas. En: *Genética Toxicológica y Carcinogénesis*. C Paz y Miño *et al.* (Eds). Quito, Ecuador, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Fundación para la Ciencia y Tecnología: 139-148.

- De la Rosa ME, Magnusson J, Ramel C, Nilsson R (1994). Modulating influence of inorganic arsenic on the recombinogenic and mutagenic action of ionizing radiation and alkylating agents in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 318: 65-71.
- Del Razo LM, García-Vargas GG, Vargas H, Albores A, Gonsebatt ME, Montero R, Ostrosky-Wegman P, Kelsh M, Cebrián ME (1997). Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study. *Arch Toxicol* 71: 211-217.
- Del Razo LM, García-Vargas GG, Hernández MC, Gómez-Muñoz A, Cebrián ME (1999). Profile of urinary arsenic metabolites in children chronically exposed to inorganic arsenic in Mexico. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. CO Albernathy, WR Chapell, RL Calderón (Eds). San Diego, Elsevier Science: 281-287.
- Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Brambila-Colombres E, Calderón-Aranda ES, Manno M, Albores A (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 177: 132-148.
- Dopp E, Hartmann LM, Florea AM, Von Recklinghausen U, Pieper R, Shokouhi B, Rettenmeier AW, Hirner AV, Obe G (2004). Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 201: 156-165.
- Drinkwater NR (1990). Experimental models and biological mechanisms for tumor promotion. *Cancer Cells* 2: 8-15.
- Drinkwater NR, Bennett LM (1991). Genetic control of carcinogenesis in experimental animals. *Prog Exp Tumor Res* 33: 1-20.
- Drobna Z, Waters SB, Devesa V, Harmon AW, Thomas DJ, Styblo M (2005). Metabolism and toxicity of arsenic in human urothelial cells expressing rat arsenic (+3 oxidation state)-methyltransferase. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 147-159.
- Dulout FN, Grillo CA, Seoane AI, Maderna CR, Nilsson R, Vahter M, Darroudi F, Natarajan AT (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.
- Eastmond DA, Tucker JD (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ Mol Mutagen* 13: 34-43.
- Eguchi N, Kuroda K, Endo G (1997). Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 32: 141-145.
- Engstrom KS, Broberg K, Concha G, Nermell B, Warholm M, Vahter M (2007). Genetic polymorphisms influencing arsenic metabolism: evidence from Argentina. *Environ Health Perspect* 115: 599-605.
- EPA (2002). Environmental Protection Agency.  
<http://www.epa.gov/safewater/ars/implement.html>.
- Ergene S, Celik A, Cavas T, Kaya F (2007). Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Goksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ Int* 33: 877-885.
- Farmer JG, Johnson LR (1990). Assessment of occupational exposure to inorganic arsenic based on urinary concentrations and speciation of arsenic. *Br J Ind Med* 47: 342-348.
- Fenech M (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 285: 35-44.
- Fenech M (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455: 81-95.
- Fenech M, Morley A (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 43: 233-246.
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S (1999). The HUMAN MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res* 428: 271-283.

- Ferreccio C, González C, Milosavljevic V (1997). Impacto en la salud atribuible a exposición a arsénico: un estudio de casos y controles. Subproyecto 2: Impacto en la Salud. FONDEF 2-24. Santiago, Chile.
- Frova C (2006). Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng* 23: 149-169.
- Gebel T (1998). Suppression of arsenic-induced chromosome mutagenicity by antimony. *Mutat Res* 412: 213-218.
- Gebel T (2000). Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology* 144: 155-162.
- Gebel TW (2001). Genotoxicity of arsenical compounds. *Int J Hyg Environ Health* 203: 249-262.
- Goering PL, Aposhian HV, Mass MJ, Cebrian M, Beck BD, Waalkes MP (1999). The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol Sci* 49: 5-14.
- Gonsebatt ME, Vega L, Salazar AM, Montero R, Guzmán P, Blas J, Del Razo LM, García-Vargas G, Albores A, Cebrián ME, Kelsh M, Ostrosky-Wegman P (1997). Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat Res* 386: 219-228.
- Guha Mazumder DN, Haque R, Ghosh N, De BK, Santra A, Chakraborty D, Smith AH (1998). Arsenic levels in drinking water and the prevalence of skin lesions in West Bengal, India. *Int J Epidemiol* 27: 871-877.
- Gutiérrez M, Wiertz JV (1997). Manejo y disposición de residuos de arsénico producidos en los procesos de fusión y refinación del cobre. Universidad de Chile, Grupo de Procesos Metalúrgicos, Departamento de Ingeniería Química. Proyecto FONDEF 2-24. Protección de la competitividad de los productos mineros de Chile: antecedentes y criterios para la regulación ambiental del arsénico. Santiago, Chile.
- Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Hogstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I, Reuterwall C, Salomaa S, Skerfving S, Sorsa M (1994). Cancer risk in humans predicted by increased levels of

- chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res* 54: 2919-2922.
- Harrington-Brock K, Cabrera M, Collard DD, Doerr CL, McConnell R, Moore MM, Sandoval H, Fuscoe JC (1999). Effects of arsenic exposure on the frequency of HPRT-mutant lymphocytes in a population of copper roasters in Antofagasta, Chile: a pilot study. *Mutat Res* 431: 247-257.
- Hartmann A, Speit G (1996). Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ Mol Mutagen* 27: 98-104.
- Hartwig A, Schwerdtle T (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett* 127: 47-54.
- Hartwig A, Groblinghoff UD, Beyersmann D, Natarajan AT, Filon R, Mullenders LH (1997). Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* 18: 399-405.
- Hartwig A, Pelzer A, Asmuss M, Burkle 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, Hirano S (2005). A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol* 79: 183-191.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 51-88.
- Healy SM, Casarez EA, Ayala-Fierro F, Aposhian H (1998). Enzymatic methylation of arsenic compounds. V. Arsenite methyltransferase activity in tissues of mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 148: 65-70.
- Hertz-Picciotto I, Smith AH, Holtzman D, Lipsett M, Alexeeff G (1992). Synergism between occupational arsenic exposure and smoking in the induction of lung cancer. *Epidemiology* 3: 23-31.

- Hirano S, Kobayashi Y, Cui X, Kanno S, Hayakawa T, Shraim A (2004). The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: important roles of thiol compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 458-67.
- Hirsch BA, Sentz KK, McGue M (1992). Genetic and environmental influences on baseline SCE. *Environ Mol Mutagen* 20: 2-11.
- Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Smith AH, Kalman DA, Moore LE (1996). Methylation study of a population environmentally exposed to arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* 104: 620-628.
- Hsu YH, Li SY, Chiou HY, Yeh PM, Liou JC, Hsueh YM, Chang SH, Chen CJ (1997). Spontaneous and induced sister chromatid exchanges and delayed cell proliferation in peripheral lymphocytes of Bowen's disease patients and matched controls of arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Mutat Res* 386: 241-251.
- Hu GG (1989). Investigation of protective effect of selenium on genetic materials among workers exposed to arsenic. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 23: 286-288.
- Hu Y, Su L, Snow ET (1998). Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. *Mutat Res* 408: 203-218.
- Huang C, Ke Q, Costa M, Shi X (2004). Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 255: 57-66.
- Huang RN, Ho IC, Yih LH, Lee TC (1995). Sodium arsenite induces chromosome endoreduplication and inhibits protein phosphatase activity in human fibroblasts. *Environ Mol Mutagen* 25: 188-196.
- Hughes MF (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 133: 1-16.
- Hughes MF (2006). Biomarkers of exposure: a case study with inorganic arsenic. *Environ Health Perspect* 114: 1790-1796.

- IARC (2004). International Agency for Research on Cancer. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, including Arsenic. Lyon, France.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Sari-Minodier I, Baciuchka-Palmaro M, Botta A Orsiere T (2007). Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis. *Mutat Res* 615: 18-27.
- Jager JW, Ostrosky-Wegman P (1997). Arsenic: a paradoxical human carcinogen. *Mutat Res* 386: 181-184.
- Jha AN, Noditi M, Nilsson R, Natarajan AT (1992). Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat Res* 284: 215-221.
- Jones FT (2007). A broad view of arsenic. *Poult Sci* 86: 2-14.
- Kashiwada E, Kuroda K, Endo G (1998). Aneuploidy induced by dimethylarsinic acid in mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 413: 33-38.
- Kharab P, Singh I (1985). Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast. *Mutat Res* 155: 117-120.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M, Jr., Lorge E, Norppa H, Surrallés J, von der Hude W, Wakata A (2000). Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environ Mol Mutagen* 35: 167-172.
- Kitchin KT, Ahmad S (2003). Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol Lett* 137: 3-13.
- Kligerman AD, Tennant AH (2007). Insights into the carcinogenic mode of action of arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 222:281-288.

- Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Harrington-Brock K, Allen JW, Winkfield E, Poorman-Allen P, Kundu B, Funasaka K, Roop BC, Mass MJ, DeMarini DM (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.
- Kurtio P, Komulainen H, Hakala E, Kahelin H, Pekkanen J (1998). Urinary excretion of arsenic species after exposure to arsenic present in drinking water. *Arch Environ Contam Toxicol* 34: 297-305.
- Kyrtopoulos SA (2006). Biomarkers in environmental carcinogenesis research: striving for a new momentum. *Toxicol Lett* 162: 3-15.
- Laliberte RE, Perregaux DG, Hoth LR, Rosner PJ, Jordan CK, Peese KM, Egger JF, Dombroski MA, Geoghegan KF, Gabel CA (2003). Glutathione s-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1beta posttranslational processing. *J Biol Chem* 278: 16567-16578.
- Lamberti L, Bigatti Ponzetto P, Ardito G (1983). Cell kinetics and sister-chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat Res*, 120: 193-199.
- Latt SA (1981). Sister chromatid exchange formation. *Annu Rev Genet* 15: 11-55.
- Latt SA, Schreck RR, Loveday KS, Dougherty CP, Shuler CF (1980). Sister chromatid exchanges. *Adv Hum Genet* 10: 267-331.
- Latt SA, Schreck RR, Dougherty CP, Shuler CF (1983). Sister chromatid exchange - the phenomenon and its relationship to chromosome-fragility diseases. En: *Chromosome Mutation and Neoplasia*. AL Liss (Ed). New York: 169-191.
- Lazutka JR, Dedonyte V, Krapavickaite D (1994). Sister-chromatid exchanges and their distribution in human lymphocytes in relation to age, sex and smoking. *Mutat Res* 306: 173-180.
- Lee TC, Ho IC (1994). Differential cytotoxic effects of arsenic on human and animal cells. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3: 101-105.

- Lee TC, Ho IC (1995). Modulation of cellular antioxidant defense activities by sodium arsenite in human fibroblasts. *Arch Toxicol* 69: 498-504.
- Lee TC, Lee KC, Tzeng YJ, Huang RY, Jan KY (1986). Sodium arsenite potentiates the clastogenicity and mutagenicity of DNA crosslinking agents. *Environ Mutagen* 8: 119-128.
- Lee-Chen SF, Yu CT, Jan KY (1992). Effect of arsenite on the DNA repair of UV-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 7: 51-55.
- Lee-Chen SF, Yu CT, Wu DR, Jan KY (1994). Differential effects of luminol, nickel, and arsenite on the rejoining of ultraviolet light and alkylation-induced DNA breaks. *Environ Mol Mutagen* 23: 116-120.
- Leonard A, Lauwerys RR (1980). Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. *Mutat Res* 75: 49-62.
- Lerda D (1994). Sister-chromatid exchange (SCE) among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Mutat Res* 312: 111-120.
- Lewinska D, Palus J, Stepnik M, Dziubaltowska E, Beck J, Rydzynski K, Natarajan AT, Nilsson R (2007). Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 80: 371-380.
- Li JH, Rossman TG (1989). Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol Toxicol* 2: 1-9.
- Lin S, Shi Q, Nix FB, Styblo M, Beck MA, Herbin-Davis KM, Hall LL, Simeonsson JB, Thomas DJ (2002). A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem* 277: 10795-10803.
- Lynn S, Lai HT, Gurr JR, Jan KY (1997). Arsenite retards DNA break rejoining by inhibiting DNA ligation. *Mutagenesis* 12: 353-358.
- Mahata J, Basu A, Ghoshal S, Sarkar JN, Roy AK, Poddar G, Nandy AK, Banerjee A, Ray K, Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK (2003). Chromosomal aberrations and sister

- chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat Res* 534: 133-143.
- Maki-Paakkanen J, Kurttio P, Paldy A, Pekkanen J (1998). Association between the clastogenic effect in peripheral lymphocytes and human exposure to arsenic through drinking water. *Environ Mol Mutagen* 32: 301-313.
- Mandal BK, Suzuki KT (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58: 201-235.
- Marahatta SB, Punyarit P, Bhudisawasdi V, Paupairoj A, Wongkham S, Petmitr S (2006). Polymorphism of glutathione S-transferase omega gene and risk of cancer. *Cancer Lett* 236: 276-281.
- Marcos R, Martínez V, Hernández A, Creus A, Sekaran C, Tokunaga H, Quinteros D (2006). Metabolic profile in workers occupationally exposed to arsenic: role of GST polymorphisms. *J Occup Environ Med* 48: 334-341.
- Marnell LL, García-Vargas GG, Chowdhury UK, Zakharyan RA, Walsh B, Avram MD, Kopplin MJ, Cebrián ME, Silbergeld EK, Aposhian HV (2003). Polymorphisms in the human monomethylarsonic acid (MMA V) reductase/hGSTO1 gene and changes in urinary arsenic profiles. *Chem Res Toxicol* 16: 1507-1513.
- Martínez V, Creus A, Venegas W, Arroyo A, Beck JP, Gebel TW, Surrallés J, 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 JP, Gebel TW, Surrallés J, Marcos R (2005). Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicol Lett* 155: 319-327.
- Mass MJ, Tennant A, Roop BC, Cullen WR, Styblo M, Thomas DJ, Kligerman AD (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, 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.
- McCollum G, Keng PC, States JC, McCabe MJ Jr. (2005). Arsenite delays progression through each cell cycle phase and induces apoptosis following G2/M arrest in U937 myeloid leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 877-887.
- Mead MN (2005). Arsenic: in search of an antidote to a global poison. *Environ Health Perspect* 113: 378-386.
- Mitra SR, Mazumder DN, Basu A, Block G, Haque R, Samanta S, Ghosh N, Smith MM, von Ehrenstein OS, Smith AH (2004). Nutritional factors and susceptibility to arsenic-caused skin lesions in West Bengal, India. *Environ Health Perspect* 112: 1104-1109.
- Moore LE, Warner ML, Smith AH, Kalman D, Smith MT (1996). Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 27: 176-184.
- Moore MM, Harrington-Brock K, Doerr CL (1997). Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat Res* 386: 279-290.
- Morgan A (2001). Exposure and Health effects. Office of Water, Office of Science and Technology. Health and Ecological Criteria Division. United States Environmental Protection Agency. Washington, DC: Chapter 3.
- Mouron SA, Golijow CD, Dulout FN (2001). DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 498: 47-55.
- Mukherjee B, Salavaggione OE, Pelleymounter LL, Moon I, Eckloff BW, Schaid DJ, Wieben ED, Weinshilboun RM (2006). Glutathione S-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos* 34: 1237-1246.
- Natarajan AT, Balajee AS, Boei JJ, Chatterjee S, Darroudi F, Grigorova M, Noditi M, Oh HJ, Slijepcevic P, Vermeulen S (1994a). Recent developments in the assessment of chromosomal damage. *Int J Radiat Biol* 66: 615-623.

- Natarajan AT, Tucker JD, Sasaki MS (1994b). Monitoring cytogenetic damage *in vivo*. En: Methods to Assess DNA Damage and Repair. Interspecies Comparisons. PHM Lohman, RG Tardiff, GN Wogan (Eds). New York, Wiley: 95-117.
- Nebert DW (2006). Drug Metabolism: Evolution. En: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: 1-6.
- Nemeti B, Csanaky I, Gregus Z (2003). Arsenate reduction in human erythrocytes and rats -testing the role of purine nucleoside phosphorylase. *Toxicol Sci* 74: 22-31.
- Nesnow S, Roop BC, Lambert G, Kadiiska M, Mason RP, Cullen WR, Mass MJ (2002). DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol* 15: 1627-1634.
- Nordenson I, Beckman G, Beckman L, Nordstrom S (1978). Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. *Hereditas* 88: 47-50.
- Nordenson I, Beckman L (1991). Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals? *Hum Hered* 41: 71-73.
- Oakley AJ (2005). Glutathione transferases: new functions. *Curr Opin Struct Biol* 15: 716-723.
- Ostrosky-Wegman P, Gonsbatt ME, Montero R, Vega L, Barba H, Espinosa J, Palao A, Cortinas C, Garcia-Vargas G, del Razo LM, Cebrián ME (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat Res* 250: 477-482.
- Painter RB (1980). A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 70: 337-341.
- Palus J, Lewinska D, Dziubaltowska E, Stepnik M, Beck J, Rydzynski K, Nilsson R (2005). DNA damage in leukocytes of workers occupationally exposed to arsenic in copper smelters. *Environ Mol Mutagen* 46: 81-87.

- Perry P, Evans HJ (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258: 121-125.
- Perry P, Wolff S (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-158.
- Petrick JS, Ayala-Fierro F, Cullen WR, Carter DE, Vasken Aposhian H (2000). Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 163: 203-207.
- Petrick JS, Jagadish B, Mash EA, Aposhian HV (2001). Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD(50) in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chem Res Toxicol* 14: 651-656.
- Pi J, Yamauchi H, Kumagai Y, Sun G, Yoshida T, Aikawa H, Hopenhayn-Rich C, Shimojo N (2002). Evidence for induction of oxidative stress caused by chronic exposure of Chinese residents to arsenic contained in drinking water. *Environ Health Perspect* 110: 331-336.
- Ponzanelli I, Landi S, Bernacchi F, Barale R. (1997). The nature of high frequency sister chromatid exchange cells (HFCs). *Mutagenesis*, 12: 329-333.
- Pu YS, Yang SM, Huang YK, Chung CJ, Huang SK, Chiu AW, Yang MH, Chen CJ, Hsueh YM (2007). Urinary arsenic profile affects the risk of urothelial carcinoma even at low arsenic exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 218: 99-106.
- Radabaugh TR, Aposhian HV (2000). Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: reduction of arsenate to arsenite by human liver arsenate reductase. *Chem Res Toxicol* 13: 26-30.
- Radabaugh TR, Sampayo-Reyes A, Zakharyan RA, Aposhian HV (2002). Arsenate reductase II. Purine nucleoside phosphorylase in the presence of dihydrolipoic acid is a route for reduction of arsenate to arsenite in mammalian systems. *Chem Res Toxicol* 15: 692-698.
- Ramírez P, Eastmond DA, Laclette JP, Ostrosky-Wegman P (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of

- aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res* 386: 291-298.
- Ramos-Morales P, Rodríguez-Arnaiz R (1995). Genotoxicity of two arsenic compounds in germ cells and somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 25: 288-299.
- Rasmussen RE, Menzel DB (1997). Variation in arsenic-induced sister chromatid exchange in human lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutat Res* 386: 299-306.
- Rea MA, Gregg JP, Qin Q, Phillips MA, Rice RH (2003). Global alteration of gene expression in human keratinocytes by inorganic arsenic. *Carcinogenesis* 24: 747-756.
- Reidy JA, Annett JL, Chen AT, Welty TK (1988). Increased sister chromatid exchange associated with smoking and coffee consumption. *Environ Mol Mutagen* 12: 311-318.
- Rizki M, Kossatz E, Xamena N, Creus A, Marcos R (2002). Influence of sodium arsenite on the genotoxicity of potassium dichromate and ethyl methanesulfonate: studies with the wing spot test in *Drosophila*. *Environ Mol Mutagen* 39: 49-54.
- Rojas E, Herrera LA, Poirier LA, Ostrosky-Wegman P (1999). Are metals dietary carcinogens? *Mutat Res* 443: 157-181.
- Romach EH, Zhao CQ, Del Razo LM, Cebrian 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: 500-508.
- Rossman TG (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat Res* 533: 37-65.
- Rossman TG, Stone D, Molina M, Troll W (1980). Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli* and Chinese hamster cells. *Environ Mutagen* 2: 371-379.

- Salama SA, Serrana M, Au WW (1999). Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. *Mutat Res* 436: 99-112.
- Schmuck EM, Board PG, Whitbread AK, Tetlow N, Cavanaugh JA, Blackburn AC, Masoumi A (2005). Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Pharmacogenet Genomics* 15: 493-501.
- Scott N, Hatlelid KM, MacKenzie NE, Carter DE (1993). Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem Res Toxicol* 6: 102-106.
- Seoane C, Grillo A, Nilsson R, Darroudi F, Natarajan AT, Dulout FN (1998). Alteraciones cromosómicas y metabolismo de arsénico en poblaciones humanas expuestas en forma crónica en Argentina. En: *Evaluación Mutagénica y Genotóxica*, DGEIC, SEMA. I Burguete, E de la Peña, A Guadaño (Eds). Madrid: 239-248.
- Shelby MD (1988). The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. *Mutat Res* 204: 3-15.
- Shi H, Shi X, Liu KJ (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 255: 67-78.
- Smith AH, Arroyo AP, Mazumder DN, Kosnett MJ, Hernandez AL, Beeris M, Smith MM, Moore LE (2000). Arsenic-induced skin lesions among Atacameño people in Northern Chile despite good nutrition and centuries of exposure. *Environ Health Perspect* 108: 617-620.
- Sram RJ, Binkova B (2000). Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997-1999. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 1: 57-70.
- Stich HF, Stich W, Rosin MP (1985). The micronucleus test on exfoliated human cells. *Basic Life Sci* 34: 337-342.
- Styblo M, Vega L, Germolec DR, LeCluyse EL, Hamilton GA, Reed W, Wang C, Cullen WR, Thomas DJ (1999). Metabolism and toxicity of arsenicals in cultured cells.

- En: Arsenic Exposure and Health Effects. CO Albernathy, WR Chapell, RL Calderón (Eds). San Diego, Elsevier: 311-323.
- Styblo M, Del Razo LM, Vega L, Germolec DR, LeCluyse EL, Hamilton GA, Reed W, Wang C, Cullen WR, Thomas DJ (2000). Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol* 74: 289-299.
- Surrallés J, Carbonell E, Marcos R, Degrassi F, Antoccia A, Tanzarella C (1992). A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 7: 407-410.
- Surrallés J, Xamena N, Creus A, Catalán J, Norppa H, Marcos R (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 341: 169-184.
- Tapio S, Grosche B (2006). Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat Res* 612: 215-246.
- Tchounwou PB, Centeno JA, Patlolla AK (2004). Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis--a health risk assessment and management approach. *Mol Cell Biochem* 255: 47-55.
- Thomas DJ (2007). Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 222:365-373.
- Thomas DJ, Styblo M, Lin S (2001). The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 176: 127-144.
- Tian D, Ma H, Feng Z, Xia Y, Le XC, Ni Z, Allen J, Collins B, Schreinemachers D Mumford JL (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(6): 473-484.
- Tishkoff SA, Pakstis AJ, Ruano G, Kidd KK (2000). The accuracy of statistical methods for estimation of haplotype frequencies: an example from the CD4 locus. *Am J Hum Genet* 67: 518-522.

- Titenko-Holland N, Jacob RA, Shang N, Balaraman A, Smith MT (1998). Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mutat Res* 417: 101-114.
- Townsend DM, Tew KD (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22: 7369-7375.
- Tripathy NK, Wurgler FE, Frei H (1990). Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 242: 169-180.
- Tucker JD, Preston RJ (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res* 365: 147-159.
- Tucker JD, Auletta A, Cimino MC, Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Tice RR, Carrano AV (1993). Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* 297: 101-180.
- Ulriksen PU, Cabello AB (1997). Concentraciones de arsénico en material particulado atmosférico en Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile y Centro de Investigación Minero Metalúrgica - C.I.M.M. Proyecto: Protección de la competitividad de los productos mineros de Chile: antecedentes y criterios para la regulación ambiental del arsénico. FONDEF 2-24. Chile.
- Vahter M (1999a). Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Sci Prog* 82: 69-88.
- Vahter M (1999b). Variation in human metabolism of arsenic. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Albernathy CO, Chapell WR, Calderón RL (Eds). San Diego, Elsevier Science: 267-279.
- Vahter M (2000). Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicol Lett* 112-113: 209-217.
- Vahter M (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181-182: 211-217.

