

Implicación de los factores nucleares
hepáticos en el proceso carcinogénico
mediado por el arsénico

Departamento de Genética y de Microbiología
Universitat Autònoma de Barcelona

Tesis Doctoral
Anna Pastoret Calderó
2012



Facultad de Biociencias
Departamento de Genética y de Microbiología
Unidad de Genética

Implicación de los factores nucleares hepáticos en el proceso carcinogénico mediado por el arsénico

Memoria presentada por ANNA PASTORET CALDERÓ, en el marco del programa de tercer ciclo de Genética de la Universitat Autònoma de Barcelona para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona

Director de Tesis

Director de Tesis

Autora

Dr. Ricard Marcos Dauder
Catedrático de Genética
UAB

Dra. Alba Hernández Bonilla
Profesora Lectora de
Genética
UAB

Anna Pastoret Calderó

Tabla de Contenido

RESUM.....	i
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Arsénico	3
1.1.1. Características generales del arsénico	3
1.1.2. Exposición humana al arsénico	5
1.1.3. Metabolización y transporte del arsénico y modulación del riesgo.....	9
1.1.4. Efectos en la salud humana debido a la exposición al arsénico	13
1.1.5. Efectos del arsénico en el hígado	15
1.1.6. La exposición crónica por arsénico y la diabetes	16
1.1.7. Mecanismos de acción del arsénico.....	19
1.2. Los factores hepáticos nucleares (HNFs) y su relación con la exposición al arsénico.....	23
1.2.1. El factor hepático nuclear 1 α (HNF1 α).....	25
1.2.2. El factor hepático nuclear 4 α (HNF4 α).....	26
1.2.3. El factor nuclear hepático 6 α (HNF6 α).....	29
1.2.4. El factor PXR (Receptor X pregnane).....	30
1.2.5. El factor FOXM1 (Proteína cabeza de horquilla M1).....	32
1.3. Indicadores utilizados para evaluar procesos tumorales.....	34
1.3.1. Desdiferenciación y marcadores de diferenciación hepática: ALDOB, PEPCK2 y Cyp1 α	34
1.3.2. Transición epitelio-mesénquima (EMT) y marcadores Slug y Snail	34
1.3.3. Remodelación de la matriz celular y secreción de MMP-2 y MMP-9	36
1.3.4. Marcadores de células madre cancerosas (CD90 y CD133) y de pluripotencia (Oct3/4, c-Myc, Lin28 y Notch2).....	37
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
3.1. La línea HepG2	45
3.2. Análisis de la cinética de crecimiento de las HepG2, mediante la realización de una curva de crecimiento.....	45
3.3. Ensayos de viabilidad usando diferentes métodos.....	45
3.4. Extracción de RNA y tratamiento con DNAasa	48

3.5.	Análisis de la expresión, a nivel del mensajero, mediante RT-PCR en dos pasos	49
3.6.	Preparación de las concentraciones de arsénico y tratamiento de las células HepG2.....	50
3.7.	Exposición prolongada <i>in vivo</i> de arsénico.....	52
3.8.	Análisis de las especies de arsénico presentes en las células y en el medio, tras la exposición de las células HepG2 a arsenito sódico	52
3.9.	Análisis del ciclo celular y de la apoptosis	52
3.10.	Síntesis de cDNA	55
3.11.	Análisis de la expresión a nivel del mensajero, mediante la PCR a Tiempo Real	55
3.12.	Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot.....	57
3.13.	Extracción de proteína a partir del hígado de hámster	59
3.14.	Estudio de la adaptabilidad de las células HepG2 a la toxicidad del arsenito sódico	60
3.15.	Utilización de la técnica de zimograma	60
3.16.	Análisis de la producción de glucosa y respuesta a la insulina por parte de las células tratadas crónicamente con arsenito sódico.....	61
3.17.	Producción de plásmidos en <i>E.coli</i> y su purificación.....	62
3.18.	Transfección de las células HepG2 con HNF4 α	62
3.19.	Estudio de la expresión de HNF4 α posteriormente a la transfección de las células con HNF4 α y exposición de éstas al arsenito sódico	63
3.20.	Estudio de la viabilidad celular en las células transfectadas con HNF4 α y expuestas al arsenito sódico.....	63
3.21.	Análisis estadístico.....	64
4.	RESULTADO	65
4.1.	La línea celular HepG2 es un buen modelo para el estudio <i>in vitro</i> de los mecanismos de acción del arsénico	67
4.1.1.	Las células HepG2 expresan los principales transportadores del arsénico y la enzima clave para la metabolización del arsénico	67
4.1.2.	Análisis de las especies de arsénico presentes en las células y en el medio tras la exposición de las células HepG2 a arsenito sódico	68
4.1.3.	Análisis de la cinética de crecimiento de las HepG2 mediante la realización de una curva de crecimiento.....	70

4.2.	Efectos tóxicos del arsénico en la línea HepG2.....	70
4.2.1.	Estudios de toxicidad del arsénico.....	71
4.2.2.	La exposición de las células HepG2 a arsenito sódico induce la expresión de MT y de HMOX	73
4.2.3.	Efectos de dosis subtóxicas de arsenito sódico sobre el ciclo celular	74
4.2.4.	Efectos de dosis subtóxicas de arsenito sódico sobre la apoptosis.....	75
4.3.	Estudio de los distintos factores nucleares seleccionados para este estudio....	76
4.3.1.	Las células HepG2 expresan los factores nucleares hepáticos objeto de estudio	76
4.3.2.	La exposición aguda a altas dosis de arsenito sódico induce alteración en la expresión de los factores nucleares HNF1 α y HNF4 α	78
4.3.3.	Alteración de la expresión en exposiciones de 48 horas con dosis subtóxicas	79
4.4.	Papel del factor HNF4 α en la viabilidad celular frente al tratamiento con arsénico.....	82
4.4.1.	Sobreexpresión de HNF4 α al transfectar las HepG2 con pl-HNF4 α	82
4.4.2.	La transfección afecta a la viabilidad de las células HepG2	83
4.4.3.	La transfección nos permite recuperar los niveles de expresión del HNF4 α disminuido por el arsenito sódico.....	84
4.4.4.	La recuperación de la expresión de HNF4 α aumenta la viabilidad de las HepG2 frente al arsenito sódico	85
4.5.	Factores nucleares y exposición crónica al arsénico	87
4.5.1.	La exposición de las células HepG2 a dosis subtóxicas de arsenito sódico de forma crónica altera la expresión de HNF1 α y HNF4 α	87
4.5.2.	La alteración de la expresión de HNF1 α y HNF4 α es dependiente de la presencia de arsénico en el medio	91
4.5.3.	Las células HepG2 expuestas a dosis subtóxicas de arsenito sódico de forma crónica presentan adaptabilidad a este elemento	92
4.6.	Disminución de la expresión HNF4 α in vivo	93
4.7.	Efecto del arsénico en los procesos tumorales.....	94
4.7.1.	Las células expuestas de forma crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico presentan una disminución de la expresión de un conjunto de marcadores hepáticos (PEPCK2, ALDOB y Cyp1 α)	95

4.7.2.	Alteración de la expresión de Slain y Slug en las HepG2 expuestas de forma crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico	96
4.7.3.	Aumento de la actividad proteica de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) en las células expuestas de forma crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico	97
4.8.	Efecto del arsénico en la subpoblación de células madre de la línea celular HepG2.....	98
4.8.1.	Las HepG2 expuestas de forma crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico presentan una disminución de la expresión de CD90 y CD133.....	98
4.8.2.	Las células HepG2 expuestas de forma crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico presentan una disminución de la expresión de Lin28, c-Myc, Notch2 y Oct-3/4	99
4.9.	Alteración del metabolismo de la glucosa en las células HepG2 expuestas de forma crónica a una concentración subtóxica de arsenito sódico.....	101
5.	DISCUSIÓN.....	105
5.1.	La línea celular HepG2 es un buen modelo para el estudio <i>in vitro</i> de los mecanismos de acción del arsénico	107
5.2.	Efectos tóxicos del arsénico en la línea celular HepG2.....	109
5.3.	Relación entre distintos factores nucleares seleccionados y la exposición al arsénico.....	111
5.4.	Papel del factor HNF4 α en la viabilidad celular.....	113
5.5.	Factores nucleares y exposición crónica al arsénico	114
5.6.	Disminución de la expresión HNF4 α <i>in vivo</i>	116
5.7.	Indicadores del potencial carcinogénico del arsénico <i>in vitro</i>	117
5.8.	Efecto del arsénico en la subpoblación de células madre en la línea celular HepG2.....	120
5.9.	Alteración del metabolismo de la glucosa en las células HepG2 expuestas de forma crónica al arsenito sódico.....	122
6.	CONCLUSIONES.....	125
7.	BIBLIOGRAFÍA	129

ABREVIATURAS

ABC	Transportadores casetes de unión al ATP
ADP	Adenosín difosfato
ALDOB	Aldosa B
AQP	Acuaporinas
AML	Leucemia mieloide aguda
APL	Leucemia promielocítica aguda
As^{III}	Ácido arsenioso
As^V	Ácido ortoarsenio
AS3MT	Arsénico-3-metiltransferasa
ATF5	Factor de transcripción activador 5
ATO	Trióxido de arsénico
ATP	Adenosín trifosfato
ATRA-	Retinoico all-trans
BER	Reparación por escisión de bases
CoA	Coenzima A
CPT	Campotecina
CS	Células madre
CSC	Células madre cancerosas
Cyp1á	Citocromo P450 familia 1, subfamilia alfa
DD-PCR	PCR de exposición diferencial
DM	Diabetes Mellitus
DMA^{III}	Ácido dimetilarsinoso
DMA^V	Ácido dimetilarsónico
DMEM	Medio mínimo esencial Eagle's
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNasa	Nucleasa del DNA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA	Ensaño de inmunoabsorción ligado a enzima
EMT	Transición epitelio-mesenquima
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos
ERKs	Quinasa reguladora de señales extracelulares
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos
FOXM1	Proteína cabeza de horquilla M1
GBC	Cáncer de vesícula
GLUT	Transportadores de glucosa
GSH	Glutation
GSTO	Glutación-S-Transferasa Omega
HCC	Carcinoma Hepatocelular
HMOX	Hemo-oxigenasa
HNF1á	Factor nuclear hepático 1 alfa
HNF1â	Factor nuclear hepático 1 beta
HNF4á	Factor nuclear hepático 4 alfa
HNF6á	Factor nuclear hepático 6 alfa
HPLC-ICP-MS	"High Performance Liquid Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry".
HRP	"Horseradish peroxidase"
IARC	Agencia Internacional de Investigación del cáncer

JNK	Quinasa N-terminal c-jun
kDa	Kilo Dalton
L.F	Lipofectamina
LC₅₀	Dosis letal
MAPK	Proteína quinasa de actividad mitogénica
MEM	Medio mínimo esencial
MET-	Transición mesenquima epitelio
MMA^{III}	Ácido Monometilarsenoso
MMA^V	Ácido Monometilarsónico
MMC	Mitomicina C
MMP	Metaloproteinasas
MODY	Diabetes de adulto en la etapa infantil-juvenil
MT	Metalotioneína
mRNA	RNA mensajero
MRP	Proteínas resistentes a múltiples drogas
NEAA	Aminoácidos no esenciales
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
OPTIMEM	Medio reducido en suero (modificación del MEM)
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK2	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 2
PI	Ioduro de propidio
PI	Plásmido
PNP	Purina nucleótido fosforilasa
PXR	Receptor X pregnane
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Nucleasa del RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SAM	S-adenosil metionina
SDS-PAGE-	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
siRNA	RNA de interferencia
TGFá	Factor de crecimiento transformante alfa
TNF-á	Factor necrótico tumoral
UV	Radiación ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WHO	Organización de Salud Mundial
XTT	2,3-bis (2-metoxi-4nitro-5sufenil)-2H-tetrazoli-5-carboxinilida

RESUMEN

El arsénico inorgánico (i-As) es un metaloide tóxico que se encuentra en el medio ambiente y que afecta a millones de personas en todo el mundo. Se considera un compuesto carcinogénico siendo el hígado un órgano diana. Además de su efecto carcinogénico, está relacionado con un aumento de la prevalencia de la diabetes. Los factores nucleares 1 y 4 α (HNF1 α y HNF4 α) son miembros clave de la red de transcripción esencial para el mantenimiento de la arquitectura del hígado. Los cambios en la expresión de HNF1 α y HNF4 α están claramente asociados con el desarrollo de cáncer de hígado y de diabetes en humanos. En este trabajo, la línea celular hepática HepG2 y los hámsteres Golden Syrian han sido expuestos a dosis subtóxicas de arsenito sódico, dosis medioambientalmente relevantes (inferiores a 10 μ M *in vitro* y de 15 mg/L *in vivo*) con la finalidad de evaluar si el arsénico es capaz de comprometer la expresión de los factores nucleares hepáticos (HNFs). También, como medida de los efectos inducidos por el i-As se ha estudiado *in vitro* la expresión de varios marcadores de diferenciación hepática y el estado de metabolización de la glucosa. Los resultados muestran una disminución de la expresión de HNF1 α y HNF4 α cuando la línea celular HepG2 se expone al arsénico, momento en el que se observa: (i) adquisición de resistencia a la toxicidad/apoptosis, (ii) pérdida de las características específicas de tejido (disminución de la expresión de ALDOB, PEPCK y CYP1A2, inducción de la transición epitelio-mesenquima (EMT) y la hipersecreción de metaloproteinasas de matriz 2 y 9), (iii) fallo del mantenimiento del balance del programa de auto-renovación (desregulación de C-MYC, OCT3/4, LIN28 y NOTCH2) y (iv) desregulación del metabolismo de la glucosa. Concluimos que la disminución de la expresión de HNF1 α y HNF4 α inducida por el i-As bajo un escenario de exposición crónica puede jugar un papel central en el efecto del arsénico en el cáncer de hígado y en la diabetes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Arsénico

Hay más de 100 millones de personas en todo el mundo que se encuentran expuestas crónicamente a niveles de arsénico perjudiciales para la salud, siendo la situación particularmente dramática en el sud-este de Asia (Straif et al., 2009). Entre los principales efectos en la salud podemos encontrar un aumento en la incidencia de padecer varios tipos de cáncer junto con otros efectos no cancerosos como sería la diabetes (Ottles et al., 2010, Jomova et al., 2011). Por lo que su presencia de forma natural o antropogénica se ha considerado como un problema de salud importante en diversas regiones del mundo (Argentina, Bangladesh, Canadá, Chile, China, Estados Unidos, Finlandia, Hungría, India, México, Mongolia, Rumania, Taiwán y Vietnam) (IARC 2004b).

1.1.1. Características generales del arsénico

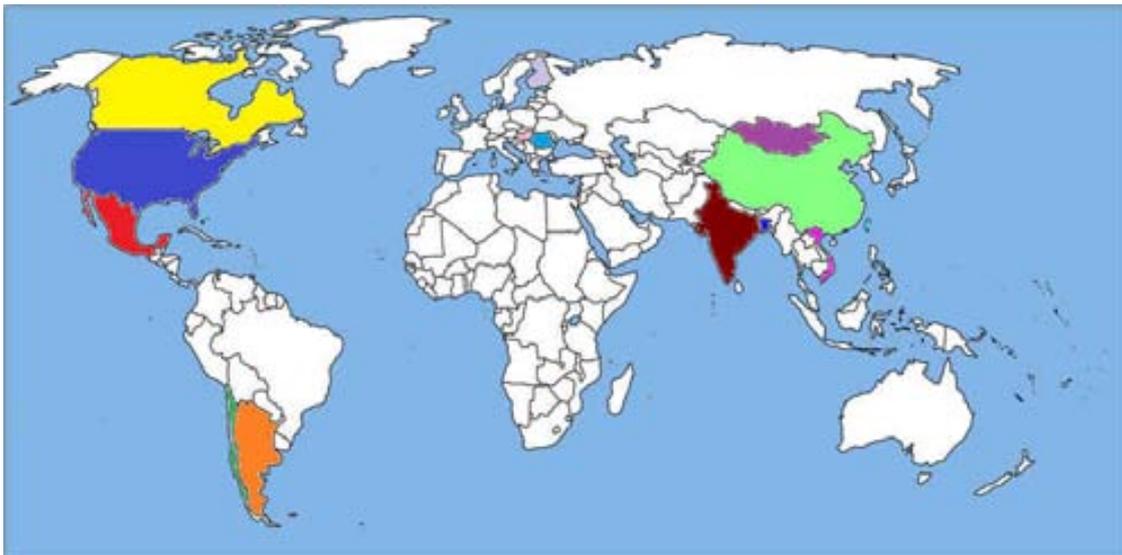
El arsénico es un metaloide que se encuentra comúnmente en el ambiente, tratándose del vigésimo elemento más común en la corteza terrestre (IARC 2004b).

Aunque en la mayoría de ambientes los niveles de arsénico son bajos y la exposición a éste no representa ningún riesgo para la salud, en algunas regiones del planeta las concentraciones de arsénico pueden llegar a ser muy elevadas suponiendo un riesgo para las personas que viven allí (Duker et al., 2005, Hughes et al., 2011).

Independientemente del origen, ya sea de modo natural (según las condiciones geológicas de la zona) o resultado de la actividad antropogénica (extracción minera, combustión de fueles, uso de plaguicidas, etc), las regiones más afectadas por niveles elevados de arsénico en el agua son algunas áreas del sur de Asia (Bangladesh e India), sud-oeste y oeste de Asia (China, Taiwán, Mongolia y Vietnam), América (Argentina, Canadá, Chile, México y USA) y Europa (Finlandia, Hungría y Rumania) (Figura 1) (IARC 2004b, Duker et al., 2005).

Para apreciar la toxicidad de este metaloide es bueno hacer un repaso de sus características químicas, que comparten propiedades de metales y de no metales. En el ambiente el arsénico se puede encontrar ya sea en forma inorgánica u orgánica, y con diferentes valencias o estados de oxidación: -3, 0, +3 y +5 (Duker et al., 2005). En combinación con otros elementos como el oxígeno, el azufre y el cloro, éste constituye el denominado como arsénico inorgánico; mientras que cuando éste se combina con el hidrógeno y el carbono hablamos de arsénico orgánico. La mayoría de compuestos de

arsénico no tienen color ni olor, por lo que su detección en el agua, comida y aire no es inmediata (Jomova et al., 2011).



 Argentina	 Hungría
 Bangladesh	 India
 Canadá	 México
 Chile	 Mongolia
 China	 Rumania
 Estados Unidos	 Taiwán
 Finlandia	 Vietnam

Figura 1 Mapa de las regiones más afectadas por niveles elevados de arsénico en el agua. Algunas de las regiones con altos niveles de arsénico en el agua son Argentina, Bangladesh, Canadá, Chile, China, Estados Unidos, Finlandia, Hungría, India, México, Mongolia, Rumania, Taiwán y Vietnam.

En la Tabla 1, podemos encontrar las abreviaturas y fórmulas químicas de algunos de los compuestos de arsénico más relevantes, el ácido ortoarsénico (V), el ácido arsenioso (III), el ácido monometilarsónico (V), el ácido monometilarsenoso (III), el ácido dimetilarsónico (V) y el ácido dimetilarsenoso (III).

Tabla 1 Resumen de los compuestos de arsénico más relevantes con su abreviatura y fórmula química.

Componentes	Abreviaturas	Fórmula química
Ácido ortoarsénico	As ^V	AsO(OH) ₃
Ácido arsenioso	As ^{III}	As(OH) ₃
Ácido monometilarsónico	MMA ^V	CH ₃ AsO(OH) ₂
Ácido monometilarsenoso	MMA ^{III}	CH ₃ As(OH) ₂
Ácido dimetilarsónico	DMA ^V	(CH ₃) ₂ AsO(OH)
Ácido dimetilarsenoso	DMA ^{III}	(CH ₃) ₂ AsOH

La valencia, además de cambiar las propiedades químicas, también modula sus propiedades biológicas de manera que los compuestos de arsénico más tóxicos son los que se encuentran en un estado de oxidación trivalente (Hughes et al., 2011).

Aunque el arsénico no es soluble en agua, sus sales presentan un amplio rango de solubilidades dependiendo del pH o del ambiente iónico. Las formas iónicas inorgánicas As^{III} y As^{V} son las más abundantes en el agua (Duker et al., 2005).

El arsénico inorgánico se clasifica, según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), como un compuesto carcinogénico del grupo I, es decir, con probada actividad carcinogénica en humanos (Straif et al., 2009). Por lo que respecta al arsénico inorgánico éste ha sido evaluado en diversas ocasiones por la IARC; así, en 1973 la IARC concluyó que había una relación significativa entre la incidencia de cáncer de piel y la exposición al arsénico inorgánico a través del consumo de agua y de fármacos. Asimismo el riesgo de padecer cáncer de pulmón se relacionó con la exposición por inhalación de altas concentraciones de trióxido de arsénico por parte de los trabajadores de la industria de la fundición del cobre. En 1980, la IARC publicó que existían evidencias suficientes para clasificar al arsénico inorgánico como carcinógeno del grupo I, debido a su clara relación con el cáncer de piel y de pulmón. En 2004, se encontraron evidencias suficientes de que la exposición a altos niveles de arsénico, a través del consumo de agua contaminada con este elemento, causaba cáncer de vejiga, pulmón y piel, aunque las evidencias en experimentación animal eran limitadas. La publicación más reciente data de 2009, donde la IARC ha vuelto a afirmar que la exposición al arsénico a través del consumo de agua causa cáncer de vejiga, de pulmón y de piel y que, además, posiblemente también causa cáncer de riñón, hígado y próstata (IARC 1980, IARC 2004b, Straif et al., 2009).

1.1.2. Exposición humana al arsénico

Hay dos situaciones que suponen la exposición al arsénico: la ocupacional y la no ocupacional o ambiental. La exposición en el ambiente laboral suele ser por inhalación y tiene lugar en industrias de fundición no férreas, de tratamientos para la preservación de la madera, de fabricación de vidrio, en la electrónica y en la producción y aplicación de plaguicidas que contienen arsénico. Por lo que respecta la exposición ambiental al arsénico ésta puede suponer su ingesta a través de la comida a excepción de la exposición que se da en las áreas con altos niveles de arsénico en el agua en las que la principal vía de exposición es a través del agua de consumo (Straif et al., 2009).

Dado que los controles en la industria acostumbran a ser bastante estrictos, en la actualidad el mayor riesgo de exposición al arsénico proviene de la exposición ambiental. Conocer los niveles ambientales a los que el arsénico representa un riesgo para la salud puede reducir los riesgos asociados a su exposición (Hughes et al., 2011).

Como se ha dicho, el agua contaminada por arsénico constituye una de las fuentes de exposición al arsénico inorgánico más importante. Es, además, la causante de la presencia de arsénico inorgánico en la comida a través de la irrigación de los cultivos, así como la preparación y la cocción de los alimentos. La mayoría de arsénico en el agua se encuentra en forma inorgánica, encontrándose en las valencias 3 ó 5, en las formas iónicas de los ácidos arsenioso y ortoarsénico, respectivamente (Otles et al., 2010). La Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA) describen el límite seguro de arsénico en 10 $\mu\text{g/L}$ y el máximo permitido en 50 $\mu\text{g/L}$ en el agua de consumo.

Para evaluar los niveles de riesgo, hay que señalar que el agua contaminada con arsénico de algunas zonas suele tener concentraciones de arsénico de entre 10 y 200 $\mu\text{g/L}$; aunque en zonas específicas se han encontrado concentraciones superiores a los 200 $\mu\text{g/L}$. Hay que recordar que alrededor de 200 millones de personas en el mundo están en riesgo por consumo de agua contaminada, de las cuales más de la mitad viven en Bangladesh, área en la que se han encontrado concentraciones de hasta 800 $\mu\text{g/L}$ en el agua de consumo (Singh et al., 2011).

Otra vía de exposición al arsénico es a través de los alimentos contaminados con este metaloide. A pesar de que el arsénico inorgánico ya no se añade a los alimentos como conservante, la dieta continúa siendo una fuente importante de exposición actual al arsénico, sobre todo en las regiones con una mayor concentración de éste en el ambiente (Otles et al., 2010). La ingesta de arsénico inorgánico a través de la dieta se debe principalmente al consumo de cereales y vegetales, especialmente en las áreas donde se riegan los alimentos con agua con altos niveles de arsénico. Otro alimento en el que se suelen encontrar concentraciones altas de arsénico es el marisco, pero en éste los principales compuestos de arsénico encontrados son la arsenobetaína y arsenocolina, compuestos orgánicos significativamente menos tóxicos que el arsénico inorgánico (Straif et al., 2009, Otles et al., 2010). Recientemente la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha estimado que la ingesta promedio de arsénico a través de los alimentos es de 0,13-0,56 $\mu\text{g/kg/día}$ (EFSA 2009).

Una vía de exposición menos importante sería a través del arsénico presente en el suelo. En el suelo se encuentra principalmente arsénico inorgánico, con predominancia del arsénico pentavalente, debido a la oxidación que se da del arsénico trivalente. La exposición al arsénico del suelo puede tener lugar de diferentes formas, aunque la más común suele ser una ingesta accidental. Comparado con la ingesta de arsénico a través del agua o de la dieta, el arsénico del suelo constituye una fracción muy pequeña de ésta. Se calcula que la cantidad de arsénico en el suelo varía desde 0,01 a más de 600 mg/kg, con un promedio entre 2 y 20 mg/kg (Hughes et al., 2011).

Otra posible exposición al arsénico consiste en la absorción a través de la piel o la inhalación de partículas en el aire. Sin embargo, la cantidad de arsénico presente en el aire es bastante baja (Hughes et al., 2011).