- Vahter M, Concha G (2001). Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacol Toxicol* 89: 1-5.
- Vahter M, Couch R, Nermell B, Nilsson R (1995). Lack of methylation of inorganic arsenic in the chimpanzee. *Toxicol Appl Pharmacol* 133: 262-268.
- Venitt S, Philips DH (1995). The importance of environmental mutagens in humans carcinogenesis and germ line mutation. En: *Environmental Mutagenesis*. S Venitt, DH Philips (Eds). Oxford, Bios Scientific Publishers: 1-20.
- Vig BK, Figueroa ML, Cornforth MN, Jenkins SH (1984). Chromosome studies in human subjects chronically exposed to arsenic in drinking water. *Am J Ind Med* 6: 325-338.
- Vogt BL, Rossman TG (2001). Effects of arsenite on p53, p21 and cyclin D expression in normal human fibroblasts - a possible mechanism for arsenite's comutagenicity. *Mutat Res* 478: 159-168.
- Vuyyuri SB, Ishaq M, Kuppala D, Grover P, Ahuja YR (2006). Evaluation of micronucleus frequencies and DNA damage in glass workers exposed to arsenic. *Environ Mol Mutagen* 47: 562-570.
- Wang TS, Huang H (1994). Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells. *Mutagenesis* 9: 253-257.
- Wang TS, Links JM, Groopman JD (2001). Molecular Epidemiology and biomarkers. En: *Genetic Toxicology and Cancer*. WN Choy (Ed). New Jersey, Marcel Dekker, Inc.: 271-298.
- Whitbread AK, Tetlow N, Eyre HJ, Sutherland GR, Board PG (2003). Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* 13: 131-144.
- Whitbread AK, Mellick GD, Silburn PA, Le Couteur DG, Board PG (2004). Glutathione transferase Omega class polymorphisms in Parkinson disease. *Neurology* 62: 1910-1911.

- WHO (2001). World Health Organization. Arsenic and arsenic compounds. Environmental Health Criteria 22 (second edition). Geneva.
- Wiencke JK, Yager JW (1992). Specificity of arsenite in potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane. *Environ Mol Mutagen* 19: 195-200.
- Wildfang E, Zakharyan RA, Aposhian HV (1998). Enzymatic methylation of arsenic compounds. VI. Characterization of hamster liver arsenite and methylarsonic acid methyltransferase activities in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 152: 366-375.
- Wildfang E, Healy SM, Aposhian HV (2000). Arsenic. En: *Molecular Biology and Toxicology of metals*. J Koropatrick, RK Zalups (Eds). Mercer University of School of Medicine and London Regional Centre: 75-112.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 14: 473-486.
- Wong SS, Tan KC, Goh CL (1998). Cutaneous manifestations of chronic arsenicism: review of seventeen cases. *J Am Acad Dermatol* 38: 179-185.
- Wood TC, Salavagionne OE, Mukherjee B, Wang L, Klumpp AF, Thomae BA, Eckloff BW, Schaid DJ, Wieben ED, Weinshilboum RM (2006). Human arsenic methyltransferase (AS3MT) pharmacogenetics: gene resequencing and functional genomics studies. *J Biol Chem* 281: 7364-7373.
- Xu C, Li CY, Kong AN (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28: 249-268.
- Yager JW, Wiencke JK (1997). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mutat Res* 386: 345-351.
- Yamanaka K, Ohba H, Hasegawa A, Sawamura R, Okada S (1989). Mutagenicity of dimethylated metabolites of inorganic arsenics. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 37: 2753-2756.

- Yamanaka K, Hayashi H, Tachikawa M, Kato K, Hasegawa A, Oku N, Okada S (1997). Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics. *Mutat Res* 394: 95-101.
- Yih LH, Lee TC (1999). Effects of exposure protocols on induction of kinetochore-plus and -minus micronuclei by arsenite in diploid human fibroblasts. *Mutat Res* 440: 75-82.
- Yin ZL, Dahlstrom JE, Le Couteur DG, Board PG (2001). Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. *J Histochem Cytochem* 49: 983-987.
- Yu HS, Liao WT, Chai CY (2006). Arsenic carcinogenesis in the skin. *J Biomed Sci* 13: 657-666.
- Yu L, Kalla K, Guthrie E, Vidrine A, Klimecki WT (2003). Genetic variation in genes associated with arsenic metabolism: glutathione S-transferase omega 1-1 and purine nucleoside phosphorylase polymorphisms in European and indigenous Americans. *Environ Health Perspect* 111: 1421-1427.
- Yu RC, Hsu KH, Chen CJ, Froines JR (2000). Arsenic methylation capacity and skin cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1259-1262.
- Zakharyan RA, Aposhian HV (1999). Arsenite methylation by methylvitamin B12 and glutathione does not require an enzyme. *Toxicol Appl Pharmacol* 154: 287-291.
- Zakharyan R, Wu Y, Bogdan GM, Aposhian HV (1995). Enzymatic methylation of arsenic compounds: assay, partial purification, and properties of arsenite methyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase of rabbit liver. *Chem Res Toxicol* 8: 1029-1038.
- Zakharyan RA, Ayala-Fierro F, Cullen WR, Carter DM, Aposhian HV (1999). Enzymatic methylation of arsenic compounds. VII. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit liver and human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 158: 9-15.

Zakharyan RA, Sampayo-Reyes A, Healy SM, Tsaprailis G, Board PG, Liebler DC, Aposhian HV (2001). Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem Res Toxicol* 14: 1051-1057.

Zalacaín M, Sierrasesúmaga L, Patiño A (2005). The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *An Sist Sanit Navar* 28: 227-36.

Zheng XH, Watts GS, Vaught S, Gandolfi AJ (2003). Low-level arsenite induced gene expression in HEK293 cells. *Toxicology* 187: 39-48.

Zhong SL, Zhou SF, Chen X, Chan SY, Chan E, Ng KY, Duan W, Huang M (2006). Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. *Eur J Pharm Sci* 28: 77-85.

**ANEXO 1: Encuesta**

## HOJA DE CONSENTIMIENTO DEL DONANTE

Este cuestionario se realiza para facilitar la selección de muestras en la investigación del eventual efecto genotóxico del arsénico en poblaciones humanas bajo condiciones ambientales de exposición. Las muestras biológicas serán analizadas mediante distintas técnicas para evaluar posibles cambios a escala celular originados por la exposición.

Este cuestionario está clasificado como confidencial y las muestras obtenidas serán utilizadas exclusivamente para este estudio.

**1. DATOS PERSONALES**

Nombre.....  
 Apellidos..... Sexo: Varón ( )      Mujer ( )  
 Fecha de nacimiento..... Edad (.....)  
 Lugar de nacimiento..... C.I.....  
 Dirección.....  
 Población.....Teléfono.....

**2. A RELLENAR POR EL INVESTIGADOR**

Muestra recogida por.....  
 Fecha..... Hora.....  
 Sangre heparinizada.....mL (aprox.)  
 Sangre EDTA.....mL (aprox.)  
 Orina.....mL (aprox.)  
 Células mucosa bucal.....mL (aprox.)  
 Código del donante..... Expuesto       Control

Firma del donante

Firma del investigador

<b>1. EXPOSICIÓN LABORAL</b>			
<b>1.1. OCUPACIÓN ACTUAL</b>			
1.1.1. ¿Trabaja ahora?	Si	1	<input type="checkbox"/>
	No	2	
1.1.2. ¿En qué? (empresa)	----- -----		<input type="checkbox"/>
1.1.3. ¿Hace cuantos años?	-----		<input type="checkbox"/>
1.1.4. Donde trabaja, considera que hay algún tipo de contaminación como:		Tiempo/años	
Sin contaminación	0 0	-----	
Ruido	0 1	-----	
Disolventes u otros prod. químicos	0 2	-----	
Metales	0 3	-----	
Pinturas	0 4	-----	
Tintes	0 5	-----	
Asbesto	0 6	-----	
Radiaciones (Ravos X. etc.)	0 7	-----	
Polvo (.....)	0 8	-----	
Pesticidas	0 9	-----	
Derivados del carbón	1 0	-----	
Derivados del petróleo	1 1	-----	
Otros (.....)	1 2	-----	
NS/NC	1 3	-----	<input type="checkbox"/>
<b>1.2. OCUPACIÓN PREVIA</b>			
1.2.1. ¿Ha realizado algún otro trabajo antes?	Si	1	<input type="checkbox"/>
	No	2	
1.2.2. ¿En qué? (empresa)	-----		<input type="checkbox"/>
	Fecha		
Alguno de los anteriores suponía exposición a:		Tiempo/años	
Sin exposición	0 0	-----	
Ruido	0 1	-----	
Disolventes u otros prod. químicos	0 2	-----	
Metales	0 3	-----	
Pinturas	0 4	-----	
Tintes	0 5	-----	
Asbesto	0 6	-----	
Radiaciones (Ravos X. etc.)	0 7	-----	
Polvo (.....)	0 8	-----	
Pesticidas	0 9	-----	
Derivados del carbón	1 0	-----	
Derivados del petróleo	1 1	-----	
Otros (.....)	1 2	-----	
NS/NC	1 3	-----	<input type="checkbox"/>

2. TIEMPO LIBRE															
<p>En su tiempo libre ¿realiza alguna de las siguientes actividades?</p> <table> <tr> <td>Jardinería u horticultura</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Bricolaje</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Carpintería</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Mecánica de automóviles/motos</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Maquetas y modelismo</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Otros (.....)</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Ninguna</td> <td>0</td> </tr> </table> <p><i>En caso de respuesta afirmativa, dar detalles de posible exposición a disolventes, pinturas, colas otras sustancias tóxicas</i></p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	Jardinería u horticultura	1	Bricolaje	2	Carpintería	3	Mecánica de automóviles/motos	4	Maquetas y modelismo	5	Otros (.....)	6	Ninguna	0	<input type="checkbox"/>
Jardinería u horticultura	1														
Bricolaje	2														
Carpintería	3														
Mecánica de automóviles/motos	4														
Maquetas y modelismo	5														
Otros (.....)	6														
Ninguna	0														

3. DIETA	
<p>¿Cuántas veces a la semana suele comer pescado y/o marisco?</p> <p>Número de veces a la semana .....</p>	<input type="checkbox"/>
<p>¿Cuándo fue la última vez que comió pescado y/o marisco?</p> <p>Hace ..... días</p>	<input type="checkbox"/>
<p>¿Cuántas veces en la última semana?</p> <p>Número de veces en la última semana .....</p>	<input type="checkbox"/>



**5. HISTORIA MÉDICA****5.1. ANTECEDENTES FAMILIARES**

¿Existe algún miembro de su familia que presente o haya cáncer? Indicar el tipo de cáncer y parentesco

.....  
 .....  
 .....

**5.2. ANTECEDENTES PERSONALES**

5.2.1. ¿Tiene o ha tenido algún problema de salud relacionado con:  
 Tiempo/años

	No	<input type="text" value="0"/>	.....
Corazón, arterias, venas (circulatorios)		<input type="text" value="1"/>	.....
Riñón (renales)		<input type="text" value="2"/>	.....
Pulmón (respiratorios)		<input type="text" value="3"/>	.....
Nervios, cerebral (neurológicos)		<input type="text" value="4"/>	.....
Digestivos		<input type="text" value="5"/>	.....
Piel (dérmicos)		<input type="text" value="6"/>	.....
Infecciosos (hepatitis, mononucleosis, SIDA)		<input type="text" value="7"/>	.....
Cáncer		<input type="text" value="8"/>	.....
NS/NC		<input type="text" value="9"/>	.....

Especificar enfermedades y edad de padecimiento

.....  
 .....

5.2.2. ¿Toma algún tipo de medicamento habitualmente?  
 Tiempo/años

	No	<input type="text" value="00"/>	.....
Insulina/Tratam. diabetis		<input type="text" value="01"/>	.....
Antibióticos		<input type="text" value="02"/>	.....
Tranquilizantes y psicofármacos		<input type="text" value="03"/>	.....
Diuréticos		<input type="text" value="04"/>	.....
Antiácidos		<input type="text" value="05"/>	.....
Antihistamínicos		<input type="text" value="06"/>	.....
Vitaminas y minerales		<input type="text" value="07"/>	.....
Analgésicos, antipiréticos		<input type="text" value="08"/>	.....
Anticonceptivos/hormonas		<input type="text" value="09"/>	.....
Otros(.....)		<input type="text" value="10"/>	.....
NS/NC		<input type="text" value="11"/>	.....

5.2.3. ¿Se ha sometido alguna vez a terapia de rayos X (incluso en la niñez) ?

No   
 Sí   
 NS/NC

5.2.4. ¿Ha recibido alguna transfusión de sangre en el último año?

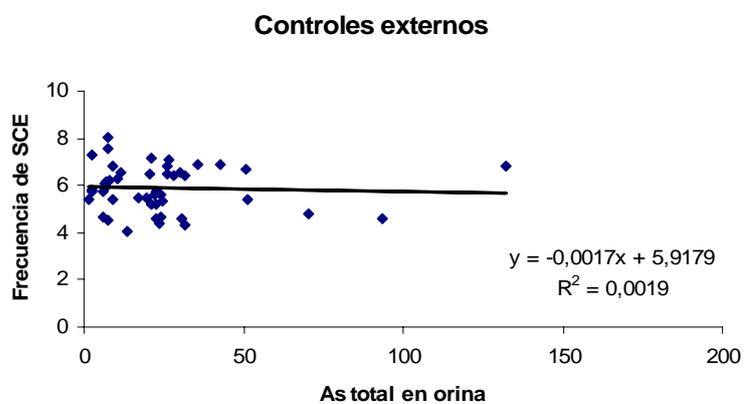
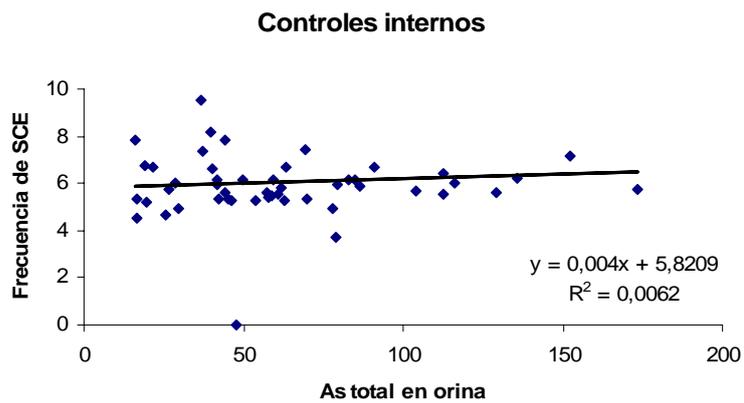
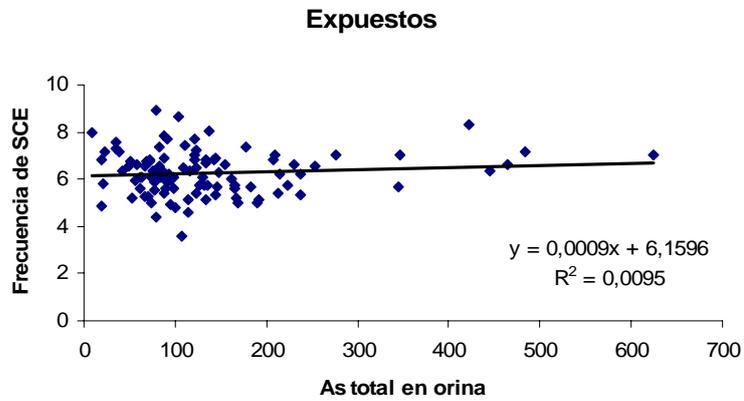
No   
 Sí   
 NS/NC



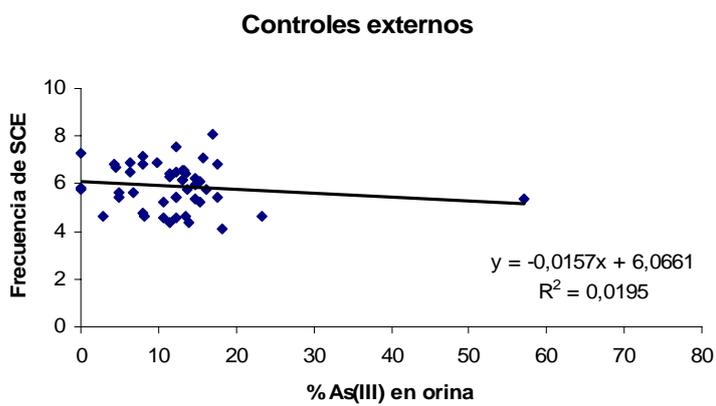
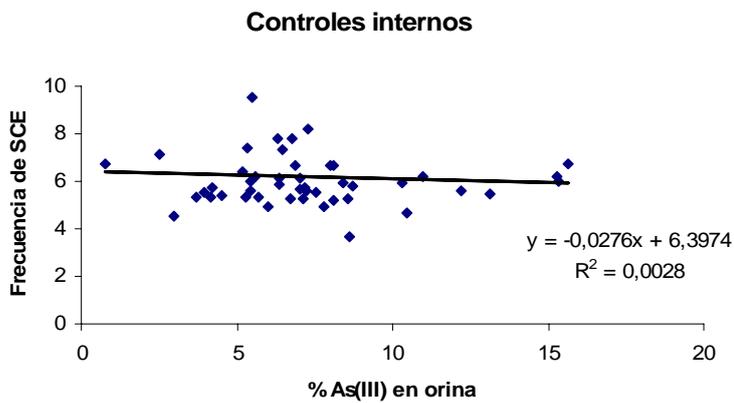
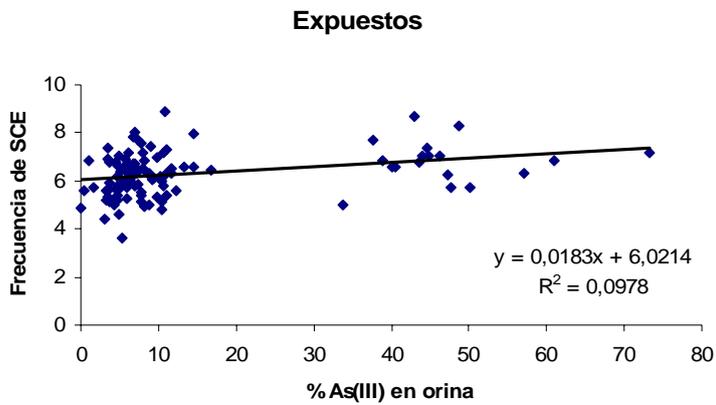


**ANEXO 2: Correlaciones entre la frecuencia de SCE y arsénico en orina**

## 2.1 Asociación entre arsénico total en orina y la frecuencia de SCE



2.2 Asociación entre porcentaje de As<sup>III</sup> en orina y la frecuencia de SCE



## Research Articles

### Sister Chromatid Exchange Analysis in Smelting Plant Workers Exposed to Arsenic

Leiliane Paiva,<sup>1</sup> Valeria Martínez,<sup>1</sup> Amadeu Creus,<sup>1</sup> Domingo Quinteros,<sup>2</sup>  
and Ricardo Marcos<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento de Salud Ocupacional, División Codelco Norte, Corporación del Cobre de Chile, Chile

There are many studies documenting the genotoxic effects of environmental exposure to arsenic. Nevertheless, few data are available on the genotoxic risks of occupational arsenic exposure. In the present study, we have evaluated whether or not occupational exposure to arsenic in a copper smelting plant results in a significant increase in the frequency of sister chromatid exchange (SCE). SCE frequencies, proliferation rate index (PRI), and high frequency cells (HFCs) were evaluated in peripheral blood lymphocytes from a group of 105 arsenic-exposed workers from a Chilean smelting plant (exposed group). Similar assays were conducted on a group of 55 workers employed at the same mine but involved in administrative jobs (internal control), and on 48 workers of another mine, with no significant levels of arsenic (external

control). Small but significant increases in SCE frequency were observed in the arsenic-exposed workers compared with the external control group ( $6.28 \pm 0.09$  vs.  $5.84 \pm 0.14$  SCE/cell;  $P < 0.01$ ). Also, significantly higher frequencies of HFCs were observed in the exposed group ( $2.21\% \pm 0.20\%$ ) than in either the external control group ( $1.20 \pm 0.23$ ;  $P = 0.002$ ) or the internal control group ( $1.30 \pm 0.24$ ;  $P = 0.008$ ). However, there was no relationship between arsenic levels in the urine of the subjects and SCE or HFC frequency. The results of the study indicate that copper smelting results in slightly increased levels of DNA damage. However, our data were not consistent with arsenic exposure being the cause of the increase. Environ. Mol. Mutagen. 47:230–235, 2006.

© 2006 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** biomonitoring; sister chromatid exchanges; human lymphocytes; arsenic exposure

#### INTRODUCTION

The genotoxicity of arsenic has attracted the attention of many researchers. Despite the fact that arsenic has been classified as a human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer [IARC, 1987, 2004], the mechanisms by which arsenic exerts its genotoxicity and causes cancer remain unclear. The importance of understanding the genotoxic and carcinogenic potential of arsenic lies in the fact that this compound naturally occurs in the drinking water of millions of people, and thus represents a serious health concern in different areas around the world. In addition, people are occupationally exposed to arsenic, especially during the activities involved in copper mining and smelting.

Many studies have evaluated the genotoxic potential of arsenic compounds [reviewed by [Basu et al., 2001], but no general agreement has been reached as to the mechanisms responsible for their genotoxicity. Although arsenic is gener-

ally not mutagenic in bacterial assays, and there have been contradictory reports on its ability to induce gene mutation in mammalian cells, results obtained using cytogenetic markers indicate that arsenic is a relatively potent clastogen.

Grant sponsor: Corporación del Cobre de Chile (CODELCO); Grant sponsor: Generalitat and the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport; Grant sponsor: Generalitat, Government of Catalonia; Grant number: 2002SGR-00197.

\*Correspondence to: Ricardo Marcos, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Mutagènesi, Edifici Cn, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain. E-mail: ricard.marcos@uab.es

Received 19 October 2005; provisionally accepted 25 October 2005; and in final form 4 November 2005

DOI 10.1002/em.20192

Published online 4 January 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Several biomonitoring studies have been carried out in human populations exposed to arsenic in drinking-water [Basu et al., 2001]. In most of these studies, genotoxicity was measured using cytogenetic endpoints in peripheral blood lymphocytes. In general, cytogenetic endpoints have been regarded as valuable tools for evaluating the possible genotoxic risks in exposed human populations. In this context, chromosome aberration (CA) has been established as a relevant biomarker for cancer risk [Hagmar et al., 1994].

In general, studies evaluating CA have detected increases associated with arsenic exposure [Gonsebatt et al., 1997; Maki-Paakkanen et al., 1998; Liou et al., 1999]. Similarly, most studies using micronuclei (MN) as a biomarker for assessing the genotoxic risk associated with arsenic exposure in drinking-water have reported positive results [Nilsson et al., 1993; Dulout et al., 1996; Basu et al., 2002; Martínez et al., 2004].

Very few biomonitoring studies have employed sister chromatid exchange (SCE) for monitoring the genotoxic effects of arsenic in groundwater, and the results of the studies that have been performed have been inconclusive. For instance, Lerda [1994] reported a significant positive relationship between SCE frequency and the arsenic levels in ingested water, and significant increases in SCE frequency were observed for Taiwanese cancer patients with blackfoot [Hsu et al., 1997]. Nevertheless, studies carried out in the U.S. [Vig et al., 1984], Mexico [Ostrosky-Wegman et al., 1991], and Argentina [Dulout et al., 1996] were unable to show significant increases in SCE as a result of arsenic exposure.

As indicated earlier, many of the studies on the genotoxic effects of environmental exposure to arsenic were conducted on populations exposed via drinking-water; very few have been conducted using occupational exposure. Increases in CA frequency were observed among smelter workers in Sweden [Beckman et al., 1977], and significant increases in both CA and MN frequencies were found among smelter workers in China [Hu, 1989]. A recent study using the Comet assay reported an increased level of DNA damage in leukocytes of workers occupationally exposed to arsenic in copper smelters [Palus et al., 2005]. In contrast, negative results were obtained in a pilot study of 15 workers from a copper smelter using *HPRT* gene mutation as a biomarker of effect [Harrington-Brock et al., 1999]. Because of this scarcity of information on the possible genotoxic consequences associated with arsenic exposure under occupational conditions, we have undertaken a study of SCE induction as a measure of genotoxic risk in a population of Chilean copper smelter workers.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Subjects

The study was approved by our University Ethics Committee. The purposes of the study were explained to potential study participants, and all the study subjects gave their informed consent. The study was con-

ducted in a total of 206 subjects working in copper mining facilities in Chile. Of these individuals, 105 were employed in a smelting plant (exposed group) and 53 worked in the same mining operation but in administrative tasks (internal control). An additional 48 subjects worked in another mine where no significant levels of arsenic were detected in the ground (external control).

Blood samples were collected from the subjects and further manipulated in accordance with ethical standards. All participants completed a questionnaire, covering standard demographic questions, a brief occupational history, and providing information on seafood consumption, and the subject's medical and family history. This questionnaire was similar to the one published by the International Commission for the Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens [Carrano and Natarajan, 1988].