Un tema al que se le está dedicando una especial atención es el de la exposición fetal a través de la placenta. Tras la exposición materna se sabe que el arsénico traspasa fácilmente la placenta y que los organismos en desarrollo son particularmente vulnerables a sus efectos tóxicos (debido a la rápida división celular y la diferenciación), por lo que la exposición transplacentaria puede suponer importantes efectos en la salud de los neonatos. Hay evidencias de que el arsénico afecta el crecimiento intrauterino y aumenta el riesgo fetal y especialmente la mortalidad infantil, aunque aún hay poca información sobre el tema (Vahter 2009, Guan et al., 2010).

Por lo que hace al uso del arsénico a lo largo de la historia decir que ya en la Edad Media el arsénico se empezó a utilizar como veneno y a lo largo de la historia se ha usado repetidamente para cometer homicidios. Entre los homicidios más famosos se encuentra el de Napoleón Bonaparte en 1851 (Lin et al., 2004). Hasta mediados de 1850s, el arsénico fue considerado un veneno popular, ya que era de fácil obtención y no olía ni tenía sabor, por lo que era indetectable en la comida y en la bebida. Los síntomas más visibles tras una exposición aguda al arsénico son náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal, los cuales podían ser fácilmente confundidos con otras enfermedades de la época, como el cólera o la neumonía (Ratnaike 2003, Huang et al., 2011a). El arsénico también se ha usado y se utiliza hoy en día, en algunas zonas pobres, para la fabricación de diversos productos, como insecticidas, herbicidas, pesticidas y conservantes de la madera. Actualmente se está utilizando para la producción de vidrio y como semiconductor (Andersson et al., 1990, Otlés et al., 2010, Park et al., 2010, Hughes et al., 2011).

Otro uso de los compuestos de arsénico, durante siglos, ha sido como agente medicinal a pesar de su toxicidad, o quizá debido a ésta. El arsénico se ha administrado de diferentes formas, ya sea dérmicamente, por inhalación, intravenosamente, u oralmente (de forma sólida y líquida), dependiendo de la prescripción (Evens et al., 2004). Desde el siglo XVIII y hasta finales del siglo XX, se utilizó un preparado de As_2O_3 con bicarbonato de potasio, conocido como solución de Fowlers; solución que se ha usado para tratar enfermedades malignas como la leucemia y enfermedades no malignas como el asma, el eccema y la psoriasis. A principios del siglo XX, se desarrolló el Salvarsan, un compuesto con arsénico orgánico, que se usó de forma eficaz para tratar la tripanosomiasis y la sífilis (antes del desarrollo de la penicilina). El uso del arsénico en el tratamiento del cáncer se vio disminuido con la aparición de la quimioterapia moderna debido, principalmente, a los efectos secundarios que este compuesto generaba (Antman 2001, Evens et al., 2004).

A pesar de su demostrada toxicidad actualmente el trióxido de arsénico (ATO) se usa para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (APL), principalmente en los pacientes que no han presentado una buena respuesta a los antitumorales estándares. Hay que recordar que la leucemia es responsable del 3% de la mortalidad debida al cáncer en Europa y Estados Unidos y que la APL es un subtipo de leucemia mieloide aguda (AML), que representa entre el 10-15% de la AML en adultos. Desde finales de los años ochenta la APL se viene tratando con quimioterapia estándar y con ácido retinoico *all-trans* (ATRA). Aunque el tratamiento con ATRA aumenta significativamente la supervivencia de los pacientes, un 25% de los pacientes recaen después del primer tratamiento, pasando a ser el trasplante de médula ósea la única opción. Debido a que el tratamiento con trióxido de arsénico (Trisenox) ha mostrado inducir una remisión del 85% en los pacientes con mala respuesta a los tratamientos convencionales, éste se está usando actualmente para tratar la APL. El tratamiento de la APL con 1 mg/mL de Trisenox se aprobó por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) en el año 2000. Todos los estudios indican una completa remisión, tanto de los pacientes que han recaído como los recién diagnosticados, sobre todo al usarlo de forma combinada con el ATRA. Numerosos estudios de la última década confirman el éxito del uso del trióxido de arsénico para el tratamiento de la APL (Evens et al., 2004, Nicolis et al., 2009).

Las virtudes de este compuesto no sólo están restringidas a la APL, ya que estudios pre-clínicos muestran que también puede ser útil para el tratamiento de varios tumores

sólidos como el de próstata, ovario y de tracto digestivo. Es por esto que hoy en día el trióxido de arsénico y otros compuestos orgánicos del arsénico se están ensayando también para ser utilizados en el tratamiento de otros cánceres (Ai et al., 2007, Diepart et al., 2011), un ejemplo sería el del carcinoma Gallbladder (GBC), que se trata de un tumor muy agresivo y letal que afecta al tracto digestivo. En este caso los tratamientos estándar consisten en cirugía y quimioterapia, que resultan insuficientes en más de la mitad de los casos. Es por esto que se ha propuesto que el uso de compuestos de arsénico puede suponer una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de los pacientes con GBC (Ai et al., 2007).

Con la finalidad de ampliar el espectro del uso del arsénico como tratamiento antitumoral y disminuir su toxicidad, se están desarrollando distintos fármacos como el darinaparsin, compuesto derivado del arsénico orgánico, que se propone para el tratamiento de tumores sólidos y neoplasias hematológicas a través de su administración oral e intravenosa. Debido a los buenos resultados obtenidos en los estudios preclínicos, ya se están empezando a llevar a cabo estudios clínicos con el darinaparsin, aunque su uso comercial aún no se ha autorizado (Mann et al., 2009, Wu et al., 2010a).

1.1.3. Metabolización y transporte del arsénico y modulación del riesgo

Hasta hace relativamente poco se aceptaba que la vía de metilación del arsénico era un proceso de detoxificación, debido a que los compuestos metilados del este elemento se consideraba que eran menos tóxicos que los compuestos de arsénico inorgánicos. Sin embargo, en la última década esta visión ha cambiado drásticamente al estudiar más detalladamente la citotoxicidad de los compuestos metilados de arsénico. Así, aunque el compuesto metilado de valencia V, es menos tóxico que el inorgánico de la misma valencia, el intermediario trivalente formado durante el proceso de metilación es mucho más tóxico que el inorgánico de valencia III (Stybło et al., 2000, Nicolis et al., 2009). Esto supone que la toxicidad del arsénico depende de la eficacia de su metabolización, siendo mayor en aquellos casos en que se acumulan importantes concentraciones de MMA^{III}. De esta manera cobra importancia, en términos de riesgo, la menor o menor capacidad metabolizadora (Hughes et al., 2011). Se ha visto como polimorfismos de la enzima fundamental para la metabolización del arsénico, la AS3MT, contribuyen significativamente a la variación interindividual en la biotransformación del arsénico y, por lo tanto, pueden contribuir a las variaciones interindividuales del riesgo de toxicidad

y carcinogenicidad del arsénico (Hernández et al., 2008, Hughes et al., 2011, Pierce et al., 2012).

Independientemente de la capacidad metabolizadora, existen evidencias de que los transportadores de membrana que regulan la entrada, retención y eliminación de los compuestos de arsénico en los hepatocitos son factores que pueden contribuir a las variaciones interindividuales de riesgo de toxicidad y carcinogénesis del arsénico (Thomas 2007, Drobna et al., 2010).

Por lo que hace al proceso de metabolización del arsénico inorgánico, decir que, el éste una vez internalizado, se metaboliza vía metilación dando lugar a metabolitos metilados. Este proceso tiene lugar tanto en microorganismos, como organismos acuáticos, pájaros y mamíferos (IARC 2004b). En humanos la metabolización del arsénico inorgánico tiene lugar fundamentalmente en el hígado formándose como resultado cuatro metabolitos: el ácido metilarsónico (MMA^{V}), el ácido monometilarsenoso (MMA^{III}), el ácido dimetilarsínico (DMA^{V}) y el ácido dimetilarsinoso (DMA^{III}) (Drobna et al., 2010).

Uno de los procesos propuestos de metabolización del arsénico inorgánico constituye la que se denomina **vía clásica o de metabolización oxidativa**. Entre las principales características de esta vía destacan que sólo el arsénico trivalente puede ser biometilado, mientras que el pentavalente tiene que ser primero reducido a trivalente; siendo la S-adenosilmetionina (SAM) el donante del grupo metilo en las consecutivas metilaciones del arsénico. La enzima catalizadora de la biometilación se considera que es la arsenito-3-metiltransferasa (AS3MT), inicialmente conocida como Cyt19. La misma enzima puede usar como sustrato tanto el As^{III} para metilarlo a MMA^{V} , como el MMA^{III} para metilarlo a DMA^{V} . Una vez dentro del torrente sanguíneo, el As^{V} se reduce a As^{III} , el cual al entrar dentro de los hepatocitos se convierte en MMA^{V} por acción de la AS3MT. Seguidamente éste se reduce a MMA^{III} , el cual sufre una metilación oxidativa y da lugar al DMA^{V} , que será a su vez reducido a DMA^{III} (Figura 2) (Lin et al., 2002, Thomas 2007, Nicolis et al., 2009). Como ya se ha mencionado la vía de metilación oxidativa requiere la reducción de las especies pentavalentes. Como posibles reductasas se han propuesto diferentes enzimas dependientes de glutatión (GSH), como la arsenato reductasa en bacterias, la deshidrogenasa gliceraldehido-3-fosfato en humanos y la glutatión-S-transferasa omega (GSTO) en conejo y hámster. De todos modos, estudios llevados a cabo con ratones *knock out* para GSTO sugieren la existencia de una vía alternativa de reducción, vista la capacidad reductora de esta línea de ratón. Otras

alternativas de reducción consideran que la purina nucleosido fosforilasa (PNP) es la enzima involucrada, aunque los resultados obtenidos distan de ser concluyentes (Nicolis et al., 2009).

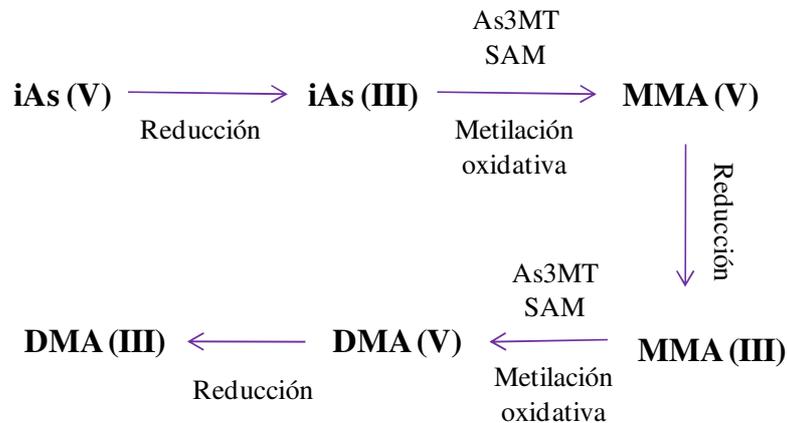


Figura 2 Representación esquemática del proceso de biometilación según la vía clásica o de metilación oxidativa. El ácido ortoarsénico (iAs^V) se reduce a ácido arsenioso (iAs^{III}). Seguidamente la enzima arsénico 3 metiltransferasa (AS3MT) cataliza la metilación oxidativa del ácido arsenioso a ácido monometilarsónico (MMA^V), actuando la S-adenosilmetionina (SAM) como donadote del grupo metilo. El MMA^V se reduce a ácido monometilarsenoso (MMA^{III}), que a su vez sufre una metilación oxidativa dando lugar al ácido dimetilarsónico (DMA^V), que se reduce a ácido dimetilarsenoso (DMA^{III}) (Nicolis et al., 2009).

Vistas las dificultades indicadas, recientemente se ha propuesto una vía de metilación del arsénico alternativa, la denominada vía de metilación reductora.

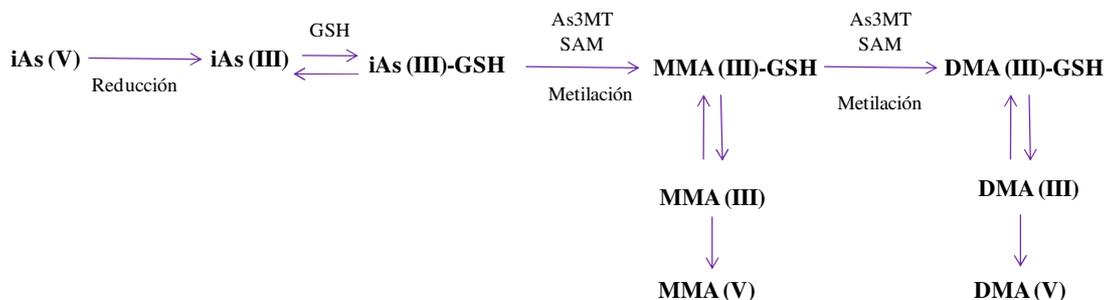


Figura 3 Representación esquemática del proceso de biometilación según la vía de metilación reductora. El ácido ortoarsénico (iAs^V) se reduce a ácido arsenioso (iAs^{III}). El ácido arsenioso forma un complejo con el glutatión (GSH), el complejo $iAs^{III}-GSH$. Seguidamente la enzima AS3MT cataliza la metilación del $iAs-GSH$ al complejo ácido monometilarsenoso (MMA^{III})-GSH, donde la S-adenosilmetionina (SAM) actúa como donador del grupo metilo. Este complejo puede volver a ser metilado dando lugar al complejo ácido dimetilarsenoso (DMA^{III})-GSH. En presencia de bajas concentraciones de glutatión, tanto $MMA^{III}-GSH$ como $DMA^{III}-GSH$ se hidrolizan a MMA^{III} y DMA^{III} , respectivamente. Éstos pueden convertirse en ácido monometilarsónico (MMA^V) y ácido dimetilarsónico (DMA^V), respectivamente (Nicolis et al., 2009).

En ésta el As^V se reduce a As^{III} , pero en vez de darse una metilación oxidativa, ésta forma un complejo arsénico-glutatión que actúa como sustrato de la AS3MT, y se

metila a MMA^{III}-glutation, que puede ser posteriormente metilado por la misma enzima a DMA^{III}-glutation. En presencia de bajas concentraciones de glutation, tanto el complejo MMA^{III}-glutation como el DMA^{III}-glutation se hidrolizan a MMA^{III} y DMA^{III}, respectivamente. En esta vía se propone que los complejos con glutation son los compuestos de arsénico transportados desde el hígado al torrente sanguíneo y al riñón (Figura 3) (Thomas 2007, Nicolis et al., 2009, Hughes et al., 2011).

Como ya se ha comentado independientemente de la capacidad metabolizadora, los transportadores de membrana también pueden contribuir a las variaciones interindividuales de riesgo de toxicidad y carcinogénesis del arsénico. Algunos de estos transportadores descritos lo constituyen la acuagliceroporinas, los transportadores de glucosa y los transportadores ABC (Thomas 2007, Drobna et al., 2010).

Las **acuagliceroporinas (AQPs)** son canales multifuncionales que transportan solutos orgánicos como el glicerol y la urea. Se ha visto que algunas AQPs son capaces de transportar compuestos trivalentes de arsénico de forma pasiva a favor del gradiente de concentración (Liu et al., 2002, Thomas 2007). Concretamente en humanos, se ha observado que la AQP7 y la AQP9 median la entrada del iAs^{III}, pero no lo hacen ni la AQP3 ni la AQP10 (Torres-Avila et al., 2010). La AQP7 y la AQP9 constituye un canal bidireccional que actúa como canal de entrada del iAs^{III} desde la sangre al hígado (principal órgano de metabolización del arsénico) y como canal de salida desde el hígado hacia el torrente sanguíneo de compuestos orgánicos del arsénico, el MMA^{III}, MMA^V y DMA^V (Liu et al., 2006, McDermott et al., 2010, Leslie 2011).

Los **transportadores de la glucosa (GLUT1-14)** pertenecen a una familia de proteínas estructuralmente relacionadas que median el transporte de la glucosa de forma pasiva a través de la membrana plasmática. Estos transportadores difieren en su distribución y en su afinidad por la glucosa. Se ha visto que algunos de los transportadores de la glucosa, como el GLUT1 y el GLUT2, participan también en el transporte del arsénico: iAs^{III} y MMA^{III} (Drobna et al., 2010, Jiang et al., 2010, Jiang et al., 2010, Leslie 2011). La GLUT1 se ha propuesto como la principal vía de entrada del As^{III} y del MMA^{III} en el corazón y en el cerebro, debido a la baja expresión de AQP7 y AQP9 en éstos (Liu et al., 2006, Leslie 2011).

También participan en el transporte del arsénico los **transportadores ABC** (transportadores casetes de unión al ATP), que son responsables del transporte activo de una gran variedad de compuestos, incluidos los fosfolípidos, péptidos, aminoácidos, fármacos y tóxicos. Concretamente hay dos miembros de los transportadores ABC, las

proteínas resistentes a multi-fármacos 1 y 2 (MRP1 y MRP2), que se sabe que participan en el transporte del arsénico. Los transportadores MRP1 y MRP2 son responsables del transporte del arsénico conjugado con glutatión, el As^{III} -GSH y el MMA^{III} -GSH, hacia el exterior de las células (Thomas 2007, Leslie 2011). Hay algunos estudios en los que parece que el MRP3 podría participar también en el transporte de los complejos As-GSH (Drobna et al., 2010). Se ha visto que al aumentar el número o la actividad de los transportadores ABC, aumenta el flujo del arsénico al exterior de la célula, por lo que disminuye la concentración de arsénico intracelular, y por lo tanto, disminuye la citotoxicidad inducida por éste (Thomas 2007).

1.1.4. Efectos en la salud humana debido a la exposición al arsénico

Podemos diferenciar entre dos tipos de efectos sobre la salud humana, según si la exposición ha sido aguda o crónica. Estos efectos se encuentran resumidos en la Tabla 2.

Exposición crónica:

La exposición crónica es la más importante en términos de salud ya que más de 100 millones de personas en todo el mundo se encuentran expuestas crónicamente a niveles de arsénico perjudiciales para la salud, siendo la situación particularmente dramática en el sud-este de Asia (Straif et al., 2009). Para observar sus efectos más nocivos no hace falta estar expuestos a altas concentraciones, ya que la exposición a través del agua de consumo de alrededor del $10 \mu\text{g/L}$, que es el estándar en muchas ciudades, se ha asociado con un apreciable riesgo de cáncer, del orden del 0,1-0,3%. Por lo que hace a los efectos cancerígenos del arsénico, existe una relación directa entre la exposición crónica a éste y un aumento de la incidencia de padecer diferentes tipos de cánceres, como el de piel, de pulmón, de vejiga, de hígado, de próstata y de riñón (Ottles et al., 2010). Asimismo, la exposición crónica al arsénico también se asocia con un aumento del riesgo de padecer numerosos efectos no cancerosos, como la queratosis palmar, cambios de pigmentación, enfermedades cardiovasculares (arterosclerosis, hipertensión, cardiopatía isquémica, arritmia ventricular, etc), efectos respiratorios, desórdenes neurológicos (deficiencia de memoria, pérdida de concentración, Parkinson, etc.) y efectos en el hígado y en el riñón, entre otros (Ratnaike 2003, Straif et al., 2009, Jomova et al., 2011, Singh et al., 2011).

Distintos estudios con animales de laboratorio también muestran como la exposición al arsénico inorgánico de forma crónica causa numerosos efectos, que afectan al sistema cardiovascular, al respiratorio, al gastrointestinal, al hematológico, al inmune, al reproductivo y al nervioso. Del mismo modo, la administración en animales de otras formas de arsénico como el MMA^V induce efectos en el tracto gastrointestinal, en el riñón, en el tiroides y en el sistema reproductivo. En cambio, la exposición a DMA^V induce efectos sobre la vejiga, el riñón, el tiroides y el desarrollo fetal (Jomova et al., 2011).

Pero la demostración experimental del potencial carcinogénico del arsénico ha sido compleja ya que ha habido una falta de evidencias en estudios con animales hasta hace relativamente poco. En 1973, año en que la IARC clasificó al arsénico como carcinógeno del grupo I, no había evidencias en animales. En la publicación de 2004, ya se citaba que habían evidencias suficientes de carcinogénesis en animales, pero tan sólo en tratamientos con DMA^V, el cual inducía la aparición de tumores en la vejiga urinaria en ratas y en pulmón en ratones tratados. Sin embargo, no ha sido hasta la publicación de 2009, en la que se considera que hay evidencias suficientes de carcinogénesis en animales en tratamientos con arsénico inorgánico (Cui et al., 2006a, Straif et al., 2009, Tokar et al., 2010a, Huang et al., 2011a).

Para los compuestos inorgánicos del arsénico, la exposición oral al arsenato sódico en ratones se ha considerado carcinogénica en pulmón, mientras que la exposición por inhalación de arsénico inorgánico (arsenato cálcico) causa tumores de pulmón en hámsteres (Tokar et al., 2010a, Hughes et al., 2011).

Hay estudios en los que se ha usado la exposición perinatal a arsénico inorgánico (arsenito sódico) en diferentes cepas de ratón debido a que, como ya se ha comentado, se trata de un período de alta sensibilidad a carcinógenos. En dos de ellos se ha observado como los roedores expuestos durante su etapa prenatal desarrollan tumores de pulmón, de hígado, de ovario, adrenal y de útero a lo largo de su vida adulta de forma dosis-dependiente. En total hay 7 estudios en animales en los que se ha demostrado que el arsénico inorgánico es carcinogénico en roedores (Waalkes et al., 2007, Tokar et al., 2010a).

Hay que resaltar que en los estudios realizados con animales las dosis a las que éstos son expuestos para la inducción de carcinogénesis son considerablemente superiores a las dosis a las que se encuentran las poblaciones humanas afectadas. Sin embargo, aunque los niveles de arsénico en el agua sean entre 100 y 200 veces superiores a los

que de manera estándar están expuestas las poblaciones humanas, estos animales tratados presentan niveles de arsénico en la sangre parecido a los de los humanos expuestos a dosis mucho más bajas. Esto indica que los ratones necesitan claramente dosis externas mucho mayores que los humanos para llegar a concentraciones internas parecidas (Waalkes et al., 2007).

Exposición aguda:

Los efectos del arsénico tras la exposición aguda son: náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea severa, aunque ésta no es una ruta normal de exposición, siendo la dosis letal en humanos de 0,6 mg/Kg/día (Ratnaike 2003, Singh et al., 2011).

Tabla 2 Efectos tóxicos causados por una exposición crónica o aguda al arsénico. Dentro de los efectos debidos a la exposición crónica, se diferencia entre efectos cancerosos y no cancerosos.

Exposición crónica		Exposición aguda
Efectos cancerosos	Efectos no cancerosos	
Piel	Hiper- hipopigmentación	Náuseas
Pulmón	Queratosis	Vómitos
Vejiga	Enfermedades cardiovasculares	Dolor abdominal
Hígado	Efectos respiratorios	Diarrea severa
Próstata	Efectos en el hígado	
Riñón	Efectos en el riñón	
	Desordenes neurológicos	

1.1.5. Efectos del arsénico en el hígado

Cabe destacar que el hígado es un órgano diana del arsénico, debido principalmente a que es en éste donde tiene lugar de forma general la metabolización del arsénico inorgánico. Por lo que el estudio de los efectos del arsénico en el hígado son de gran interés, ya que éste sufre toda una serie de efectos que dan lugar a la aparición de diversas patologías (Mazumder 2005, Liu et al., 2008a, Islam et al., 2011).

Hay estudios epidemiológicos que indican una clara asociación entre la exposición crónica al arsénico y el funcionamiento anormal del hígado, la hepatomegalia, la fibrosis, la cirrosis y la ascitis. Siendo la cirrosis y la ascitis una de las principales causas de mortalidad debidas a la exposición al arsénico. Se considera que la cirrosis es

un efecto secundario del daño de los vasos sanguíneos hepáticos. Además, la cirrosis está asociada con la aparición posterior de cáncer de hígado (Liu et al., 2002, Guha Mazumder 2008a, Guha Mazumder 2008b, Liu et al., 2008a, Islam et al., 2011, Jomova et al., 2011).

En estudios realizados con poblaciones de Bengal, India y Bangladesh se observó que la lesión en el hígado más común causada por la exposición al arsénico de forma crónica es la hepatomegalia siendo la prevalencia de la fibrosis también muy importante (Mazumder 2005, Guha Mazumder et al., 2011).

El efecto dañino en el hígado por parte del arsénico inorgánico también se ha observado en estudios *in vivo* con ratones. Ratones que habían estado expuestos a 250 ppb de arsenito sódico durante 8 semanas y en los que se ha observado como el arsénico estimula la formación de capilares del endotelio sinusoidal hepático y la remodelación de los vasos sanguíneos en el hígado de éstos (Straub et al., 2007).

Otro de los efectos que el arsénico puede inducir en el hígado según varios estudios realizados en poblaciones humanas, como por ejemplo en Taiwan, es la aparición de cáncer en este órgano (Smith et al., 1992, Liu et al., 2008a). Estos efectos cancerosos no se han observado únicamente en poblaciones humanas expuestas al arsénico de forma crónica sino que también se ha visto en modelos animales, concretamente en ratones que habían sido expuestos al arsenito sódico durante su desarrollo embrionario (Tokar et al., 2011).

Tanto en humanos como en estudios con modelos animales se ha visto que concretamente la exposición al arsénico ha estado relacionada con dos tipos de cánceres de hígado, el cáncer angiosarcoma hepático y el carcinoma hepatocelular (Smith et al., 1992, Waalkes et al., 2006). El carcinoma hepatocelular es el tipo de cáncer de hígado más común en el mundo y en muchos casos suele aparecer a continuación de una cirrosis. En cambio, el cáncer angiosarcoma, es un tipo de cáncer de hígado poco común, que crece rápidamente y que suele ser detectado demasiado tarde para tratarlo de forma efectiva, por lo que normalmente es mortal (Smith et al., 1992, Huang et al., 2011b).