### Lymphocyte Culture and SCE Analysis

Blood samples were obtained from each subject by venipuncture using heparinized vacutainers, and sent directly to the laboratory. Lymphocyte cultures were initiated by adding 0.5 mL of whole blood to 4.5 mL of RPMI 1640 medium supplemented with 15% heat-inactivated fetal calf serum, 1% antibiotics (penicillin and streptomycin), and 1% L-glutamine (all provided by Gibco Life Technologies, Paisley, UK). The lymphocytes were stimulated by 1% phytohemagglutinin (Gibco); in addition, 5-bromodeoxyuridine (BrdU) was added to the cultures at a final concentration of 8  $\mu\text{g/mL}$ .

The cultures were incubated at 37°C for 72 hr in the dark to avoid photolysis, and 2 hr prior to harvesting, 0.1  $\mu\text{g/mL}$  of Colcemid® was added. The cells were collected by centrifugation, resuspended in a pre-warmed hypotonic solution (0.075 M KCl) for 20 min, and fixed in methanol/acetic acid (3:1, v/v). Two or more air-dried slide preparations were made for each sample, and the slides were coded and stained by the fluorescence plus Giemsa procedure [Perry and Wolf, 1974]. A total of 100 metaphases were examined to determine the proportion of cells that had undergone one, two, or more divisions; these data were used to calculate the proliferation rate index (PRI) [Lamberti et al., 1983]. We purchased Giemsa from Merck (Darmstadt, Germany), BrdU, and Hoechst 33258 dye from Eastman Kodak (Rochester, NY); all other chemicals were obtained from Gibco Life Technologies.

SCE frequency for each donor was determined by examining a total of 50 well-spread metaphases (25/replicate slide) containing  $46 \pm 1$  chromosomes. The percentage of high frequency cells (HFCs) for each individual also was estimated from the pooled distribution of all SCE measurements. We defined HFCs as those cells that displayed SCE values above the 95th percentile of the SCE/cell distribution for the population.

### Statistical Methods

SCE and HFC distributions departed significantly from normality (Kolmogorov-Smirnov test of goodness of fit,  $P > 0.05$ ). In the case of SCE, we applied square-root transformation to ensure that the assumptions underlying the use of parametric statistical tests were met. Comparisons of SCE and PRI frequencies between groups were performed using Student's *t*-test, while the nonparametric Mann-Whitney test was used for comparisons involving HFCs. A multiple regression analysis was carried out to evaluate the possible effects of the confounding factors considered in this study on the SCE and PRI variables. In addition, differences between groups for the frequency of smokers and relatives with cancer were evaluated by the chi-square test. Statistical computations were performed using SPSS, version 11.5 (SPSS, Chicago, IL), run on a Pentium PC. For all analyses, differences were regarded as statistically significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Characteristics of the exposed group and the two control groups are shown in Table I. Potential confounding

TABLE I. Population Description

	Exposed	Internal control	External control
No. of subjects	105	53	48
Arsenic in urine $\pm$ SE ( $\mu\text{g/L}$ )	136.01 $\pm$ 10.18 <sup>*1,4</sup>	64.60 $\pm$ 5.05 <sup>*4,5</sup>	21.34 $\pm$ 2.64
Age $\pm$ SE	46.20 $\pm$ 0.60 <sup>*1,4</sup>	51.79 $\pm$ 0.90 <sup>*4</sup>	40.71 $\pm$ 1.35
Alcohol $\pm$ SE (g/week)	72.91 $\pm$ 7.86 <sup>*1,1</sup>	49.64 $\pm$ 7.44	44.19 $\pm$ 6.25
No. smokers	50 (47.6%) <sup>***4</sup>	7 (13.2%) <sup>†1,4</sup>	22 (45.8%)
No. cigarettes/day $\pm$ SE	5.90 $\pm$ 0.64	3.14 $\pm$ 0.99	7.36 $\pm$ 1.47
Cups of tea/day $\pm$ SE	1.96 $\pm$ 0.12	2.15 $\pm$ 0.28	1.79 $\pm$ 0.22
Cups of coffee/day $\pm$ SE	0.60 $\pm$ 0.14 <sup>*4</sup>	0.49 $\pm$ 0.11 <sup>†4</sup>	1.12 $\pm$ 0.22
Relatives with cancer	39 (37.1%)	20 (37.7%)	27 (56.3%)

Mann-Whitney test: arsenic in urine, alcohol, cigarettes, tea, and coffee; *t*-test: age;  $\chi^2$ : number of smokers and relatives with cancer.

\* $P < 0.001$ .

<sup>1</sup>Internal control.

<sup>4</sup>External control.

<sup>5</sup>Exposed.

<sup>†</sup> $P < 0.01$ .

\*\* $P < 0.05$ .

factors for the SCE measurements also are indicated. Some of these potentially confounding factors were different in the exposed group and at least one of the controls. For example, the mean age of the exposed workers was lower than the internal controls, but it was higher than the external controls ( $P < 0.001$ ). There also were differences in alcohol (ethanol) consumption: the exposed group consumed more g/week of ethanol than either of the control groups ( $P < 0.05$ ). Concerning smoking habits, the exposed group had more smokers than the internal control ( $P < 0.01$ ), but the number of cigarettes smoked per day in the three groups was similar. Very little tea and coffee was consumed by the three groups and the differences were of questionable relevance. Table I also gives the percentage of individuals who reported cancer among close relatives. No differences were observed between the exposed group and the internal control; there was a higher incidence of relatives with cancer in the external control than the exposed group, but the difference did not attain statistical significance. When the effects of the different factors were evaluated, only exposure and coffee and tea consumption appeared to affect the SCE frequency.

Urinary arsenic concentration is a well-validated indicator of exposure [Gebel et al., 1998; Walker and Griffin, 1998]. The urinary arsenic levels of the three groups included in this investigation were previously measured by us [Marcos et al., in press], and these measurements are included in Table I. The average total arsenic in the urine of workers from the exposed group, the internal control, and the external control was 136.01, 64.60, and 21.34  $\mu\text{g/L}$ , respectively. As reference values for the general population are usually less than 35  $\mu\text{g/mL}$  [ACGIH, 2000], these data indicate an elevated arsenic exposure for the exposed group of workers at the copper smelting plant, as well as a lesser exposure for workers from the internal control group who presumably work in areas with lower levels of arsenic contamination.

TABLE II. Genetic Damage Observed in the Study Groups

	Exposed	Internal control	External control
SCE/cell	6.28 $\pm$ 0.09 <sup>*1</sup>	6.21 $\pm$ 0.23	5.84 $\pm$ 0.14
% HFC	2.21 $\pm$ 0.20 <sup>*1,4</sup>	1.30 $\pm$ 0.24	1.20 $\pm$ 0.23
PRI	1.97 $\pm$ 0.02	1.92 $\pm$ 0.03 <sup>*1</sup>	2.05 $\pm$ 0.03

Data presented as mean  $\pm$  SE; statistical analyses: SCE and PRI, *t*-test; HFC, Mann-Whitney test.

\* $P < 0.01$ .

<sup>1</sup>External control.

<sup>4</sup>Internal control.

SCE frequencies for the study groups are given in Table II. Although the difference in SCE observed between the arsenic-exposed workers and the external control group was small (6.28  $\pm$  0.09 vs. 5.84  $\pm$  0.14 SCE/cell), it was statistically significant ( $P < 0.01$ ). When the proportion of HFCs was considered, significant differences were observed between the exposed group (2.21%  $\pm$  0.20%) and both the external (1.20  $\pm$  0.23;  $P = 0.002$ ) and internal (1.30  $\pm$  0.24;  $P = 0.008$ ) control groups.

The PRI is a measure of the cytotoxicity associated with exposure [Lamberti et al., 1983]. The PRI was highest in the external control, but it was not affected significantly by arsenic exposure (Table II).

In spite of the low but significant increase observed in the genotoxic effect (SCE and HFC) in the exposed group, no significant associations were observed between the concentration of arsenic in urine and genotoxicity (SCE) for any of the three groups analyzed, as graphically depicted in Figure 1. Similar analysis conducted with HFC frequencies indicated that there was no significant association between urinary arsenic concentration and HFC frequency for any of the study groups (data not shown).

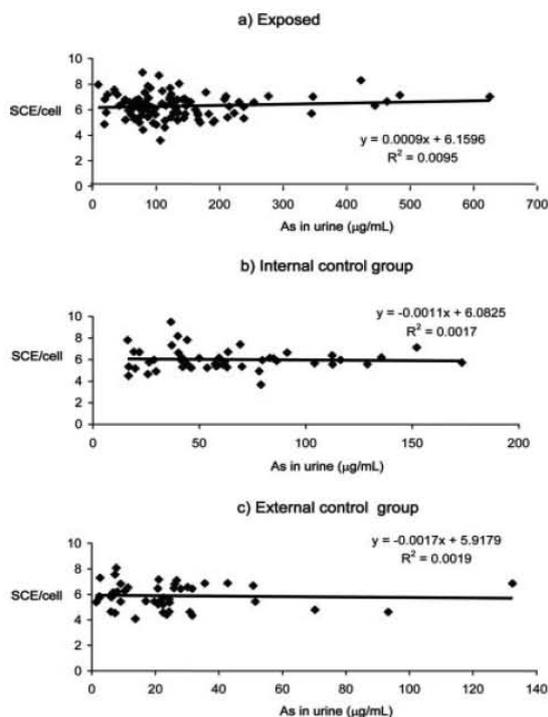


Fig. 1. Correlations between concentration of arsenic in urine and frequency of SCE for (a) exposed population; (b) internal control; and (c) external control.

## DISCUSSION

Although the most common symptoms related to arsenic exposure are skin lesions, melanosis, conjunctivitis, keratosis, and hyperkeratosis, other more extreme health effects, including cancer, also have been reported after chronic exposure [Abemathy et al., 1999; Hall, 2002].

Increased frequencies of CAs and MN have been found in biomonitoring studies of human populations exposed to arsenic (see the review of Basu et al., [2001]). Thus, these data indicate that arsenic is a human clastogen and aneugen. Environmental arsenic is usually found in its inorganic form. When ingested, inorganic arsenic is metabolized to monomethylarsonous acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA), and these methylated species can be detected in the urine of exposed individuals [Apostoli et al., 1999]. Although biomethylation of arsenic long was considered as the major detoxification pathway [Vahter and Concha, 2001], observations indicating that methylated trivalent arsenic metabolites are more toxic and genotoxic than the inorganic trivalent arsenic species

have made this interpretation of arsenic metabolism questionable [Styblo et al., 2002]. This is important for in vitro studies of arsenic since the genotoxicity reported depends upon which of the arsenic species are tested.

In previous studies, treatment of *Vicia faba* with well water samples from different Mexican sites containing high levels of arsenic induced significant, dose-related increases in SCE frequency [Gómez-Arroyo et al., 1997]. Only trivalent methylated arsenic compounds were able to induce significant increases in SCE frequency in Chinese hamster ovary cells, with inorganic arsenic inducing only marginal increases [Dopp et al., 2004]. DMA significantly increased SCE frequencies in a human fibroblast cell line, but the increases for DMA were relatively small [Mourón et al., 2005].

Arsenic treatment of primary human lymphocytes from different donors produced variable SCE frequencies, ranging from no response to a threefold increase in the frequency of SCE [Rasmussen and Menzel, 1997], suggesting that the genotoxicity of arsenic is genetically controlled. In addition, SCE assays performed on lymphocytes from four patients who ingested arsenic oxide, detected significantly elevated SCE frequency only after exposure to a high dose (20 g) of the drug [Hantson et al., 1996]. Thus, the available evidence indicates that arsenic is a relatively weak inducer of SCE, and the in vitro data suggest that positive responses may be limited to the methylated trivalent arsenic species. These data for SCE are consistent with previous findings for biomonitoring studies of arsenic-exposed populations, where both positive [Lerda, 1994; Hsu et al., 1997; Mahata et al., 2003] and negative [Vig et al., 1984; Dulout et al., 1996] SCE responses were found. One of the limitations in using SCE to monitor human populations is that, unlike CA and MN, SCE are only induced in vitro, after the addition of BrdU to the cultures. Thus, SCE are not a measure of cumulative DNA damage, and only measure the portion of damage present at the time of cell culture.

In our study, we found small increases in the SCE frequency in the smelting plant workers, although no positive correlations with exposure level, as measured by the total content of arsenic in urine, were found. A lack of correlation between cytogenetic effects and total arsenic species in urine have also been reported in other human biomonitoring studies [Palus et al., 2005]. The weak induction of SCE obtained in the present work is in agreement with results reported in other biomonitoring studies and is consistent with arsenic being a relatively weak SCE inducer. There was also a small increase in the frequency of HFCs in the exposed group. HFCs have been proposed as a good indicator of genetic damage under conditions where there are high levels of exposure [Hantson et al., 1996] or chronic exposure [Carrano and Moore, 1982]. As with SCE, there was no association between urinary arsenic concentration and HFC frequency, making

it unlikely that the increase seen in workers was due solely to arsenic exposure.

The slightly lower mean PRI of exposed workers and the internal control compared to that of the external control suggests an effect of exposure at the smelting plant site on the proliferative activity of lymphocytes. In spite of the significant difference between the internal and external controls, we consider these differences to be of marginal biological relevance.

In summary, and in spite of the significant difference in SCE and HFCs frequency between the smelter workers and the controls, the lack of correlation between the cytogenetic parameters and arsenic in urine, together with the fact that arsenic is a poor inducer of SCE, suggests that the minor increases observed in the smelter group are not the consequence of exposure to arsenic by itself. Other factors present at working place may account for the differences observed in SCE.

## REFERENCES

- ACGIH 2000. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
- Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C, Waalkes M. 1999. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ Health Perspect* 107:593–597.
- Apostoli P, Bartoli D, Alessio L, Buchet JP. 1999. Biological monitoring of occupational exposure to inorganic arsenic. *Occup Environ Med* 56:825–832.
- Basu A, Mahata J, Gupta S, Giri AK. 2001. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat Res* 488: 171–194.
- Basu A, Mahata J, Roy AK, Sarkar JN, Poddar G, Nandy AK, Sarkar PK, Dutta PK, Banerjee A, Das M, Ray K, Roychaudhury S, Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK. 2002. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat Res* 516:29–40.
- Beckman G, Beckman L, Nordenson I. 1977. Chromosome aberrations in workers exposed to arsenic. *Environ Health Perspect* 19:145–146.
- Carrano AV, Moore II DH. 1982. The rationale and methodology for quantifying sister-chromatid exchange in humans. In: Heddle JA, editor. *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*. New York: Academic Press, pp 267–304.
- Carrano AV, Natarajan AT. 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens*. ICPEMC publication no 14. *Mutat Res* 204:379–406.
- Dopp E, Hartman LM, Florea AM, von Recklinghausen U, Pieper R, Shokouhi B, Rettenmeier AW, Hirner AV, Obe G. 2004. Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 201:156–165.
- Dulout FN, Grillo CA, Seoane AI, Maderna CR, Nilsson R, Vahter M, Darroudi F, Natarajan AT. 1996. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. *Mutat Res* 370:51–158.
- Gebel TW, Suchenwirth RHR, Bolten C, Dunkelberg HH. 1998. Human biomonitoring of arsenic and antimony in case of an elevated geogenic exposure. *Environ Health Perspect* 106:33–39.
- Gómez-Arroyo S, Armienta MA, Cortés-Eslava J, Villalobos-Pietrini R. 1997. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutat Res* 394:1–7.
- Gonsebatt ME, Vega L, Salazar AM, Montero R, Guzmán P, Blas J, del Razo LM, García-Vargas G, Albores A, Cebrián ME, et al. 1997. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat Res* 386: 219–228.
- Hagmar L, Brøgger A, Hansteen IL, Heim S, Högstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I, et al. 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res* 54:2919–2922.
- Hall AH. 2002. Chronic arsenic poisoning. *Toxicol Lett* 128:69–72.
- Hantson P, Verellen-Dumoulin C, Libouton JM, Leonard A, Leonard ED, Mahieu P. 1996. Sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes after ingestion of high doses of arsenicals. *Int Arch Occup Environ Health* 68:342–344.
- Harrington-Brock K, Cabrera M, Collard DD, Doerr CL, McConnell R, Moore MM, Sandoval H, Fuscoe JC. 1999. Effects of arsenic exposure on the frequency of HPRT-mutant lymphocytes in a population of copper roasters in Antofagasta, Chile: a pilot study. *Mutat Res* 431:247–257.
- Hsu YH, Li SH, Chiou HY, Yeh PM, Liou JC, Hsueh YM, Chang SH, Chen CJ. 1997. Spontaneous and induced sister chromatid exchanges and delayed cell proliferation in peripheral lymphocytes of Bowen's disease patients and matched controls of arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Mutat Res* 386:241–251.
- Hu GG. 1989. Investigation of protective effects of selenium on genetic material among workers exposed to arsenic. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 23:286–288 (in Chinese).
- International Agency for Research on Cancer. 1987. Arsenic and arsenic compounds. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon, France: IARC. Suppl. 7.
- International Agency for Research on Cancer. 2004. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, including Arsenic. Lyon, France: IARC. Vol. 84.
- Lamberti L, Bigatti Ponzetto P, Ardito G. 1983. Cell kinetics and sister-chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat Res* 120:193–199.
- Lerda D. 1994. Sister-chromatid exchange (SCE) among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Mutat Res* 312: 111–120.
- Liou SH, Lung JC, Chen YH, Yang T, Hsieh LL, Chen CJ, Wu TN. 1999. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Res* 59:1481–1484.
- Mahata J, Basu A, Ghoshal S, Sarkar JN, Roy AK, Poddar G, Nandy AK, Banerjee A, Ray K, Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK. 2003. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat Res* 534:133–143.
- Maki-Paakkainen J, Kurtio P, Paldy A, Pekkanen J. 1998. Association between the clastogenic effect in peripheral lymphocytes and human exposure to arsenic through drinking water. *Environ Mol Mutagen* 32:301–313.
- Marcos R, Martínez V, Hernández A, Creus A, Sekaran C, Tokunaga H, Quinteros D. In press. Metabolic profile in workers occupationally exposed to arsenic. Role of *GST* polymorphisms. *J Occupat Environ Med*.
- Martínez V, Creus A, Venegas W, Arroyo A, Beck JP, Gebel TW, Surrallés J, Marcos R. 2004. Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic. *Mutat Res* 564:65–74.

- Mourón SA, Grillo CA, Dulout FN, Golijow CD. 2005. DNA-protein cross-links and sister chromatid exchanges induced by dimethylarsinic acid in human fibroblast cells. *Mutat Res* 581:83–90.
- Nilsson R, Jha AN, Zaprianov Z, Natarajan AT. 1993. Chromosomal aberrations in humans exposed to arsenic in the Srednogie area, Bulgaria. *Fresenius Environ Bull* 2:59–64.
- Ostrosky-Wegman P, Gonsebatt ME, Montero R, Vega L, Barba H, Espinosa J, Palao A, Cortinas C, García-Vargas G, del Razo LM, et al. 1991. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat Res* 250:477–482.
- Palus J, Lewinska D, Dziubaltowska E, Stepnik M, Beck J, Rydzynski K, Nilsson R. 2005. DNA damage in leukocytes of workers occupationally exposed to arsenic in copper smelters. *Environ Mol Mutagen* 46:81–87.
- Perry P, Wolf S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251:156–158.
- Rasmussen RE, Menzel DB. 1997. Variation in arsenic-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutat Res* 386:299–306.
- Styblo M, Drobna Z, Jaspers I, Lin S, Thomas DJ. 2002. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic. A research update. *Environ Health Perspect* 110(suppl 5):767–771.
- Vahter M, Concha G. 2001. Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacol Toxicol* 89:1–5.
- Vig BK, Figueroa ML, Cornforth MN, Jenkins SH. 1984. Chromosome studies in human subjects chronically exposed to arsenic in drinking water. *Am J Ind Med* 6:325–338.
- Walker S, Griffin S. 1998. Site-specific data confirm arsenic exposure predicted by the U.S. Environmental Protection Agency. *Environ Health Perspect* 106:133–139.

Accepted by —  
R. J. Preston

**Evaluation of micronucleus frequencies in blood lymphocytes and buccal cells from smelting plant workers exposed to arsenic**

**Leiliane Paiva<sup>1</sup>, Valeria Martínez<sup>1</sup>, Amadeu Creus<sup>1</sup>, Domingo Quinteros<sup>2</sup> and Ricardo Marcos<sup>1,3\*</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> *Departamento de Salud Ocupacional, División Codelco Norte, Corporación del Cobre de Chile, Chile*

<sup>3</sup> *CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Spain*

\*Correspondence to: Ricardo Marcos, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Mutagènesi, Edifici Cn, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain.

E-mail: [ricard.marcos@uab.es](mailto:ricard.marcos@uab.es)

## **Abstract**

Arsenic is a world health problem due to the seriousness of its effects, mainly related with the increase of cancer. In Chile, the geological characteristics of the northern region, associated with the development of the copper mining and smelting activities, have contributed to increase the environmental levels of arsenic. This study has been conducted to investigate the relationship between arsenic occupational exposure and genotoxic effects in smelting plant workers. To determine the genotoxic risk related to the increase of cancer among the chronically exposed population, the frequency of micronuclei in blood (BNMN) and in buccal cells (BCMn) has been evaluated.

The study was carried out in a total of 206 men, divided into 3 groups: an exposed group of 105 individuals working in a smelting plant; an internal control group with 53 employees at the same mine, but in the administrative area; and an external control group of 48 workers from another copper mine where no significant levels of arsenic were detected.

As expected, differences between arsenic levels in urine has been detected between groups, being the exposed group the one with higher level of total arsenic in urine, followed by the internal control group. Despite that, no significant differences on the MN frequencies in lymphocytes were detected among these groups. Significantly higher BCMN frequencies were observed in the internal control group than in either the exposed group or the external control. However, there was no relationship between arsenic levels in the urine of the subjects and MN frequency.

**Key words: biomonitoring; human lymphocytes; buccal cells; arsenic exposure; MN assay**

## Introduction

Arsenic is an element widely spread into the environment. Millions of people are chronically exposed to arsenic in different parts of the world via drinking water or industrial sources, such extractive mining and the smelting of copper. India and Bangladesh are the most affected regions, but there are serious problems caused by arsenic in Taiwan, North of Mexico, Chile and Argentina as well. Epidemiological studies have also demonstrated the existence of high levels of arsenic in other regions such as Poland, USA, Canada, Hungary and Japan (Gebel, 2001; Mandal and Suzuki, 2002).

Arsenic is known to be cytotoxic, genotoxic and carcinogen in humans. Even though the mechanisms of action of this element are not fully understood, it has been clearly reported that its exposure is associated with anemia, neuropathies, hyperpigmentation and the irritation of many tissues such as the skin and the gastrointestinal tract. In addition, significant increases of cancer, particularly of the bladder, liver, skin and lung has been associated with arsenic exposure. The principal route of arsenic exposure in occupational settings is by inhalation, while ingestion of contaminated drinking water is the predominant source of environmental exposure (Morgan, 2001; Tseng, 2007).

In the north of Chile, high concentrations of arsenic are detected in the soil and water, due to natural sources (hydrogeological characteristics of the region) and these levels increase as a consequence of the intense copper mining activities (Biondi et al., 1995). In the 1960s, there was a serious epidemiological health problem caused by chronic arsenic exposure. During 12 years, from 1959 to 1970, about 130,000 inhabitants were consuming drinking water with average levels of arsenic as high as 0.8 mg/L. To solve this problem, water purification plants have been constructed and, consequently, the levels of arsenic have been reduced significantly, to reach the maxim permitted value of 50 µg/L (ATSDR, 2000). Nevertheless, the high levels of arsenic in natural water still remain, and the air contamination increases as a result of mining activity, mainly in the surrounding areas of mines and smelting factories.

Although several epidemiological studies have been carried out in human populations chronically exposed to environmental arsenic, only a few have been focused to occupational exposure. This lack of occupational risk information gives relevance to the studies carried out to get information on the arsenic effects in people exposed to arsenic at

the work place. How to measure the exposure levels and how to determine the effects of such exposures are critical points in this type of studies.

Urinary arsenic concentration is considered a good biomarker of current arsenic exposure and it has been used in these types of studies with people environmentally exposed to this element (Morgan, 2001; Basu et al., 2002). In addition, cytogenetic endpoints, as for example chromosome aberrations or micronuclei induction, have also been usually employed as a measure of genotoxic effects. In most of these studies, significant increases in the selected biomarkers have been obtained (Moore et al., 1996; Gonsebatt et al., 1997; Mahata et al., 2003; Vuyyuri et al., 2006; Larmarcovai et al., 2007), indicating the existence of genotoxic risk associated to arsenic exposure.

In this context, the current investigation was carried out to evaluate the possible association between the arsenic exposure and its genotoxic effects in a group of Chilean copper miner workers. The concentration of arsenic, and their metabolites (organic and inorganic), in urine has been used as a biomarker of exposure. In addition, the incidence of micronuclei in both peripheral blood lymphocytes and mucosa buccal cells, have been used as biomarkers of induced genetic damage.

## **Materials and methods**

### *Study subjects*

The present study was carried out with a total of 206 male workers from copper mines, divided into three groups: exposed, internal control and external control. The exposed group was formed by a total of 105 smelting workers, and 53 individuals working in administrative tasks at the same mining place composed the internal control. The external control group consisted of 48 workers from another copper mine, placed far away in a zone without significant levels of arsenic in the ground.

Our University Ethics Committee approved the study. The purposes of the study were explained to all participants and, previous to the sampling procedure, all subjects gave their informed consent, and blood and urine samples were collected and further manipulated in accordance with ethical standards. All participants completed a detailed questionnaire, covering standard demographic questions, a brief occupational history, and providing information on ethnicity, habits, and medical and family history.

*Analysis of arsenic species in urine*

A HPLC- ICP/MS analysis was carried out to detect and measure the arsenic metabolites in urine. Approximately 125 mL of urine were obtained from each studied individual in vials containing 0.01M sodium azide. All samples were sent to the National Institute of Health Sciences in Tokyo (Japan), where they had been frozen before being processed. A detailed description of the analytical protocol followed for analyzing arsenic species in urine, including reagents, instrumentation and procedures was accurately described in a previous study (Marcos et al., 2006). The total amount of arsenic detected in urine includes both the inorganic ( $\text{As}^{\text{III}}$  and  $\text{As}^{\text{V}}$ ) and organic (MMA and DMA) forms.

*Lymphocyte culture and MN assay*

Blood samples were obtained from each subject by venipuncture using heparinized vacutainers, and sent directly to the laboratory of the Mutagenesis Group at the Autonomous University of Barcelona in Bellaterra (Spain). Lymphocyte cultures were set up by adding 0.5 mL of whole blood to 4.5 mL of RPMI 1640 medium supplemented with 15% of heat-inactivated fetal calf serum, 1% of antibiotics (penicillin and streptomycin) and 1% of L-glutamine (all provided by Gibco Life Technologies, Paisley, UK). Lymphocytes were stimulated by 1% of phytohaemagglutinin (Gibco) at 37°C. After 44 h, 6 µg/mL of cytochalasin B (Cyt-B, Sigma, St. Louis, MO, USA) were added to the culture to arrest cytokinesis. At 72 h of incubation, cultures were harvested by centrifugation at 120 x g for 8 min. Next, blood cultures were washed once in RPMI 1640 medium followed by a mild hypotonic treatment (2-3 min in 0.075 M KCl at 4°C). Cells were centrifuged and fixed in a methanol/acetic acid (3:1 v/v) solution. Two or more slides were coded and stained with 10% of Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) in phosphate buffer (pH 6.8) for 10 min.

To determine the frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) and the total number of micronuclei, a total of 1000 binucleated cells with well-preserved cytoplasm (500 per replicate) for each subject were blind scored on coded slides. In addition, a total of 500 lymphocytes were scored to determine the percentage of cells with one, two, or more nuclei and the cytokinesis-block proliferation index (CPBI) was calculated.

*Buccal cells procedure, staining and MN scoring*

Buccal cell samples were obtained by rubbing the inside of the cheeks of study subjects with a toothbrush. The cells were collected in a tube containing 20mL of buffer solution (0.1M EDTA, 0.01 M Tris-HCL and 0.02 M NaCl, pH 7). After three washes in this buffer solution, followed by centrifugation at 400 x g during 10 min, 50µL of an adequate cell suspension density was dropped onto a preheated (55°C) slides and allowed to air-dry for 15 min on a slide-warmer. The slides were fixed in 80% cold ethanol for 30 min, air-dried overnight at room temperature, and stored at -20°C until use. The slides were sent to the laboratory of the Mutagenesis Group in Bellaterra where they were stained with 1 µg/mL of 4',6-di-amidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). A total of 2000 cells for each studied subject were scored blind, on coded slides, under an Olympus BX50 fluorescent microscope.

The criteria followed for MN evaluation were those proposed by Titenko-Holland et al. (1998). The frequency of mononucleated buccal cells with micronuclei (BCM<sub>N</sub>) was determined for each studied subject.

*Statistical analysis*

The statistical computations were performed using the SPSS, version 11.5 software (SPSS, Chicago, IL), run on a Pentium PC-compatible. For the descriptive data, the differences between means observed among the studied groups were analyzed by using the Student's *t*-test or the Mann-Whitney test, while differences in frequencies were evaluated by the chi-square test. The comparisons of BNM<sub>N</sub> and BCM<sub>N</sub> frequencies were performed using an ANOVA test. As the BCM<sub>N</sub> values did not cover the requirements for a parametric analysis, the square-root transformation was applied. In addition, a multiple regression analysis was carried out to evaluate the possible effects of the confounding factors, considered in this study, on the BNM<sub>N</sub> and BCM<sub>N</sub> parameters. The adequacy of the fit for each model was verified by the analysis of residuals, tolerance limits and homogeneity of variances. For all analyses, differences were regarded as statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### *Descriptive population data*

The main characteristics of the three groups studied in this investigation are shown in Table 1. In this table, potential confounding factors such as age, alcohol, tea and coffee consumption, and smoking habits are also indicated. Concerning age, the mean age of the exposed group was lower than that of the internal control, but it was higher than the mean of the external control group. In relation to alcohol (ethanol) consumption, the ingestion (g/week) in the exposed group was higher than either of the control groups. Tobacco is a well-known factor that can influence the level of genotoxic damage. In this study we observed some differences in the percentage of smokers among the three groups, but it should be noted that the number of cigarettes consumed per day was quite similar in each group and relatively low (less than 8 cigarettes/ day). This means that no heavy smokers were present in the studied groups. Regarding tea and coffee drinking, as the consumption was very little, the differences were of questionable relevance and the data were irrelevant in the final analysis.

The time elapsed in the respective working places have been 16.96, 24.94, and 14.03 years, for exposed, internal control, and external control, respectively.

Table 1 also gives the percentage of subjects who reported cases of cancer among close relatives. No differences were found between the exposed group and the internal control; the higher incidence reported for the external control did not attain statistical significance.

The total arsenic content in urine was 136.01, 63.30 and 23.65  $\mu\text{g/L}$  for the exposed, internal control, and external control groups, respectively. As expected, differences between the arsenic urinary levels of the studied workers were detected, according to the different occupational exposure (Table 2). Thus, the level in the exposed group was clearly higher than in the two controls. It was more than two-fold the value of the internal control level and, interestingly, this value was significantly higher than in the external control. This clearly indicates an environmental contamination in the factory site, out of the smelting plant, which supposes a significant exposure to arsenic.

In general, the standard human profile for arsenic excretion corresponds to 10-30% of inorganic arsenic, 10-20% of monomethylarsonic (MMA) and 60-80% of dimethylarsinic acid (DMA) (Vahter and Concha, 2001). In all groups, the percentage of organic arsenic

constituted more than 80% of the total excreted. The proportion of the inorganic form was higher among the exposed group, reaching 19.11% of the total As excreted; this proportion was slightly lower for the internal and external controls, respectively (16.95% and 13.44%). Statistical differences between the percentages of total organic and inorganic arsenic levels excreted by the 3 studied groups were not detected. In contrast, the levels of both inorganic and organic forms analyzed, according to the percentage of each pentavalent or trivalent species, attain statistical differences in all the comparisons carried out.

#### *Micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and buccal cells*

The analysis of the cytogenetic damage, measured by the micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes and mucosa buccal cells, is indicated in Table 3. Despite the differences of exposure levels between the studied groups, no significant differences for the MN frequencies in lymphocytes were observed between the exposed group and both control groups.

The CBPI is an index that measures lymphocyte proliferation. The CBPI was the same in the exposed group and the external control, while the internal control presented a lower value. From these data it seems that the CBPI was not significantly affected by arsenic exposure.

Regarding the frequencies of MN in buccal cells, the internal control group was the one with the higher frequency, followed by the exposed group and the external control group, respectively. It is difficult to find an explanation for the high value found in the internal control group. Moreover, additional analyses have been performed separately for each group and no dose-response relationships between As levels and MN frequencies were found.

When the groups were divided according to the smoking habit, no significant differences in the MN frequencies for both lymphocytes and buccal cells were observed (data not shown). Similar results had been obtained when the MN frequencies were analyzed taking into account the arsenic excretion pattern of each studied group. Frequencies of MN in lymphocytes and/or in buccal cells do not associate with an abnormal excretion pattern (Table 4).

Finally, a multiple regression analysis was carried out to verify if any of the confounding factors evaluated in this study could be correlated with the MN frequencies. Despite some of these factors show mean values that attain statistical differences among the three groups, only the age appeared to be directly related with BNMN and BCMN frequencies (Table 5). Overall, these results did not demonstrate any effect of arsenic exposure on the cytogenetic damage variables studied.

## Discussion

Several data from biomonitoring studies have indicated that the MN frequency, either using peripheral blood lymphocytes or epithelial mucosa buccal cells, is a good biomarker of genotoxic effects for risk assessment purposes (Surrallés et al., 1992; Fenech, 1993). Arsenic is a well-known carcinogen in humans but the mechanisms underlying its genotoxic action remain still unclear. In general, arsenic does not seem to exert a potent mutagenic effect but it has been clearly demonstrated to be an effective co-mutagen with radiation and with several chemical mutagens. Furthermore, arsenic and its metabolites are able to induce clastogenic and aneugenic effects leading to different types of DNA damage in both *in vitro* and *in vivo* conditions (reviewed by Basu et al., 2001).

Most of the epidemiological studies carried out in human populations exposed to arsenic in drinking water have demonstrated positive correlations between the increase in the frequencies of micronuclei and chromosome aberrations and high levels of exposure (Nilsson et al., 1993; Dulout et al., 1996; Basu et al., 2001; 2002; Chakraborty et al., 2006). Moreover, chronic exposure to arsenic has been associated with increases in human cancer incidence, mainly in skin, lung, bladder, liver and kidney (Basu et al., 2001).

Since a limited number of studies have been carried out on people occupationally exposed to arsenic, the main objective of the current investigation was to evaluate the possible association between arsenic exposure at working place and genotoxic effects. Workers from a copper smelting facility placed in northern Chile constituted the selected exposed group. Internal and external control groups were selected as reference groups and peripheral blood lymphocytes and epithelial buccal cells have been used as target cells covering a wide range of exposure routes. It must be recalled that lymphocytes have been commonly used as cell targets detecting general exposure. Exfoliated buccal cells have

been considered as representative of epithelial cells and their application in biomonitoring studies have been increasing, principally due to the fact that epithelial cells are involved in the origin of more than 90% of human cancers (Rosin and Gilbert, 1990; Biggs et al., 1997; Majer et al., 2001).

Occupational arsenic exposure was measured according to the levels of total arsenic and its metabolites in the urine. Despite the values of arsenic in urine were clearly higher in the exposed group working at the copper smelting plant, it should be noted that the value obtained for the internal control also indicates a certain occupational exposure due to arsenic contamination.

In spite that arsenic exposure, primarily through inhalation, did really occurs in workers, no significant increases in the MN frequency was observed in the group of smelters. Thus, although data from arsenic and their metabolites in urine could be considered as an appropriated biomarker of current exposure, it was not found any correlation between the arsenic levels and the induction of cytogenetic damage, measured by the MN assay, in our studied population. CBPI index can be considered as an indicator of cell cycle delay, but a slight decrease of this value was only observed in the internal control group, not in the smelter workers. This did not correlate with exposure. To explain this fact, it should be noted that this parameter seems to reflect physiological aspects more than occupational or genotoxic exposures (Lazutka et al., 1994).

Differences in MN frequencies could not be linked with arsenic levels in urine, but were associated with age. In fact, the group with higher MN frequencies was also the one with the higher mean age. This agrees with previous reports where MN frequencies significantly increase with the age of the analyzed subjects (Barale et al., 1998; Fenech, 1998; Martínez et al., 2004). Supporting these results, regression analysis showed that age was the only variable that appeared to be significantly linked with the increase of MN frequencies, both in lymphocytes and buccal cells.

At this point, it should be mentioned that a previous study was carried out in the same population using the SCE assay as a biomarker of genetic damage induction. Even though slight but significant differences in SCE and HFCs frequencies between the smelting workers and controls were detected, we suggested that the slight increases observed in the smelter group probably were not correlated with arsenic exposure (Paiva et al., 2006). Therefore, it is not surprising that we were unable to detect any correlation between the chronic arsenic exposure and genetic damage using the MN assay, either in lymphocytes or

in buccal cells. In addition, although most epidemiological studies have detected a positive association between DNA damage induction and arsenic exposure, there are some reports also showing contradictory data after environmental or occupational exposures (Basu et al., 2004; Palus et al., 2005; Martinez et al., 2005; Lewinska et al., 2006). If arsenic acts through an ROS mechanism, cells that are not dividing at the time of exposure would not show MN, unless arsenic bound to the active sites of spindle attachment leading to aneuploidy induction.

Considering the lack of correlation between arsenic levels in urine and the cytogenetic data obtained from different studies, it is possible that more than the effects of arsenic exposure *per se*, other individual or environmental factors will account for the observed effects. It should be investigated which are these factors to have a more accurate picture on the genotoxic risk associated with a defined occupational exposure.

In summary, under the particular conditions of this study, no significant increases in the frequencies of MN in lymphocytes and buccal cells have been detected in workers from a copper smelting facility that could be directly associated with arsenic exposure.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank G. Umbert, T. Amador and A. Corral for their expert technical assistance in the preparation and scoring of samples. We are grateful to Laboratorios Lácer S.A. (Barcelona) for kindly giving us the toothbrushes. This investigation was partially supported by a contract with the Corporación del Cobre de Chile (CODELCO) and by a grant from the Generalitat de Catalunya (2005SGR-00136). Leiliane Paiva and Valeria Martínez were supported during this work by a fellowship from the Generalitat de Catalunya and the Spanish Ministry of Education and Science, respectively.

**References**

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2000. Case studies in environmental medicine. Arsenic toxicity. Original date: June 1990; revision date: October 2000 [www.atsdr.cdc.gov/HEC/CSEM/](http://www.atsdr.cdc.gov/HEC/CSEM/).
- Barale R, Chelotti L, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M, Bulleri M, He J, Baldacci S, Di Pede F, Gemignani F, Landi S. 1998. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population. II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen* 31: 228-242.
- Basu A, Mahata J, Gupta S, Giri AK. 2001. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat Res* 488:171-194.
- Basu A, Mahata J, Roy AK, Sarkar JN, Poddar G, Nandy AK, Sarkar PK, Dutta PK, 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 JK, Banerjee A, Ray K, Giri AK. 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 Biomarkers Prev* 13: 820-827.
- Biggs ML, Kalman DA, Moore LE, Hoppenhayn-Rich C, Smith MT, Smith AH. 1997. Relationship of urinary arsenic to intake estimates and a biomarker of effect, bladder cell micronuclei. *Mutat Res* 386:185-195.
- Biondi RS, Corco LS, Cohen RS, Martínez MS, Torrico RF. 1995. Arsénico: Impacto sobre el hombre y su entorno. II Región de Chile (Antofagasta). Programa Ambiente 02 (1992 –1993). Centro de Investigaciones Ecobiológicas y Médicas de Altura CIEMA. División Chuquicamata de CODELCO, Chile.
- Chakraborty T, Das U, Poddar S, Sengupta B, De M. 2006. Micronuclei and chromosomal aberrations as biomarkers: a study in an arsenic exposed population in West Bengal, India. *Environ Contam Toxicol* 76: 970-976.
- Dulout FN, Grillo CA, Seoane AI, Maderna CR, Nilsson R, Vahter M, Darroudi F, Natarajan AT. 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.

- Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 285: 35-44.
- Fenech M. 1998. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes - a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat Res* 404: 155-165.
- Gebel, TW. 2001. Genotoxicity of arsenical compounds. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203: 249-262.
- Gonsebatt ME, Vega L, Salazar AM, Montero R, Guzmán P, Blas J, Del Razo LM, García-Vargas G, Albores A, Cebrián ME, Kelsh M, Ostrosky-Wegman P. 1997. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res* 386: 219-228.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Sari-Minodier I, Baciuchka-Palmaro M, Botta A, Orsiere T. Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis. 2007. *Mutat Res* 615: 18-27.
- Lazutka JR, Dedonyté V, Krapavickaitė D. 1994. Sister-chromatid exchanges and their distribution in human lymphocytes in relation to age, sex and smoking. *Mutat Res* 306: 173-180.
- Lewinska D, Palus J, Stepnik M, Dziubaltowska E, Beck J, Rydzynski K, Natarajan AT, Nilsson R. 2007. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 80: 371-380.
- Majer BJ, Laky B, Knasmuller S, Kassie F. 2001. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage an in chemoprevention trials. *Mutat Res* 489: 147-172.
- Mahata J, Basu A, Ghoshal S, Sarkar JN, Roy AK, Poddar G, Nandy AK, Banerjee A, Ray K, Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK. 2003. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat Res* 534: 133-143.
- Mandal BK, Suzuki KT. 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58: 201-235.
- Marcos R, Martínez V, Hernández A, Creus A, Sekaran C, Tokunaga H, Quinteros D. 2006. Metabolic profile in workers occupationally exposed to arsenic. Role of GST polymorphisms. *J Occup Environ Med* 48 : 334-341.

- Martínez V, Creus A, Venegas W, Arroyo A, Beck JP, Gebel TW, Surrallés J, 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 JP, Gebel TW, Surrallés J, Marcos R. 2005. Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicol Letters* 155: 319-327.
- Moore LE, Warner ML, Smith AH, Kaldman D, Smith MT. 1996. Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 27: 176-184.
- Morgan A. 2001. Exposure and health effects. Office of Water, Office of Science and Technology. Health and Ecological Criteria Division. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, Chapter 3.
- Nilsson R, Jha AN, Zaprianov Z, Natarajan AT. 1993. Chromosomal aberrations in humans exposed to arsenic in the Srednogorie area, Bulgaria. *Fresenius Environ Bull* 2: 59-64.
- Paiva L, Martínez V, Creus A, Quinteros D, Marcos R. 2006. Sister chromatid exchange analysis in smelting plant workers exposed to arsenic. *Environ Mol Mutagen* 47: 230-235.
- Palus J, Lewinska D, Dziubaltowska E, Stepnik M, Beck J, Rydzynski K, Nilsson R. 2005. DNA damage in leukocytes of workers occupationally exposed to arsenic in copper smelters. *Environ Mol Mutagen* 46: 81-87.
- Rosin MP, Gilbert A. 1990. Modulation of genotoxic effect in humans. In: Mendelson ML, Albertini RI (eds.) *Mutation and the Environment, Part E*. Wiley-Liss, New York, pp. 351-359.
- Surrallés J, Carbonell E, Marcos R, Degrassi A, Antoccia A, Tanzarella C. 1992. A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 7 : 407- 410.
- Titenko-Holland N, Jacob RA, Shang N, Balaraman A, Smith MT. 1998. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mut Res* 417 : 101-104.
- Tseng, CH. 2007. Arsenic methylation, urinary arsenic metabolites and human diseases : current perspective. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 25: 1-22.

Vahter M, Concha G. 2001. Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacol Toxicol* 89:1-5.

Vuyyuri SB, Ishaq M, Kuppala D, Grover P, Ahuja YR. 2006. Evaluation of micronucleus frequencies and DNA damage in glass workers exposed to arsenic. *Environ Mol Mutagen* 47: 562-570.

**Table 1: Description of the studied groups**

	<b>Exposed</b> Mean $\pm$ SE	<b>Internal control</b> Mean $\pm$ SE	<b>External control</b> Mean $\pm$ SE
No. subjects	105	52	50
Arsenic in urine ( $\mu\text{g/L}$ )	136.01 $\pm$ 10.18 *** b,c	63.30 $\pm$ 4.97 *** a,c	23.65 $\pm$ 3.45
Years of exposure	16.96 $\pm$ 0.69 *** b,c	24.94 $\pm$ 1.04 *** a,c	14.03 $\pm$ 1.32
Age	46.20 $\pm$ 0.60 *** b,c	51.85 $\pm$ 0.92 *** c	40.74 $\pm$ 1.32
Alcohol (g/week)	72.91 $\pm$ 7.86 * b,c	50.33 $\pm$ 7.55	43.57 $\pm$ 6.15
Non-smokers (%)	38.1	50.0	38.0
Ex-smokers (%)	14.3	36.5	18.0
Smokers (%)	47.6 *** b	13.5 *** a,c	44.0
N°. cigarettes/day $\pm$ SE	6.15 $\pm$ 0.64	3.67 $\pm$ 0.99	7.36 $\pm$ 1.47
Cups of tea/day $\pm$ SE	1.96 $\pm$ 0.12	2.15 $\pm$ 0.28	1.80 $\pm$ 0.22
Cups of coffee/day $\pm$ SE	0.60 $\pm$ 0.14 *** c	0.50 $\pm$ 0.11 * c	1.10 $\pm$ 0.22
Relatives with cancer (%)	38.6	39.2	55.1

Mann-Whitney test: arsenic in urine, years of exposure, alcohol, cigarettes, tea, and coffee; *t*-test: age;  $\chi^2$ : number of smokers and relatives with cancer; SE: standard error; a- exposed; b- internal control; c- external control; \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ .

**Table 2:** Urinary profiles in the urine

As ( $\mu\text{g/L}$ )	Exposed workers (mean As $\pm$ SE)	Internal control (mean As $\pm$ SE)	External control (mean As $\pm$ SE)
Total As	136.01 $\pm$ 10.18 *** <sup>b,c</sup>	63.30 $\pm$ 4.97 *** <sup>a,c</sup>	23.65 $\pm$ 3.45
iAs (%)	19.11 $\pm$ 1.46	16.95 $\pm$ 1.49	13.44 $\pm$ 1.25
org As (%)	80.89 $\pm$ 1.46	83.05 $\pm$ 1.49	86.56 $\pm$ 1.25
% As <sup>V</sup>	5.22 $\pm$ 0.44 ** <sup>b</sup> , *** <sup>c</sup>	8.84 $\pm$ 1.03 ** <sup>a</sup> , *** <sup>c</sup>	1.30 $\pm$ 0.25
% As <sup>III</sup>	13.89 $\pm$ 1.54 ** <sup>c</sup>	8.10 $\pm$ 1.10 *** <sup>c</sup>	12.13 $\pm$ 1.21
% MMA	12.85 $\pm$ 0.62 *** <sup>b</sup> , * <sup>c</sup>	16.55 $\pm$ 0.88 *** <sup>a,c</sup>	10.33 $\pm$ 1.42
% DMA	68.04 $\pm$ 1.32 *** <sup>c</sup>	66.50 $\pm$ 1.58 *** <sup>c</sup>	76.23 $\pm$ 2.20

SE: standard error; a- exposed; b- internal control; c- external control  
Mann-Whitney test; \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$

**Table 3:** Genetic damage observed in the study population

	Exposed group	Internal control	External control
N° of studied individuals	105	52	50
BNMN (Mean $\pm$ SE)	8.08 $\pm$ 0.55	9.96 $\pm$ 0.79	8.50 $\pm$ 0.78
CBPI (Mean $\pm$ SE)	1.51 $\pm$ 0.01 *** <sup>b</sup>	1.43 $\pm$ 0.02 *** <sup>a,c</sup>	1.52 $\pm$ 0.01
BCMNI (Mean $\pm$ SE)	14.11 $\pm$ 1.16 *** <sup>b</sup> , ** <sup>c</sup>	23.15 $\pm$ 2.76 *** <sup>a,c</sup>	8.34 $\pm$ 0.99

SE: standard error; a- exposed; b- internal control; c- external control.  
ANOVA: BNMN, BCMNI, CBPI. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$

**Table 4:** MN frequencies according to the urinary arsenic profile

<b>Exposed group (a)</b>	<b>% Asi</b>		<b>% MMA</b>		<b>% DMA</b>	
	$\leq 30\%$	<b>&gt; 30%</b>	$\leq 20\%$	<b>&gt; 20%</b>	$\geq 60\%$	<b>&lt; 60%</b>
N° of subjects (%)	81.9	18.10	84.8	15.20	77.1	22.9
BNMN (mean $\pm$ S.E)	8.30 $\pm$ 0.63	7.05 $\pm$ 1.10	8.13 $\pm$ 0.58	7.75 $\pm$ 1.65	8.41 $\pm$ 0.65	6.96 $\pm$ 0.95
BCMN (mean $\pm$ S.E)	14.72 $\pm$ 1.18 <b>*b, ***c</b>	11.37 $\pm$ 3.49	13.36 $\pm$ 1.26 <b>***b, *c</b>	18.19 $\pm$ 2.77	14.98 $\pm$ 1.22 <b>*b, ***c</b>	11.21 $\pm$ 2.90
<b>Internal control (b)</b>	<b>% Asi</b>		<b>% MMA</b>		<b>% DMA</b>	
	$\leq 30\%$	<b>&gt; 30%</b>	$\leq 20\%$	<b>&gt; 20%</b>	$\geq 60\%$	<b>&lt; 60%</b>
N° of subjects (%)	90.4	9.6	73.1	26.9	75.0	25.0
BNMN (mean $\pm$ S.E)	10.00 $\pm$ 0.83	9.50 $\pm$ 3.01	10.09 $\pm$ 0.85	9.64 $\pm$ 1.85	10.00 $\pm$ 1.00	9.83 $\pm$ 1.07
BCMN (mean $\pm$ S.E)	23.81 $\pm$ 3.03 <b>*a, ***c</b>	17.0 $\pm$ 2.59	23.03 $\pm$ 3.11 <b>***a,c</b>	23.50 $\pm$ 6.01	25.54 $\pm$ 3.48 <b>*a, ***c</b>	16.00 $\pm$ 2.93
<b>External control (c)</b>	<b>% Asi</b>		<b>% MMA</b>		<b>% DMA</b>	
	$\leq 30\%$	<b>&gt; 30%</b>	$\leq 20\%$	<b>&gt; 20%</b>	$\geq 60\%$	<b>&lt; 60%</b>
N° of subjects (%)	97.6	2.1	85.4	14.6	89.6	10.40
BNMN (mean $\pm$ S.E)	8.13 $\pm$ 0.78	18.00 $\pm$ 0.0	8.37 $\pm$ 0.87	8.14 $\pm$ 2.02	8.33 $\pm$ 0.83	8.40 $\pm$ 2.87
BCMN (mean $\pm$ S.E)	8.32 $\pm$ 1.02	4.00 $\pm$ 0.0	8.34 $\pm$ 1.05	7.57 $\pm$ 3.36	8.53 $\pm$ 1.11	5.60 $\pm$ 0.93

SE: standard error; ANOVA: BNMN, BCMN. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$

\* all comparisons were performed between groups with similar pattern of excretion;

\*\* abnormal percentage values were showed in bold.