1.1.6. La exposición crónica por arsénico y la diabetes

Otra de las patologías inducidas por la exposición al arsénico de forma crónica es la diabetes de tipo II, por lo que el arsénico se trata de un factor de riesgo ambiental para

esta enfermedad (Rahman et al., 1995, Rahman et al., 1998, Lewis et al., 1999, Díaz-Villasenor et al., 2007, Joshi et al., 2010, Huang et al., 2011a).

Se pueden diferenciar dos tipos de diabetes, las denominadas de tipo I y tipo II, aunque en este trabajo nos centraremos en la diabetes de tipo II o no insulina dependiente, ya que es la que se encuentra relacionada con la exposición al arsénico (Rahman et al., 1995, Rahman et al., 1998, Lewis et al., 1999, Huang et al., 2011a). Se trata de una enfermedad multiorgánica resultado de la interacción entre factores ambientales y predisposición genética o susceptibilidad (Figura 4).

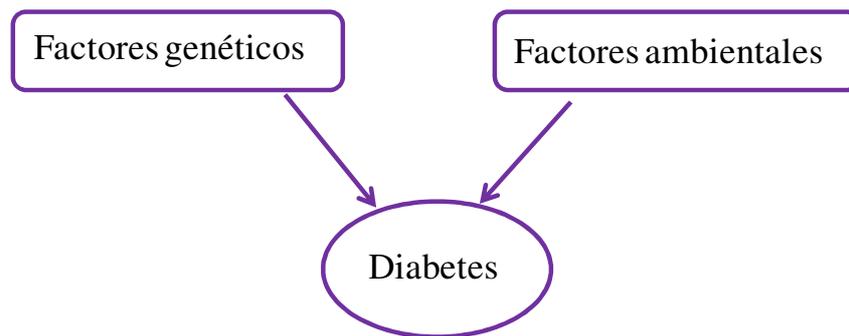


Figura 4 Factores de predisposición a la diabetes tipo II. La DM tipo II es una enfermedad multiorgánica resultado de la interacción entre factores ambientales y predisposición genética o susceptibilidad (Joshi et al., 2010).

Se caracteriza por la presencia de defectos en la producción o secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas, así como por defectos de la acción de la insulina en los tejidos periféricos (músculos y adipocitos), y/o aumento de la producción endógena de glucosa por parte del hígado. Se ha estimado que aproximadamente un 90-95% de las DM son de tipo II. Se consideran factores de riesgo la presencia de ciertos polimorfismos genéticos, la edad, el sexo, la historia familiar, la obesidad, la inactividad física, la dieta, el estrés y la exposición a diversos tóxicos medioambientales (Kriebel et al., 2001, Zimmet et al., 2001, Díaz-Villasenor et al., 2007, Joshi et al., 2010).

Como ejemplo de genes ligados al riesgo de la DM tipo II se encuentran los factores nucleares HNF1 α y HNF4 α , donde se han encontrado variantes que predisponen a un mayor riesgo (Anuradha et al., 2005). La alteración en estos factores también se ha relacionado con MODY1 y MODY3, respectivamente (Ryffel 2001, Anuradha et al., 2011, Saif-Ali et al., 2011).

Hay varios estudios que indican que existe una relación entre la exposición al arsénico y la prevalencia de DM en pueblos de la costa sudoeste de Taiwán, donde los habitantes están expuestos a elevados niveles de arsénico a través del consumo de agua

contaminada. La incidencia de DM en estos pueblos es de 2 a 5 veces mayor que en áreas donde la arseniasis no es endémica. Resultados parecidos se han obtenido en Bangladesh, Estados Unidos y Suecia (Rahman et al., 1995, Rahman et al., 1998, Lewis et al., 1999, Huang et al., 2011a).

Altos niveles de prevalencia de diabetes también se han encontrado entre trabajadores de la fundición de cobre y de la industria del vidrio (Joshi et al., 2010). Aunque se sabe que el arsénico es un factor de riesgo para la DM, los efectos detallados y el mecanismo molecular del arsénico relacionado con la DM no están claros (Díaz-Villasenor et al., 2007, Huang et al., 2011a). Debido a la complejidad de la etiología de la DM tipo II, el arsénico puede estar induciendo la aparición de esta enfermedad de diferentes formas. El arsénico podría inducir la alteración de la expresión de genes relacionados con la diabetes tipo II dando lugar a (1) alteración de la gluconeogénesis en el hígado, (2) reducción de la síntesis y secreción de la insulina e inducción de estrés oxidativo en las células β pancreáticas, (3) proliferación y cambios en el patrón de diferenciación anormal de los adipocitos y/o músculos, producidos por la alteración de la expresión de genes implicados en estos procesos (reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, vías de señalización), y (4) resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, causado por la alteración de factores de transcripción involucrados en la sensibilidad de la insulina, la inducción de citoquinas como TNF- α y IL-6, e inhibición de la activación Akt, que disminuye la translocación del transportador de membrana GLUT4 (Figura 6) (Díaz-Villasenor et al., 2007).

Se han llevado a cabo algunos experimentos *in vitro*, los cuales indican que el arsénico contribuye al desarrollo de la DM a través de la alteración del funcionamiento de las células β , particularmente afectando la síntesis y secreción de la insulina, y alterando la entrada de glucosa estimulada por la insulina en los tejidos periféricos, adipocitos y células musculares. Los experimentos realizados *in vitro* se han hecho con tiempos de exposición cortos y con células β del páncreas, con células musculares y con adipocitos, pero no con hepatocitos ni tiempos de exposición prolongados (Huang et al., 2011a).

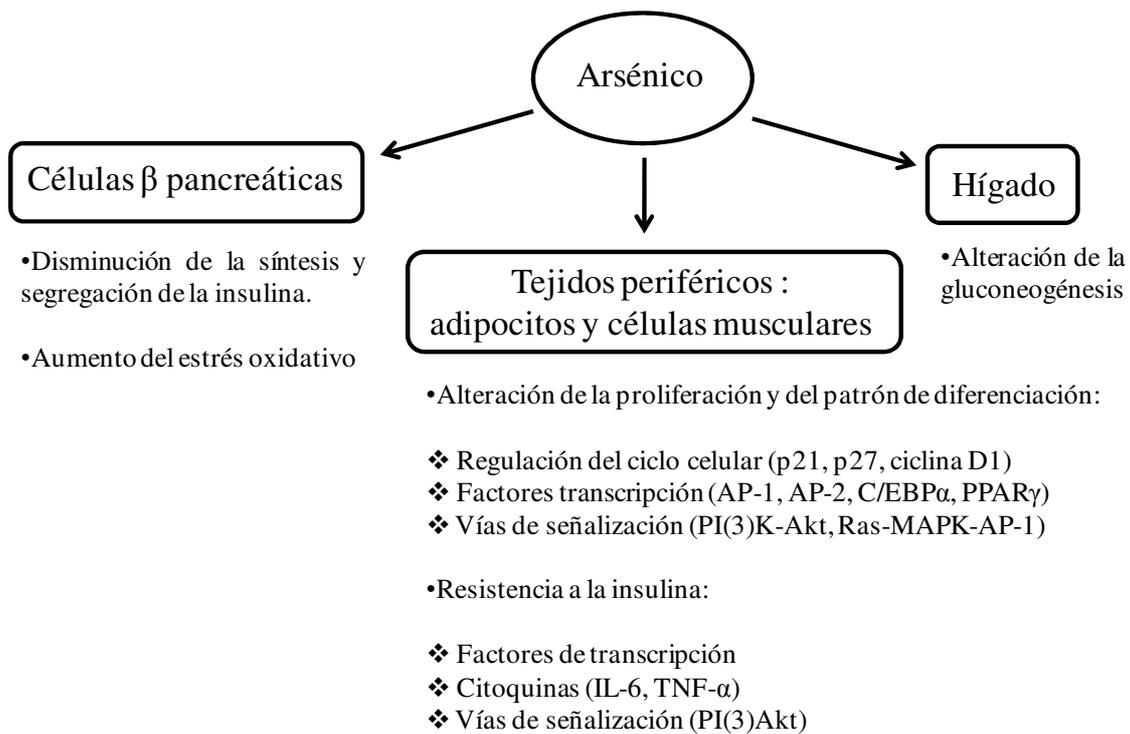


Figura 5 Mecanismos de inducción de diabetes tipo II por el arsénico. El arsénico induce la alteración de la expresión de genes relacionados con la diabetes tipo II dando lugar a (1) alteración de la gluconeogénesis en el hígado, (2) reducción de la síntesis y secreción de la insulina y inducción de estrés oxidativo en las células β pancreáticas, (3) proliferación y patrón de diferenciación anormal de los adipocitos y/o músculos, producido por la alteración de la expresión de genes implicados en estos procesos (reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, vías de señalización) (4) resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, causado por la alteración de factores de transcripción involucrados en la sensibilidad de la insulina, la inducción de citoquinas como TNF-α y IL-6, e inhibición de la activación Akt, que disminuye la translocación del transportador de membrana GLUT4 (Díaz-Villasenor et al., 2007).

1.1.7. Mecanismos de acción del arsénico

Los mecanismos de acción del arsénico, en muchas de las enfermedades relacionadas con su exposición, no se conocen de manera precisa, a pesar de la cantidad de esfuerzo dedicado. Es posible que no sea un único mecanismo de acción el que da lugar a los efectos adversos del arsénico, sino que podría ser que éste actuara a través de diferentes mecanismos de acción y que estos fueran independientes entre sí (Hughes et al., 2011). Dado que el conocimiento de los mecanismos de acción del arsénico puede llevarnos a una mejor protección de las poblaciones expuestas a este elemento, es importante conocer las distintas propuestas hechas para explicar cómo este elemento produce sus efectos.

Entre los diversos mecanismos de acción del arsénico que se han propuestos destacan, la interacción con el azufre, la sustitución del grupo fosfato en algunas reacciones

bioquímicas, la formación de especies reactivas, efectos genotóxicos, alteración de la reparación del DNA, de la transducción de señales, de la proliferación del DNA, tolerancia a la apoptosis, así como alteraciones epigenéticas (Rossman et al., 1977, Basu et al., 2001, IARC 2004b, Sykora et al., 2008, Waalkes et al., 2008, De Vizcaya-Ruiz et al., 2009, Druwe et al., 2010, Hughes et al., 2011, Jomova et al., 2011, Martínez et al., 2011, Ren et al., 2011, Smeester et al., 2011, WHO 2011).

a) Inhibición de enzimas/proteínas

El arsénico en su forma trivalente es altamente reactivo y se sabe que tiene la capacidad de interactuar con el azufre, formando complejos As-S, de forma que el arsénico afecta a los compuestos celulares que contiene grupos sulfhídricos. Por este mecanismo afecta la entrada de glucosa en la célula, la gluconeogénesis, la oxidación de los ácidos grasos, la producción de acetil CoA y actúa inhibiendo la producción de glutatión, enzima que protege a la célula contra el daño oxidativo (Hughes et al., 2011). Además, se ha demostrado que el arsénico inhibe la reparación del DNA en bacterias y en células de mamífero. Este efecto de inhibición de la reparación del DNA podría explicar el efecto co-genotóxico del arsénico con la radiación ultravioleta y otros agentes genotóxicos (Rossman et al., 1977). Se han propuesto diferentes mecanismos a través de los cuales el arsénico podría alterar la reparación del DNA, entre ellos se encuentra la unión directa con la DNA ligasa III, la alteración de las señales celulares que actuarían modificando la expresión de determinados genes, así como su interacción con los motivos de dedos de zinc de proteínas que intervienen en estos dos sistemas de reparación del DNA (Liu et al., 2008a, Hughes et al., 2011).

El daño en el DNA puede ser reparado a través del mecanismo de reparación por escisión. Hay dos tipos de mecanismos de reparación por escisión: el de reparación por escisión de bases (BER) y el de reparación por escisión de nucleótidos (NER). Los enzimas de BER reconocen lesiones específicas en el DNA, en cambio los de NER reconocen alteraciones en el plegamiento de la doble hélice de DNA (Basu et al., 2001, Sykora et al., 2008, De Vizcaya-Ruiz et al., 2009, Hughes et al., 2011, Martínez et al., 2011), ambos mecanismos se han visto afectados por la exposición al arsénico, aunque con diferentes efectos según la especie utilizada (Ebert et al., 2011), concluyendo que una exposición a una mezcla de diversas especies de arsénico (como sucede tras el metabolismo en humanos) puede suponer mayores efectos en la disminución de la eficacia de los mecanismos BER y NER que la exposición a una sola especie.

b) Formación de especies reactivas

La formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por parte del arsénico es uno de los mecanismos de acción del arsénico más estudiados. Tanto *in vitro* como *in vivo* se ha observado la formación de especies reactivas en presencia de arsénico. La producción de estas especies se ha detectado mediante incrementos de daño oxidativo (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina) en el DNA, la peroxidación lipídica, la expresión de genes de respuesta al estrés, la pérdida de antioxidantes (glutathione) y la inducción de proteínas de choque térmico, entre otros mecanismos.

Además, son varios los estudios que han mostrado que la adición de antioxidantes o radicales depuradores disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta al arsénico, pero este efecto no siempre se ha observado *in vivo* (IARC 2004a, IARC 2004b, Jomova et al., 2011, Martínez et al., 2011). (IARC 2004b, Hughes et al., 2011, Hughes et al., 2011, Jomova et al., 2011, Martínez et al., 2011)

c) Genotoxicidad

Hay estudios que el arsénico actúa induciendo deleciones, roturas de simple y doble cadena del DNA, intercambios entre cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas, aneuploidías y micronúcleos. Otros efectos del arsénico relacionados con la genotoxicidad incluyen la amplificación de genes específicos, la transformación celular y la inestabilidad genómica. Todos estos efectos genotóxicos del arsénico se han observado tanto *in vitro*, en células de mamífero, como *in vivo* en animales de laboratorio y en humanos (Guha Mazumder 2008a, Hughes et al., 2011, Jomova et al., 2011, Martínez et al., 2011).

Al igual que sucede con la toxicidad general, el arsénico trivalente, tanto el inorgánico como el orgánico, es más potente desde el punto de vista genotóxico, que los pentavalentes.

Todo esto puede ser resultado de la generación de ROS, de la inhibición de la reparación del DNA, o de la alteración de la metilación del DNA, mecanismos que pueden conducir a una inestabilidad genómica (Rossman et al., 1977, IARC 2004b, Hughes et al., 2011).

d) Transducción de la señales

Las vías de transducción de las señales transmiten la señal extracelular, a través de una serie de moléculas de señales intracelulares (ej.: las proteínas quinasas), que actúan alterando la expresión de diversos genes.

Dado que diversos procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis están dirigidas por estas vías o cascadas, el arsénico puede alterar las señales de transducción involucradas, conduciendo a la activación e inhibición de factores de transcripción que se unen al DNA y regulan la transcripción génica. Se ha visto por ejemplo que el arsénico afecta a la cascada MAPK (proteínas quinasas de actividad mitogénica), a la ERKs (quinasas reguladoras de señales extracelulares) y a la JNKs (quinasas N-terminal c-jun), así como a p38 (Druwe et al., 2010, Hughes et al., 2011, Hughes et al., 2011).

De hecho en diferentes estudios se ha observado como el arsénico tiene la capacidad de aumentar la proliferación celular. Este efecto se ha observado principalmente en la piel, donde el arsénico podría estar realizando su efecto a través de la estimulación de la expresión de diferentes factores del crecimiento, entre ellos el TGF- α (factor de crecimiento transformante α) o induciendo la expresión, de Rac1, proteína que participa en la regulación del ciclo celular (IARC 2004b, Waalkes et al., 2008, Hughes et al., 2011). Y también se ha observado como frente a la exposición crónica al arsénico las células transformadas con arsénico muestran tolerancia a la apoptosis frente a las células control, se cree que este efecto podría darse a través de la alteración de la vía JNK (Qu et al., 2002). La aparición de tolerancia a la apoptosis puede ser un factor importante en la cancerogénesis inducida por el arsénico, debido a que no tiene lugar la eliminación por apoptosis de las células dañadas (Liu et al., 2008a).

e) Alteraciones epigenéticas

Se ha propuesto que la alteración de la expresión génica como respuesta a la exposición al arsénico, podría venir mediada por procesos epigenéticos inducidos por este agente. De forma general, parece que la exposición al arsénico da lugar a una hipometilación del DNA, la cual se podría explicar porque tanto la metilación del arsénico como la metilación del DNA usan el mismo donador del grupo metilo, SAM (s-adenosil metionina); por lo que una exposición prolongada al arsénico podría conducir a una insuficiencia de SAM y, por lo tanto, a una hipometilación del DNA. Por otro lado, también se ha observado una hipermetilación en los promotores de ciertos genes en el

cáncer de piel y de vejiga asociados con la exposición al arsénico. La hipo- o hipermetilación del promotor de ciertos genes puede mediar la carcinogénesis a través del aumento o disminución de la expresión de oncogenes o genes supresores de tumores (Hughes et al., 2011, Martínez et al., 2011, Ren et al., 2011, Smeester et al., 2011).

Otros mecanismos epigenéticos a través de los cuales el arsénico podría estar actuando sería a través de la modificación de las histonas y de la regulación de miRNA. Sin embargo a pesar de las propuestas existentes no está completamente claro cuál es el efecto del arsénico en la alteración epigenética, lo que requieren futuras investigaciones (Liu et al., 2008a, Guha Mazumder et al., 2011, Hughes et al., 2011, Ren et al., 2011, Smeester et al., 2011).

Como se desprende de lo anteriormente citado, son múltiples los mecanismos mediante los cuales el arsénico puede ejercer los diversos efectos que se le atribuyen. Aunque son múltiples los mecanismos generales propuestos, son pocos los estudios realizados para conocer el papel de genes específicos en la respuesta a la exposición al arsénico. Para resolver parte de estas dudas, nuestro Grupo se ha centrado en el estudio de un conjunto de factores nucleares hepáticos.

Como esta tesis se ha centrado en el estudio de los mecanismos de acción del arsénico en el hígado y especialmente en su efecto carcinogénico, destacar que de entre los mecanismos de acción del arsénico comentados, se han propuesto en concreto como mecanismos carcinogénicos del hígado la inducción de estrés oxidativo, la alteración de los niveles de metilación celular, la adquisición de tolerancia a la apoptosis y la inestabilidad genómica (Liu et al., 2008a, Majumdar et al., 2011).

1.2. Los factores hepáticos nucleares (HNFs) y su relación con la exposición al arsénico

En un estudio previo en nuestro laboratorio en el que se expusieron hámsteres de forma crónica (durante 18 semanas) a arsenito sódico a través del consumo de agua de beber (15 mg de iAs/L; pH = 7.5). En el que se observaron diferencias de expresión en varios genes entre los animales tratados y los control al hacer un rastreo del mRNA usando la técnica DD-PCR a partir del hígado de los animales expuestos (n=11) y los animales control (n=5). Uno de estos genes fue el factor nuclear hepático 1 α (HNF1 α), en el cual se observó una disminución de la expresión en los animales tratados respecto los controles (Hernández et al., 2011). Se trata de un factor de transcripción que forma parte

de una red compleja de interacciones, entre factores de transcripción hepáticos, que cuenta entre sus miembros con HNF4 α , HNF6 α , PXR y FOXM1, y que participan en la regulación de varios procesos fundamentales para el desarrollo y funcionamiento del hígado.

Como se ve en la Figura 6 todos estos factores de transcripción, HNF1 α , HNF4 α , HNF6 α , PXR y FOXM1, interactúan regulándose entre ellos en el hígado. Se conoce que HNF4 α participa en el control de la expresión a nivel del mensajero de HNF1 α , HNF6 α , PXR y HNF4 α (auto-regulación). HNF6 α participa en la regulación de HNF4 α , HNF1 α y FOXM1. HNF1 α participa en la regulación de HNF4 α y HNF1 α (auto-regulación). PXR participa en la regulación de HNF4 α y, por último, FOXM1 participa en la regulación de HNF6 α (Landry et al., 1997, Odom et al., 2004, Lazarevich et al., 2008, Gao et al., 2010, Pelletier et al., 2011, Koo et al., 2012).

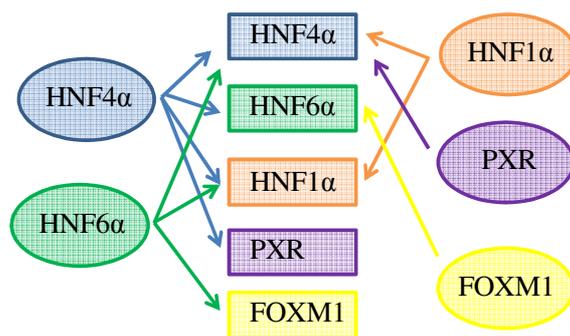


Figura 6 Red de interacciones entre factores de transcripción en hepatocitos. Se observa como los diferentes factores de transcripción, HNF1 α , HNF4 α , HNF6 α , PXR y FOXM1, interactúan regulándose entre ellos. Se conoce que HNF4 α participa en el control de la expresión a nivel del mensajero de HNF1 α , HNF6 α , PXR y HNF4 α (auto-regulación). HNF6 α participa en la regulación de HNF4 α , HNF1 α y FOXM1. HNF1 α participa en la regulación de HNF4 α y HNF1 α (auto-regulación). PXR participa en la regulación de HNF4 α y por último FOXM1 participa en la regulación de HNF6 α . Los círculos representan las proteínas y los rectángulos los genes de los que se ve regulada la transcripción a nivel de mRNA.

Se conoce que el factor HNF1 α , junto con la mayoría de los factores de transcripción hepáticos mencionados (HNF4 α , HNF6 α , PXR y FOXM1), es fundamental para el desarrollo y funcionamiento normal del hígado, jugando un papel muy importante en la diferenciación y en el mantenimiento del fenotipo epitelial de los hepatocitos. Además, se le considera un represor tumoral y su alteración se ha asociado con la diabetes (Ryffel 2001, Pelletier et al., 2011). Dado que la exposición crónica al arsénico supone un aumento en la incidencia de cáncer de hígado y de diabetes (Joshi et al., 2010), nosotros hemos apostado por estos genes como componentes esenciales de la respuesta observada frente al arsénico. Es por esto que es interesante conocer algunas de las características de cada uno de ellos.

1.2.1. El factor hepático nuclear 1 α (HNF1 α)

La familia HNF1 forma parte de la super-familia de las homoproteínas, y está formada por dos miembros, HNF1 α y HNF1 β , también conocidos como HNF1, LFB1, TCF1, MODY3 y IDDM20, y FJHN, HNF1, HPC11, LF-B3, MODY5 y TCF2, respectivamente. En humanos *HNF1 α* se encuentra en el cromosoma 12, en la región 12q22-qter, se trata de un gen de 23.767 pb que da lugar a una proteína de 631 aminoácidos. *HNF1 β* se localiza en el cromosoma 17, en la región 17cen-q21-3, se trata de un gen de 58.663 pb que da lugar a una proteína de 557 aminoácidos. Las proteínas resultantes del gen *HNF1 α* y *HNF1 β* son homólogas y pueden reconocer el mismo sitio de unión al DNA. HNF1 α se une al DNA formando homo-dímeros o hetero-dímeros con HNF1 β (Ryffel 2001, Abelev et al., 2006, Pelletier et al., 2011).

Se cree que este factor, al igual que el HNF4 α , interactúa con múltiples co-activadores que actúan alterando la estructura de la cromatina y activando la transcripción del gen en cuestión (Abelev et al., 2006).

Ambos factores (HNF1 α y HNF1 β) se expresan en el epitelio polarizado de varios tejidos, como el hígado, el riñón, el páncreas y el tracto digestivo. HNF1 α y HNF1 β se expresan de forma secuencial, es decir HNF1 β se expresa durante el desarrollo temprano, mientras que HNF1 α lo hace en los hepatocitos adultos, donde HNF1 β se expresa débilmente (Pelletier et al., 2011).

Aunque la expresión de HNF1 α no es crucial para el desarrollo embrionario normal, su inactivación da lugar a alteraciones en las funciones del hígado, riñón y páncreas en etapas tempranas de la vida. Algunas de las alteraciones observadas incluyen, retraso en el crecimiento, deficiencia en la secreción de la insulina por parte de las células β pancreáticas, alteración de la homeostasis de los ácidos grasos, disminución de la expresión del transportador glucosa-6-fosfato en los hepatocitos, disfunción renal y aumento de la masa del hígado (Ryffel 2001, Abelev et al., 2006).

En el hígado HNF1 α se une a los promotores de como mínimo 222 genes. Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que HNF1 α juega un papel importante en la diferenciación de los hepatocitos y en la regulación del metabolismo de la glucosa (gluconeogénesis), de los amino ácidos y de los lípidos (inhibe la lipogénesis), así como en la proliferación celular (inhibiendo la proliferación), en la síntesis de proteínas del suero y de otros componentes que participan en los procesos de detoxificación (Odom et al., 2004, Pelletier et al., 2011). Además, alteraciones en la expresión o mutaciones en

el gen *HNF1 β* se han relacionado con el desarrollo de MODY3, un tipo de diabetes (Nauck et al., 1998, Ryffel 2001, Lazarevich et al., 2008).

La diferenciación de los hepatocitos se consigue a través de una red compleja de regulaciones cruzadas entre distintos factores de transcripción, especialmente entre HNF1 α y HNF4 α (Pelletier et al., 2011). En dicha red HNF4 α estimula la expresión de HNF1 α , y a la vez, HNF1 α estimula también la expresión de HNF4 α . HNF1 α tiene la capacidad de actuar reprimiendo su propia expresión y la de HNF4 α , a través de la interacción con éste en el promotor (Odom et al., 2004, Pelletier et al., 2011). Si se induce la expresión de HNF1 α en células hepáticas desdiferenciadas se observa una re-diferenciación hepática, junto con la activación de la expresión de HNF4 α , e incluso del HNF1 α endógeno (Ryffel 2001).