**Table 5:** Multiple regression analysis

	$\beta$	$R^2$	$P$
BNMN		0.236	
age	0.260		0.002
exposure (years)	0.033		0.664
As total in urine	- 0.007		0.057
alcohol consumption	- 0.007		0.157
smoking habits			0.101
Non-smokers	- 0.237		
Ex-smokers	1.785		
Smokers	0		
BCMn		0.088	
age	0.058		0.023
exposure (years)	- 0.022		0.342
As total in urine	0.001		0.319
alcohol consumption	- 0.003		0.123
smoking habits			0.082
Non-smokers	0.574		
Ex-smokers	0.235		
Smokers	0		

$\beta$ : standardized coefficient;  $R^2$ : coefficient of determination;  
P: levels of significance



---

**Polymorphism of glutathione transferase Omega 1 in a population exposed to a high environmental arsenic burden**

Leiliane Paiva<sup>1</sup>, Ricard Marcos<sup>1,2</sup>, Amadeu Creus<sup>1</sup>, Marjorie Coggan<sup>3</sup>, Aaron J Oakley<sup>4</sup>  
and Philip G. Board<sup>3\*</sup>

1. Group of Mutagenesis, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.
2. CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Spain.
3. John Curtin School of Medical Research Australian National University, Canberra, Australia.
4. Research School of Chemistry Australian National University, Canberra, Australia.

Short title: GSTO1-1 polymorphism and arsenic disposition

All correspondence to

Dr Philip G Board

John Curtin School of Medical Research

PO Box 334 Canberra, ACT 2601, Australia

Tel 61 2 61254714

Fax 61 2 61254712

Email: [Philip.Board@anu.edu.au](mailto:Philip.Board@anu.edu.au)

This work was funded by grants 316955 and 366731 from the Australian National Health and Medical Research Council and by the Generalitat de Catalunya (CIRIT, 2005SGR-00136).

**Abstract**

**Objectives and methods.** The aim of this study was to investigate genetic variation in glutathione transferase Omega 1 (GSTO1-1) in *Atacameños*, an indigenous population from Chile that has been exposed to environmental arsenic for many generations. GSTO1-1 is thought to catalyse the rate-limiting step in the biotransformation of arsenic in humans and may modulate the response of cancer patients to arsenic trioxide therapy. Allele frequencies were determined by PCR based methods and a polymorphic variant (GSTO1-1 Val236) was expressed in *E. coli* and functionally characterized. Urinary arsenic profiles were determined by ICP/MS.

**Results.** A novel allele resulting in an Ala236Val substitution that has not been functionally characterized was detected in *Atacameños* and Chilean subjects at a frequency of 0.033 and 0.009 respectively. The Val236 isoenzyme has diminished specific activity (10-20%) with a range of substrates. This loss of activity appears to result from a decrease in the  $K_{cat}$ . The Val236 variant is also unstable and rapidly loses activity during purification or when heated at 45°C. The percent of inorganic arsenic in the urine of 205 Chilean subjects showed a bimodal distribution that was not associated with the Ala140Asp, Glu155del, or Ala236Val polymorphisms in GSTO1-1.

**Conclusions.** It is likely that heterozygotes inheriting the Val236 variant subunit would have a partial deficiency of GSTO1-1 activity. Despite their effects on enzyme function the known variants of GSTO1-1 do not appear to explain the observed variability in the excretion of inorganic arsenic.

**Key words:** Glutathione transferase Omega; Polymorphisms; Arsenic biotransformation; Urinary arsenic.

## Introduction

Arsenic is an important environmental pollutant classified by the IARC as a carcinogen in humans. Millions of people are chronically exposed to arsenic in different parts of the world via drinking water, or due to industrial activities. Epidemiological data has revealed that chronic exposure to arsenic is associated with an increase of bladder, skin, lung and liver cancers, as well as with other diseases (1-3).

Arsenic biotransformation involves successive methylation and reduction reactions leading to the excretion of organic metabolites such as monomethylarsonic acid ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ), monomethylarsonous acid ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ), dimethylarsinic acid ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) and dimethylarsinous acid ( $\text{DMA}^{\text{III}}$ ), in addition to their parental inorganic species (4, 5). The oxidative methylation pathway requires a trivalent arsenic substrate and the Omega class glutathione transferase enzymes GSTO1-1 and GSTO2-2 have been shown to catalyse the reduction steps in the pathway *in vitro* (6-8). The role of the arsenic biotransformation process, as a detoxification pathway, has been discussed by many authors (9-13). Since the trivalent methylated metabolites are more cytotoxic and genotoxic than the trivalent inorganic species, the biotransformation process may significantly enhance the cytotoxic and carcinogenic risk of arsenic exposure.

The standard urinary arsenic profile in humans exposed to arsenic includes 10-30% inorganic arsenic, 10-20% MMA ( $\text{MMA}^{\text{V}}$  and  $\text{MMA}^{\text{III}}$ ) and 60-80% DMA ( $\text{DMA}^{\text{V}}$  and  $\text{DMA}^{\text{III}}$ ) (2, 14). However, large variations in the relative proportions of arsenic metabolites have been commonly detected between groups and individuals from the same exposed population (14-16). The existence of large inter-individual variations, both in arsenic excretion and in the toxic response to similar exposures, indicates the existence of a genetic basis for variation in arsenic metabolism (17).

Studies of a South American *Atacameños* Indian population demonstrated that some individuals have an unusual arsenic excretion pattern, presenting low levels of MMA in urine compared to the standard profile (4, 14, 17). This variability might indicate the existence of genetic differences in arsenic metabolism among *Atacameños*, with respect to other ethnic groups. Since the *Atacameños* have been exposed to high levels of arsenic for many generations, some allelic variants could have been selected and may be present at a different frequency, in this ethnic group.

Arsenic trioxide is increasingly used in the treatment of acute promyelocytic leukaemia and has potential for therapy in other cancers (18, 19). Some fatal adverse reactions to

arsenic trioxide therapy have been reported and while a pharmacogenetic explanation is probable, no distinct gene has yet been identified (20).

As the omega class glutathione transferase GSTO1-1 has been considered to be the rate limiting step for arsenic biotransformation in humans (6) genetic variation in GSTO1-1 could be an important factor in the variability found in humans, both in arsenic excretion and in arsenic susceptibility. Some correlations between genetic variation in GSTO1-1 and arsenic biotransformation have been reported (7, 21, 22). In addition to its role in arsenic biotransformation, GSTO1-1 is the only enzyme known to catalyse the biotransformation of  $\alpha$ -haloketones such as 2-chloroacetophenone (tear gas) (23), it has been implicated in the activation of interleukin 1 (24), and also linked to the age at onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases (25-27). Given the potential role of the Omega class GSTs in the biotransformation of arsenic in humans and its novel role in other significant biological processes, it is important that genetic variants of *GSTO1* are identified and functionally characterized.

In this study we have investigated the genetic variation in *GSTO1* in a group of indigenous Chilean subjects (*Atacameños*) that have had chronic high-level multi-generational exposure to arsenic. Notably, in this population we have identified a GSTO1-1 variant that has low catalytic efficiency and is distinctly unstable. We have also assessed the impact of this and other GSTO1-1 variants on arsenic excretion.

## **Materials and methods**

### ***Studied populations***

A total of 488 individuals have been evaluated in this study that was approved by the Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona. Prior to the study, all subjects gave informed consent and blood and urine samples were collected and further manipulated in accordance with the approved ethical standards.

An initial study was carried out to analyse the frequencies of 6 polymorphic sites within the *GSTO1* gene in 281 individuals belonging to different ethnic groups: 46 Chilean Indian (*Atacameños*), 111 Chileans and 124 Europeans (all of them from Barcelona, Spain). The study was expanded analysing the urinary arsenic profile of 207 Chilean males that were genotyped for four specific *GSTO1* polymorphisms (Ala140Asp, Glu155del, Glu208Lys and Ala236Val). The individuals comprising this population sample had varying levels of occupational arsenic exposure and this is reflected in the wide range of total urinary

arsenic values that were observed (0-600 $\mu$ g/L). Of these individuals, 105 were employed in a smelting plant and 52 worked in the same mining operation but in administrative tasks. In addition, 50 subjects worked in another mine where no significant levels of arsenic in the ground were detected.

Fish and seafood consumption was insignificant due to the geographical characteristics of the studied population. In general, small amounts of arsenobetaine (AB) and traces of arsenocholine (AC) can potentially be found in the urine of some subjects due the consumption of chicken, which is often fed with fish remains. Despite that possibility, no peaks of arsenobetaine or arsenocholine were obtained from the urine of the studied subjects. Therefore, the amount of total arsenic detected in urine of these individuals includes the sum of inorganic (AsIII and AsV) and organic (MMA and DMA) forms.

### ***Genetic polymorphisms analysis***

DNA was isolated from peripheral blood samples by the use of standard phenol-chloroform extraction. Primers and specific conditions for DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR) are described in Table 1. Isolated DNA (1  $\mu$ l) was amplified in a 25  $\mu$ L reaction mixture containing 0.2  $\mu$ M of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X PCR Buffer, 1 U of Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI) and 0.25 $\mu$ M of each primer. To detect the frequencies of the GGC and AGG deletions, a radioactive PCR was carried out, under the same initial conditions with the addition of 3  $\mu$ Ci of [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] dATP to the reaction. PCRs consisted of an initial denaturising step at 95°C for 3 min, followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 50 - 62°C for 30 s, 72°C for 30 s (35 cycles of 95°C for 40 s, 62°C for 40 s, 72°C for 40 s, for the exon/ intron 1) and a final extension step at 72°C for 40 s.

A restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was carried out to detect the nucleotide changes causing the Ser86Cys, Ala140Asp and Ala236Val amino acid substitutions. PCR products from each region (a total of 5  $\mu$ L) were digested overnight at 37°C with 2 U of specific restriction enzymes (New England Biolabs, UK) in a total volume of 20  $\mu$ L. The digested products were separated by 10 or 12% polyacrylamide gel electrophoresis, stained with SYBR Gold (Invitrogen, USA) and photographed under ultraviolet illumination. The enzymes used for the RFLP analyses and the different DNA fragment patterns expected for the three nucleotide changes are also described in Table1. PCR products covering exon/intron 1 and the exon 4 were separated on 6% denaturing

polyacrylamide gel at 90W for 2.5-5 h, autoradiographed and analysed for the GGC and GAG deletions, respectively. To detect the E208K change, an allele specific PCR was carried out following the methodology reported on the Proligo web page ([www.proligo.com](http://www.proligo.com)). The PCR conditions were similar as previously described and the amplicons were visualized on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

### ***Analysis of arsenic species in urine***

Approximately 125 mL of urine was obtained from each individual in vials containing 0.01 M sodium azide. Samples were stored frozen for further analyses at the National Institute of Health Sciences at Tokyo. Determination of the levels of total arsenic, trivalent inorganic arsenic ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), pentavalent inorganic arsenic ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), MMA and DMA were obtained by High-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-ICP/MS) as described previously (28).

MMA, DMA, and arsenobetaine were obtained from Tri Chemical Lab. (Yamanashi, Japan). Sodium arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), sodium arsenate ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) and other chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Stock solutions of  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ , MMA, and DMA were prepared by dissolving these chemicals in MilliQ water (at a final concentration of 1000 ppb) and finally kept at 4°C.

To detect arsenic species, an Agilent 7500 inductive coupled plasma mass spectrometer (Agilent, Wilmington, DE, USA) was used with the following parameters: Rf power 1400 W, Rf refraction 5W, plasma gas current 15 L/min, carrier gas current 0.8 L/min, monitoring mass 35 (Cl), 75 (As), integrating interval 0.3s, single round scan. HPLC was performed using a STM-10A auto sampler, and Shimadzu CTO-10AC column oven under the following conditions: mobile phase 10 mM phosphate buffer (pH 6.0), flow rate 1 mL/min, column temperature 35 °C, and injection volume 20 µL. The analytical column used was a gel PAK GL-IC-A15 (4.6 mm i.d. X 150 mm) packed with cation-exchange resin (Hitachi Kasei Co Ltd. Tokyo, Japan). After thawing, 20 µL of urine was injected into the HPLC column, and the peak areas of arsenic species were measured by ICP/MS after 8 minutes. The amount of each arsenic species was calculated from the standard curves prepared using 0, 25, and 100 ppb of each standard. The skimmer cone and sampling cone of ICP/MS were always cleaned with water after each day of use.

The experimental protocol used was able to discriminate between the different arsenic species, including arsenobetaine (AB) or arsenocholine (AC). Retention times ( $t_R$ ) for AB,

DMA, MMA and As<sup>V</sup> were 126s, 170s, 240s and 359s, respectively when using solutions containing 150 ppb of each compound. The  $t_R$  of arsenocholine was 113 s. In addition, the HPLC-ICP/MS chromatogram obtained using 20 $\mu$ L of a standard solution containing 150 ppb of AB and As<sup>III</sup> shows peak of retention times for AB and As<sup>III</sup> at 126 s and 143 s, respectively.

### ***Statistical analysis***

Specific genotype frequencies, allele frequencies and goodness of fit tests for Hardy-Weinberg equilibrium were calculated using the HELIXTree software program ([www.goldenhelix.com](http://www.goldenhelix.com)) for Windows. The inference of phase haplotypes and their frequencies were estimated using the Expectation-Maximization algorithm (EM) in the HELIXTree program. In addition, Linkage Disequilibrium (LD) analyses were also carried out as previously described (29, 30).

To compare the *GSTO1* polymorphism frequencies, as well the haplotype distributions between the studied groups, Chi-Square tests and Fisher's exact test were carried out using the SPSS version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software.

### ***Enzyme activity***

The activity of purified recombinant GSTO1-1 was determined with a range of substrates. Thioltransferase, dehydroascorbate reductase and methylarsonate reductase activities were determined by previously described methods (8, 31). Phenacylglutathione reductase activity was determined spectrophotometrically with S-(phenacyl)glutathione, S-(2',4'-dichlorophenacyl)glutathione and S-(4'-nitrophenacyl)glutathione at 271nm, 276nm and 305nm respectively. The assay has been previously described (23) and contained 100mM Tris-HCl pH8.0, 1.5mM EDTA, 10mM 2-mercaptoethanol, and 0.5mM phenacylglutathione substrate. The mM absorptivity change used for rate calculations for S-(phenacyl)glutathione, S-(2',4'-dichlorophenacyl)glutathione and S-(4'-nitrophenacyl)glutathione was -1.89OD, -1.48OD and -1.12OD respectively. The substrates S-(phenacyl)glutathione and S-(2',4'-dichlorophenacyl)glutathione were prepared by a previously described method (23). S-(4'-nitrophenacyl)glutathione was prepared by a similar method from glutathione and 2-bromo-4'-nitroacetophenone (Aldrich).

For the determination of kinetic constants the rates were measured in triplicate at 5 concentrations of S-(4'-nitrophenacyl)glutathione between 0.04mM and 0.4mM. The data were fitted to the Michaelis-Menten equation by MacCurveFit 1.5 (Kevin Raner Software, Mt Waverly Australia).

### ***Heat stability***

Purified preparations of normal and variant GSTO1-1 (0.5mg/ml in 20mMTris/HCl pH8,1mM 2-mercaptoethanol) were incubated at 45°C for up to 60 minutes and were assayed for activity with S-(4'-nitrophenacyl)glutathione as a substrate.

### ***Recombinant enzyme expression***

The cDNA encoding the GSTO1-1 Val236 isoenzyme was generated from the normal GSTO1 cDNA by mutagenesis with the QUIKCHANGE protocol (Stratagene). The mutated product was checked by DNA sequencing at the ACRF Biomolecular Resource Facility, JCSMR, ANU. Both the normal GSTO1-1 and variant GSTO1-1 Val236 enzymes were expressed in *E. coli* BL21(DE3) as N-terminal poly-His tagged ubiquitin fusion proteins from the pHUE plasmid (32). The N-terminal fusion was then cleaved by a modified mouse deubiquitylating enzyme (33) to yield enzyme with no additional N-terminal residues.

## **Results**

### ***GSTO1 genotyping***

The six selected *GSTO1* polymorphisms were evaluated in *Atacameños* and their frequencies were compared with those observed in the Chilean and European groups. A detailed description of the studied polymorphisms and the observed frequencies is presented in Table 2.

A GGC deletion, located in intron 1, was identified in each population sample and the variant allele was more frequent in Europeans than in Chileans and *Atacameños*. The variant allele frequency being 6.3 times lower in *Atacameños* than in Europeans.

The Ser86Cys polymorphism was not found in any of the three groups studied here although it was originally reported in a population sample from Mexico (21). On the other

hand, the Ala140Asp substitution was observed in all groups. In this case, variant allele frequencies were similar to those obtained for the GGC deletion.

The AGG deletion from exon 4 (Glu155del) and the linked Glu208Lys change were found only among Chileans and Europeans. In contrast with the other studies, a C > T transition in exon 6 (Ala236Val) was only found in *Atacameños* and Chileans. In this case the variant allele frequency is higher in the *Atacameños* Indians than in the Chileans.

Genotype distributions for all polymorphisms were in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium, except in the case of the intron 1 GGCdel distribution among *Atacameños*, showing a slight disagreement ( $p = 0.052$ ). Overall, these results demonstrate considerable differences among the three ethnic groups, and the polymorphisms studied. In contrast with the results obtained for Chileans and Europeans, the *Atacameños* are less polymorphic at the *GSTO1* locus.

#### ***Linkage disequilibrium within GSTO1***

In agreement with other studies, individuals with both the Ala140Asp change and the GGC deletion were identified. In Europeans this genotype was found with a high frequency (58.9%) and in Chileans, 37.8% were carriers of both alleles; in contrast, only 6.5% of *Atacameños* carried this genotype. These differences in the distribution of the double variant genotype (Ala140Asp substitution and GGC deletion) were statistically significant (chi-square: (2df) = 39.05,  $p < 0.001$ ). Moreover, linkage disequilibrium between the Ala140Asp substitution and the GGC deletion was observed in the three groups: LD correlation  $R = 0.59$  for *Atacameños* ( $p < 0.00007$ ),  $R = 0.835$  for Europeans ( $p < 0.0001$ ) and  $R = 0.93$  for Chileans ( $p < 0.00001$ ).

The AGG deletion (Glu155del) and the Glu208Lys substitution were found together only in Chileans and Europeans. In Europeans, a total of 5 individuals presented the Glu155 deletion and all of them were also heterozygous for the Glu208Lys change. Among Chileans, only 1 out of 3 individuals with the Glu155del presented the double variant genotype. As expected, significant linkage disequilibrium between the Glu208Lys substitution and the Glu155 deletion was confirmed in Europeans with LD correlation  $R = 0.795$  ( $p < 0.0001$ ) and it was also detected in Chileans with values of  $R = 0.575$  ( $p < 0.00001$ ).

***Haplotype analysis***

Haplotype analysis for *GSTO1* revealed that Europeans, followed by Chileans, present more diversity than *Atacameños*. The results obtained in this analysis revealed a total of 16 possible haplotypes for Europeans and 12 for Chileans; whereas in *Atacameños* only 5 haplotypes were detected. In fact, only 13 allelic forms of the 16 predicted haplotypes were found in the studied individuals and only 6 were observed in at least 2 of the 3 groups studied. A description of these haplotypes, an estimation of their frequencies and the number of individuals in the three studied groups are presented in Table 3.

It should be noted that haplotype 3, defined by the Val236 variant, was the only allelic form not detected among Europeans. Arbitrarily considering that the relatively common haplotypes have a minimum frequency of 0.10 (22, 34), *Atacameños* were defined by the haplotype 1. In contrast, Europeans were characterized by haplotypes 1, 2, 4 and 5, whereas haplotypes 1 and 4 were the allelic forms representing Chileans.

***Functional analysis of the Ala236Val variant***

The effect of the Ala236Val substitution identified in the *Atacameños* and Chilean population samples on GSTO1-1 function was completely unknown. To examine the properties of the Val236 variant we expressed the recombinant protein in *E.coli* and compared its catalytic properties with the most common GSTO1-1 isoform. As shown in Table 4 the Val236 variant has a significantly lower specific activity than the normal GSTO1-1 isoform with a range of different substrates. Notably, monomethylarsonate(V) (MMAV) reductase and dimethylarsinic acid(V) (DMAV) reductase activities were only 31 and 19% of normal respectively. In this study we used a new substrate, S-(4'-nitrophenacyl)glutathione to measure phenacylglutathione reductase activity and found that this substrate is reduced at over 10 times the rate of other previously studied phenacylglutathiones (23) and over 500 times the rate achieved with MMAV. Despite having higher activity with S-(4'-nitrophenacyl)glutathione as a substrate the Val236 variant had only 17% of normal activity. The relatively high activity of the enzymes with S-(4'-nitrophenacyl)glutathione allowed the determination of kinetic constants for the Val236 enzyme. As shown in Table 5 the Val236 isoform has a markedly diminished  $k_{cat}$  that appears to account for the lower catalytic efficiency and specific activity of this variant.

During the preparation and purification of these proteins we noted that the Val236 variant lost activity at a rapid rate. To quantify this apparent instability we measured its heat stability at 45°C (Figure 1). This study clearly confirmed the pronounced instability of this new variant.

#### ***Analysis of urinary arsenic profiles.***

Because some allelic variants of GSTO1-1 have abnormal function we were interested to determine if they were responsible for changes in arsenic biotransformation. We determined the urinary concentrations of inorganic arsenic ( $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ ) and organic arsenic (MMA, DMA) in a sample of 205 Chilean males who were also genotyped for the Ala140Asp, Glu155Del and Ala236Val polymorphisms. The individuals comprising this population sample had been exposed to varying levels of environmental arsenic and this is reflected in the wide range of total urinary arsenic values that were observed (0-600 $\mu\text{g/L}$ ). Linear regression failed to find any statistically significant association between genotype and any of the urinary arsenic variables except for a decrease in %DMA in Ala236Val heterozygotes ( $P=0.045$ ). However as this weak association is based on values from only 4 heterozygotes it seems unlikely to be of biological significance. Graphical analysis of the data revealed that the percentage of urinary arsenic that is inorganic has a bimodal distribution (figure 2). The population sample can be divided into low and high inorganic arsenic excretion sub-groups with means of  $13.1 \pm 5.5\%$  and  $47.5 \pm 9.3\%$  if the cut off between the two groups is taken at 30%. A plot of the percent inorganic arsenic against total arsenic (figure 3A) indicates that the bimodal distribution of inorganic arsenic was not strongly dependent on the total urinary arsenic ( $r=0.39$ ). This distinct bimodal distribution could potentially be explained by the presence of a recessive gene that regulates the biotransformation of arsenic. To determine if variants of *GSTO1* contribute to this striking anomaly in arsenic metabolism we compared plots of the percent inorganic arsenic vs total arsenic for the *GSTO1* coding region variants and non-variant controls. As shown in figure 3 none of the *GSTO1* alleles segregated specifically with the high or low subgroups as would be expected if they were responsible for the bimodal distribution of inorganic arsenic excretion.

## Discussion

This investigation was initiated because previous studies had identified individual variations in urinary arsenic excretion profiles among Chileans and indigenous *Atacameños* who are exposed to high a burden of arsenic in their drinking water or in their working environment (4, 14, 17). In addition, several fatal adverse reactions have been reported following treatment of acute promyelocytic leukaemia patients with arsenic trioxide (20). Since a previous study has suggested that GSTO1-1 is the rate-limiting step in the oxidative methylation pathway for the biotransformation of arsenic in humans (6), it is important to evaluate the impact of the genetic diversity of GSTO1-1. Several previous studies have identified genetic variations that appear to have an impact on GSTO1-1 function and arsenic metabolism (7, 8, 21). In particular a deletion of Glu155 associated with a Glu208Lys substitution generates an enzyme with decreased stability that has been associated with unusual urinary arsenic excretion patterns in two Mexican subjects exposed to arsenic in their drinking water (21). In the present study the Glu155 deletion was identified in the Chilean sample and Spanish European population sample but not in the indigenous *Atacameños*. A Ser86Cys substitution initially reported in a Mexican population sample (21), was not detected in the in any of the populations sampled in the present study. Further investigations are required to determine the distribution of this variant in the indigenous populations of the Americas and if it is of functional significance. The characterization of the Val236 variant was of particular interest in the present study. This variant has been previously noted in Mexican subjects (21, 22) was found at its highest frequency in the *Atacameños* population sample and was also present at a lower frequency in the Chilean sample. As this variant is absent in the European population sample its presence in the Chileans is presumably the result of admixture since European colonization. Functional studies of the recombinant GSTO1-1 Val236 variant showed that it had a low specific activity with a range of substrates and that the low activity was probably due to a low  $k_{cat}$ . The Val236 variant was also shown to be very unstable during storage and in a heat stability test. A previous study indicated that the Val236 variant can be transiently expressed at high levels in COS cells but its stability was not investigated (35). In a previous study (36) we determined the crystal structure of human GSTO1-1 and to further investigate the effects of the Ala236Val substitution we have constructed a model of the variant enzyme. The position of the substitution is shown in Figure 4. Ala 236 occurs in helix  $\alpha$ 10 and the side chain is buried between helix  $\alpha$ 10 and helix  $\alpha$ 9. The

substitution of Val with a bulky side chain at position 236 may alter the loop between  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  and the position of the C-terminal loop beyond helix  $\alpha 10$ . Helix  $\alpha 10$  and the C-terminal loop constitute a novel extension that interacts with an additional N-terminal extension (36). This is a novel topology not present in members of other GST classes. The role of the N and C-terminal extensions and their interaction in GSTO1-1 is not understood and this substitution is the first evidence that this region of the molecule plays a role in both stability and function.

Because of its low catalytic activity and its instability it appears that the Val236 variant may cause severe GSTO1-1 deficiency in homozygotes. It is also likely that heterozygotes would exhibit a partial deficiency. However, as GSTO1-1 deficient mice appear to survive under normal laboratory conditions (37), it seems unlikely that homozygosity for the Val236 allele is particularly deleterious in humans on a normal diet. Although we did not identify any homozygotes in this study the maintenance of Hardy-Weinberg equilibrium for this allele in the Chilean and *Atacameños* population samples supports the conclusion that deficiency of GSTO1-1 may not be deleterious.

Given the potential role of GSTO1-1 in the biotransformation of arsenic we were particularly interested to study the effect of the Val236 allele on urinary arsenic profiles. Unfortunately a study of 205 Chileans only identified 4 individuals who were heterozygous for the Ala236Val substitution. This was too few to allow meaningful statistical analysis of urinary arsenic excretion profiles. A previous study in Mexican subjects exposed to high levels of arsenic in their drinking water reported a high fraction of inorganic arsenic in the urine of two subjects who were heterozygous for the Glu155del, Lys208 haplotype (21). We have previously shown that similar to the Val236 variant, the Glu155del, Lys208 GSTO1-1 protein is unstable (8). Among the 205 Chilean males studied, we identified 9 heterozygotes for the compound Glu155del, Lys208 allele. Because the frequency of this allele is low the number of heterozygotes was low and we failed to find any association with arsenic excretion profiles. We also found carriers of this allele in both the high and low inorganic arsenic excretion groups indicating that the association between high inorganic urinary arsenic and the Glu155del, Lys208 allele previously noted in two Mexican subjects may have happened by chance. The fact that those two individuals were related supports the conclusion that a high percentage of inorganic arsenic in urine is due to the effect of another gene. The Ala140Asp

polymorphism is more common than the other variants studied but does not appear to have a direct effect on GSTO1-1 activity [7]. Although this SNP could potentially be linked to other functional SNPs that impact on *GSTO1* regulation we found that it does not clearly segregate with the high or low inorganic arsenic excretion groups and is therefore not responsible for this notable difference in arsenic biotransformation.

In vitro studies have suggested that the trivalent arsenical species  $\text{MMA}^{\text{III}}$  and  $\text{DMA}^{\text{III}}$  are intermediates generated by GSTO1-1 in the oxidative methylation pathway and are considered to be more cytotoxic and genotoxic than their inorganic parent species (9-13). A genetic deficiency of GSTO1-1 that limited the biotransformation of arsenic and the generation of these intermediates could be considered an advantage in environments where there is a high environmental arsenic burden. In contrast such a deficiency could be a disadvantage in subjects where arsenic trioxide is used to eliminate tumour cells. The known genetic variants that have the potential to cause a GSTO1-1 deficiency appear to be relatively rare (<5%) and this may limit their importance in arsenic trioxide chemotherapy. Although previous studies have suggested that GSTO1-1 is the rate-limiting step in the biotransformation of arsenic, the studies undertaken here suggest that its role may be less significant than the unknown factor that causes the high and low inorganic arsenic excretion groups. This view is supported by a recent study that failed to find a difference in arsenate metabolism in GSTO1-1 deficient mice (37).

The cause of the high or low excretion of inorganic arsenic is at present unknown although it is likely to be something that regulates flow of arsenic through the oxidative methylation pathway. The present data suggest that it is not dependent on known alleles of *GSTO1*. We have previously shown that GSTO2-2 can also reduce  $\text{MMA}^{\text{V}}$  to  $\text{MMA}^{\text{III}}$  and therefore has the potential to play a role [8]. Although GSTO2-2 is known to be polymorphic, relatively little is known about its structure and function and further studies are required to exclude it as a factor that regulates arsenic biotransformation.

It is thought that arsenic III methyltransferase (AS3MT) is primarily responsible for the two methylation steps in the oxidative methylation pathway and could therefore be involved in the regulation of arsenic biotransformation. A previous study of rat AS3MT found that it could also catalyse the reductive steps in this pathway and this observation requires confirmation in humans (38). The catalysis of both critical reactions in this pathway by AS3MT could make the contribution of GSTO1-1 to arsenic biotransformation

redundant, and not the rate limiting step as has been previously suggested (6). This could explain the lack of association between *GSTO1* polymorphisms and urinary arsenic excretion profiles. A number of polymorphisms in human AS3MT have been detected (39) and a recent studies have reported a significant association between a Met287Thr substitution in AS3MT and the percent of MMA in urine (40,41). Further investigation of the role of genetic variation in AS3MT in regulating individual differences in arsenic biotransformation is clearly warranted.

In summary, this study has identified and characterized an unstable variant form of *GSTO1-1* that occurs in South American populations that have been exposed to a high environmental arsenic burden for many generations. However, the inheritance of this and other variants of *GSTO1-1* do not appear to explain the variability in urinary arsenic excretion observed in the subjects under investigation.

**References**

1. Basu A, Mahata J, Gupta S, Giri AK. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat Res* 2001; 488: 171-194.
2. Rossman TG. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat Res* 2003; 533:37-65.
3. Tapio S, Grosche B. Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat Res* 2006; 612: 215-246.
4. Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 2002; 181-182: 211-217.
5. Aposhian HV, Zakharyan RA, Avram MD, Sampayo-Reyes A, Wollenberg ML. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198: 327-335.
6. Zakharyan RA, Sampayo-Reyes A, Healy SM, Tsaprailis G, Board PG, Liebler DC, Aposhian HV. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 1051-1057.
7. Whitbread AK, Tetlow N, Eyre HJ, Sutherland GR, Board PG. 2003 Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 131-144.
8. Schmuck EM, Board PG, Whitbread AK, Tetlow N, Cavanaugh JA, Blackburn AC, Masoumi A. 2005 Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 493-501.
9. Cohen SM, Arnold LL, Uzvolgyi E, Cano M, St John M, Yamamoto S, Lu X, Le XC. Possible role of dimethylarsinous acid in dimethylarsinic acid-induced urothelial toxicity and regeneration in the rat. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1150-1157.
10. Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 2002; 133: 1-16.
11. Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Harrington-Brock K, Allen JW, Winkfield E, Poorman-Allen P, Kundu B, Funasaka K, Roop BC, Mass MJ, DeMarini DM.

- Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ Mol Mutagen* 2003; 42:192-205.
12. Kumagai Y, Sumi D. Arsenic: signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 243-262.
  13. Thomas DJ, Styblo M, Lin S. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 176: 127-144.
  14. Vahter M. Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicol Lett* 2000; 112-113: 209-217.
  15. Loffredo CA, Aposhian HV, Cebrian ME, Yamauchi H, Silbergeld EK. Variability in human metabolism of arsenic. *Environ Res* 2003; 92: 85-91.
  16. Vahter M. Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Applied organometallic chemistry* 1994; 8: 175-182.
  17. Chung JS, Kalman DA, Moore LE, Kosnett MJ, Arroyo AP, Beeris M, Mazumder DN, Hernandez AL, Smith AH. Family correlations of arsenic methylation patterns in children and parents exposed to high concentrations of arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 729-733.
  18. Tallman MS. Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 57-65.
  19. Berenson JR, Yeh HS. Arsenic compounds in the treatment of multiple myeloma: a new role for a historical remedy. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006; 7: 192-198.
  20. Westervelt P, Brown RA, Adkins DR, Khoury H, Curtin P, Hurd D, Luger SM, Ma MK, Ley TJ, DiPersio JF. Sudden death among patients with acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. *Blood* 2001; 98: 266-271.
  21. Marnell LL, Garcia-Vargas GG, Chowdhury UK, Zakharyan RA, Walsh B, Avram MD, Kopplin MJ, Cebrian ME, Silbergeld EK, Aposhian HV. Polymorphisms in the human monomethylarsonic acid (MMA V) reductase/hGSTO1 gene and changes in urinary arsenic profiles. *Chem Res Toxicol* 2003; 16: 1507-1513.
  22. Yu L, Kalla K, Guthrie E, Vidrine A, Klimecki WT. Genetic variation in genes associated with arsenic metabolism: glutathione S-transferase omega 1-1 and purine nucleoside phosphorylase polymorphisms in European and indigenous Americans. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 1421-1427.

23. Board PG, Anders MW. Glutathione transferase omega 1 catalyzes the reduction of S-(phenacyl)glutathiones to acetophenones. *Chem Res Toxicol* 2007; 20: 149-154.
24. Laliberte RE, Perregaux DG, Hoth LR, Rosner PJ, Jordan CK, Peese KM, Egger JF, Dombroski MA, Geoghegan KF, Gabel CA. Glutathione s-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1beta posttranslational processing. *J Biol Chem* 2003; 278: 16567-16578.
25. Li YJ, Oliveira SA, Xu P, Martin ER, Stenger JE, Scherzer CR, Hauser MA, Scott WK, Small GW, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Jankovic J, Goetz CG, Mastaglia F, Middleton LT, Roses AD, Saunders AM, Schmechel DE, Gullans SR, Haines JL, Gilbert JR, Vance JM, Pericak-Vance MA. Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 3259-3267.
26. Kolsch H, Linnebank M, Lutjohann D, Jessen F, Wullner U, Harbrecht U, Thelen KM, Kreis M, Hentschel F, Schulz A, von Bergmann K, Maier W, Heun R. Polymorphisms in glutathione S-transferase omega-1 and AD, vascular dementia, and stroke. *Neurology* 2004; 63: 2255-2260.
27. Whitbread AK, Mellick GD, Silburn PA, Le Couteur DG, Board PG. Glutathione transferase Omega class polymorphisms in Parkinson disease. *Neurology* 2004; 62: 1910-1911.
28. Marcos R, Martinez V, Hernandez A, Creus A, Sekaran C, Tokunaga H, Quinteros D. Metabolic profile in workers occupationally exposed to arsenic: role of GST polymorphisms. *J Occup Environ Med* 2006; 48: 334-341.
29. Xu CF, Lewis K, Cantone KL, Khan P, Donnelly C, White N, Crocker N, Boyd PR, Zaykin DV, Purvis IJ. Effectiveness of computational methods in haplotype prediction. *Hum Genet* 2002; 110: 148-156.
30. Zaykin DV, Westfall PH, Young SS, Karnoub MA, Wagner MJ, Ehm MG. Testing association of statistically inferred haplotypes with discrete and continuous traits in samples of unrelated individuals. *Hum Hered* 2002; 53: 79-91.
31. Whitbread AK, Masoumi A, Tetlow N, Schmuck E, Coggan M, Board PG. Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods Enzymol* 2005; 401: 78-99.

32. Catanzariti AM, Soboleva TA, Jans DA, Board PG, Baker RT. An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins. *Protein Sci* 2004; 13: 1331-1339.
33. Baker RT, Catanzariti AM, Karunasekara Y, Soboleva TA, Sharwood R, Whitney S, Board PG. Using deubiquitylating enzymes as research tools. *Methods Enzymol* 2005; 398:540-554.
34. Tishkoff SA, Pakstis AJ, Ruano G, Kidd KK 2000 The accuracy of statistical methods for estimation of haplotype frequencies: an example from the CD4 locus. *Am J Hum Genet* 67: 518-522.
35. Mukherjee B, Salavaggione OE, Pellemounter LL, Moon I, Eckloff BW, Schaid DJ, Wieben ED, Weinshilboum RM. Glutathione S-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos* 2006 34:1237-1246.
36. Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Eastal S, Jermini LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J. Identification, Characterization and Crystal structure of the Omega Class Glutathione Transferases. *J Biol Chem* 2000; 275: 24798-24806.
37. Chowdhury UK, Zakharyan RA, Hernandez A, Avram MD, Kopplin MJ, Aposhian HV. Glutathione-S-transferase-omega [MMA(V) reductase] knockout mice: enzyme and arsenic species concentrations in tissues after arsenate administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 216: 446-457.
38. Thomas DJ, Waters SB, Styblo M. Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004 198:319-326.
39. Wood TC, Salavaggione OE, Mukherjee B, Wang L, Klumpp AF, Thomae BA, Eckloff BW, Schaid DJ, Wieben ED, Weinshilboum RM. 2006 Human arsenic methyltransferase (AS3MT) pharmacogenetics: gene resequencing and functional genomics studies. *J Biol Chem* 2006 281:7364-7373.
40. Lindberg AL, Kumar R, Goessler W, Thirumaran R, Gurzau E, Koppova K, Rudnai P, Leonardi G, Fletcher T, Vahter M. Metabolism of low-dose inorganic arsenic in a central European population: influence of sex and genetic polymorphisms. *Environ Health Perspect* 2007 115: 1081-1086

41. Hernández A, Xamena N, Surrallés J, Sekaran C, Tokunaga H, Quinteros D, Creus A, Marcos R. Role of the Met<sub>287</sub>Thr polymorphism in the AS3MT gene on the metabolic arsenic profile Mutat Res 2007 (in press)

Table 1 Primers and specific PCR conditions for each polymorphism analysed

Polymorphism studied / region	Primer Sequence 5' to 3'	Amplified specific conditions and polymorphism analysis	Product length Wild type; Wt Variant; V
ggc del/ Intron 1	O1ex1 F: GCAGGCACCTTTTGAGCTAAGG O1ex1 R: GGAGAAGCGAAGGCGATTAC	62°C annealing temperature 3 µ Ci [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dATP 6% denaturing polyacrylamide gel (5 h at 90W); autoradiography	Wt/Wt = 344 bp Wt/V = 340/341 bp V/V = 341 bp
Ser86Cys/ Exon 3	Ex3 F: GCACAAAAGTTGTTTCCCTTCTC Ex3 R: TCTCTCCCAAATCACTGAACC *	62°C annealing temperature Digestion overnight with <i>Myl</i> I at 37° 12% polyacrylamide gel	Wt/Wt = 198/167bp Wt/V = 365,198 and 167 bp V/V = 365 bp
Ala140Asp/ Exon 4	Poli4 F: TCTAGGTGCCATCCCTTG** Poli4 R: TGATAGCTAGGAGAAATAATTACCTC**	58°C annealing temperature Digestion overnight with <i>Cae</i> 8I at 37° C; 12% polyacrylamide gel	Wt/Wt = 68/59 bp Wt/V = 127, 68 and 59 bp V/V = 127bp
Glu155del/ Exon 4	Poli4 F: TCTAGGTGCCATCCCTTG Poli4 R: TGATAGCTAGGAGAAATAATTACCTC	58°C annealing temperature 3 µ Ci [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dATP 6% denaturing polyacrylamide gel (2,5 h at 90W); autoradiography	Wt/Wt = 127bp Wt/V = 127/124 bp V/V = 124 bp
Glu208Lys/ Exon 6	Ex6 wt F: GGCAGCCATGAAG + GAAG Ex6 m F: GGCAGCCATGAAG + AAAG Ex6 R: AAGATGATCCCATGCAACCT	60°C annealing temperature; 2,0 mM MgCl <sub>2</sub> ; Allele specific PCR; 2% agarose gel	Wt/Wt = 227 bp (primer F wt) Wt/V = 227 bp (primer F wt y V) V/V = 227bp (primer F V)
Ala236Val/ Exon 6	Ex6 F: CTGTGATGTCATCCTAGTTG * Ex6 R: CATGCAACCTGAACCTTGGT *	50°C annealing temperature Digestion overnight with <i>Sna</i> I at 37°C; 10% polyacrylamide gel	Wt/Wt = 192/116 bp Wt/V = 308, 192 and 116 bp V/V = 308 bp

\* Marnell et al., 2003; \*\* Whitbread et al., 2003.

**Table 2 Polymorphisms of GSTO1 analysed in this study**

Region	Sequence 5' to 3'	Effects on the protein	Groups studied for each SNP	Frequency n (%)			Variant allele frequency
				Wt/Wt	Wt/V	V/V	
Intron 1	CCCGGC <b>ggc/-</b> ATGTTC	Noncoding	Atacameños	41 (89.1)	4 (8.7)	1 (2.2)	0.065
			Chilean	69 (62.2)	37 (33.3)	5 (4.5)	0.212
			European	44 (35.5)	58 (46.8)	22 (17.7)	0.411
Exon 3	ACGAGT <b>c/g</b> TGCCAT	Ser86Cys	Atacameños	46 (100)	0	0	0
			Chilean	111 (100)	0	0	0
			European	124 (100)	0	0	0
Exon 4	ACTATG <b>c/a</b> TGGCCT	Ala140Asp	Atacameños	42 (91.3)	4 (8.7)	0	0.043
			Chilean	67 (60.4)	40 (36.0)	4 (3.6)	0.216
			European	45 (36.3)	59 (47.6)	20 (16.1)	0.399
	TAGAGG <b>agg/-</b> TAATTA	Glu155del	Atacameños	46 (100)	0	0	0
			Chilean	108 (97.3)	3 (2.7)	0	0.013
			European	119 (96.0)	5 (4.0)	0	0.020
Exon 6	ATGAAG <b>g/a</b> AAGATC	Glu208Lys	Atacameños	46 (100)	0	0	0
			Chilean	110 (99.1)	1 (0.9)	0	0.004
			European	119 (96)	5 (4.0)	0	0.020
	CTGAGG <b>c/t</b> CTGTGA	Ala236Val	Atacameños	43 (93.5)	3 (6.5)	0	0.033
			Chilean	109 (98.2)	2 (1.8)	0	0.009
			European	124 (100)	0	0	0

**Table 3 Haplotypes found in the groups and their estimated frequencies**

Haplotypes found in the groups	N° individuals observed for each haplotype (EM frequencies - CI 99%)		
	Atacameños	Chilean	European
1. GGC/ S86/ A140/ E155/ E208/ A236	37 (0.880)	64 (0.674)	37 (0.436)
2. GGCdel/ S86/ A140/ E155/ E208/ A236	2 (0.043)	0 (0.009)	6 (0.143)
3. GGC/ S86/ A140/ E155/ E208/ V236	3 (0.033)	1 (0.007)	0
4. GGCdel/ S86/ D140/ E155/ E208/ A236	3 (0.0217)	41 (0.120)	70 (0.258)
5. GGC/ S86/ D140/ E155/ E208/ A236	1 (0.0217)	1 (0.091)	5 (0.130)
6. GGC/ S86/ A140/ E155del/ K208/ A236	0	1 (0.002)	1 (0.004)

**Table 4. The specific activity of the 236Ala and 236Val isoforms of GSTO1-1 with a range of substrates.**

Activity / Substrate	236Ala (normal)	236Val (variant)
<b>Thioltransferase</b>		
hydroxyethyl disulfide	2.8 ± 0.042	0.32 ± 0.004
<b>Dehydroascorbate reductase</b>		
dehydroascorbate	0.22 ± 0.016	0.08 ± 0.017
<b>Methylarsonate reductase</b>		
monomethylarsonate(V)	0.32 ± 0.035	0.1 ± 0.008
dimethylarsinic acid(V)	0.16 ± .025	0.03 ± 0.015
<b>Phenacylglutathione reductase</b>		
S-(phenacyl)glutathione	15.6 ± 0.37	2.6 ± 0.09
S-(2,4-dichlorophenacyl)glutathione	12.1 ± 0.5	2.5 ± 0.23
S-(4-nitrophenacyl)glutathione	168.6 ± 6.3	28.7 ± 0.58

All values are expressed as  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  at 37°C, mean  $\pm$  SD, N = 3

**Table 5. Kinetic parameters for the 236Ala and 236Val isoforms of GSTO1-1 with S-(4-nitrophenacyl)glutathione**

	$k_{cat}$ ( $\text{S}^{-1}$ )	$K_m^{4\text{-NPG}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat} / K_m$ ( $\text{M}^{-1}.\text{S}^{-1}$ )
Ala236	84.1 ± 3.6	20.9 ± 3.9	4.0 x 10 <sup>6</sup>
Val236	11.6 ± 0.36	8.5 ± 0.2	1.4 x 10 <sup>6</sup>

All reactions used 2-mercaptoethanol as a reducing substrate.

The kinetic constants  $\pm$  SD, were determined from triplicate rate determinations at 5 substrate concentrations as described in the text.

## Figure Legends

### Figure 1

Stability of GSTO1-1 variants at 45°C.

■, GSTO1-1; ○, GSTO1-1 Val236.

### Figure 2

Histogram showing the number of individuals with varying percentages of urinary inorganic arsenic.

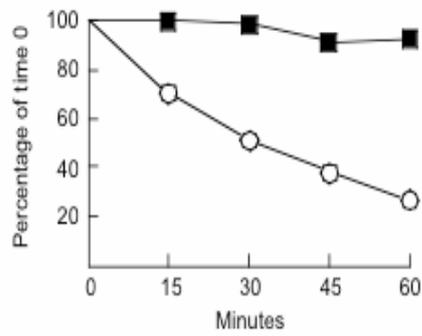
### Figure 3

Plots of the percent inorganic arsenic, against total urinary arsenic. Panel A, all 205 Chilean males in the study. Panels B-C highlight the different genotypes. Panel B, □ Val236 heterozygotes, ◇ wild type homozygotes.. Panel C, □ Glu155del,Lys208 heterozygotes, ◇ wild type homozygotes. Panel D, □ Asp140 homozygotes, ● Ala140Asp heterozygotes, ◇ wild type homozygotes.

### Figure 4

A) Crystal structure of GSTO1-1, illustrating the region around residue Ala236 (yellow spheres). The residues contacting Ala236 are shown. B) Model of GSTO1 Val236, showing Val236 (yellow spheres) and surrounding residues.