Respecto a su papel en el proceso tumoral, se ha propuesto que HNF1 α tiene una función represora de genes potencialmente tumorigénicos del hígado, por lo que HNF1 α actuaría como un gen supresor de tumores (Pelletier et al., 2010, Pelletier et al., 2011).

En el cuadro siguiente se resumen los procesos con los que está relacionado el factor HNF1 α .

HNF1 α está relacionado con:

- Desarrollo y funcionamiento del hígado
- Diferenciación y mantenimiento de la diferenciación (EMT)
- Metabolismo de la glucosa, aminoácidos y lípidos
- Regulación del ciclo celular
- Síntesis de proteínas del suero
- Motilidad
- Se considera un supresor de tumores
- Diabetes

1.2.2. El factor hepático nuclear 4 α (HNF4 α)

El factor nuclear hepático 4 α (HNF4 α), también es conocido como TCF, HNF4, MODY, MODY1, NR2A1, TCF14 y NR2A21. En humanos el gen *HNF4 α* se encuentra localizado en el cromosoma 20, en la región 20q13.12, y consta de 75.590 pb, dando lugar a una proteína de 474 aminoácidos. HNF4 α pertenece a la sub-familia de receptores nucleares hormonales y se une al DNA en forma de homo-dímero (Ning et

al., 2010), expresándose principalmente en el hígado, riñón, intestino, páncreas y estómago (Lucas et al., 2005).

Al igual que el factor *HNF1 α* , el *HNF4 α* es un factor nuclear indispensable para la formación epitelial hepática durante el desarrollo embrionario y para el mantenimiento del fenotipo epitelial de los hepatocitos en el hígado adulto (Lemaigre et al., 2004, Ning et al., 2010). Su papel en el desarrollo embrionario es básico ya que los embriones de ratón deficientes para este factor mueren debido a un fallo en la gastrulación (Chen et al., 1994).

Para la diferenciación hepática y el funcionamiento normal del hígado adulto se necesita la expresión de varios genes específicos del hígado, y la expresión de la mayoría de genes hepáticos está regulada por la acción combinada de varios factores de transcripción. En todo este proceso se cree que el factor *HNF4 α* actúa como gen principal en una cascada de factores de transcripción que pueden conducir a la diferenciación de los hepatocitos (Naiki et al., 2002, Chen et al., 2010).

La importancia del factor *HNF4 α* radica en que en el hígado tiene como mínimo 1.575 genes diana; es decir, participa en el control de la expresión de un 12% de los genes totales, que representan en este caso casi la mitad de los genes activados en este órgano (Lemaigre et al., 2004), lo que lo hace un regulador central de varios procesos que controlan la homeostasis celular. Sus genes diana se encuentran involucrados en procesos tales como la homeostasis de los lípidos (transporte y metabolización), la progresión del ciclo celular (inhibición de la proliferación), la apoptosis (inducción), el metabolismo de la glucosa, de los aminoácidos y de diversos xenobióticos, los componentes de la coagulación de la sangre, la formación y mantenimiento de la morfología del epitelio, la diferenciación y mantenimiento de la diferenciación de los hepatocitos y en la motilidad (Li et al., 2000, Naiki et al., 2002, Odom et al., 2004, Lucas et al., 2005, Chen et al., 2010). Hay que señalar que, además, algunos de sus genes diana son factores de transcripción como *HNF1 α* , *PXR* y *HNF6 α* , además de sí mismo (auto-regulación) (Li et al., 2000, Odom et al., 2004, Abelev et al., 2006, Lazarevich et al., 2008, Lu et al., 2008).

HNF4 α reprime la transición epitelio-mesénquima (EMT) al inhibir la expresión de los genes reguladores de este proceso (*Snail* y *Slug*) y la de los genes mesenquimales en los hepatocitos diferenciados. De forma que *HNF4 α* , al igual que el *HNF1 α* , son factores fundamentales para la diferenciación de los hepatocitos, tanto por su papel en la represión de genes mesenquimales, como en la inducción de genes epiteliales

(Lazarevich et al., 2008, Ning et al., 2010, Pelletier et al., 2011, Santangelo et al., 2011). Por lo que respecta a su papel en los procesos tumorales, se ha visto que en los carcinomas hepatocelulares (HCC) y en los tumores renales se produce una disminución de la expresión de *HNF4α*; jugando éste un papel crítico en la progresión de HCC hacia un fenotipo más agresivo. Se ha visto que al incrementarse la expresión de *HNF4α* en las células tumorales estas recuperan parcialmente su morfología epitelial, se re-diferencian, disminuye la proliferación y se retarda significativamente el crecimiento del tumor después de un trasplante subcutáneo. Por estas razones se considera que este factor, al igual que el factor *HNF1α*, es un potencial supresor de tumores (Ishiyama et al., 2003, Lucas et al., 2005, Lazarevich et al., 2008, Ning et al., 2010).

Por lo que respecta al papel de *HNF4α* en los procesos diabéticos, se conoce que en las células β del páncreas *HNF4α* actúa regulando la secreción de la insulina y en el hígado regulando el metabolismo de la glucosa (Jafar-Mohammadi et al., 2011). Se ha observado que la alteración de la expresión del *HNF4α* se asocia con un aumento del riesgo de padecer diabetes tipo II (Odom et al., 2004). Además, mutaciones en *HNF4α* causan MODY1, diabetes mellitus caracterizada por su temprana aparición y un defecto en la secreción de la insulina en respuesta a la estimulación por parte de la glucosa en las células β pancreáticas (Nauck et al., 1998, Ryffel 2001).

En el cuadro siguiente, se resumen los procesos en los que interviene el factor *HNF4α*.

***HNF4α* está relacionado con:**

- Desarrollo y funcionamiento del hígado
- Mantenimiento de la morfología del epitelio
- Diferenciación y mantenimiento de la diferenciación (EMT, genes mesenquimales y genes epiteliales)
- Regulación del ciclo celular
- Apoptosis
- Metabolismo de la glucosa, aminoácidos, lípidos y xenobióticos
- Síntesis de componentes de coagulación
- Progresión tumoral (HCC)
- Motilidad
- Se considera un supresor de tumores
- Diabetes

1.2.3. El factor nuclear hepático 6 α (HNF6 α)

El factor nuclear hepático 6 α (HNF6 α) también se le conoce como HNF6. En humanos el gen *HNF6 α* se encuentra en el cromosoma 15, en la región 15q21.3, constando de 32.857 pb y dando lugar a una proteína de 465 aminoácidos. HNF6 α pertenece a la familia ONECUT y se trata de un factor de transcripción que se une al DNA en forma de monómero (Wang et al., 2012).

Durante el desarrollo se expresa en hígado, páncreas, piel, testículos, sistema nervioso e intestino, jugando un papel importante en el desarrollo de estos órganos. En cambio, en el organismo adulto, su expresión queda limitada al hígado y al páncreas (Landry et al., 1997, Wang et al., 2012).

En el hígado, durante las primeras fases de su desarrollo, se encuentran altos niveles de expresión de HNF6 α , que luego disminuyen, volviéndose casi indetectables. Sin embargo, su expresión vuelve a recuperarse justo en los últimos estadios del desarrollo del hígado. Es por esto que se considera que HNF6 α juega un papel importante en los primeros estadios del desarrollo del hígado, así como en el control de los últimos pasos de diferenciación del fenotipo adulto (Landry et al., 1997).

Respecto a la importancia de este factor, se ha observado que los ratones deficientes en HNF6 α presentan una función alterada del hígado y del páncreas, y unos niveles de glucosa en sangre altos. Esto confirma que HNF6 α es un factor clave en la diferenciación de las células epiteliales del hígado y de las células endocrinas en el páncreas (Lannoy et al., 2002, Abelev et al., 2006).

En el hígado, HNF6 α regula la expresión de cómo mínimo de 227 genes. A través de la regulación de sus genes diana HNF6 α está involucrado en el metabolismo de la glucosa (activa la glucosa-6-fosfatasa, los transportadores de la glucosa y la glucoquinasa) y del colesterol, así como en la biosíntesis y transporte de ácido biliar, en la síntesis de proteínas del suero, en la diferenciación y la regeneración del hígado, al tiempo que participa en la regulación del ciclo celular (estimula la proliferación), en la respuesta inflamatoria y en la migración celular (Lannoy et al., 2002, Lemaigre et al., 2004, Tan et al., 2006, Wang et al., 2012).

Como genes diana tiene a *HNF1 α* , *HNF4 α* y *FOXM1*, aunque también actúa controlando su propia expresión y, como hemos mencionado anteriormente, HNF4 α participa asimismo en la regulación de *HNF6 α* . Por tanto, junto con los otros factores transcripcionales, HNF6 α opera coordinadamente en la red de regulación de los hepatocitos (Landry et al., 1997, Odom et al., 2004).

Además de su función como factor de transcripción, HNF6 α actúa antagonizando los glucocorticoides al unirse a sus receptores. A través de este mecanismo, alteraciones en la expresión de HNF6 α pueden afectar a la respuesta inmune e inflamatoria, así como al metabolismo de la glucosa, de las proteínas y de los lípidos (Wang et al., 2012). Aunque no hay mucha información acerca del papel que juega HNF6 α en el proceso tumoral, se ha descrito que HNF6 α inhibe la metástasis del cáncer de colon (Wang et al., 2012). Por lo que respecta a su relación con el proceso diabético, al igual que sucedía con HNF1 α y HNF4 α , el factor HNF6 α también se ha encontrado asociado con MODY y con la diabetes tipo II (Moller et al., 1999, Lannoy et al., 2002, Tweedie et al., 2006).

En el siguiente cuadro se resumen los procesos en los que está implicado el HNF6 α .

HNF6 α está relacionado con:

- Desarrollo y funcionamiento del hígado
- Diferenciación
- Metabolismo de la glucosa y colesterol
- Biosíntesis y transporte del ácido biliar
- Regulación del ciclo celular
- Síntesis de proteínas del suero
- Regeneración
- Respuesta inflamatoria
- Motilidad
- Inhibe la metástasis (colón)
- Antagoniza receptores de glucocorticoides
- Diabetes

1.2.4. El factor PXR (Receptor X pregnane)

El receptor X pregnane (PXR) también se le conoce como BXR, PAR, PRR, SAR, SXR y PAR1. En humanos el gen PXR se encuentra localizado en el cromosoma 3, en la región 3q12-q13.3, constando de 38.002 pb y dando lugar a una proteína de 434 aminoácidos. PXR pertenece a la superfamilia de receptores hormonales nucleares y se une al DNA en forma de heterodímero, junto con el receptor X retinoico (RXR), ejerciendo como factor transcripcional (Ihunnah et al., 2011).

Aunque PXR se expresa principalmente en hígado, intestino y riñón, también se expresa (pero con niveles más bajos) en útero, ovario, placenta, mama, en la barrera hematoencefálica y en ciertas regiones del cerebro, corazón, glándulas adrenales y médula ósea (Gao et al., 2010).

En el hígado PXR regula la expresión de genes específicos y participa en el red de interacciones de factores de transcripción en los hepatocitos, donde actúa inhibiendo el factor HNF4 α (Gao et al., 2010). Además de estas funciones, también juega un papel fundamental en el metabolismo de los xenobióticos a través de la inducción de enzimas que participan tanto en la fase I (citocromo P-450) como en la fase II de metabolización, así como en la expresión de transportadores (transportadores ABC) (Ihunnah et al., 2011).

Además de su papel en la metabolización de los xenobióticos, PXR juega un papel importante en el metabolismo energético; participando en el control del metabolismo de la glucosa (inhibe la gluconeogénesis), de los lípidos (lipogénesis) y de la vitamina D. Sus genes diana están también involucrados en la homeostasis hormonal de esteroides, en procesos inflamatorios (inhibición), en el control del ciclo celular (inhibe la proliferación), en la regeneración y en la apoptosis (inhibición) (Ouyang et al., 2010, Ihunnah et al., 2011, Zhuang et al., 2011).

PXR también está involucrado en el proceso de carcinogénesis, previniendo el daño en el DNA inducido por carcinógenos, y actuando sobre la progresión tumoral. Su efecto en la supresión del crecimiento tumoral se debe principalmente a su capacidad de regular el ciclo celular, por lo que se sugiere que posee una actividad supresora de tumores, al igual que los factores HNF1 α y HNF4 α . Por otro lado, PXR podría jugar un papel importante en el desarrollo de tumores resistentes a fármacos antitumorales (Ouyang et al., 2010, Habano et al., 2011).

Por lo que respecta al posible papel del factor PXR en el proceso diabetogénico, no se tienen aún evidencias claras respecto a si PXR puede jugar algún papel en la diabetes tipo II (Gao et al., 2010).

En la el cuadro siguiente se resumen los principales procesos en los que está relacionado el factor PXR.

PXR está relacionado con:

- Metabolismo de xenobióticos, glucosa, lípidos y vitamina D
- Homeostasis hormonal de esteroides
- Procesos inflamatorios
- Regulación del ciclo celular
- Regeneración
- Apoptosis
- Crecimiento y progresión tumoral
- Se considera un supresor de tumores
- Diabetes

1.2.5. El factor FOXM1 (Proteína cabeza de horquilla M1)

La proteína *box forkhead* (cabeza de horquilla) M1 (FOXM1) también se la conoce como MPP2, TGT3, HFH11, HNF-3, INS-1, PIG29, FKHL16, FOXM1B, HFH-11, TRIDENT y MPHOSPH2, pertenece a la familia de los factores de transcripción *Forkhead*. En humanos el gen *FOXM1* se encuentra en el cromosoma 12, en la región 12q13; posee 19.475 pb y da lugar a una proteína de 748 aminoácidos (Koo et al., 2012).

A diferencia de lo que sucedía en los otros factores, la expresión de FOXM1 se ve limitada a las células en proliferación, por lo que en los adultos tan sólo se activa en los casos de regeneración. Se trata, así, de un factor clave en la regeneración del pulmón, hígado y páncreas (Raychaudhuri et al., 2011, Koo et al., 2012).

Además de su acción en los procesos regenerativos FOXM1, a través del control de sus genes diana, participa en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos como la regulación del ciclo celular (estimula la proliferación), la reparación del daño en el DNA, la homeostasis de tejidos, la apoptosis, la angiogénesis (al activar el VEGF), la senescencia (la inhibe), la diferenciación celular y la estabilidad cromosómica. Por lo que respecta a su relación con los otros factores, se ha visto que participa en la regulación de HNF6 α (Frau et al., 2010, Wu et al., 2010b, Koo et al., 2012).

Por las funciones que regula, se considera que FOXM1 juega un papel crucial en el desarrollo, lo que se demuestra en ratones deficientes para este factor que mueren antes de nacer, debido a anomalías en el hígado, los pulmones y el corazón (Koo et al., 2012).

En cuanto a su papel en el proceso tumoral, se ha detectado una expresión elevada de FOXM1 en el cáncer de hígado (HCC), de colón, de riñón, de próstata, de vejiga, de cerebro, de mama, de pulmón, de páncreas, de piel, de ovario y de boca, entre otros. De esto se desprende que FOXM1 juega un papel importante en la tumorigénesis y en la progresión tumoral; de hecho, FOXM1 actúa estimulando características de células madre, como la autorenovación, la inmortalidad y la habilidad proliferativa. Además, también actúa estimulando la transición EMT, la migración celular y la metástasis (Frau et al., 2010, Wu et al., 2010b, Raychaudhuri et al., 2011, Koo et al., 2012).

Respecto al mecanismo mediante el cual FOXM1 incide en la invasión tumoral y en la metástasis, se ha visto que FOXM1, actúa estimulando la expresión de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9), proteínas que actúan degradando la matriz extracelular y que se considera que están implicadas en la invasión tumoral y metástasis (Abelev et al., 2006, Wu et al., 2010b). Este efecto se ha observado en células tumorales de páncreas a las que se ha inactivado FOXM1, detectándose una disminución de la expresión de MMP-2 y MMP-9 acompañada de una disminución de la invasividad y metástasis (Wu et al., 2010b, Raychaudhuri et al., 2011, Koo et al., 2012).

Por lo que hace referencia al posible papel del factor FOXM1 en el proceso diabetogénico, no hemos podido encontrar ningún trabajo que relacione ambos aspectos.

En el cuadro siguiente se resumen los principales procesos en los que el factor FOXM1 se ha relacionado.

FOXM1 está relacionado con:

- Desarrollo del hígado
- Regulación del ciclo celular
- Regeneración
- Reparación del daño en el DNA
- Estabilidad cromosómica
- Apoptosis
- Diferenciación (EMT)
- Progresión tumoral
- Invasividad y metástasis (MMP-2 y MMP-9)
- Motilidad

1.3. Indicadores utilizados para evaluar procesos tumorales

Como hemos visto hasta al momento, tanto el arsénico como a los factores de transcripción se les ha asociado con el proceso de tumorigénesis. Por lo que cuando se desarrollan estudios carcinogénicos es necesario utilizar todo un compendio de indicadores/ensayos que nos permitan evaluar dichos procesos. Concretamente en esta trabajo nos hemos centrado en el estudio de la desdiferenciación, la remodelación de la matriz, así como del papel que juegan las células madre cancerosas en los tumores y de los marcadores que podemos utilizar para el estudio de todos estos procesos.

1.3.1. Desdiferenciación y marcadores de diferenciación hepática:

ALDOB, PEPCK2 y Cyp1 α

La desdiferenciación es un evento clave en la patología de todos los carcinomas, como sucede en el carcinoma hepatocelular (HCC), proceso que se ha asociado con la alteración en la expresión de diversos factores de transcripción enriquecidos en el hígado, como los estudiados en este trabajo (HNF1 α , HNF4 α , HNF6 α , PXR y FOXM1) (Li et al., 2000, Ishiyama et al., 2003, Abelev et al., 2006, Martínez-Jiménez et al., 2006).

El papel que juega la desdiferenciación en el proceso tumoral caracteriza su comportamiento; así, un tumor pobremente diferenciado sugiere un mal pronóstico, mientras que un tumor bien diferenciado sugiere un mejor pronóstico (Sell 2004).

Para determinar el nivel de desdiferenciación de un tumor, como es el caso de los tumores hepáticos, existen una serie de marcadores de diferenciación en los hepatocitos como ALDOB, PEPCK2 y Cyp1 α ; así, la disminución en la expresión de estos marcadores nos indica que está teniendo lugar un proceso de desdiferenciación de los hepatocitos (Martínez-Jiménez et al., 2006, Ooe et al., 2006).

1.3.2. Transición epitelio-mesénquima (EMT) y marcadores Slug y Snail

Ligado a los procesos de desdiferenciación se encuentra la transición epitelio-mesénquima (EMT), que es el proceso por el cual las células polarizadas del epitelio pierden su conexión célula-célula y adquieren características mesenquimales de motilidad e invasividad. El proceso reverso es la transición mesénquima-epitelio (MET). La dinámica del proceso EMT/MET es esencial para el desarrollo embrionario, así como para la regeneración y la iniciación de patologías como la fibrosis y la

metástasis cancerosa (Abelev et al., 2006, Santangelo et al., 2011) (Figura 7). EMT tiene lugar durante la progresión de varios carcinomas como el carcinoma hepatocelular (HCC), jugando un papel importante en la diseminación de los hepatocitos malignos (van Zijl et al., 2009, Santangelo et al., 2011).

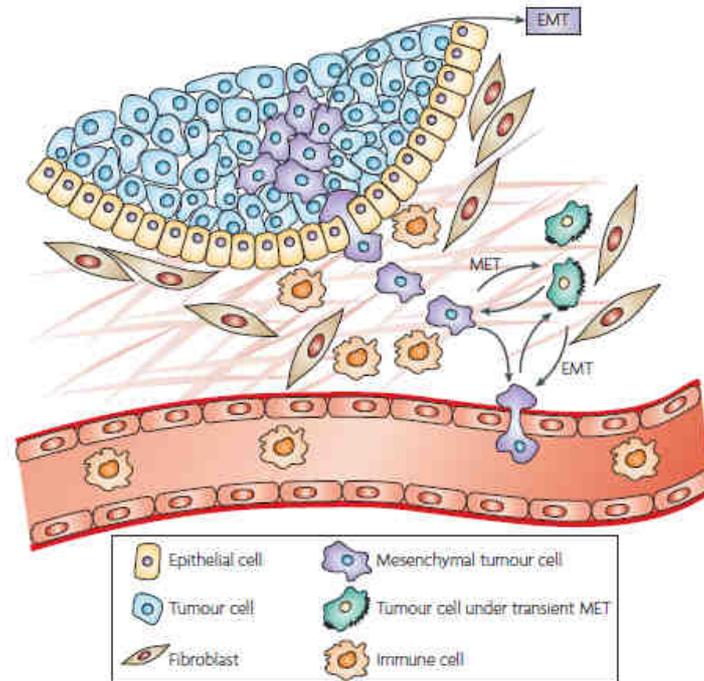


Figura 7 Diagrama esquemático del proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) y mesénquima-epitelio (MET) en un tumor. El proceso EMT durante la invasión tumoral se caracteriza por la pérdida de adhesión célula-célula y de polaridad, lo que da lugar a un cambio en el citoesqueleto y un aumento de la motilidad. Las células que previamente han sufrido un EMT pueden readquirir su fenotipo epitelial a través del proceso MET. EMT también puede tener un papel importante en la metástasis, al promover el paso de las células hacia el torrente sanguíneo (Peinado et al., 2007).

Los factores Snail (Snai1) y Slug (Snai2) pertenecen a la familia Snai, que se encuentra muy conservada a lo largo de la evolución. Estos dos factores están involucrados en un amplio espectro de funciones biológicas, incluyendo la diferenciación celular, la motilidad celular, la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Recientemente se ha visto que ambos factores están implicados en la progresión de tumores vía regulación (represión) de la E-caderina (Martin et al., 2005). La E-caderina es una molécula de adhesión célula-célula dependiente de calcio, que se organiza en complejos caderina-cadenina; complejos que son necesarios para el establecimiento del epitelio embrionario y la homeostasis del epitelio adulto. La pérdida de la E-caderina tiene lugar en muchos

carcinomas y se asocia con la invasividad tumoral (Peinado et al., 2007). En este contexto Snail y Slug inducen parcialmente EMT a través de la inhibición directa de la transcripción del gen de la E-caderina. Snail también actúa como un punto integrador de otros inductores de EMT, como son Wnt, TGF- β , Notch y estrógenos (Santangelo et al., 2011).

Se ha visto que tanto el factor nuclear HNF4 α como el HNF1 α juegan un papel importante en la transición EMT al participar en el mantenimiento del fenotipo de los hepatocitos diferenciados, estimulando MET. A la vez, inhiben la expresión de diversos marcadores mesenquimales (vimentina y fibronectina) e inhiben la expresión de Snail y Slug, reprimiendo así la EMT (Pelletier et al., 2011, Santangelo et al., 2011). Se ha visto como la restauración de la expresión de HNF4 α en células HCC revierte el fenotipo de los hepatocitos, estableciendo la organización epitelial y reduciendo la proliferación celular, lo que indica que la pérdida de HNF4 α es importante para la progresión de HCC (van Zijl et al., 2009, Ning et al., 2010, Santangelo et al., 2011). También se ha observado como HNF1 α coopera con HNF4 α inhibiendo la transición EMT (Pelletier et al., 2011).

Por otro lado, se ha visto como Snail aumenta la expresión de las MMP-2 y MMP-9, que actúan degradando la matriz extracelular (Peinado et al., 2007).

1.3.3. Remodelación de la matriz celular y secreción de MMP-2 y MMP-9

Uno de los marcadores más utilizados en los ensayos de carcinogénesis es la remodelación de la matriz celular mediante el estudio de la secreción de las metaloproteinasas de la matriz celular (MMPs). Las MMPs son enzimas de actividad proteolítica que actúan remodelando la matriz celular durante la progresión tumoral. La sobreproducción de MMPs es un factor importante en los procesos de invasión y metástasis, debido a que destruyen las barreras de diseminación de las células tumorales hacia otros territorios. También juegan un papel importante en la transdiferenciación epitelio-mesénquima. Por lo tanto, una manera de cuantificar la agresividad de un tumor es valorando la actividad de las metaloproteinasas (Abelev et al., 2006, Liu et al., 2012).

1.3.4. Marcadores de células madre cancerosas (CD90 y CD133) y de pluripotencia (Oct3/4, c-Myc, Lin28 y Notch2)

Las células madre (SC, *stem cells*) se definen como células que tienen la habilidad de perpetuarse a través de la auto-renovación y de generar células maduras de un tejido determinado a través de la diferenciación. Aunque no son muy abundantes, casi todos los tejidos y órganos, contienen poblaciones pequeñas de SCs (Hughes et al., 2011), Reya, 2001),

En los últimos años han incrementado las evidencias que dan soporte a la idea de que los tumores están organizados en poblaciones heterogéneas de células con diferentes propiedades biológicas y que la capacidad de formación, crecimiento y progresión del tumor recae en una porción pequeña de células, que son las denominadas células madre cancerosas (CSCs). Estas células presentan propiedades de las células madre, como la habilidad de autoperpetuarse y la de generar células maduras heterogéneas a través de la diferenciación, aunque de forma aberrante, generando la gran heterogeneidad de células existentes en los tumores (Ma et al., 2007, Shankar et al., 2011, Tokar et al., 2011).

La existencia de las CSC fue inicialmente descubierta en la leucemia mieloide aguda, aunque luego se han encontrado en una gran variedad de tumores sólidos como el de mama, de hígado, de cerebro, gástrico, de pulmón, de próstata, de páncreas y de colón (Reya et al., 2001, Ma et al., 2007).

Las CSCs, al igual que las SC, se pueden identificar mediante diferentes marcadores de membrana como el CD133 y el CD90, así como marcadores de pluripotencia como Oct3/4, c-Myc, Lin28 y Notch2 (Tokar et al., 2010, Liu et al., 2011, Shankar et al., 2011, Xue et al., 2012). El origen de las CSCs es complejo ya que pueden provenir tanto de SCs, como de células en proceso de diferenciación o de células maduras, en el que podrían tener un papel importante la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Figura 8) (Bomken et al., 2010, Roy et al., 2011).