**Figure 1**



**Figure 2**

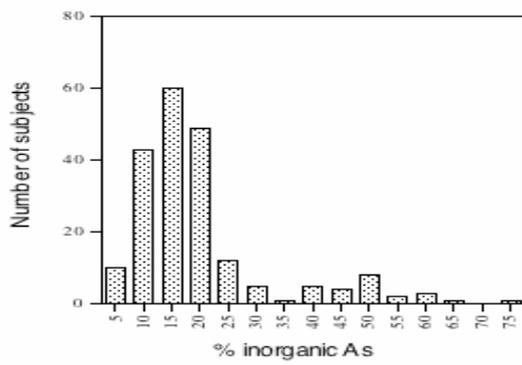


Figure 3

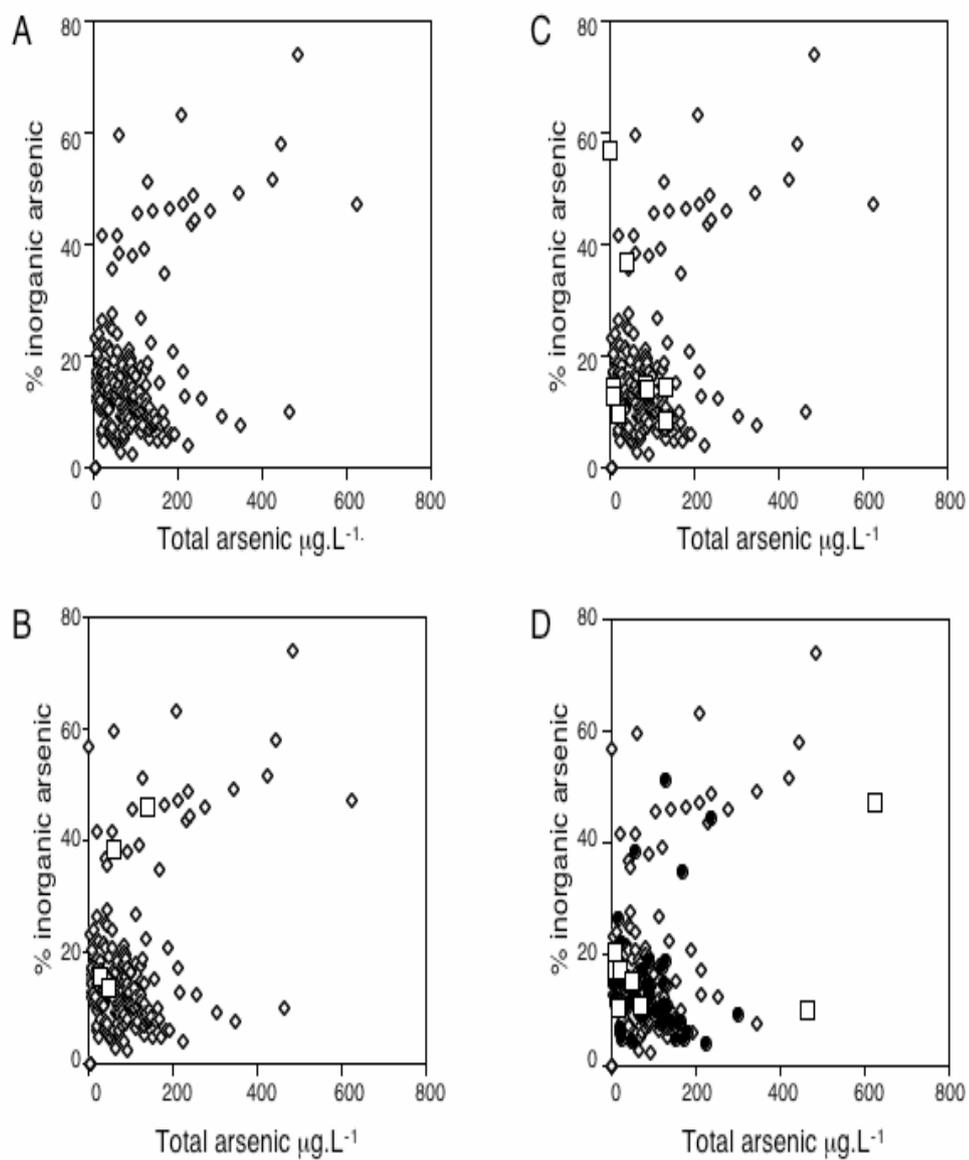
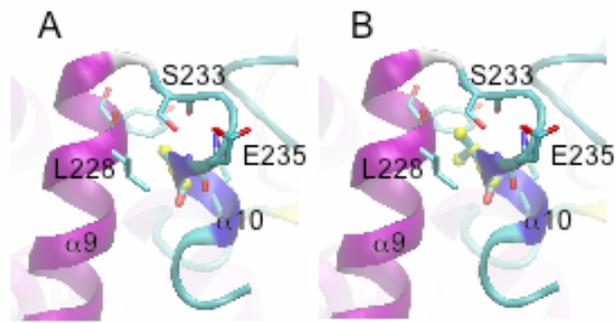


Figure 4



## **Role of GSTO1 and GSTO2 in arsenic toxicity**

Leiliane Paiva<sup>1</sup>, Amadeu Creus<sup>1</sup> and Ricard Marcos<sup>1,2</sup> \*

<sup>1</sup>*Group of Mutagenesis, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain.*

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

\*Corresponding author. Ricardo Marcos, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Mutagènesi, Edifici Cn, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain.

E-mail: [ricard.marcos@uab.es](mailto:ricard.marcos@uab.es)

**Abstract**

Contamination of environmental water resources with arsenic represents a major health problem for some countries, since increased levels of arsenic have proved to be a risk factor in cancer incidence. Two members of the new identified Omega class glutathione S-transferases (GSTO1 and GSTO2) have been proposed to play an important role in cellular homeostasis, mediating the arsenic reduction pathway. Despite significant progress has been made in the study of GSTOs expression and pharmacokinetics, the function of these enzymes in protecting living organisms from invasion of xenobiotics, in particular arsenic, is under discussion. Two cell lines with different expression levels of GSTO1 have been used to evaluate the cytotoxic response of various arsenic compounds. In addition, depletion of the GSTO1 and GSTO2 levels with siRNA has also been used. Reduction of oxidative stress by *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) indicates that, with the exception of DMA<sup>V</sup>, the other arsenic compounds induce oxidative damage that affect more significantly the cell line with higher expression of GSTO1. Results do not show significant variations in toxicity according to the different expression levels, which would indicate a low role of these enzymes in enzyme metabolism/toxicity.

*Keywords:* GSTO1; GSTO2; Arsenic toxicity; RNAi

## Introduction

Long term exposure to arsenic, via drinking water, has been related to a variety of health concerns including several types of cancer, cardiovascular diseases, diabetes and neurological disorders (Basu et al., 2001; Morgan, 2001; Rossman, 2003). Inorganic arsenic uptake supposes its internal biotransformation, including redox transformation between penta- and trivalent states ( $\text{As}^{\text{V}}$ , arsenate and  $\text{As}^{\text{III}}$ , arsenite), reduction and methylation, as well as the biosynthesis of organoarsenic compounds. These steps lead to the excretion in the urine of both inorganic species and organic methylated metabolites, such as MMA (monomethyl) and DMA (dimethyl) forms (Vahter, 2002). Although biotransformation was initially considered as a detoxification mechanism, further studies have demonstrated that trivalent methylated arsenic metabolites are more cytotoxic and genotoxic than the corresponding trivalent inorganic species (Yamanaka et al., 1997; Aposhian et al., 1999; Thomas et al., 2001; Cohen et al., 2002; Hughes, 2002; Mandal and Suzuki, 2002; Kligerman et al., 2003). In this biotransformation pathway, oxidative damage involving reactive oxygen species (ROS) production is an important mechanism to be considered as a component of the carcinogenicity of arsenic compounds (Kitchin and Ahmad, 2003; Valko et al., 2006).

Glutathione S-transferase enzymes (GSTs) catalyze the conjugation of glutathione (GSH) to a wide range of electrophilic compounds including chemical carcinogens, therapeutic drugs and products of oxidative stress (Board et al., 2000; Townsend and Tew, 2003; Whitbread et al., 2003). The Omega class of cytosolic GSTs (GSTOs) has some structural and functional characteristics not shared with other GSTs, and it has been recently discovered to contain two functional members in humans: GSTO1 and GSTO2 (Board et al., 2000; Whitbread et al., 2003). GSTO1 was previously identified as the human monomethylarsonic acid reductase ( $\text{MMA}^{\text{V}}$  reductase), showing dehydroascorbate

and thioltransferase activities. In addition, GSTO1 has shown to modulate the function of the ryanodine receptor calcium release channels (Yin et al., 2001; Schmuck et al., 2005). Both human *GSTO1* and *GSTO2* genes contain 6 exons and are localized at chromosome 10, separated by 7.5 Kb. The GSTO1 is a protein of 27.5 kDa with a higher expression at nucleus and cytoplasmic regions of a wide range of tissues. The widespread expression of GSTO1 suggests that it exerts an important function in the cellular metabolism (Board et al., 2000). *GSTO2* encodes a protein of approximately 28 kDa sharing 64% homology with *GSTO1*. Expression of GSTO2 appears to be less abundant in comparison with GSTO1; however, it has been detected in a variety of tissues including liver, kidney, skeletal muscle and prostate, with a maximum expression in testis (Whitbread et al., 2003). In addition, genetic polymorphisms of *GSTOs* have been associated with the development of some types of cancer and with the age-at-onset of both Alzheimer's and Parkinson's diseases (Marahatta et al., 2005; Schmuck et al., 2005). From all these GSTO1/GSTO2 properties, it is easy to assume that these enzymes have a significant function in maintaining cell homeostasis, playing an important role as an antioxidant system.

GSTO1 is the main mediator in the arsenic reduction pathway and, consequently, it is considered to be the rate limiting factor for the arsenic metabolism (Zakharyan et al., 1999). Although GSTO2 has lower DMA<sup>V</sup> reductase activity, in comparison with GSTO1, both enzymes seem to play a role in arsenic metabolism (Schmuck et al., 2005). Despite the toxic effects of arsenic, it is used in anti-cancer therapy. Thus, arsenic trioxide (ATO) has shown to be effective in the treatment of different tumours, including acute promyelocytic leukaemia (McCollum et al., 2005). The mechanisms underlying the paradoxical effects of arsenic are not clearly understood but many possible modes of action have been suggested, including influence on signalling pathways, mitotic arrest, apoptosis and induction of oxidative stress (Liu et al., 2003; McCollum et al., 2005). In this context,

the different expression of Omega class enzymes, like other GSTs, could be an important parameter involved in the individual adverse reactions observed after arsenic trioxide therapy (Schmuck et al., 2005).

Recently, in an *in vivo* study using knockout mice, it has been demonstrated that other enzymes than GSTO can modulate each step of the inorganic arsenic biotransformation (Chowdhury et al., 2006). In this context, the present study tries to add more information about if GSTO1 and GSTO2 expression does modulates arsenic toxicity. To cover such objective, two cell lines expressing different levels of GSTO1 have been treated with different arsenic compounds. In addition, the role of GSTO1 was also evaluated by depleting GSTO1 levels by siRNA.

## Materials and methods

### *Cell culture and reagents.*

The human lung SV40 immortalized MRC5 and the human bladder SW800 cell lines were used. MRC5 was cultured in RPMI 1640 medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 1% of antibiotics (penicillin and streptomycin) and 15% of heat-inactivated fetal bovine serum. SW800 was growth in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM)-F12 supplemented with 10% FCS at 37° C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. Sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>, As<sup>III</sup>), sodium arsenate (Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, As<sup>V</sup>), arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ATO), monomethylarsonic acid (CH<sub>5</sub>AsO<sub>3</sub>.Na, MMA<sup>V</sup>), dimethylarsinic acid ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>As(O)OH, DMA<sup>V</sup>), N-acetyl-L-cysteine (NAC), actinomycin D (ACTD), cycloheximide (CHX) and thymidine (Thym) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

### *Cell viability assays.*

Exponentially growing cells were seeded in 96 wells ELISA microtiter plates, at a density of 2000 cells, in a final volume of 100 µL culture medium per well. Cells were allowed to grow for 24 h and then were treated with different concentrations of each compound. After incubation for 21 h, XTT reagent was added to each well and incubated for 3 h more, according to the Cell Proliferation KitII (XTT) manufacturer's manual (Roche, Basel, Switzerland). After that, optical density ABS values were measured at 490 nm using a microplate ELISA reader to calculate inhibition rate for cell viability and, accordingly, the IC<sub>50</sub>. At least, three independent experiments were carried out per concentration for each compound. Eight wells per each arsenic compound have been scored in each experiment.

*RNA interference.*

RNA interference experiments were conducted as described (23). Shortly, cells were transfected with either scrambled RNA (scRNA) or three designed sets of GSTO siRNA primers (UGCAGUGGUGCAAUCAUGGdTdT; CAUGGCUCACUGCAACCUdTdT; GCCACUGUACUCCAGUCUGdTdT; Sigma-Proligo) by Lipofectamin2000 transfection reagents (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Transfection was carried out twice with an interval of 24 h. After the second transfection, cells were either harvested to prepare lysates or processed to arsenic treatment. At the end of the treatment period, the number of viable cells was determined by XTT assay as described above.

*Western blotting.*

Cell lysates were prepared in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5/150 mM NaCl/1% Triton X-100/1 mM phenyl methylsulfonyl fluoride, and 1 mg/mL each of leupeptin, pepstatin, antipain and 1mM sodium orthovanadate. Proteins (50 mg) from each lysate were separated by SDS-PAGE and transblotted or dot-blotted onto Immobilon P membranes. Blots were stained with GSTO1 antiserum (1:500) or GSTO2 antiserum (1:500), kindly provided by Dr. P. Board (JCRMS, Canberra, Australia) and antiP53 (1:200), anti-GAPDH (1:200) and anti-PARP (1:500) (all from Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Primary antibodies were detected by anti-rabbit (1:5000) or anti-mouse (1:2500) IgG coupled to horseradish peroxidase secondary antibodies (Sigma) and then visualized by using a chemiluminescence kit (Immun-Star HRP, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Loading of protein was monitored by reprobing stripped membranes with anti GADPH (Santa Cruz Biotechnology) or anti  $\beta$ -actin antibody (Oncogene Science, Cambridge, MA, USA).

*Statistical analysis.*

Specific differences in sensitivity to arsenic compounds between cell lines, treated or untreated with siRNA, were examined by the t-test using the SPSS version 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software. All experiments have been performed in triplicate. To quantify scanned dot-blot results, the TotalLab1.1 program was utilized after digitizing.

**Results***Characterization of GSTO1 and GSTO2 expression in MRC5 and SW800 cell lines*

To determine the expression of GSTO1 and GSTO2 in the selected cell lines, Western blot methodologies were used. Results revealed high levels of GSTO1 basal expression in MRC5, in comparison with SW800 bladder cancer cells, that present a very low basal expression (Fig.1A). After stripping and reprobing the same blot with GSTO2 anti-serum, we could show that both cell lines moderately express GSTO2 protein. Normalization of GSTO1 and GSTO2 signals was performed after reprobing the blot with antibodies to GAPDH (Fig.1B) or  $\beta$ -actin (Fig.1C). The results show that GSTO1 expression differs between lines, although GSTO2 expression is quite homogeneous in both cell lines.

*Different arsenic compounds have different cytotoxic effects*

MRC5 and SW800 cell lines were treated with different concentrations of the different selected arsenic compounds and the inhibition of cell proliferation was monitored using the XTT assay (Fig. 2). As expected, MMA<sup>V</sup> and DMA<sup>V</sup> are less toxic than the other compounds and, consequently, they were tested at mM doses, while the other compounds were tested at  $\mu$ M doses. Although at the highest dose tested some statistical differences between cells lines were observed, the general pattern does not seem to indicate that the cytotoxic effect on MRC5 is different than in SW800 cells.

---

*Arsenic produces oxidative damage*

To discriminate the effect of oxidative stress in arsenic cytotoxicity, the XTT assay was carried out using a specific inhibitor (NAC) to eliminate the damage produced by oxidative species. NAC inhibitor alone did not reveal any cytotoxicity in both cell lines, even at the higher (10mM) dose tested (data not shown). Both cell lines have been treated with a range of arsenic concentrations, from the different compounds, in the presence or absence of 5 mM NAC (Figs. 3 and 4). With the exception of DMA<sup>V</sup>, the other compounds showed a low dose range where oxidative stress overlaps with cytotoxic effects. This would indicate that two different mechanisms of response can be present in the cells, depending on the arsenic concentration. SW800 cells seem to be more resistant than MRC5 cells since the toxicity threshold is always reached at lower arsenic concentrations.

*Depletion of GSTO1 and GSTO2 by siRNA and arsenic toxicity*

To add more information on the role of GSTO1 and GSTO2 into arsenic toxicity, RNA interference experiments to deplete the level of GSTO1 and GSTO2 expression were carried out in MRC5 cells. Thus, a set of RNA oligonucleotides directed against homologous sequences of GSTO1 and GSTO2 were designed. Transfection of MRC5 cells for two times, with the complete set of 3 oligonucleotides, and monitoring of the level of RNA and protein expression two days after transfection was carried out. Western blot analysis of the corresponding samples showed significant (80%) reduction of GSTO1 expression after day 2 of transfection (Fig. 5A, B).

After GSTO1 depletion, cells were treated with the selected arsenic compounds and assayed for toxicity. Results are indicated in Fig. 6, indicating that non-significant differences in toxicity were observed between depleted and non-depleted cells for any of the arsenic compounds tested. This would suggest that GSTO1 and GSTO2 do not seem to play an important role in arsenic toxicity in our study conditions.

## Discussion

Inorganic arsenic exposure, mainly via drinking water, has proved to be a risk factor in cancer incidence (Basu et al., 2001; Mandal and Suzuki, 2002). Inorganic arsenic is internally biotransformed via reductions and methylations. These steps lead to the excretion in the urine of both parent inorganic species and organic methylated metabolites, such as MMA (monomethyl) and DMA (dimethyl) compounds (Vahter, 2002). Understanding the role of enzymes needed for arsenic biotransformation is a challenge for modern toxicology.

Among others, glutathione S-transferase enzymes play a pivotal role in cellular detoxification, catalyzing conjugation of their thiol groups to the electrophilic centers of insoluble chemicals, hence helping them to be excreted from the organism (Boylan and Chasseaud, 1969). Recently, a new class of GST (Omega GST, GSTO) has been discovered, possessing properties unlike those of the other GSTs (Board et al., 2000). Two members of this class, GSTO1 and GSTO2, catalyze monomethyl arsenate reduction, the rate-limiting stage of arsenic transformation (Schmuck et al., 2005; Mukherjee et al., 2006). Different polymorphisms of *GSTO1* and *GSTO2* genes have been identified among various ethnic groups that would point their functionally important role (Mukherjee et al., 2006).

Although significant progress has been made in the study of GSTOs expression and pharmacokinetics, it is still uncertain their role in protecting living organisms from xenobiotics, mainly arsenic compounds. GSTO1 and GSTO2 proteins have been already characterized in a wide range of human tissues (Yin et al., 2001; Cohen et al., 2002; Townsend and Tew, 2003) and, although its role in arsenic metabolism has been proposed, there is a lack of studies evaluating its real role in arsenic toxicity modulation. It has been extensively reported that arsenic trivalent species are more toxic than pentavalent ones

(Zakharyan et al., 1999; Yin et al., 2001; Liu et al., 2003; Whitbread et al., 2003; Marahatta et al., 2005; McCollum et al., 2005; Schmuck et al., 2005) and, since GSTO1 and GSTO2 have been suggested to transform pentavalent arsenic to its trivalent form (Zakharyan et al., 1999; Schmuck et al., 2005; Mukherjee et al., 2006), it can be hypothesized that cells expressing lower levels of GSTO1 and GSTO2 should reveal lower cytotoxic response when treated with pentavalent rather than trivalent arsenic chemicals. On the other hand, trivalent inorganic arsenic forms should have no or little dependence on the level of GSTO expression. Thus, in our work we attempted to relate the expression level of GSTO1 and GSTO2 to the cytotoxic response that various arsenic compounds might have during cell metabolism.

We must keep in mind that GSTO1 and GSTO2 are bifunctional enzymes with a certain degree of unclear properties. It has been previously reported that GSTs protect cells from drug-induced apoptosis (Mahajan et al., 2005; Sharma et al., 2006), and that endogenous over expression of GST may result in a better resistance to alkylating agents in some cell lines (Cnubben et al., 1998; Xie et al., 2005). In addition, there are studies showing GSTOs involvement in triggering apoptosis (Wang et al., 2005); therefore, it is important to position GSTO1 and GSTO2 roles in the response towards arsenic toxicity.

NAC treatment has significantly reduced the toxicity of the arsenic compounds, which would confirm the induction of oxidative damage by the arsenic compounds. The lack of effect of NAC in front of DMA<sup>V</sup> treatments seems to indicate that this compound has little effect in the induction of oxidative damage. These results suggest that, for DMA<sup>V</sup>, the arsenic toxicity *per se* overlaps with oxidative stress induction. It must be stressed that for the other arsenic compounds, cells with low GSTO1 (SW800) expression were more resistant, since oxidative damage was always induced at higher concentrations. These data showing that low GSTO1 expression is linked to a high tolerance to arsenic, measured as

induction of oxidative damage, can be important in the case of human exposure. Thus, people living in areas with high levels of pollution, or people therapeutically treated with arsenic trioxide, may have different risk according to their GSTO1 expression. In this context, genetic polymorphisms affecting such enzyme expression would be linked to high/low risk of deleterious effects of arsenic. One should remember, however, that more unknown factors can influence GSTO activity and, therefore, more detailed information on the cellular redistribution of GSTO1 and GSTO2 upon arsenic exposure is needed to make out the actual role of GSTO1 and GSTO2 in arsenic biotransformation and its role on the protection against oxidative stress induction.

Although cells expressing low levels of GSTO1 (SW800) seemed to have a tendency to present low cytotoxic response to the  $As^V$  and  $MMA^V$  forms of arsenic (Fig. 2), these results were not supported for the data obtained when GSTO1 protein expression was depleted by siRNA, although only a modest down regulation of GSTO1 was achieved. Thus, in general, different expression of GSTO1 and GSTO2 did not seem to affect the toxic effects of the different arsenic forms assayed. This lack of effect can be interpreted in terms of the substitutive role of other GSTs. Thus, taking into account the overlapping function of the different GSTs, the possible effects induced by the reduction in the expression of one enzyme (GSTO1) can be balanced by the expression of other equivalent enzymes (GSTO2). These conclusions would agree with the *in vivo* results recently reported in knockdown mice where other enzymes, in addition to GSTO, seem to be involved in the different biotransformation steps of inorganic arsenic metabolism (Chowdhury et al., 2006).

**Acknowledgments**

We are grateful to Dr. A. Lyakhovich (UAB) for his expert assistance in the study design, in the performance of RNAi experiments, and for helpful discussions on this manuscript. We are also indebted to Dr. F.X. Real (Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona) for supplying bladder cancer lines and to Dr. P. Board (JCRMS, Canberra, Australia) for GSTO1/GSTO2 antiserum and valuable discussions on this topic. This work was partially supported by the Generalitat de Catalunya (CIRIT, 2005SGR-00136). The first author was supported during this work by a doctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya.

**References**

- Aposhian, H.V., R.A. Zakharyan, E.K. Wildfang, S.M. Healy, J. Gailer, T.R. Radabaugh, G.M. Bogdan, T.A. Powell and M.M. Aposhian. How is inorganic arsenic detoxified? In: Chapell, W.R., Abernathy, C.O., Calderón, R.L. (Eds.), *Arsenic Exposure and Health Effects*. Elsevier Science, San Diego, (1999) pp: 289-297.
- Basu, A., J. Mahata, S. Gupta and A.K. Giri. Genetic toxicology of paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat Res* **488** (2001) 171-194.
- Board, P.G., M.Coggan, G. Chelvanayagam, S. Easteal, L.S. Jermin, G.K. Schulte, D.E. Danley, L.R. Hoth, M.C. Griffor, A.V. Kamath, M.H. Rosner, B.A. Chrnyk, D.E. Perregaux, C.A. Gabel, K.F. Geoghegan, and J. Pandit. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem* **275** (2000) 24798-24806.
- Boylard, E. and L.F. Chasseaud. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol Biol* **32** (1969) 173-219.
- Chowdhury, U.K., R.A. Zakharyan, A. Hernández, M.D. Avram, M.J. Kopplin and H.V. Aposhian. Glutathione-S-transferase-omega [MMA(V) reductase] knockout mice: enzyme and arsenic species concentrations in tissues after arsenate administration. *Toxicol Appl Pharmacol* **216** (2006) 446-457.
- Cnubben, N.H., A.J. Rommens, M.J. Oudshoorn and P.J. Van Bladeren. Glutathione-dependent biotransformation of the alkylating drug thiotepa and transport of its metabolite monogluthionylthiotepa in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* **58** (1998) 4616-4623.
- Cohen, S.M., L.L. Arnold, E. Uzvolgyi, M. Cano, M. St John, S. Yamamoto, X. Lu and X.C. Le. Possible role of dimethylarsinous acid in dimethylarsinic acid-induced urothelial toxicity and regeneration in the rat. *Chem Res Toxicol* **15** (2002) 1150-1157.
- Hughes, M.F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* **133** (2002) 1-16.
- Kitchin, K.T. and S. Ahmad. Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol Lett* **137** (2003) 3-13.
- Kligerman, A.D., C.L. Doerr, A.H. Tennant, K. Harrington-Brock, J.W. Allen, E. Winkfield, P. Poorman-Allen, B. Kundu, K. Funasaka, B.C. Roop, M.J. Mass and D.M. DeMarini. Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of

- arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ Mol Mutagen* **42** (2003) 192-205.
- Liu, L., J.R. Trimarchi, P. Navarro, M.A. Blasco and D.L. Keefe. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. *J Biol Chem* **278** (2003) 31998-32004.
- Mahajan, S. and W.M. Atkins. The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cell Mol Life Sci* **62** (2005) 1221-1233.
- Mandal, B.K. and K.T. Suzuki. Arsenic round the world: a review. *Talanta* **58** (2002) 201-235.
- Marahatta, S.B., P. Punyarit, V. Bhudisawasdi, A. Paupairoj, S. Wongkham and S. Petmitr. Polymorphism of glutathione S-transferase Omega gene and risk of cancer. *Cancer Lett* **236** (2005) 276-281.
- McCollum, G., P.C. Keng, J.C. States and M.J. McCabe Jr. Arsenite delays progression through each cell cycle phase and induces apoptosis following G2/M arrest in U937 myeloid leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* **313** (2005) 877-887.
- Morgan, A. Health and Ecological Criteria Division. Exposure and health effects. Office of Water, Office of Science and Technology United States Environmental Protection Agency, Washington DC (2001) Chapter 3.
- Mukherjee, B., O.E. Salavaggione, L.L. Pellemounter, I. Moon, B.W. Eckloff, D.J. Schaid, E.D. Wieben and R.M. Weinshilboum. Glutathione S-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos* **34** (2006) 1237-1246.
- Rossman, T.G. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat Res* **533** (2003) 37-65.
- Schmuck, E.M., P.G. Board, A.K. Whitbread, N. Tetlow, J.A. Cavanaugh, A.C. Blackburn and A. Masoumi. Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Pharmacogenet Genomics* **15** (2005) 493-501.
- Sharma, A., B. Patrick, J. Li, R. Sharma, P.V. Jeyabal, P.M. Reddy, S. Awasthi and Y.C. Awasthi. Glutathione S-transferases as antioxidant enzymes: small cell lung cancer (H69) cells transfected with hGSTA1 resist doxorubicin-induced apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **452** (2006) 165-173.
- Thomas, D.J., M. Styblo, and S. Lin. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* **176** (2001) 127-144.