Las terapias que existen contra la mayoría de cánceres se centran en atacar la gran masa de células del tumor. Y aunque estas terapias son capaces de disminuir la medida del tumor inicial, acostumbran a fallar en la erradicación del cáncer, todo y que se consigue alargar la vida de los pacientes. Crear fármacos contra las CSCs podría aumentar el éxito, prevenir las recaídas y incluso curar los tumores con metástasis (Figura 8) (Reya et al., 2001, Ma et al., 2007, Bomken et al., 2010).

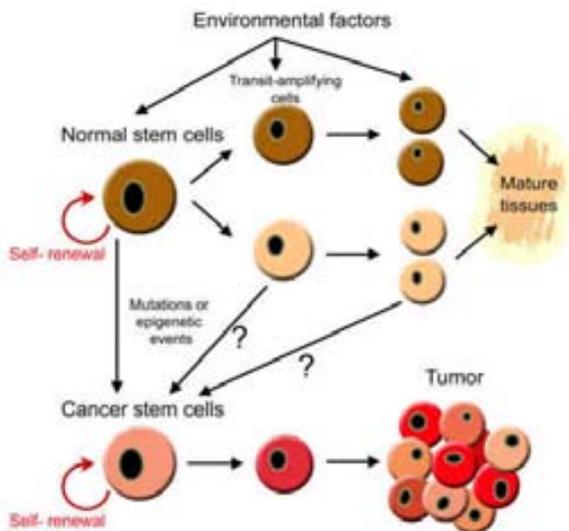


Figura 8 Formación de las células madre tumorales (CSCs). Numerosos factores ambientales pueden conducir a la formación de las CSCs a partir de las SCs y/o de células progenitoras. Las SCs tienen la habilidad de autorenovarse y diferenciarse en células progenitoras, que de forma sucesiva se diferencian en varios tipos celulares maduros. Las CSCs pueden originarse debido a eventos genéticos o epigenéticos a partir de las SCs o de las células progenitoras. Las CSCs también tienen la habilidad de autorenovarse y de diferenciarse, dando lugar a una población de células tumorales heterogénea (Tokar et al., 2011).

El interés de las SC en este contexto se debe a que se ha visto que los compuestos de arsénico afectan a la dinámica y diferenciación de las SC. Así, la exposición crónica a arsénico *in vivo* puede transformar directamente las SCs epiteliales de próstata en CSC (Tokar et al., 2011). Una manera de confirmar este resultado *in vitro*, y de manera sencilla, es utilizar la línea celular hepática, HepG2, ya que se conoce que aproximadamente un 8% de su población celular son CSCs (Ma et al., 2007). Por tanto, el estudio del efecto del arsénico en esta proporción de células tras el tratamiento con arsénico es de gran interés y utilidad, tanto en el estudio del efecto del éste como agente cancerígeno como en su uso como anti-cancerígeno.

2. OBJETIVOS

Como ha quedado reflejado en la Introducción de esta Tesis, hay regiones del mundo en las que en el ambiente se encuentran niveles de arsénico inorgánico perjudiciales para la salud. Entre los efectos perjudiciales de este agente se encuentra un aumento en la incidencia de diferentes tipos de cáncer, como el cáncer de hígado, así como otras patologías entre las que podemos destacar la diabetes. A pesar del gran interés despertado por el conocimiento de los mecanismos involucrados en los efectos del arsénico, aún quedan por determinar múltiples aspectos relacionados con dichos mecanismos.

Por lo tanto, el principal objetivo de este trabajo es aportar información sobre los mecanismos de acción del arsénico con el fin de progresar en su entendimiento.

Con la finalidad de conseguir nuestro objetivo principal hemos planteado toda una serie de subobjetivos específicos, como:

1. Determinar si la línea celular HepG2 es un buen modelo para el estudio de los mecanismos de acción del arsénico.
2. Determinar si la expresión de los factores nucleares HNF1 α , HNF4 α , HNF6 α , FOXM1 y PXR se ve alterada en la línea celular HepG2 en respuesta a una exposición aguda al arsénico inorgánico.
3. Determinar si la expresión de los factores nucleares clave, HNF1 α , HNF4 α , se ve alterada en la línea celular HepG2 en respuesta a dosis de arsénico consideradas medioambientalmente relevantes.
4. Determinar si la exposición de los factores clave, HNF1 α , HNF4 α , también se ve alterada *in vivo* en respuesta a una exposición al arsénico medioambientalmente relevante.
5. Determinar si, como consecuencia de la exposición crónica al arsénico y del efecto de éste sobre la expresión de los HNFs, la línea celular HepG2 muestra alteraciones en el estado de diferenciación celular.
6. Determinar si, como consecuencia de la exposición crónica al arsénico y del efecto de éste sobre la expresión de los HNFs, la línea celular HepG2 muestra alteraciones del metabolismo de la glucosa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. La línea HepG2

La línea celular utilizada en este trabajo ha sido la HepG2. Se trata de una línea celular hepática humana que proviene de un carcinoma hepatocelular de un varón americano caucásico de quince años. Esta línea celular crece en monocapa, formando pequeños agregados, y tienen un cariotipo hiperdiploide con 55 cromosomas. Las HepG2 secretan la mayoría de proteínas plasmáticas: albúmina, α_2 -macroglobulina, fibrinógeno, etc, y su implantación en ratones inmunocomprometidos no desarrolla tumores. Esta línea nos fue facilitada por la Dra. Isabel Vázquez Baanante del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona (UB).

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de esta línea celular consta de: medio MEM GlutaMax (Medio Mínimo Esencial, Life Technologies, NY, USA) complementado con 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), 2 mM de L-glutamina, 1,5 g/L de bicarbonato sódico, 1 mM de piruvato sódico, 10% FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria) y 1% de plasmocin (InvivoGen, CA, USA). Las condiciones de mantenimiento de los cultivos han sido de 37 °C con una atmósfera del 5% de CO₂.

3.2. Análisis de la cinética de crecimiento de las HepG2, mediante la realización de una curva de crecimiento

Con el fin de conocer la velocidad de crecimiento de las HepG2, y así poder diseñar los distintos experimentos de esta Tesis, se ha llevado a cabo un análisis de la cinética de crecimiento de las HepG2 mediante la realización de una curva de crecimiento. Para ello se sembraron 100.000 células por pocillo, en placas de 6 pocillos, con un volumen de 2,5 mL de medio por cada pocillo. Cada 24 horas, hasta las 120 horas, se tripsinizaron los cultivos y se contaron las células del pocillo correspondiente utilizando un contador automático (Beckman Coulter, CA, USA). Los experimentos para el estudio de la cinética de crecimiento se hicieron por triplicado.

3.3. Ensayos de viabilidad usando diferentes métodos

En esta Tesis el ensayo de viabilidad estándar ha consistido en el recuento de las células vivas tras su exposición a diferentes concentraciones de arsenito sódico. Éste ensayo se ha usado para tres finalidades, (1) para conocer qué concentraciones de arsenito sódico son subtóxicas para la línea celular HepG2, (2) para estudiar si las células HepG2 se

adaptan a la exposición del arsenito sódico cuando éstas se han expuesto previamente a concentraciones subtóxicas de forma prolongada y (3) para estudiar el efecto en la viabilidad de la re-expresión del factor HNF4 α en las células HepG2 tratadas con arsenito sódico.

Dado que existen diversas maneras de medir las células vivas tras un tratamiento, en este trabajo hemos utilizado diversas aproximaciones. Sin embargo, independiente del método utilizado para llevar a cabo el ensayo de viabilidad, el arsenito sódico siempre se preparó disolviéndolo con PBS y ajustando el pH con HCl hasta 7,4. La cantidad de arsenito sódico añadido al medio nunca superó el 1%.

Los primeros ensayos de viabilidad se hicieron usando el sistema “Cell Proliferation Kit II (XTT)” (Roche, Basel, Suiza). Este sistema se basa en la metabolización del compuesto XTT [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carboxianilida] por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales. Fruto de esta metabolización es la aparición de cristales de formazán, que se pueden medir por espectrometría, asumiendo que la cantidad presente es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. El protocolo seguido para la realización del ensayo de viabilidad con XTT fue el recomendado por el fabricante (Roche, Basel, Suiza).

Para la realización de este ensayo las células HepG2 se sembraron en placas de 96 pocillos, colocando 2.000 células en cada pocillo con un volumen final de 100 μ L de medio. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmosfera con 5% de CO₂. Pasadas las 24 horas se reemplazó el medio de cultivo por medio con arsenito sódico (Sigma-Aldrich, MO, USA), incubándose las células durante 24 ó 48 horas. Las concentraciones usadas de arsenito sódico fueron 0, 5, 10, 20, 80 y 100 μ M. Al cabo de 20 ó 42 h de incubación se añadió el reactivo XTT y la incubación duró 4 h más, completando así las 24 ó 48 horas de tratamiento agudo. La cantidad de formazán producido se calculó usando un lector de placas de ELISA, el Sunrisereader con el software XFluor (Tecan, Männedorf, Suiza).

Frente a la posibilidad de que el arsénico pudiera tener algún efecto tóxico sobre las mitocondrias y por lo tanto alterara los resultados de viabilidad realizados, se decidió repetir el experimento de viabilidad, pero esta vez llevando a cabo el conteo de las células “vivas”. En este caso las células HepG2 se sembraron en placas de 6 pocillos, ubicando 250.000 células por pocillo con un volumen final de 2 mL de medio. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera del 5% de CO₂. Pasadas las 24 horas se reemplazó el medio de las HepG2 con medio con arsenito sódico y se

incubaron las células durante 24 ó 48 horas. Las concentraciones usadas de arsenito sódico fueron las mismas que en el experimento anterior (0, 5, 10, 20, 40, 80 y 100 μM). Tras la incubación de 24 ó 48 horas, se eliminó el medio y las células se lavaron dos veces con 1 mL de PBS (con el fin de eliminar las células muertas). A continuación se añadieron 500 μL de tripsina al 1x (PAA Laboratories, Pasching, Austria), la cual se inactivó al cabo de 3 minutos añadiendo 1 mL de inactivador (PBS + 2% de FBS). El número de células se calculó usando el contador automático (Beckman Coulter, CA, USA) añadiendo un volumen de 100 μL de la muestra en una cubeta con 10 mL de isoton (Beckman Coulter, CA, USA). Una vez contadas todas las muestras se calculó el tanto por ciento de células de los diferentes tratamientos respecto al control (0 μM de arsenito sódico). Los ensayos de viabilidad se realizaron por triplicado.

El tercer tipo de experimento de viabilidad se llevó a cabo durante mi estancia en el Karolinska Institute. Este ensayo se llevó a cabo con el sistema NucleoCounter (Chemometec, Allerød, Denmark), el cual permite calcular tanto el número de células viables como de no viables. Para ello, el tratamiento de las células HepG2 se hizo exactamente de la misma forma que en el método anterior, en placas de 6 pocillos. Para realizar el ensayo de viabilidad con este sistema primero se cuentan las células totales y después las células muertas, pudiendo calcular así las células viables de cada muestra como la diferencia entre ambos valores. Para el cálculo de las células muertas lo que se hace es introducir parte de la muestra en los casetes, que contienen yoduro de propidio (PI), de forma que se teñirán sólo los núcleos de las células muertas. En cambio para el cálculo de las células totales se realiza un paso previo de lisis, de forma que ahora todos los núcleos se tiñen con el PI, tal y como podemos ver en el esquema de la Figura 9.

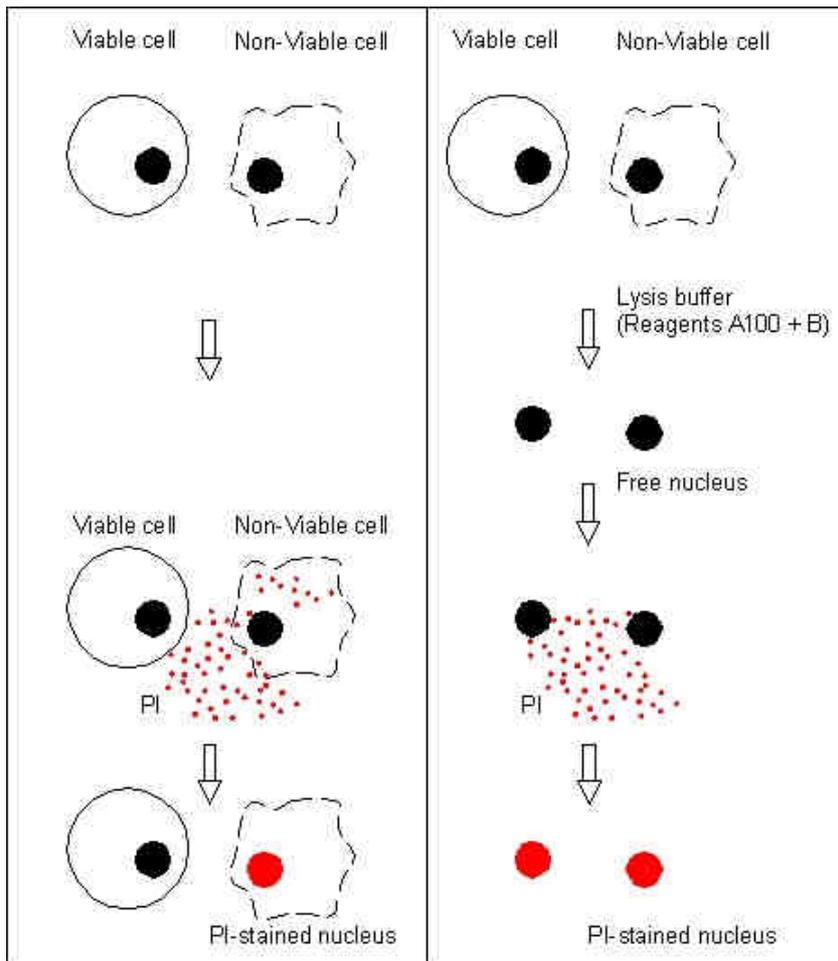


Figura 9 Funcionamiento del sistema NucleoCounter. En la figura de la izquierda, el PI sólo tiñe el núcleo de las células muertas, permitiendo conocer únicamente el número de células muertas de cada muestra. En cambio en la figura de la derecha, las células son previamente lisadas, por lo que el PI tiñe todos los núcleos presentes, obteniendo así el número total de células de cada muestra. Al restar de las células totales las células muertas, se obtiene el número de células viables.

3.4. Extracción de RNA y tratamiento con DNAasa

El RNA total de las muestras se extrajo utilizando el kit Trizol Reagent (Life Technologies, CA, USA), siguiendo las instrucciones y recomendaciones dadas por el fabricante. El trizol reagent es una solución que facilita el aislamiento del RNA manteniendo su integridad.

El primer paso para extraer el RNA de las células es lissarlas al añadir el trizol, seguido por la separación de fases con cloroformo, precipitación del RNA con isopropanol al 100%, lavado del RNA con etanol al 75%, y secado e hidratación con 20 μ L de agua libre de RNasas. La cantidad de RNA extraído se midió con el NanoDrop 100 (Thermoscientific, DE, USA) siendo ésta de alrededor de 2000 ng/ μ L.

Con el fin de eliminar la posible contaminación con DNA genómico de las muestras de RNA, 11 μ g de RNA se trataron con Turbo DNA-free kit (Ambion, TX, USA), lo que nos permitirá estar seguros, cuando se realice una RT-PCR o una PCR a Tiempo Real, de que se está amplificando el RNA y no el DNA genómico.

3.5. Análisis de la expresión, a nivel del mensajero, mediante RT-PCR en dos pasos

Para el estudio de la expresión en las células HepG2, de un conjunto seleccionado de genes, se hizo una RT-PCR en dos pasos. En la Tabla 3 se encuentran los cebadores de los genes estudiados, junto con la temperatura de fusión (T_m) y el tamaño del producto amplificado.

Tabla 3 Cebadores diseñados para el estudio de la expresión de un conjunto de genes mediante RT-PCR.

Genes	Secuencia	Longitud (pb)	T_m (°C)
<i>AS3MT</i> (directo)	5'-GGAGAGAAGTTGCCAACATC-3'	201	57
<i>AS3MT</i> (reverso)	5'-TGTCAGACTCTTCTGCAAGC-3'		
<i>HMOX</i> (directo)	5'-CTCAAACCTCCAAAAGCC-3'	220	59
<i>HMOX</i> (reverso)	5'-TCAAAAACCAACCCCAACCC-3'		
<i>MT1A</i> (directo)	5'-CTCGAAATGGACCCCAACT-3'	214	59
<i>MT1A</i> (reverso)	5'-ATATCTTCGAGCAGGGCTGTC-3'		
<i>AQP3</i> (directo)	5'-TGACCAGTTCATAGGCACAG-3'	305	57
<i>AQP3</i> (reverso)	5'-TCAGCTGGTACACGAAGACA-3'		
<i>AQP7</i> (directo)	5'-GGAAGATGGTGCAGAGTTC-3'	327	57
<i>AQP7</i> (reverso)	5'-AGTGGAGAATGGCCGTGTAG-3'		
<i>AQP9</i> (directo)	5'-CAAGCACAGTCGTTGAT-3'	371	55
<i>AQP9</i> (reverso)	5'-AGTTCCCGCTATGCTAC-3'		
<i>GLUT1</i> (directo)	5'-TCCACGAGCATCTTCGAGA-3'	393	57
<i>GLUT1</i> (reverso)	5'-ATACTGGAAGCACATGCCC-3'		
<i>GLUT2</i> (directo)	5'-CACTGATGCTGCATGTGGC-3'	522	57
<i>GLUT2</i> (reverso)	5'-ATGTGAACAGGGTAAAGGCC-3'		
<i>GLUT3</i> (directo)	5'-TTCAAGAGCCCATCTATGCC-3'	457	57

GLUT3 (reverso)	5'-GGTCTCAGGGACTTTGAAGA-3'		
MRP1 (directo)	5'-CATGAAGGCCATCGGACTCT-3'		
MRP1 (reverso)	5'-CAGGTCCACGTGCAGACA-3'	259	59
MRP2 (directo)	5'-ACAGAGGCTGGTGGCAACC -3'		
MRP2 (reverso)	5'-ACCATTACCTTGTCACTGTCCATGA-3'	227	59
β-actina (directo)	5'-GATGCAGAAGGAGATCACTG-3'		
β-actina (reverso)	5'-ACTCGTCATACTCCTGCTTG-3'	157	57-62

La RT-PCR consiste en dos pasos, una retrotranscripción (RT) en la que se sintetiza cDNA a partir de mRNA, seguida de una PCR proceso en el que se amplifican las copias del cDNA sintetizado previamente. En los dos pasos se usaron los cebadores específicos del gen de interés. La RT se hizo a partir del RNA extraído y tratado con DNasa con “Omniscript Reverse Transcription” (Qiagen, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniendo así el cDNA. Seguidamente con este cDNA se realizó una PCR con “DFS-Taq DNA Polymerase” (Bioron, Ludwigshafen, Alemania) siguiendo también las instrucciones del fabricante.

Finalmente se comprobó la expresión de los distintos genes estudiados en un gel de agarosa al 1,5% utilizando un voltaje de 120V, a partir del producto amplificado de la PCR.

3.6. Preparación de las concentraciones de arsénico y tratamiento de las células HepG2

El compuesto de arsénico utilizado ha sido el arsenito de sodio (Sigma-Aldrich, MO, USA). A partir de este compuesto en polvo se preparó una solución stock de 10 mM con PBS, a la que se le ajustó el pH a 7,4 con HCl. Una vez ajustado el pH se filtró con filtros de 22 micras, se hicieron alícuotas y se congelaron a -20 °C hasta su uso. Una vez descongeladas las alícuotas se guardan a 4 °C no más de 10 días. A partir de la solución stock se añade el volumen requerido de medio para obtener la concentración deseada.

Se han hecho dos tipos de exposiciones una de corta duración (24 ó 48 horas) y otra de larga duración (1-18 semanas).

En el primer caso las células se cultivaron en placas de 6 pocillos y, después de 24 horas de incubación, se les eliminó el medio con el que se encontraban creciendo (sin arsénico), se lavaron con PBS y se les añadió el medio con arsénico, manteniéndose en estas condiciones durante 24 ó 48 horas. Los tratamientos se hicieron por triplicado y una vez terminado el tratamiento se colectó el material necesario (RNA y proteínas) para realizar los experimentos pertinentes.

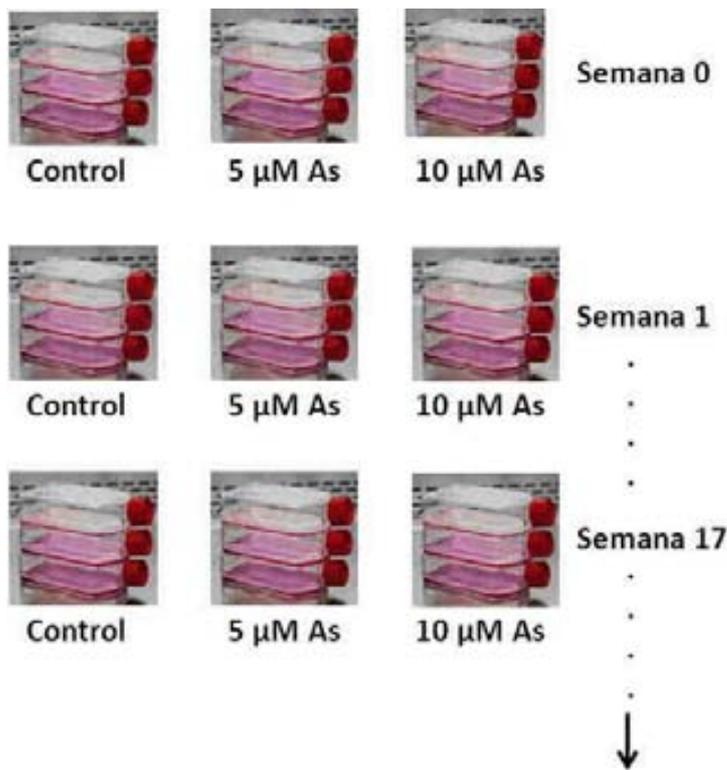


Figura 10 Método para la exposición de larga duración de las células HepG2 al arsenito sódico. Se trabajó con 3 placas de células controles, 3 de células expuestas a 5 μM y 3 de células expuestas a 10 μM a lo largo del tiempo (semanas). De esta forma se pueden comparar las células expuestas con las células controles de la misma semana de exposición.

En el caso de los tratamientos de larga duración las células se trataron en placas de 75 cm³ y, antes de llegar a la confluencia (una vez por semana), se tripsinizaron y se sembraron en nuevas placas de 75 cm³. A lo largo de la semana el medio de las células con el tratamiento se cambió dos veces, renovando de esta forma el medio y el arsénico. El protocolo utilizado supuso utilizar 3 frascos de 75 cm³ para las células controles, 3 para las células expuestas a 5 μM de arsénico y 3 para las expuestas a 10 μM de arsénico, como se puede observar en la Figura 10. De esta manera para cada semana de tratamiento teníamos las células expuestas con su respectivo control de la misma semana.

3.7. Exposición prolongada *in vivo* de arsénico

Un grupo de hámsteres *Golden Syrian* (5-6 semanas, \approx 100 g) fueron mantenidos en las instalaciones estabularias de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB). Los animales expuestos a arsénico (n=11) recibieron agua *ad libitum* con 15 mg de iAs/L (pH = 7,5, preparada de nuevo cada 2 días) durante 18 semanas. Los animales control (n=5) se mantuvieron bajo las mismas condiciones y recibieron la misma agua de beber, excepto por el contenido de arsénico. Tras las 18 semanas de exposición los hígados de todos los animales utilizados fueron separados y congelados a -80°C , para el posterior análisis de expresión. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la UAB.

3.8. Análisis de las especies de arsénico presentes en las células y en el medio, tras la exposición de las células HepG2 a arsenito sódico

Conocer la capacidad de metabolizar el arsénico es básico a la hora de utilizar una determinada línea celular, dada la diferente toxicidad de los distintos metabolitos que se pueden formar durante el proceso de metabolización. Para ello, las células se sembraron en placas de 6 pocillos durante 24 horas, y luego el medio se reemplazó con medio complementado con 5 μM de arsenito sódico. Pasadas 24 horas más de incubación, el medio y la mono-capa de células se colectaron en criotubos y se congelaron directamente en nitrógeno líquido. Para llevar a cabo el análisis químico de especiación las muestras se enviaron a México (laboratorio de la Dra. Adriana Sampayo en Monterrey), donde antes de llevar a cabo el análisis de especiación químico las células se lisaron en hielo durante 10 min con un tampón de lisis [10 mM Tris (pH 7,4), 10 mM EDTA (pH 8,0) y 0,5% Triton X-100].

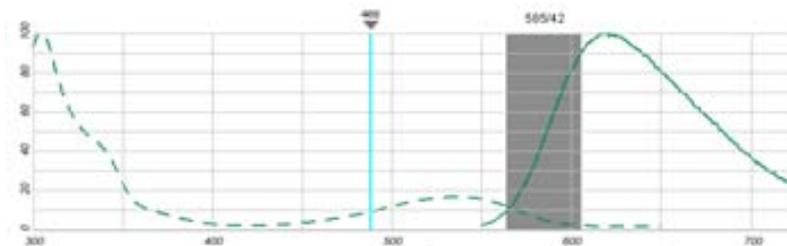
Las distintas especies de arsénico se valoraron mediante HPLC-ICP-MS (High Performance Liquid Chromatography con Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Con este método se midieron los niveles de las siguientes especies de arsénico: As^{III} , As^{V} , MMA^{III} , MMA^{V} , DMA^{V} .

3.9. Análisis del ciclo celular y de la apoptosis

Variaciones en el ciclo celular e inducción de apoptosis son parámetros asociadas con la toxicidad de un tratamiento. Para evaluar alteraciones en el ciclo celular se utilizó la citometría de flujo, que nos permite medir la cantidad de DNA en cada célula. Para ello las células se sembraron en placas de 6 pocillos y después de 24 horas de incubación el medio se reemplazó con medio con diferentes concentraciones de arsenito sódico (0, 0,5,

2, 5 y 10 μM) y se incubaron durante 24 ó 48 horas. Las células se fijaron con etanol al 70%, y una vez fijadas se eliminó el etanol, se resuspendieron en 500 μL de una solución de PBS + yoduro de propidio (PI) [40 $\mu\text{g}/\text{mL}$] (Life Technologies, CA, USA), a la que se añadieron 0,1 mg/mL de RNasa (Life Technologies, CA, USA) y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Pasado este tiempo las células se mantienen en hielo hasta analizarse en el citómetro de flujo. Para este análisis se ha utilizado el modelo BD FACScalibur (Becton Dickisnon, NJ, USA) del Servicio de Citometría de la UAB. Como control positivo se usó la mitomicina C ($\text{C}_5\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$) (MMC) (Sigma-Aldrich, MO, USA). La fluorescencia del PI se midió mediante la excitación con el láser azul de 488 nm y emisión en el canal FL2 de 585/42 nm (Figura 11).

A)



B)

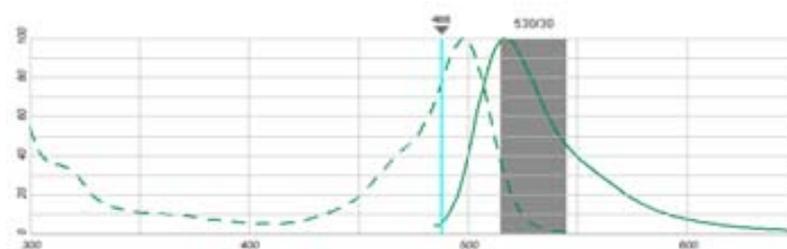


Figura 11 Excitación y emisión del yoduro de propidio (PI) y de la fluoresceína. (A) Excitación del IP a 488 nm y emisión a 586/42 nm. (B) Excitación de la fluoresceína a 488 nm y emisión a 530/30 nm.

La cuantificación de la fluorescencia nos permite diferenciar las células con contenido 2n (fase G1), 4n (fase G2) o intermedio (fase S) (Figura 12). El porcentaje de células en cada fase se calcula utilizando el software FlowJo (TreeStar, CA, USA).

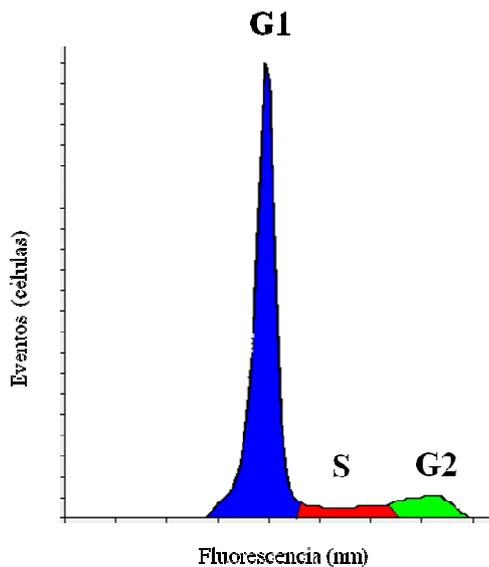


Figura 12 La cuantificación de la fluorescencia nos permite diferenciar las células con contenido $2n$ (fase G₀/G₁), $4n$ (fase G₂/M) o intermedio (fase S). Los niveles de fluorescencia presentes en las células están relacionados con la cantidad de DNA que éstas presentan, de forma que las células que se encuentran en la fase G₀/G₁ presentan menos fluorescencia que las que se encuentran en la fase S y éstas menos que las que se encuentran en la fase (G₂/M). La fluorescencia de estas últimas es el doble de las que se encuentran en la fase G₀/G₁. En la gráfica se representa la fluorescencia respecto a los eventos.

La inducción de apoptosis se analizó usando el kit “Annexin-V-FLUOS Staining Kit” (Roche, Basel, Suiza), que permite detectar las células en apoptosis al detectar la presencia en la parte externa de la membrana celular de la fosfatidilserina (PS). Normalmente la PS se encuentra en la parte interna de la membrana celular, pero al producirse una alteración de la membrana celular durante los primeros estadios de la apoptosis ésta se trasloca hacia la membrana externa (Figura 13).

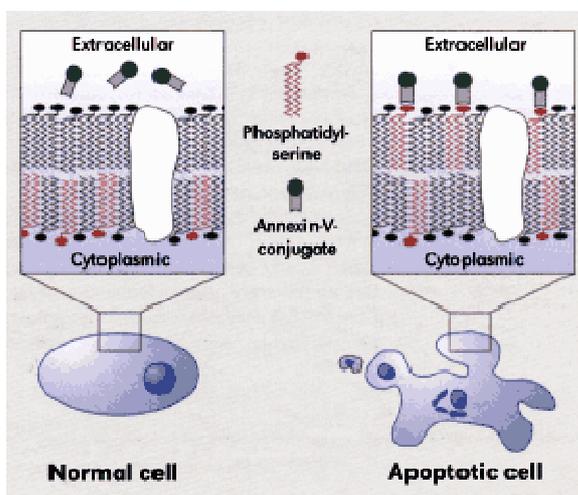


Figura 13. Representación de la localización de la fosfatidilserina (PS). En las células normales las PSs se encuentran en la parte interna de la membrana plasmática, pero en las células apoptóticas tiene lugar la translocación de las PS, permitiendo a la Annexin V unirse a la PS (Roche, Basel, Suiza).

Con el fin de diferenciar las células apoptóticas de las necróticas, las células se tiñen también con PI (Tabla 4). La preparación de las células para el estudio de la apoptosis se hizo siguiendo las indicaciones del fabricante. Para este análisis se ha utilizado el modelo BD FACScalibur (Becton Dickison, NJ, USA) del Servicio de Citometría de la UAB y como control positivo se usó la camptotecina (CPT) (Sigma-Aldrich, MO,

USA). Se midió la fluorescencia del PI y de la fluoresceína, mediante la excitación con el láser azul a 488 nm y la emisión en el canal FL2 de 585/42 nm para el PI y el canal FL1 de 530/30 nm para la fluoresceína (Figura 11). El porcentaje de células apoptóticas se calculó utilizando el software FlowJo (TreeStar, CA, USA). En la Tabla 4 se indica cómo se detectan los distintos efectos utilizando esta metodología.

Tabla 4 Diferenciación de las células normales, apoptóticas y necróticas utilizando el Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche). Las células normales no se teñirán ni con annexina ni con PI. Las apoptóticas solo se teñirán con la annexina, no con el PI ya que el núcleo se encuentra protegido dentro de las células. Las células necróticas presentarán los dos tipos de tinción, ya que presentan expuestos al exterior tanto las fosfatidilserina como el núcleo.

	Células normales	Células apoptóticas	Células necróticas
Annexina-V	-	+	+
PI	-	-	+

3.10. Síntesis de cDNA

La RT se realizó utilizando el kit “Transcriptor first strand cDNA synthesis” (Roche, Basel, Suiza). Para ello se partió de una concentración de 1 µg de RNA y la reacción se realizó utilizando los parámetros recomendados por el fabricante, usando como cebadores hexámeros al azar. Del producto resultante de la reacción se utilizaron 2 µL de cDNA para llevar a cabo la reacción de PCR a Tiempo Real, tal y como aconseja el fabricante.

3.11. Análisis de la expresión a nivel del mensajero, mediante la PCR a Tiempo Real

Para la amplificación mediante PCR a Tiempo Real se diseñaron los cebadores de un conjunto de genes, descritos en la Tabla 5. La PCR a Tiempo Real se realizó mediante el sistema “LightCycler® 480” con placas de 96 pocillos. Para la preparación de las muestras se utilizó el Kit “LightCycler 480 SYBR Green I Master” (Roche, Basel, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica nos permite cuantificar la cantidad de hebras de DNA de doble cadena a tiempo real al medir la señal fluorescente del SYBR Green, de forma que, durante la reacción el aumento de la fluorescencia del SYBR Green es directamente proporcional a la cantidad de DNA de doble hebra generada. Los parámetros utilizados para realizar la PCR fueron los recomendados por

el fabricante. Con el fin de comprobar que sólo se ha amplificado el producto deseado, se hace un análisis de la curva de fusión en cada reacción de PCR. El análisis de la curva de fusión se basa en que cada molécula de DNA de doble cadena tiene su temperatura de fusión concreta y, por lo tanto, se desnaturalizan a diferentes temperaturas. De forma complementaria a la curva de fusión, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1,5% a 120 V. Utilizando el software LightCycler 480 (Roche, Basel, Suiza), se realizó una cuantificación relativa avanzada de la expresión de los genes de interés, utilizando como gen de referencia la β -actina e indicándole al software cual es la eficiencia de amplificación de los cebadores utilizados, previamente calculada haciendo una curva estándar a partir de una dilución seriada con diferentes concentraciones de cDNA.

Tabla 5. Cebadores diseñados para el estudio de la expresión de un conjunto de genes a través de la PCR a Tiempo Real.

Genes	Secuencia	Longitud (pb)	Tm (°C)
<i>HNF1a</i> (directo)	5'-GTGCGTGTCTACAACCTGGTT-3'	214	59
<i>HNF1a</i> (reverso)	5'-CTTCTGCAGTCTCACTGGTC-3'		
<i>FOXM1</i> (directo)	5'-GCCATCAACAGCACTGAGAG-3'	192	57
<i>FOXM1</i> (reverso)	5'-GGTGAATGGTCCAGAAGGAG-3'		
<i>FOXA1</i> (directo)	5'-AGACACGCAGGAGGCCTACT-3'	236	61
<i>FOXA1</i> (reverso)	5'-GCCGCAGTCATGCTGTTCA-3'		
<i>HNF4a</i> (directo)	5'-GCTCCTAGGCAATGACTACA-3'	249	59
<i>HNF4a</i> (reverso)	5'-GTCGTTGATGTAGTCCTCCA-3'		
<i>HNF6a</i> (directo)	5'-GTATCACCACCGAGCTCAAG-3'	314	60
<i>HNF6a</i> (reverso)	5'-GGTGTGTTGCCTCTATCCTT-3'		
<i>PXR</i> (directo)	5'-TGAAGGTCTCTCTGCAGCTG-3'	314	57
<i>PXR</i> (reverso)	5'-CACCTGCAGTGTCTTCCAAG-3'		
<i>PEPCK2</i> (directo)	5'-AGATCATCTCCTTCGGCAGC-3'	144	60

<i>PEPCK2</i> (reverso)	5'-CCGGAGTCGACCTTCACTGT-3'		
<i>Aldo B</i> (directo)	5'-CTACCAGAAGGACAGCCAGG-3'	121	60
<i>Aldo B</i> (reverso)	5'-TCTTGTACTGAGCACAGCGC-3'		
<i>Cyp1a2</i> (directo)	5'-GTTCAAGCACAGCAAGAAGG-3'	207	60
<i>Cyp1a2</i> (reverso)	5'-GCCAATCACAGTGTCCAGCT-3'		
<i>CD90</i> (directo)	5'-CGAACCAACTTCACCAGCAA-3'	136	60
<i>CD90</i> (reverso)	5'-TTGTCTCTGAGCACTGTGACG-3'		
<i>CD133</i> (directo)	5'-AGCAGTCTGACCAGCGTGAA-3'	146	60
<i>CD133</i> (reverso)	5'-GGTGGAAGCTGCCTCAGTTC-3'		
<i>Slug</i> (directo)	5'-GGACACATTAGAACTCACACGGG-3'	51	62
<i>Slug</i> (reverso)	5'-GCAGTGAGGGCAAGAAAAGG-3'		
<i>Slain</i> (directo)	5'-CACTATGCCGCGCTCTTTC-3'	101	62
<i>Slain</i> (reverso)	5'-GCTGGAAGGTAAACTCTGGATTAGA-3'		
<i>β-actina</i> (directo)	5'-GATGCAGAAGGAGATCACTG-3'	157	57-62
<i>β-actina</i> (reverso)	5'-ACTCGTCATACTCCTGCTTG-3'		

3.12. Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot

Para medir los niveles de expresión a nivel de proteína se partió de un botón de células, lavado previamente con PBS y congeladas a -20 °C como mínimo durante 24 horas, al cual una vez descongelado se le añadió, con el fin de lisar las células, una solución de RIPA (RIPA Buffer Lysis, 10X, Millipore, MA, USA) junto con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free: protease inhibitor cocktail/tablets, Roche, Basel, Suiza) e inhibidores de fosfatasas (PhosSTOP, Roche, Basel, Suiza). La mezcla se incubó a 4 °C durante 10 minutos, y a continuación, con el fin de favorecer la lisis celular y la degradación del DNA, se sonicaron las muestras tres veces con un sonicador digital Branson (Branson Sonic Power, CT, USA), durante 15 segundos, a una amplitud del 20%.

Tabla 6 Resumen de los anticuerpos primarios utilizados para realizar el western-blot. Se indica la referencia del anticuerpo, la casa comercial, la dilución utilizada y el peso molecular.

Anticuerpo	Dilución o concentración	Peso molecular (kDa)
anti-HNF1α (610902) (BD, NJ, USA)	1:250	92
anti-FoxM1 (ab55006) (Abcam, MA, USA)	2,5 μ g/mL	84
anti-HNF4α (ab55223) (Abcam, MA, USA)	1:750	52
anti-HNF4a (ab92378) (Abcam, MA, USA)	1:1000	53
anti-HNF6α (sc-6559) (Santa Cruz, CA, USA)	1:500	50
anti-PXR (ab66756) (Abcam, MA, USA)	0,25 μ g/mL	50
anti-Notch2 (ab52302) (Abcam, MA, USA)	1:700	110
anti-Oct4 (ab27985) (Abcam, MA, USA)	1 μ g/mL	45
anti-Lin28 (ab46020) (Abcam, MA, USA)	1:1000	29
anti c-Myc (ab32) (Abcam, MA, USA)	1:1000	45
anti-β-actina (ab8226) (Abcam, MA, USA)	1:500	42
anti-β-actina (ab1801) (Abcam, MA, USA)	1:1000	42

Para eliminar los posibles restos celulares las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos. La concentración de proteínas obtenida se determinó con el método colorimétrico de Bradford (Bradford ProteinAssay, Bio-Rad, CA, USA), según las indicaciones del fabricante. La cantidad deseada de proteína (30 ng) se mezcló con la proporción necesaria de Laemmli 2X (Sigma-Aldrich, MO, USA), desnaturalizada durante 5 minutos a 95 °C y cargada en un gel desnaturalizante SDS-PAGE a la concentración de acrilamida del 4% para el gel apilador y del 10% para el gel de resolución. A continuación se procedió con un protocolo de Western Blot estándar, con transferencia en el sistema Transblot Semi-Dry de Bio-Rad (Bio-Rad, CA, USA), 1 hora

a 20 V, en filtro de nitrocelulosa de 0,45 μ g (Bio-Rad, CA, USA). Posteriormente se bloquearon las membranas con 5% de leche desnatada en TBS + Tween durante 2 horas a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 16 horas a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los indicados en la Tabla 6.

El filtro de nitrocelulosa se incubó posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP), durante 1 hora a temperatura ambiente y se detectó la señal después de incubar el filtro con la solución sustrato Pierce ECL Western Blottingsubstrate (Thermo Scientific, IL, USA), usando el sistema Gene Genome Syngene Bio Imaging (Syngene, MD, USA). Como control se usó la β -actina (Tabla 6) y los anticuerpos secundarios utilizados fueron los indicados en la Tabla 7.

Tabla 7 Resumen de los anticuerpos secundarios utilizados para realizar el western-blot. Se indica la referencia del anticuerpo, la casa comercial y la dilución utilizada.

Anticuerpo	Dilución
anti-Mouse IgG (ab6808) (Abcam, MA, USA)	1:2500
anti-Rabbit IgG (ab6721) (Abcam, MA, USA),	1:2500
anti-Goat IgG (SC-2020) (Santa Cruz, CA, USA)	1:5000

3.13.Extracción de proteína a partir del hígado de hámster

En un estudio previo se trataron con arsenito sódico 11 hámsteres (Golden Syrian hámsteres) de entre 5 y 10 semanas de vida con unos 100 g de peso. Éstos se trataron con 15 mg de arsenito sódico (25 mg NaAsO₂/L, pH 7,5) durante 18 semanas a través del agua de la dieta. Después del tratamiento, el hígado de estos hámster y el de 5 controles tratados con sólo agua se congelaron a -80 °C.

A partir de los 11 hígados proveniente de los hámster expuestos a i-As y el de los 5 animales controles se extrajo la proteína para ver la expresión de los genes de interés. Para realizar dicha extracción lo primero que se hizo es cortar con un bisturí un pequeño trozo de hígado, que se introdujo en un tubo (critubo), para su homogenización. Para ello se añadió Laemmli (10 μ L por μ g de tejido) (Sigma-Aldrich, MO, USA), se homogenizó con unos pequeños morteros de forma mecánica y seguidamente se sonicó

durante 15 segundos a una amplitud del 20%, tres veces (Branson Sonic Power, CT, USA). La cuantificación de la proteína extraída se hizo con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, DE, USA), de la manera antes indicada.

3.14. Estudio de la adaptabilidad de las células HepG2 a la toxicidad del arsenito sódico

Con el objetivo de conocer si las células tienen la capacidad de adaptarse a la exposición al arsénico se realizó un estudio de adaptabilidad a la toxicidad del este compuesto en las células HepG2. Para ello, y de forma previa a la realización del ensayo de viabilidad, las células HepG2 se trataron con 0, 5 y 10 μM de arsenito sódico durante 10 semanas. A continuación se realizó el ensayo de viabilidad, siguiendo el protocolo explicado previamente, en el que las células se expusieron durante 24 horas a diferentes concentraciones de arsenito sódico (5, 10, 20, 50, 100 y 150 μM).

3.15. Utilización de la técnica de zimograma

Una de las técnicas más utilizadas para la detección de la actividad de las MMPs es el zimograma de sustrato. Se trata de una técnica electroforética, basada en el SDS-PAGE, que incluye un sustrato copolarizado junto con el gel de poliacrilamida, para la detección de la actividad enzimática, basado en la separación del peso molecular. Según el sustrato incorporado se pueden detectar diferentes MMPs. Para la MMP-2 y la MMP-9 el sustrato más utilizado es la gelatina (Kupai et al., 2010). Esta técnica permite la visualización y la cuantificación de los niveles de proteinasas de una muestra y se basa en la hidrólisis por parte de las proteinasas de su sustrato (el proteoglicano, la gelatina o la caseína) presente en un gel. Esta técnica es particularmente útil para el análisis de la composición de proteínasa en muestras biológicas complejas, debido a que su visualización depende de su actividad proteolítica (Troeborg et al., 2004).

En nuestro estudio, a las células HepG2 expuestas a lo largo de 18 semanas a 5 μM de arsenito sódico se les midió la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2, MMP-9), comparando los valores obtenidos con los de los controles del mismo pase celular. Para ello se recolectó y se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ el medio, el cual permaneció congelado hasta en día en que se realizó el zimograma. Para ello, se descongelaron en hielo las muestras, se centrifugaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 800 rpm durante 10 minutos y luego, el medio se mezcló con tampón de zimograma (Bio-Rad, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Para examinar la actividad de MMP-2 y de MMP-9, se realizó un SDS-

PAGE zimograma con geles de caseína al 10% (Bio-Rad, CA, USA). Se cargaron las muestras en el gel y se corrieron a 100 V durante 90 minutos en tampón 1X Tris-Glicina SDS (Bio-Rad, CA, USA). Una vez pasados los 90 minutos, los geles se incubaron en tampón renaturalizador (Bio-Rad, CA, USA) en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, los geles se equilibraron con tampón revelador (Bio-Rad, CA, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Se sustituyó el tampón revelador por un nuevo tampón y se incubó a 37 °C durante toda la noche para la máxima sensibilidad. El día siguiente se tiñeron los geles con 0,1% de azul brillante de Coomassie (Bio-Rad, CA, USA) durante 1 hora, y se destiñen con metanol:ácido acético:dH₂O (4:1:5) hasta que las áreas de la actividad proteásica aparecían como bandas claras sobre el fondo azul oscuro. Finalmente, se midió el área de las bandas de lisis usando el programa de análisis ImageJ.

3.16. Análisis de la producción de glucosa y respuesta a la insulina por parte de las células tratadas crónicamente con arsenito sódico

Con el objetivo de estudiar si la exposición prolongada de las células HepG2 a arsenito sódico estaba induciendo una alteración del metabolismo de la glucosa, tanto por lo que hace a la producción de glucosa por parte de las células, como a su respuesta frente a la insulina, se realizó un análisis de la producción de glucosa y se estudió la respuesta de estas células frente a la insulina.

Para llevar a cabo estos experimentos se sembraron las células en placas de 24 pocillos y después de 24 horas de incubación, se cambió el medio por DMEM libre de glucosa (Life Technologies, NY, USA) suplementado con 2 mM de piruvato sódico (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 20 mM de lactato sódico (Sigma-Aldrich, MO, USA) y 10% de FBS (Life Technologies, NY, USA). Pasadas 3 horas, se colectó el medio para medir los niveles de glucosa usando el ensayo “Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay kit” (Life Technologies, NY, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y con el lector espectrofotométrico Sunrise (Tecan, Männedorf, Suiza).

Para llevar a cabo el estudio de la respuesta a la insulina, se utilizó el mismo método de lectura de la glucosa, pero con algunas pequeñas variaciones explicadas a continuación. Después de las 24 horas de incubación, se reemplazó el medio de las células por medio DMEM sin glucosa y suplementado. Al cabo de 8 horas se añadió 1 µM de insulina (Sigma-Aldrich, MO, USA) y las células se incubaron durante 3 horas más. Una vez pasadas estas 3 horas, se colectó el medio y se midió la concentración de glucosa.

En todas las muestras analizadas los niveles de glucosa obtenidos se ajustaron con la concentración de proteína presente en cada muestra.

3.17. Producción de plásmidos en *E.coli* y su purificación

Para la producción de plásmidos se usaron bacterias *E.coli* competentes (Life Technologies, CA, USA) a las que se les añadieron 50 ng del plásmido deseado. Se incuban durante 30 minutos en hielo y a continuación se transfirieron a agua caliente a 42 °C durante 90 segundos momento en el que el plásmido entra dentro de la bacteria. A continuación se colocaron en hielo durante 3 minutos, y se les añadió LB, dejándose durante 30 minutos en agitación a 37 °C. Se añadieron 30 µL de la suspensión de células en placas de Petri con agar que contienen ampicilina, en nuestro caso, y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. El día siguiente se seleccionó una colonia de las placas de Petri, se colocó en 10 mL de LB con ampicilina y se dejó incubando a 37 °C en agitación durante 16 horas. Posteriormente se procedió a la purificación de los plásmidos.

La purificación de los plásmidos se hizo con el kit Hispeed Plasmid Purification (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de plásmido purificado se midió usando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, DE, USA).

3.18. Transfección de las células HepG2 con HNF4 α

Con la finalidad de profundizar en el estudio del papel del factor HNF4 α en la línea celular HepG2, ésta se transfectó con el plásmido-HNF4 α (regalo de Dr. Ferdinand M. van't Hooft). Para ello se usaron placas de 6 pocillos en las que se sembraron 300.000 células por pocillo. Se dejaron crecer durante 24 horas y luego se procedió a la transfección mediante la adicción de la concentración deseada de plásmido en medio OPTIMEM (Life Technologies, CA, USA) junto con lipofectamina 2000 (LF) (Life Technologies, CA, USA), de la que se añadieron 3 µL de LF por cada 1 µg de plásmido. El protocolo que se siguió para llevar a cabo la transfección fue el siguiente: se prepararon dos eppendorf uno con medio y LF y el otro con el medio y el plásmido, se esperaron 5 minutos y luego éstos se mezclaron y se esperó durante 20 minutos, tiempo en el que tiene lugar la interacción de los lípidos de la LF con los plásmidos. A continuación se añadió el contenido a las células, que habían estado previamente expuestas al medio OPTIMEM durante 20 minutos. Después de la adicción del

plásmido con la LF, las células se dejaron en el incubador durante 5 horas. Al cabo de estas 5 horas, se eliminó el medio, se limpió con PBS y se añadió el medio habitual de crecimiento de las células.

Una vez transcurridas 24 horas desde la transfección, se extrae la proteína de las células para hacer un Western blot y así observar el cambio de expresión del factor HNF4 α (sobreexpresión).

3.19. Estudio de la expresión de HNF4 α posteriormente a la transfección de las células con HNF4 α y exposición de éstas al arsenito sódico

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron tres tipos de control: uno de los controles son células no transfectadas y expuestas a arsenito sódico; el otro control son células no transfectadas pero si expuestas a la LF 2000 y a las diferentes concentraciones de arsenito sódico; finalmente, el tercer control consiste en células transfectadas con el plásmido sin gen y expuestas a las diferentes concentraciones de arsenito sódico. En el experimento propiamente dicho se utilizaron células transfectadas con el plásmido HNF4 α y expuestas a arsenito sódico.

Para ello se sembraron en placas de 6 pocillos 300.000 células por pocillo. Al cabo de 24 horas las células se transfectaron siguiendo el protocolo explicado en el apartado anterior. Una vez transfectadas se esperaron 24 horas para la adición de las diferentes concentraciones de arsenito sódico. Finalmente se procedió a realizar la extracción de proteína y la realización de los western blot.

Para la posterior comparación de la expresión del HNF4 α se hicieron los respectivos western blots cargándose en un mismo gel todas las muestras a comparar.