- Townsend, D. and K. Tew. Cancer drugs, genetic variation and the glutathione-S-transferase gene family. *Am. J. Pharmacogenomics* **3** (2003) 57-172.
- Vahter, M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* **181-182** (2002) 211-217.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.
- Wang, L., J. Xu, C. Ji, S. Gu, Y. Lv, S. Li, Y. Xu, Y. Xie and Y. Mao. Cloning, expression and characterization of human glutathione S-transferase Omega 2. *Int J Mol Med* 16 (2005) 19-27.
- Whitbread, A.K., N. Tetlow, H.J. Eyre, G.R. Sutherland and P.G. Board. Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* **13** (2003) 131-144.
- Xie, J., K. Shults, L. Flye, F. Jiang, D.R. Head and R.C. Briggs. Overexpression of GSTA2 protects against cell cycle arrest and apoptosis induced by the DNA inter-strand crosslinking nitrogen mustard, mechlorethamine. *J Cell Biochem* **95** (2005) 339-351.
- Yamanaka, K., H. Hayashi, M. Tachikawa, K. Kato, A. Hasegawa, N. Oku and S. Okada. Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics. *Mutat Res* **394** (1997) 95-101.
- Yin, Z.L., J.E. Dahlstrom, D.G. Le Couteur and P.G. Board. Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. *Histochem Cytochem* **49** (2001) 983-987.
- Zakharyan, R.A., F. Ayala-Fierro, W.R. Cullen, D.M. Carter and H.V. Aposhian. Enzymatic methylation of arsenic compounds. VII. Monomethylarsonous acid (MMA III) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit liver and human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **158** (1999) 9-15.
- Zhang, H.Y., Q. Du, C. Wahlestedt and Z. Liang. RNA interference with chemically modified siRNA. *Curr Top Med Chem* **6** (2006) 893-900.

**Legends:**

Fig. 1. GSTO1 and GSTO2 expression in different cell lines. Aliquots of cell lysates (SW800, lane 1; RT4, middle lane; MRC5, lane 2) were subjected to SDS-PAGE and Western Blot. SW800 and RT4 are two different human bladder cell lines (A). Levels of GSTO1 and GSTO2 proteins for MRC5 and SW800 cells were normalized according to  $\beta$ -actin (B) values.

Fig. 2. Proliferation inhibition after treatment with arsenic compounds. MRC5 or SW800 cells were treated with  $\text{As}^{\text{III}}$  (A),  $\text{As}^{\text{V}}$  (B),  $\text{MMA}^{\text{V}}$  (C),  $\text{DMA}^{\text{V}}$  (D) or  $\text{As}_2\text{O}_3$  (E) for 24 h. Each point represents mean values of at least 3 independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between control and arsenic treated cells (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ).

Fig. 3. Oxidative damage induced by arsenic treatment in SW800 cells treated with  $\text{As}^{\text{III}}$  (A),  $\text{As}^{\text{V}}$  (B),  $\text{MMA}^{\text{V}}$  (C),  $\text{DMA}^{\text{V}}$  (D) or  $\text{As}_2\text{O}_3$  (E). Treatments last for 24 h either in presence or absence of oxidative damage inhibitor (NAC). Each point represents mean values of at least 3 independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between control and arsenic treated cells (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

Fig. 4. Oxidative damage induced by arsenic treatment in MRC5 cells treated with  $\text{As}^{\text{III}}$  (A),  $\text{As}^{\text{V}}$  (B),  $\text{MMA}^{\text{V}}$  (C),  $\text{DMA}^{\text{V}}$  (D) or  $\text{As}_2\text{O}_3$  (E). Treatments last for 24 h either in the presence or absence of oxidative damage inhibitor (NAC). Each point represents mean values of at least 3 independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between control and arsenic treated cells (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

Fig. 5. siRNA depletion of GSTO1 and GSTO2. MRC5 cells have been transfected two times either with control (scrambled) RNA (scRNA) or with siRNA directed against GSTO1/2 gene (siRNA). Western blot analysis was performed to monitor depletion of GSTO1/2 protein level. Lane 1: scRNAi 1day treat/once; Lane 2: scRNAi 2days treat/once; Lane 3: scRNAi 2 days/twice; Lane 4: siRNA 1day treat/once; Lane 5: siRNA 2 days treat/once; Lane 6: siRNA 2 days/twice (A). Levels of GSTO1 and GSTO2 proteins were normalized according to GAPDH expression (B).

Fig. 6. Effect of GSTO1 and GSTO2 depletion, on cell proliferation, after treatment with arsenic compounds. MRC5 cells have been treated with  $As^{III}$  (A),  $As^V$  (B),  $MMA^V$  (C),  $DMA^V$  (D) or  $As_2O_3$  (E) compounds for 24 h after transfection with siRNA for GSTO1/2 or scrambled RNA (scRNA). All data represent the percent of inhibition of cell proliferation in control versus treated cells. Each point represents at least 2 independent experiments and the values are expressed as the mean  $\pm$  SD, as indicated by the bars.

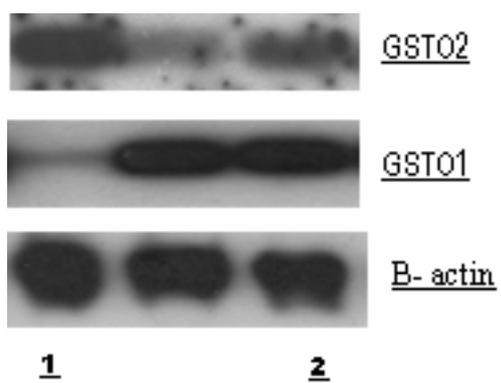
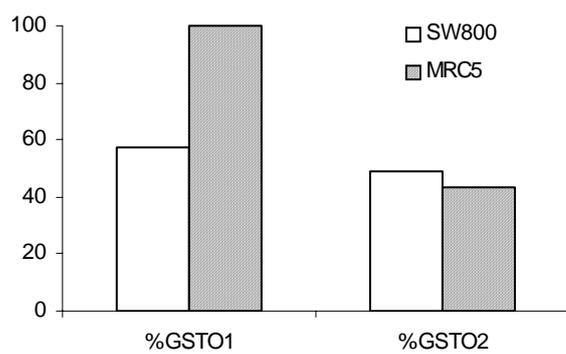
**A****B**

Fig. 1.

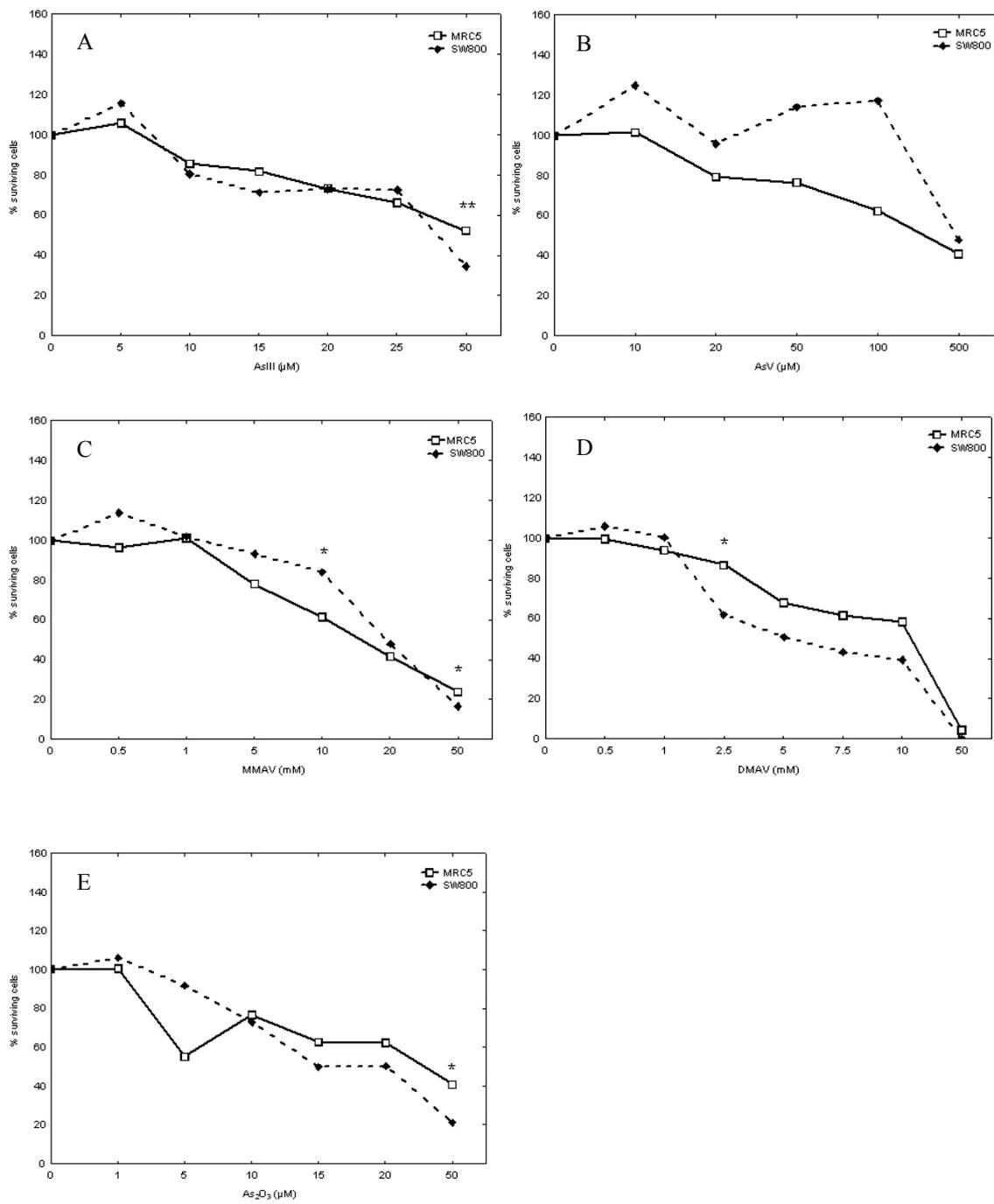


Fig. 2

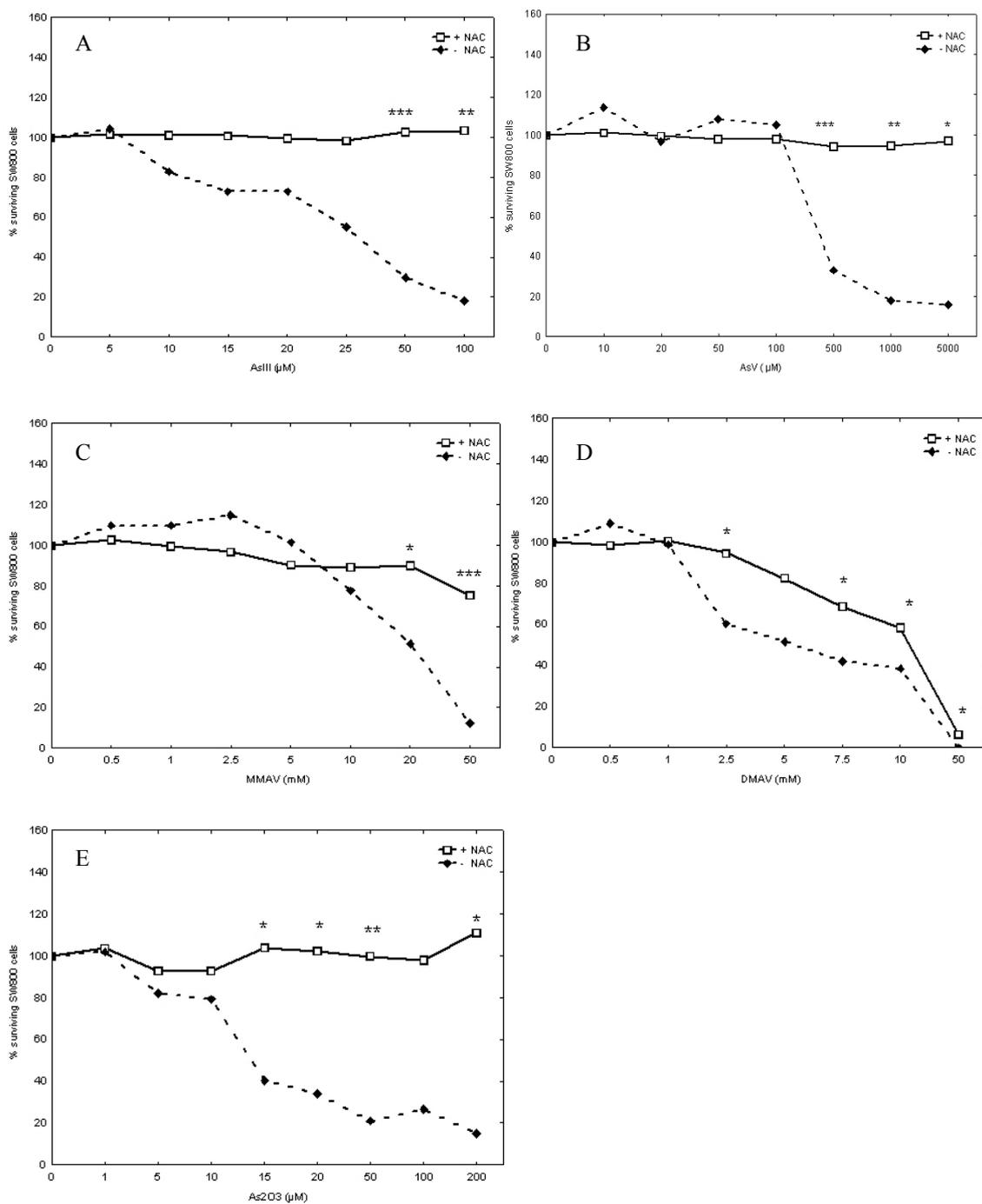


Fig. 3.

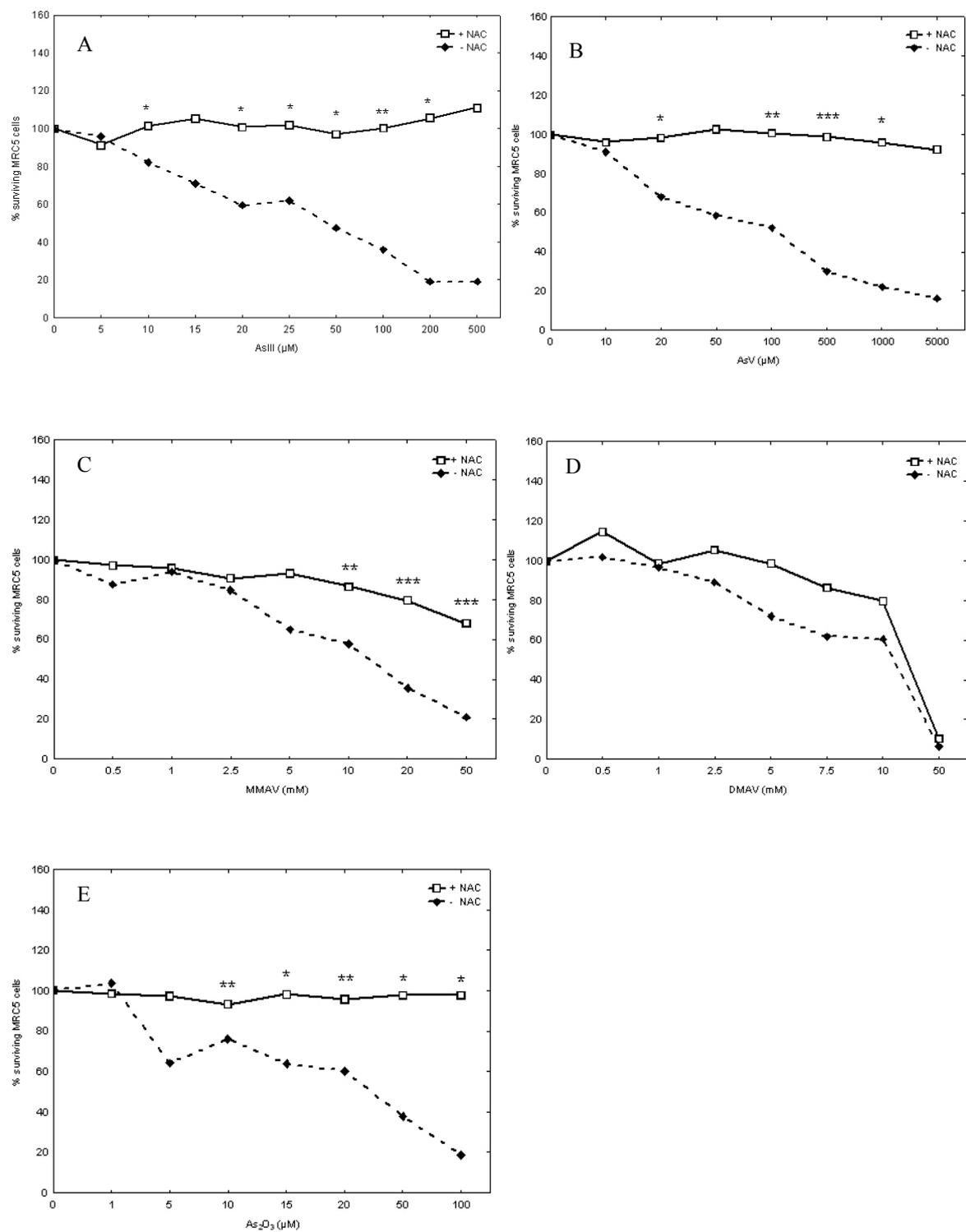


Fig. 4.

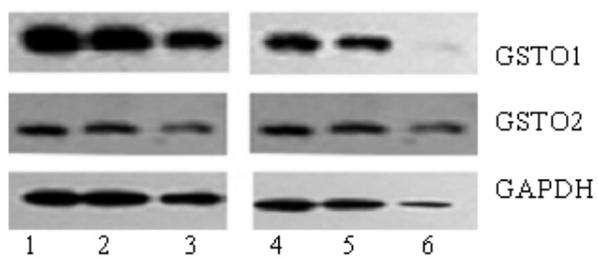
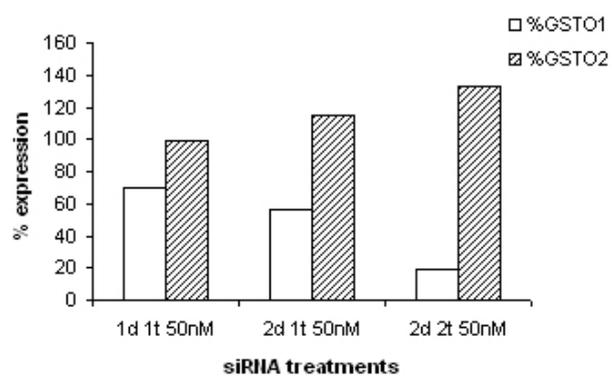
**A****B**

Fig. 5.

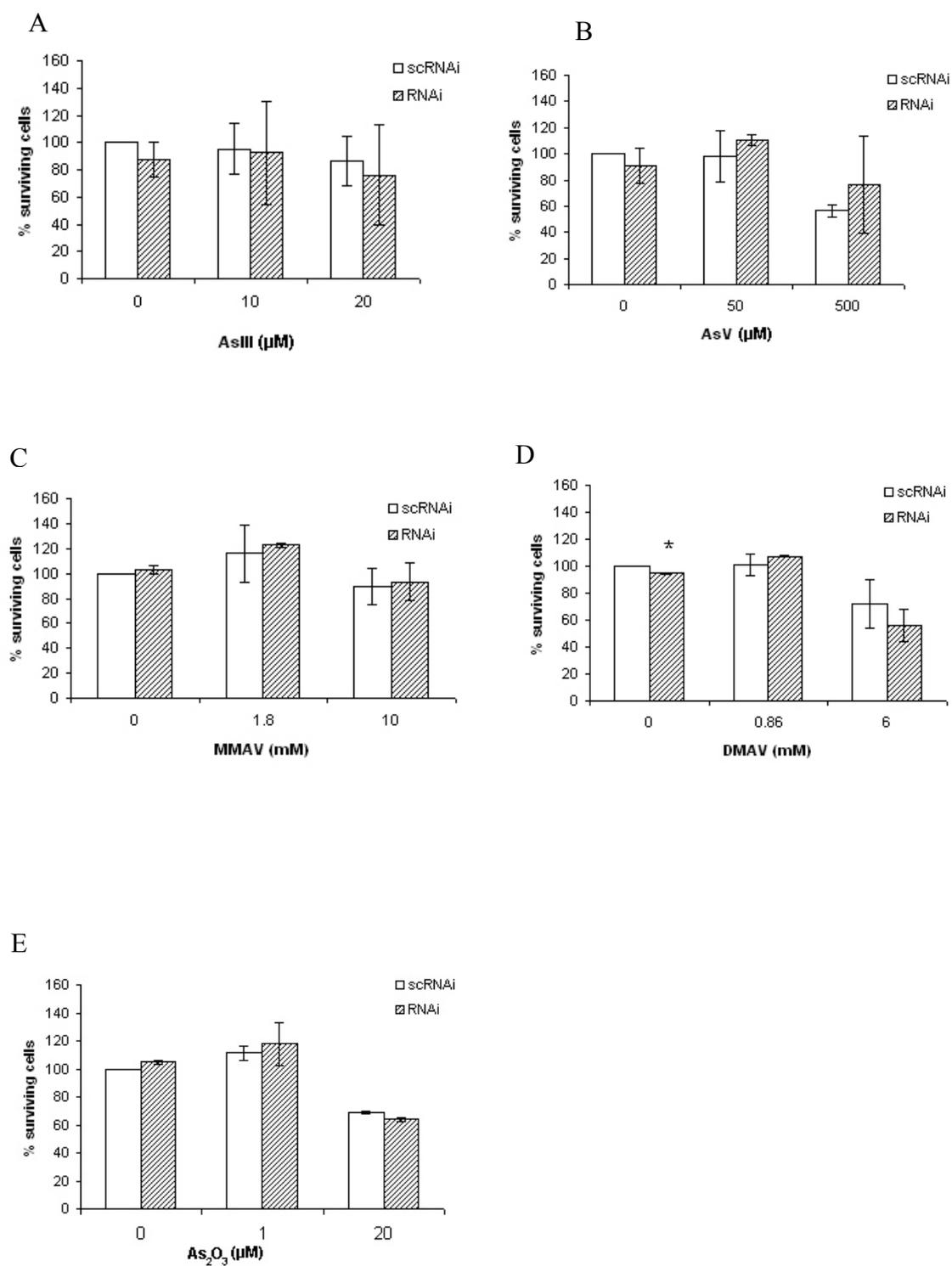


Fig. 6.