3.20. Estudio de la viabilidad celular en las células transfectadas con HNF4 α y expuestas al arsenito sódico

Para determinar esta variable se sembraron 300.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Al cabo de 24 horas las células se transfectaron siguiendo el protocolo explicado previamente. Una vez transfectadas se esperaron 24 horas para la adición de las diferentes concentraciones de arsénico. Finalmente se procedió a realizar el ensayo de viabilidad siguiendo el protocolo explicado previamente.

Con la finalidad de llevar a cabo este experimento se trabajó conjuntamente con 4 placas de 6 pocillos. En la número 1, las células no fueron transfectadas, éstas sólo fueron expuestas a las diferentes concentraciones de arsenito sódico. Las células de la

placa número 2 tampoco se transfectaron pero si se expusieron a la LF y a las diferentes concentraciones de arsenito sódico. Las células de la placa 3 y 4 se transfectaron y se expusieron a las diferentes concentraciones de arsenito sódico. Las diferencias entre la 3 y la 4 radican en que la número 3 se transfectó con el plásmido control, el cual no sobreexpresa ningún gen, y la número 4 con el plásmido con el gen HNF4 α .

3.21. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS v15.9 para Windows. Como ninguno de los parámetros analizados presenta una distribución normal, se usó la prueba U de Mann-Whitney, también conocida como Wilcoxon. Se trata de una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Las muestras se consideraron significativamente diferentes siempre que se obtuviera un $P < 0,05$.

4. RESULTADO

4.1. La línea celular HepG2 es un buen modelo para el estudio *in vitro* de los mecanismos de acción del arsénico

En un estudio previo de nuestro laboratorio en el que se expusieron hámsteres de forma crónica (durante 18 semanas) a arsenito sódico, a través del consumo de agua de beber (0,27 mg NaAsO₂/L; pH = 7,5), se observaron diferencias en la expresión en varios genes entre los animales tratados y los control. Estas diferencias se observaron al hacer un rastreo del mRNA, usando la técnica DD-PCR a partir del hígado de animales expuestos (n=11) y animales control (n=5). Uno de estos genes fue el factor nuclear hepático 1α (HNF1α), en el que se observó una disminución de la expresión en los animales, tratados respecto a los controles (Hernández et al., 2011).

Con la finalidad de poder centrarnos en el estudio de este factor, así como de otros que se encuentran en la misma red, se decidió pasar a un modelo *in vitro*. Para este objetivo se decidió utilizar una línea hepática, como la HepG2, por tres motivos:

- (1) porque el hígado junto con el riñón son los principales órganos diana del arsénico,
- (2) porque es en el hígado donde tiene lugar principalmente la biometilación del arsénico, y (3) porque la red de factores transcripción a estudiar es específica de hígado, aunque algunos de estos factores también se expresen en otros órganos.

La línea celular HepG2 ha sido y está siendo una línea celular ampliamente utilizada para el estudio de los efectos de diferentes compuestos de arsénico *in vitro* (Cui et al., 2006b, Liu et al., 2011, Watanabe et al., 2011, Noreault-Conti et al., 2012). También se está utilizando en el estudio de la expresión de los factores nucleares seleccionados, tanto por lo que hace a su efecto en procesos cancerosos como en la diabetes (Stepanian et al., 2003, Navalón-García et al., 2006, Zamule et al., 2008, Yu et al., 2009).

De todas formas, antes de empezar a trabajar con la línea celular hepática HepG2, se realizaron toda una serie de experimentos con la finalidad de ver si realmente ésta era una buena línea para el estudio de los mecanismos de acción del arsénico en el hígado.

4.1.1. Las células HepG2 expresan los principales transportadores del arsénico y la enzima clave para la metabolización del arsénico

El primer paso antes de empezar los estudios sobre los mecanismos de acción de este metaloide fue conocer si esta línea celular era capaz de incorporar el arsénico inorgánico del medio. Mediante una RT-PCR se estudió la expresión, a nivel del

mensajero, de un conjunto de genes relacionados con el transporte del arsénico hacia dentro y hacia fuera de la célula. Los transportadores estudiados fueron: *AQP3* (acuoporina 3), *AQP9* (acuoporina 9), *GLUT1* (transportador de la glucosa 1), *GLUT2* (transportador de la glucosa 2), *GLUT3* (transportador de la glucosa 3), *MRP1* (proteína multi-resistente a los fármacos 1) y *MRP2* (proteína multi-resistente a los fármacos 2). También se estudió la expresión de la *AS3MT* (arsénico-3-metiltransferasa), enzima fundamental en el biometabolismo del arsénico.

En la Figura 14, podemos ver los resultados de las RT-PCR, que nos muestran como las HepG2 expresan los genes de todos los transportadores estudiados: *MRP1* (259 pb), *MRP2* (227 pb), *GLUT1* (393 pb), *GLUT2* (521 pb), *GLUT3* (457 pb), *AQP3* (305 pb) y *AQP9* (371 pb). Además de los distintos transportadores involucrados en la entrada y salida de los distintos compuestos de arsénico de la célula, se demuestra que nuestra línea HepG2 también expresa el gen *AS3MT*, cuyo producto está directamente involucrado en el paso del arsénico inorgánico a sus formas metiladas (MMA y DMA), que juegan un papel esencial en la toxicidad y genotoxicidad del arsénico.

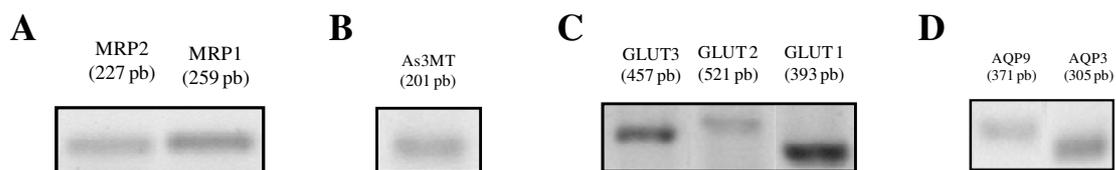


Figura 14 Expresión de un conjunto de transportadores del arsénico (*MRP1*, *MRP2*, *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*, *AQP3*, *AQP9*), así como de la *AS3MT*, en las células HepG2. Mediante RT-PCR se estudió la expresión de un conjunto de transportadores del arsénico y de *AS3MT* en las células HepG2. (A) Las HepG2 expresan los genes *MRP1* (259 pb) y *MRP2* (227 pb). (B) Las HepG2 expresan el gen *AS3MT* (201 pb). (C) Las HepG2 expresan los genes *GLUT1* (393 pb), *GLUT2* (521 pb) y *GLUT3* (457 pb). (D) Las HepG2 expresan los genes *AQP3* (305 pb) y *AQP9* (371 pb). En todos los casos se corrieron geles de un 2% de agarosa, durante 30 minutos a 120 V.

4.1.2. Análisis de las especies de arsénico presentes en las células y en el medio tras la exposición de las células HepG2 a arsenito sódico

Aunque en el apartado anterior se mostró que la línea seleccionada expresaba el gen *AS3MT*, es preciso demostrar que este metabolismo verdaderamente tiene lugar en dichas células. Para ello, la mejor manera es detectar la presencia de sus metabolitos metilados tras la exposición a arsénico inorgánico. Para ello, mediante HPLC, se analizó la presencia y proporciones de los metabolitos y de sus especies inorgánicas tras la

exposición a una concentración de 5 μM de arsenito sódico, durante 48 horas. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 15.

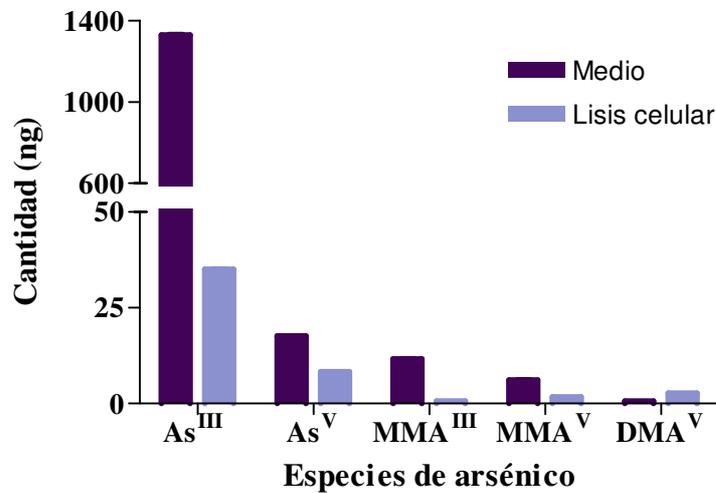


Figura 15 Especies de arsénico observadas tras la exposición de las células HepG2 a arsenito sódico. Las células HepG2 se expusieron durante 48 horas a 5 μM de arsenito sódico, y se analizaron las especies de arsénico en las células y en el medio. Las especies de arsénico encontradas en las células fueron: As^{III} (35 ng), As^V (8,25 ng), MMA^{III} (0,65 ng), MMA^V (1,7 ng) y DMA^V (2,7 ng). En el medio fueron: As^{III} (1328 ng), As^V (17,6 ng), MMA^{III} (11,6 ng), MMA^V (6,1 ng) y DMA^V (0,65 ng).

Como se observa en el Figura 15, tras el tratamiento se observa la presencia de MMA y DMA, indicativo de que la metabolización del arsénico inorgánico tuvo lugar.

Las especies de arsénico encontradas en las células fueron: As^{III} (35 ng), As^V (8,25 ng), MMA^{III} (0,65 ng), MMA^V (1,7 ng) y DMA^V (2,7 ng). En el medio fueron: As^{III} (1328 ng), As^V (17,6 ng), MMA^{III} (11,6 ng), MMA^V (6,1 ng) y DMA^V (0,65 ng). De estos resultados se desprende que en el medio se encuentra un 90,6% del arsénico total, mientras que un 3,4% se halla dentro de las células. Asimismo se ve que un 98,33% del arsénico total se encuentra en estado inorgánico y un 1,67% en estado orgánico y, respecto a su compartimentación, se observa que el porcentaje de arsénico inorgánico dentro de la célula es del 89,5%, mientras que en el medio éste es de 98,6%. Estos resultados confirman que no tan sólo las células HepG2 expresan AS3MT sino que pueden llevar a cabo de manera efectiva la metabolización del arsénico inorgánico a sus formas metiladas.

4.1.3. Análisis de la cinética de crecimiento de las HepG2 mediante la realización de una curva de crecimiento

Una vez demostrada la utilidad de nuestra línea celular para los estudios con arsénico pasamos a analizar cuál es su velocidad de crecimiento para así poder diseñar los distintos experimentos de esta Tesis. Para ello se llevó a cabo un estudio de la cinética de crecimiento y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16.

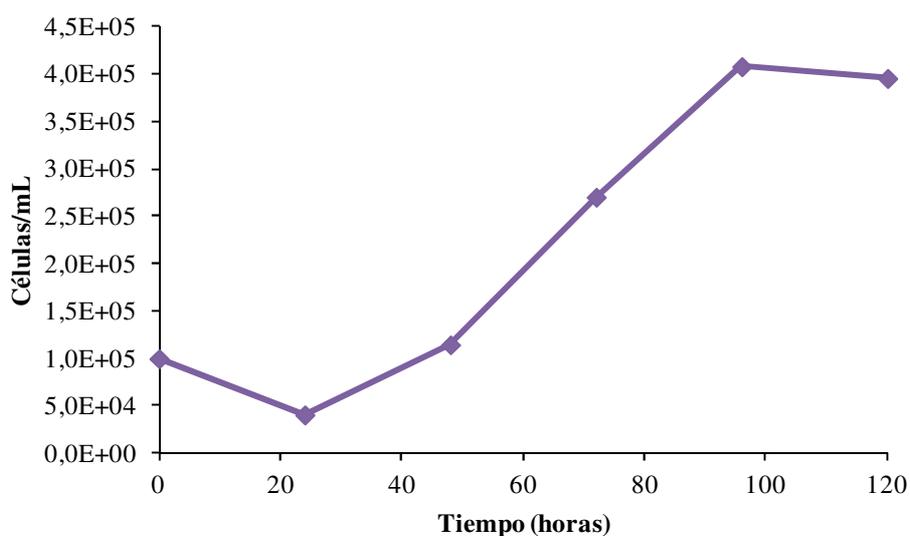


Figura 16 Curva de crecimiento de las HepG2. Aunque hasta las 24 horas se observa una pequeña disminución del número de células por mL, a partir de este tiempo la población crece hasta llegar a la *fase plateau* a las 120 horas.

En la curva de crecimiento llevada a cabo se observa, de forma general, un aumento del número de células a lo largo del tiempo, con excepción de las primeras 24 horas, donde se da una pequeña disminución del número de células por mL. Las células crecen de manera continuada hasta las 120 horas, momento en que las células se encuentran en una confluencia del 100% (*fase plateau*).

Estos resultados nos permiten conocer el tiempo de duplicación de la HepG2, el cual es de unas 24,55 horas.

4.2. Efectos tóxicos del arsénico en la línea HepG2

Una vez demostrada la eficiencia de la línea celular HepG2, se trató de ver el efecto de diferentes dosis de arsénico sobre la línea escogida, con la finalidad de poder seleccionar concentraciones subtóxicas a las que poder realizar los distintos

experimentos diseñados en esta Tesis. Seguidamente se estudió el efecto de dichas dosis en las HepG2, por lo que respecta a la alteración del ciclo celular y la apoptosis.

4.2.1. Estudios de toxicidad del arsénico

El objetivo de estos estudios de toxicidad es conocer cómo afectan diferentes dosis de arsenito sódico a las células y, a partir de estos resultados, escoger una serie de concentraciones subtóxicas para exponer a las HepG2 en los estudios posteriores.

Como se puede ver en el apartado de materiales y métodos, se han utilizado diferentes metodologías para llevar a cabo este ensayo.

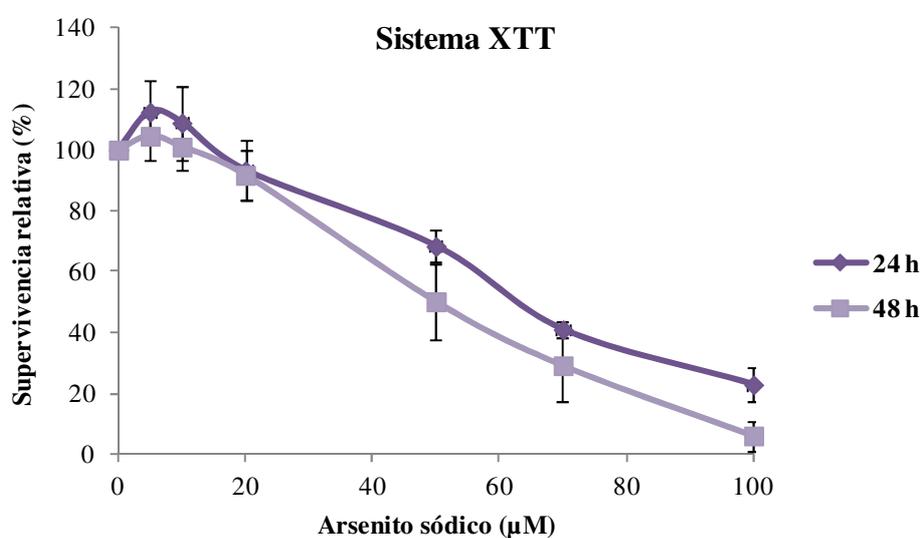


Figura 17 Ensayo de viabilidad de la HepG2 usando el ensayo XTT. Las HepG2 se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito sódico (0, 5, 10, 20, 50, 70 y 100 µM) durante 24 ó 48 horas. El arsenito sódico afecta significativamente a la viabilidad de las HepG2 a concentraciones de 50 µM o superiores, en períodos de 24 y 48 horas de exposición. Con LC_{50} de 67,50 y 54,50 µM en las células expuestas durante 24 y 48 horas, respectivamente.

En la Figura 17, se muestran los resultados del ensayo de viabilidad realizado usando el sistema XTT, representando la supervivencia relativa en porcentaje respecto a concentraciones micro-molares de arsenito sódico. Así, las células HepG2 se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito sódico (0, 5, 10, 20, 50, 70, 100 µM) durante 24 y 48 horas, observándose un efecto en la viabilidad dependiente del tiempo, es decir que la misma concentración de arsenito sódico afecta más a las células si éstas están expuestas durante 48 horas en vez de 24 horas. Siendo la LC_{50} (concentración letal para el 50% de las células) de 67,50 y 54,50 µM en las células expuestas a 24 y 48 horas, respectivamente.

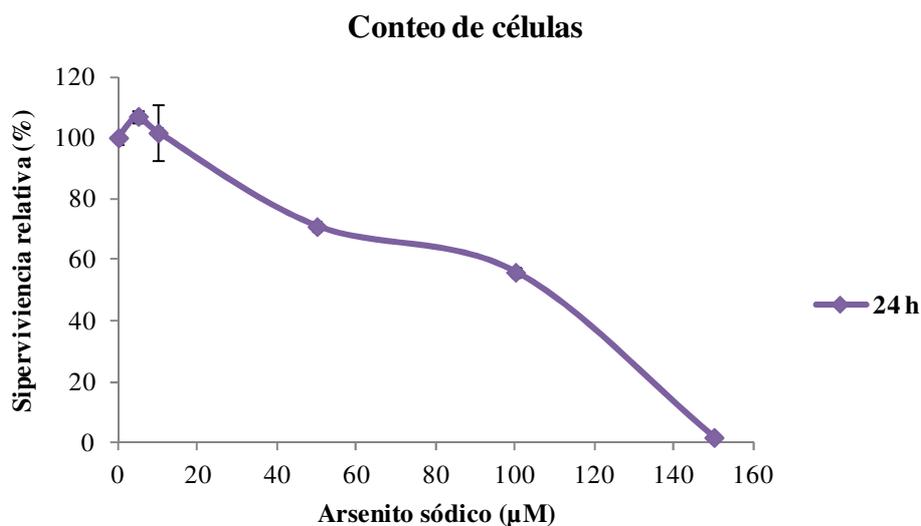


Figura 18 Ensayo de viabilidad de la HepG2 usando el conteo de células. Las HepG2 se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito sódico (0, 5, 10, 50, 100 y 150 μM) durante 24 horas. El arsenito sódico afecta significativamente a la viabilidad de las HepG2 a concentraciones de 50 μM tras un tratamiento de 24 horas, con una LC_{50} de 88,76 μM .

En la Figura 18, se representa el resultado del ensayo de viabilidad llevado a cabo usando el conteo de células. Para ello, las HepG2 se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito sódico (0, 5, 10, 50, 100 y 150 μM) durante 24 horas. Como se observa, el arsenito sódico afecta significativamente a la viabilidad de las HepG2 a concentraciones de 50 μM , tras un tratamiento de 24 horas, con una LC_{50} de 88,76 μM .

En la Figura 19, se indican los resultados del ensayo de viabilidad realizado usando el sistema NucleoCounter. En este ensayo las HepG2 se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito sódico (0, 5, 10, 20, 40 y 80 μM) durante 24 horas. Se observa que el arsenito sódico afecta significativamente a la viabilidad de las HepG2 a concentraciones de 20 μM , tras un tratamiento de 24 horas, con una LC_{50} de 48,54 μM .

Los distintos resultados obtenidos en el estudio de la toxicidad del arsenito sódico, usando los diferentes sistemas, nos han permitido escoger un conjunto de dosis subtóxicas para el tratamiento de las células. Las dosis subtóxicas seleccionadas han sido inferiores a 10 μM , concretamente: 0,5, 2, 5 y 10 μM .

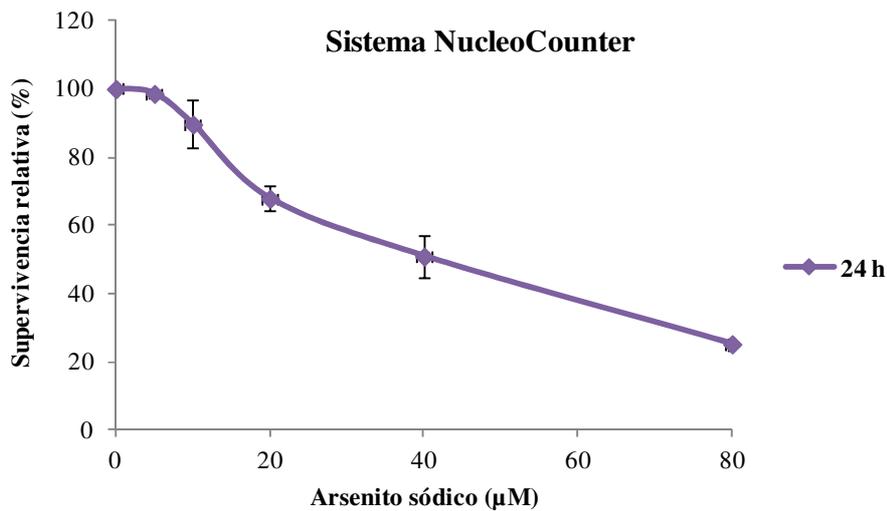


Figura 19 Ensayo de viabilidad de la HepG2 usando el sistema NucleoCounter. Las HepG2 se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito sódico (0, 5, 10, 20, 40 y 80 µM) durante 24 horas. El arsenito sódico afecta significativamente a la viabilidad de las HepG2 a concentraciones de 20 µM tras un tratamiento de 24 horas, con una LC_{50} de 48,54 µM.

4.2.2. La exposición de las células HepG2 a arsenito sódico induce la expresión de MT y de HMOX

Para saber si realmente las células HepG2 estaban respondiendo a la exposición del arsenito sódico, y si la toxicidad observada era resultado de esta exposición, se estudió la expresión de dos genes como son el de la metalotioneina (MT) y el de la hemo oxigenasa (HMOX), ya que se sabe que la expresión de estos genes se ve inducida en presencia de arsénico.

Así, en las células HepG2 expuestas durante 48 horas a diferentes concentraciones subtóxicas de arsenito sódico (0,5, 2 y 5 µM) se estudió la expresión de estos dos genes usando la PCR a Tiempo Real y los resultados obtenidos se indican en la Figura 20.

Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo de la expresión de ambos genes, ya desde la exposición a la dosis más baja de arsenito sódico (0,5 µM). La conclusión de este experimento es que el arsénico está ejerciendo efectos tóxicos en nuestras células y la relación dosis-respuesta observada es reflejo directo de esta acción tóxica.

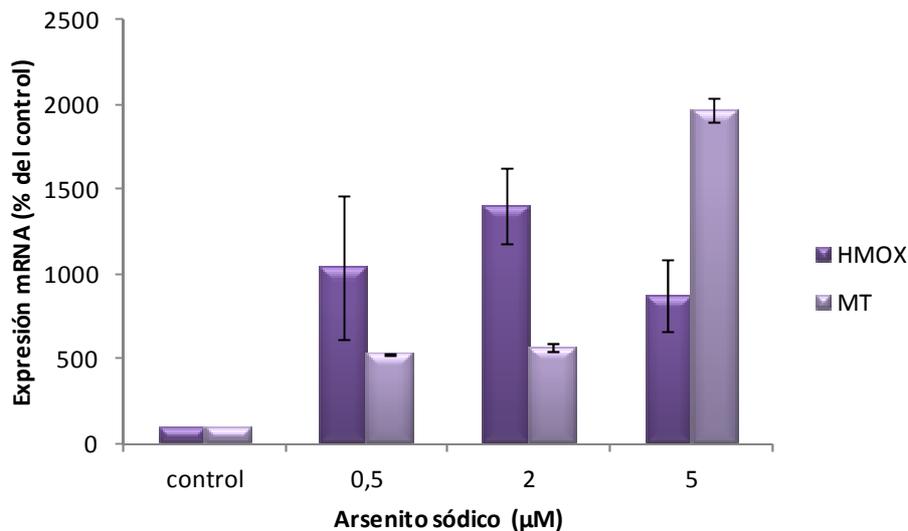


Figura 20 Inducción de la expresión de MT y de HMOX tras la exposición a dosis subtóxicas de arsenito sódico. Después de exponer las HepG2 durante 48 horas a diferentes concentraciones de arsenito sódico (0,5, 2 y 5 µM) se observa un aumento de la expresión de MT en cualquiera de las dosis expuestas, como mínimo alrededor del 500% y como máximo alrededor del 2000% respecto al control. Por lo que hace al HMOX se observa también un aumento de la expresión en cualquiera de las dosis expuestas, como mínimo alrededor del 1000% y como máximo alrededor del 1400% respecto al control.

4.2.3. Efectos de dosis subtóxicas de arsenito sódico sobre el ciclo celular

Como ya se ha comentado, nos interesaba trabajar a dosis subtóxicas y para ello necesitamos conocer que las dosis escogidas no tienen efectos importantes sobre una serie de parámetros característicos. Uno de los primeros efectos relacionados con la toxicidad es una ralentización del ciclo celular, para permitir una mejor respuesta celular frente a las agresiones sufridas; es por esto que se estudió el arresto del ciclo celular en las HepG2, tras haberse expuesto a dosis subtóxicas de arsenito sódico (0,5, 2, 5 y 10 µM) durante 48 horas.

En la Figura 21 podemos ver los resultados obtenidos en este experimento, no observándose ninguna alteración significativa en las distintas fases del ciclo celular de las células expuestas, respecto a las células control.

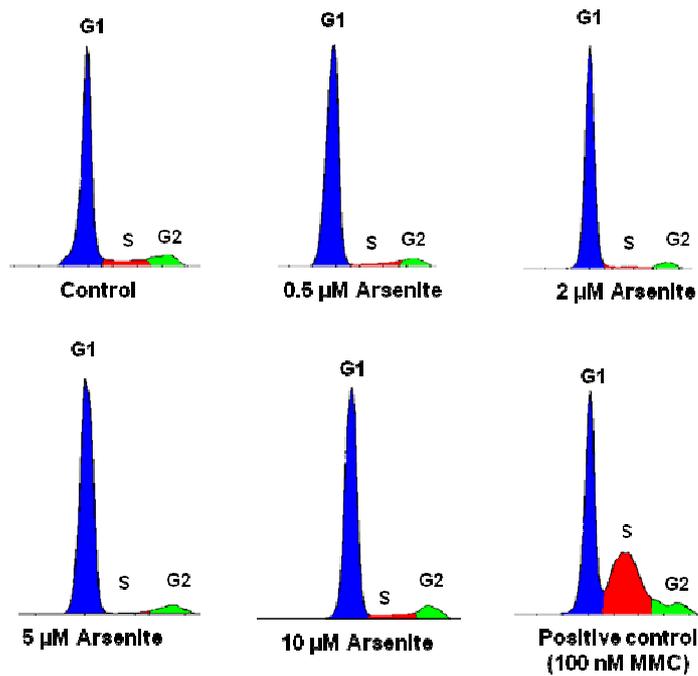


Figura 21 Las dosis subtóxicas de arsenito sódico utilizadas no tienen ningún efecto significativo en el arresto del ciclo celular. En las HepG2 expuestas a arsenito sódico (0,5, 2, 5 y 10 µM) durante 48 horas no se observa ningún cambio significativo en las fases del ciclo celular. La distribución de las células control fue de G1: 86,85%, S: 10,66%, G2: 4,52%. En las células expuestas a 0,5 µM de arsenito sódico fue de G1: 82,51%, S: 12,21%, G2: 5,33%. En las expuestas a 2 µM fue de G1: 86,35%, S: 8,68%, G2: 4,83%. En las expuestas a 5 µM fue de G1: 74,67%, S: 18,02%, G2: 6,96% y en las expuestas a 10 µM de G1: 75,06 %, S: 16,07 %, G2: 7,69%. Como control positivo se usó la MMC (100 nM), la distribución en este caso fue de G1: 66.54%, S: 16.02% y G2: 17.44%.

4.2.4. Efectos de dosis subtóxicas de arsenito sódico sobre la apoptosis

Otro de los efectos asociados con la toxicidad es la inducción de apoptosis, ruta utilizada por las células como vía alternativa a la reparación del daño inducido. Por tanto, se trata de conocer si las dosis subtóxicas escogidas son capaces de inducir o no apoptosis. Para ello, se estudió la inducción de la apoptosis en las HepG2, tras haberse expuesto a dosis subtóxicas de arsenito sódico (0,5, 2, 5 y 10 µM) durante 48 horas. En la Figura 22 podemos ver los resultados obtenidos en este experimento, en los cuales no se observa ninguna alteración significativa en la inducción de la apoptosis en las células expuestas a las dosis de arsenito sódico estudiadas, respecto a las células control.

Los porcentajes de apoptosis obtenidos fueron de 2,92, 3,20, 3,57 y 3,19% tras someter las células a concentraciones de 0,5, 2, 5 y 10 µM de arsenito sódico, respectivamente. Estos porcentajes no son significadamente diferentes a los observados en las células control (2,16%). Como control positivo se usó una concentración de 1,5 µM de camptotecina (CPT) que, como se observa, es capaz de inducir un elevado porcentaje de apoptosis (33,88%).

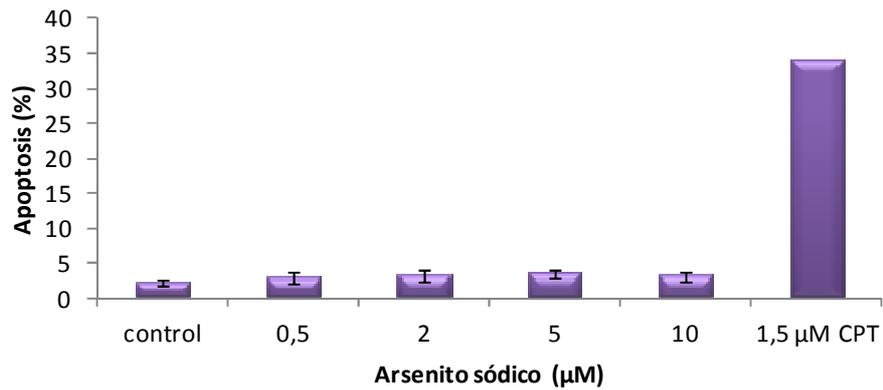


Figura 22 Las dosis subtóxicas de arsenito sódico utilizadas no tienen ningún efecto significativo en la inducción de apoptosis. Cuando las HepG2 se expusieron a dosis subtóxicas de arsenito sódico (0,5, 2, 5 y 10 µM) durante 48 horas, el porcentaje de apoptosis observado fue de 2,92, 3,2, 3,57 y 3,19%, respectivamente. Estos porcentajes no son significativamente diferentes al observado en las células control (2,16%). Como control positivo se usó 1,5 µM de CPT, que indujo un porcentaje de apoptosis del 33,88%.

4.3. Estudio de los distintos factores nucleares seleccionados para este estudio

4.3.1. Las células HepG2 expresan los factores nucleares hepáticos objeto de estudio

Dado que el objetivo de la tesis es estudiar la respuesta de los distintos factores seleccionados, tras la exposición con arsénico, es necesario conocer si dichos factores se expresan de manera espontánea y cuáles son los niveles de expresión observados en estas condiciones. Para ello se analizó la expresión de los factores HNF1 α , HNF4 α , HNF6 α , PXR y FOXM1, mediante PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23.

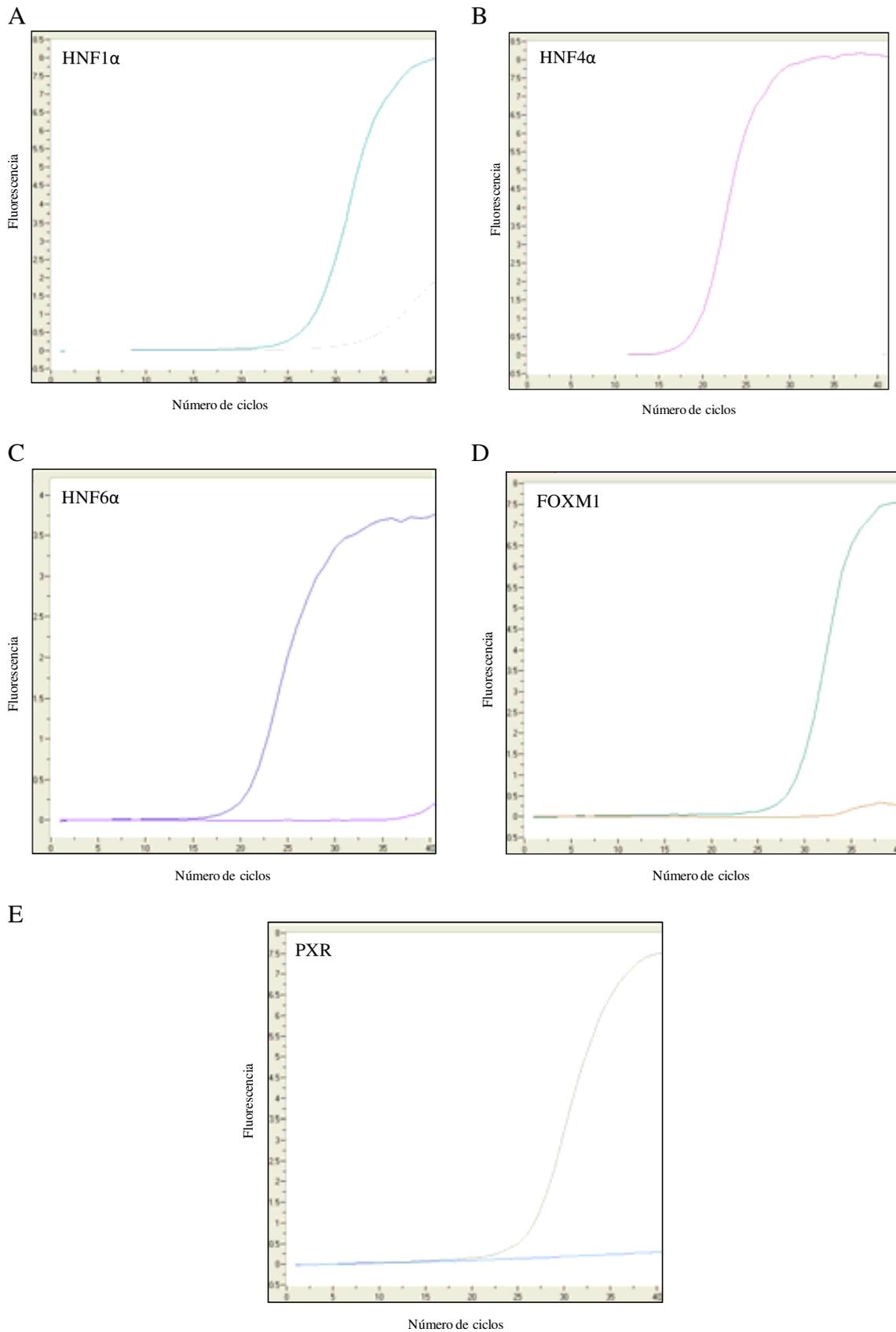


Figura 23 Representación de la amplificación de los factores HNF1 α , HNF4 α , HNF6 α , FOXM1 y PXR. Representación de la fluorescencia respecto al número de ciclos de amplificación de (A) HNF1 α , (B) HNF4 α , (C) HNF6 α , (D) FOXM1 y (E) PXR.

4.3.2. La exposición aguda a altas dosis de arsenito sódico induce alteración en la expresión de los factores nucleares HNF1 α y HNF4 α

Una vez demostrada la expresión basal de los distintos factores, se llevó a cabo un estudio piloto sobre los efectos de una exposición aguda a elevadas dosis de arsenito sódico. Para ello se seleccionó el mismo rango de dosis del experimento de toxicidad (4.2.1) y se estudiaron las alteraciones en la expresión tras un tratamiento de 24 horas.

En este experimento piloto tan sólo se evaluaron los efectos en la expresión de HNF1 α y HNF4 α . Para ello se expusieron las células HepG2 durante 24 horas a diferentes dosis de arsenito sódico (5, 10, 20, 50 y 100 μ M).

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la Figura 24, donde se observa una disminución de la expresión, tanto de HNF1 α como de HNF4 α en las dosis tóxicas, respecto a lo que se observa en el control, sin que llegue a desaparecer la expresión de estos dos factores nucleares hepáticos.

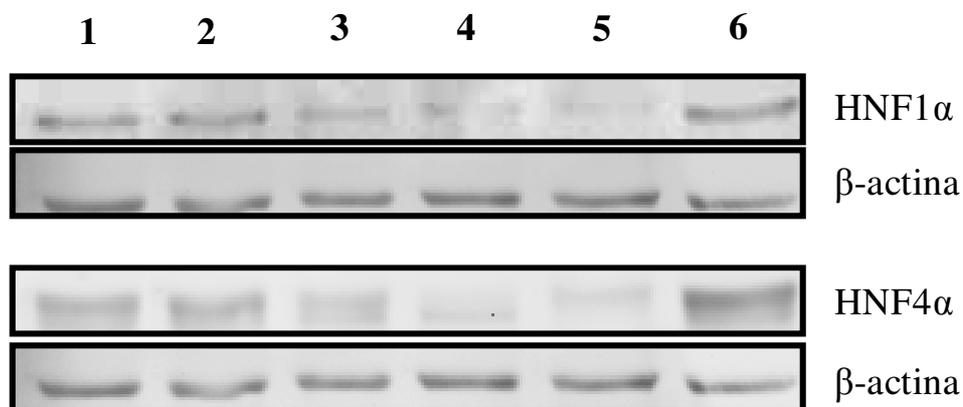


Figura 24 Disminución de la expresión de HNF1 α y HNF4 α cuando las HepG2 se exponen a dosis altas de arsenito sódico. Resultados obtenidos tras el tratamiento de 24 horas con diferentes concentraciones de arsenito sódico (5, 10, 20, 50 y 100 μ M). En el carril (1) encontramos las expuestas a 5 μ M, en el (2) a 10 μ M, en el (3) a 20 μ M, en el (4) a 50 μ M, en el (5) a 100 μ M. En el (6) se indican las células control. De forma general se observa una disminución de la expresión de HNF1 α y HNF4 α en todas las dosis de arsenito sódico. Los niveles de expresión del HNF1 α fueron de 100, 116,20, 113,50, 61,00, 34,20 y 34,40% mientras que los del factor HNF4 α fueron de 100, 106,03, 92,44, 39,55, 11,47 y 18,00%. Como proteína de referencia se ha usado la β -actina.

Los resultados indican que cuando las células HepG2 se tratan durante 24 horas con dosis crecientes de arsenito sódico se observa una disminución significativa de la expresión, a dosis de 20 μ M o superiores. La disminución de la expresión de HNF1 α y

HNF4 α es dosis-dependiente, sin llegar a niveles inferiores al 10% de la expresión respecto al control, en ningún momento. Concretamente los niveles de expresión del HNF4 α fueron de 100, 106,03, 92,44, 39,55, 11,47 y 18,00% y los del factor HNF1 α fueron de 100, 116,20, 113,50, 61,00, 34,20, 34,40% cuando las HepG2 se expusieron a 0, 5, 10, 20, 50 y 100 μ M de arsenito sódico, respectivamente (Figura 24).

4.3.3. Alteración de la expresión en exposiciones de 48 horas con dosis subtóxicas

Una vez demostrado que altas dosis de arsénico son capaces de alterar significativamente la expresión de HNF1 α y HNF4 α , la pregunta era que sucedía con la expresión de todos los factores tras la exposición aguda (durante 48 horas) a concentraciones subtóxicas (0,5, 2, 5 y 10 μ M) de arsenito sódico.

En la Figura 25 se observa la expresión de los factores nucleares hepáticos: PXR, HNF1 α , HNF4 α , FOXM1 y HNF6 α , a nivel del mensajero y a nivel de proteína, tras la exposición a concentraciones subtóxicas (0,5, 2, 5 y 10 μ M) durante 48 horas.

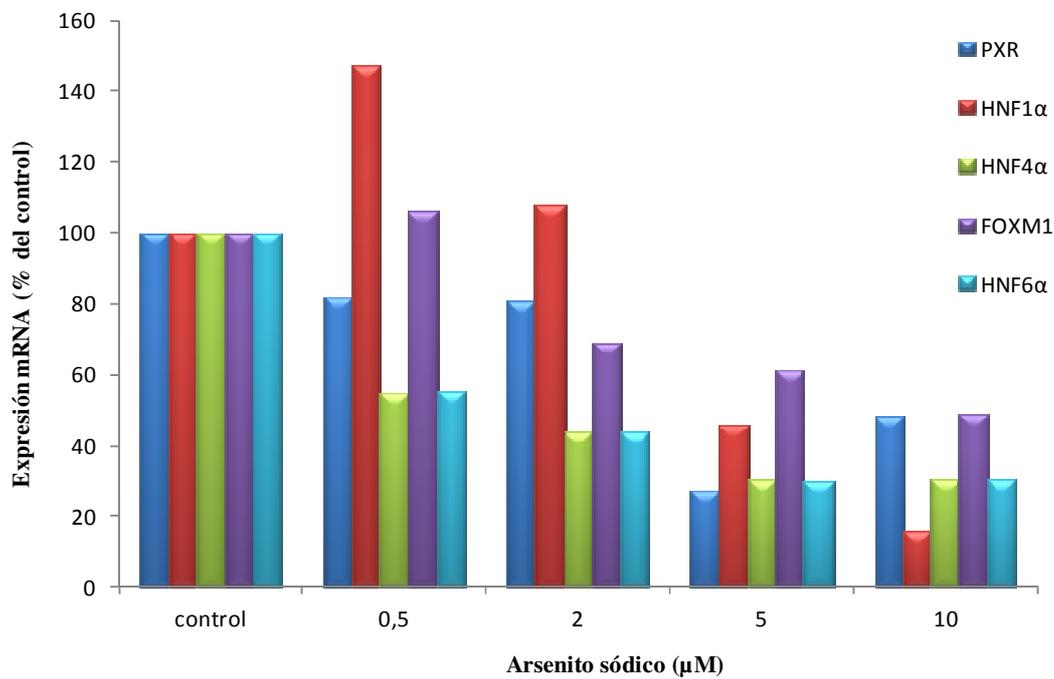
De forma general se observa en todos los factores estudiados una disminución de la expresión dosis-dependiente en las células expuestas, con respecto a los valores observados en las células control. En la parte superior de la Figura 25 (A) podemos ver los resultados del estudio de expresión a nivel del mensajero de PXR, HNF1 α , HNF4 α , FOXM1 y HNF6 α . En la gráfica se observa una disminución de la expresión de HNF1 α cuando las células se tratan como mínimo con una concentración de 5 μ M de arsenito sódico, y de FOXM1 a partir de 2 μ M. En cambio, la expresión de HNF4 α , PXR y HNF6 α se ve alterada ya a la dosis más baja de arsenito sódico ensayada (0,5 μ M). En todos los casos estamos hablando de una disminución significativa de la expresión de estos factores, alcanzando valores de entre el 50 y el 80% respecto al control, para la dosis más alta evaluada (10 μ M).

En la parte inferior de la Figura 25 (B), se observan los resultados de la expresión de HNF1 α , FOXM1 y HNF4 α a nivel de proteína.

En estas figuras se percibe una disminución de la expresión de éstos cuando las células se tratan con las diferentes concentraciones de arsenito sódico, observándose una mayor disminución de la expresión de los factores nucleares a la dosis de 10 μ M. Los cambios a nivel de proteína observados concuerdan con los observados previamente a nivel del mensajero. La conclusión de este estudio es que, a pesar de utilizar dosis subtóxicas de

arsenito sódico, éstas son suficientes como para inducir una alteración de la expresión de los distintos factores estudiados.

A



B

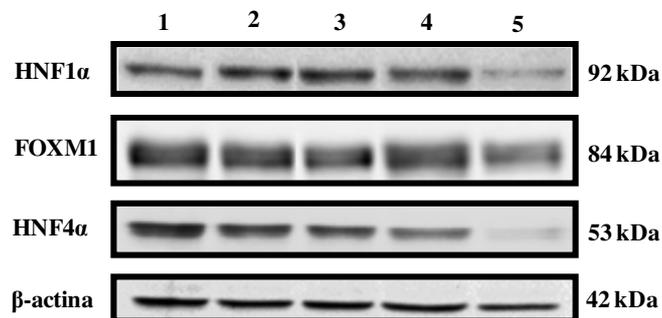


Figura 25 Estudio de la expresión de un conjunto de factores nucleares (PXR, HNF1 α , HNF4 α , FOXM1 y HNF6 α). Las células se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito sódico (0,5, 2, 5 y 10 μM) durante 48 horas y posteriormente se llevó a cabo el estudio de la expresión, tanto a nivel del mRNA como de proteína. (A) Expresión de PXR, HNF1 α , HNF4 α , FOXM1 y HNF6 α a nivel del mRNA tras la exposición al arsenito sódico. De forma general se observa una disminución dosis-dependiente de la expresión de todos los factores estudiados. Los niveles de expresión del factor PXR fueron 100, 81,67, 80,67, 27,33 y 48,00%; para el factor HNF1 α los niveles de expresión fueron 100, 147,33, 107,33, 45,67, y 16,00%; para HNF4 α fueron 100, 54,67, 43,75, 30,00 y 30,33%; en el caso del factor FOXM1 éstos fueron 100, 106,00, 68,67, 61,00 y 49,00%; y, por último, para el factor HNF6 α éstos fueron 100, 54,78, 43,58, 29,91 y 30,4% cuando las células están expuestas a 0, 0,5, 2, 5 y 10 μM respectivamente. (B) Expresión a nivel de proteína de HNF1 α , FOXM1 y HNF4 α , se observa una disminución de la expresión en los 3 factores estudiados, de forma dosis-dependiente, y que concuerda con la observada a nivel del mensajero. En todos los casos se usó como gen de referencia, en la PCR a Tiempo Real, o como control, en el western blot, la β -actina. El carril (1) corresponde a las células control, el (2) a las células expuestas a 0,5 μM de arsenito sódico, el (3) a las expuestas a 2 μM , el (4) a las expuestas a 5 μM y el (5) a las expuestas a 10 μM de arsenito sódico.

4.4. Papel del factor HNF4 α en la viabilidad celular frente al tratamiento con arsénico

Dada la gran importancia de este factor en la homeostasis de los hepatocitos, nos preguntamos si al menos parte del efecto tóxico inducido por el arsénico puede ser debido a la alteración inducida por este metaloide en la expresión del HNF4 α .

Con el fin de comprobar nuestra hipótesis, las HepG2 se transfectaron con un plásmido que contenía el factor HNF4 α . El objetivo de esta transfección fue conseguir niveles de expresión del HNF4 α en las células expuestas al arsenito sódico parecidos a los de las células control (no expuestas) y evaluar, mediante un ensayo de viabilidad, si éstas se veían menos afectadas (toxicidad) a las mismas concentraciones de arsenito sódico que las células no transfectadas.

4.4.1. Sobreexpresión de HNF4 α al transfectar las HepG2 con pl-HNF4 α

Lo primero que se hizo fue comprobar la eficacia de la transfección. Así, las células HepG2 se transfectaron con diferentes concentraciones de pl-HNF4 α : 2, 4 y 6 μ g del plásmido deseado. En la Figura 26 se puede observar que se consiguió una sobreexpresión del factor HNF4 α , al transfectar las células con pl-HNF4 α . Así, aunque las HepG2 transfectadas con 2 μ g de HNF4 α no muestran un aumento significativo de la expresión proteica de HNF4 α , sí que se observa un aumento significativo en la expresión de este factor en las células transfectadas con 4 y 6 μ g de pl-HNF4 α , con unos valores de expresión de 145,53 y 148,80% respecto a las células control, respectivamente (Figura 26).

Dado que no se observó una mayor transfección en las células transfectadas con 6 μ g del plásmido, seguramente debido a que mueren más células durante la transfección, la cantidad de plásmido utilizado en las transfecciones posteriores fue de 4 μ g.

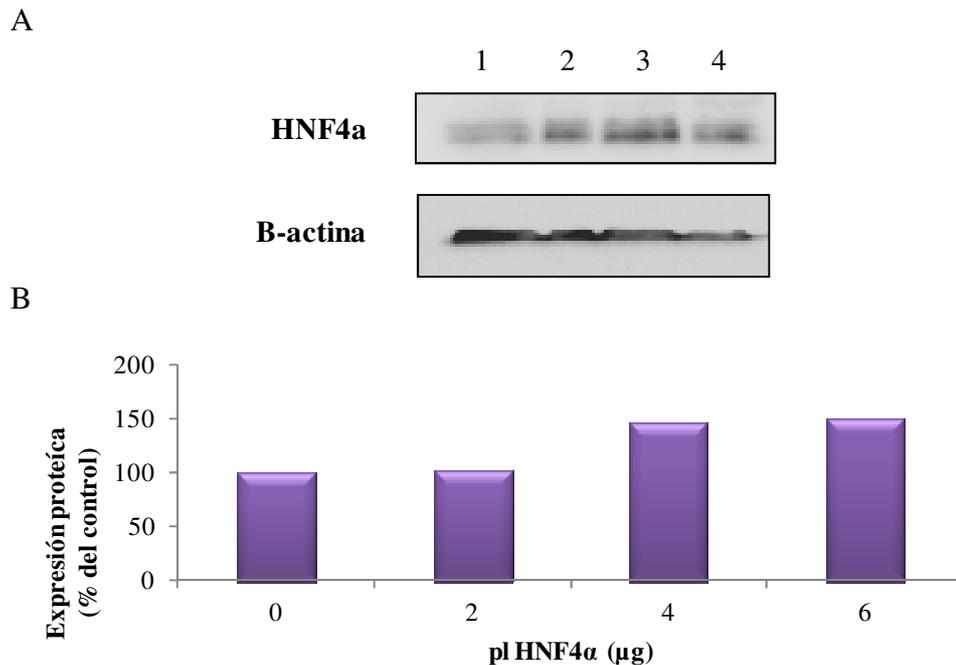


Figura 26 Sobreexpresión proteica de HNF4α al transfectar las HepG2 con pl-HNF4α. Las HepG2 se transfectaron con diferentes concentraciones de pl-HNF4α (2, 4 y 6 μg). (A) En el primer carril (1) encontramos la banda de expresión de HNF4α correspondiente a las células control (no transfectadas), el carril (2) corresponde a las células transfectadas con 2 μg del plásmido, en el (3) se encuentran las HepG2 transfectadas con 4 μg del plásmido y por último (4) las transfectadas con 6 μg. Como proteína de referencia se usó la β-actina. Se observa una mayor intensidad de las bandas de HNF4α en las células transfectadas, especialmente en las transfectadas con 6 μg del pl-HNF4α. (B) Representación gráfica de la cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas en el western blot. Los niveles de expresión obtenidos respecto al control (células no transfectadas con pl-HNF4α y expuestas a la lipofectamina) fueron de 102,14, 145,53 y 148,80% para las células transfectadas con 2, 4 y 6 μg de pl-HNF4α, respectivamente.

4.4.2. La transfección afecta a la viabilidad de las células HepG2

Con el fin de conocer cuál era el efecto de la transfección en la viabilidad de las HepG2, se hizo un ensayo de viabilidad de las HepG2 en diferentes condiciones, (a) cuando estas fueron expuestas a la lipofectamina (LF), (b) transfectadas con el plásmido control y (c) transfectadas con el pl-HNF4α. Los resultados obtenidos están expresados en la Figura 27.

Los resultados nos muestran que la viabilidad de las HepG2 se ve afectada tanto por la exposición a la LF, como por la transfección (plásmido control o con el gen HNF4α). Concretamente la viabilidad relativa fue de 64,06, 48,30 y 45,31% respecto al control, para las células expuestas a la LF, transfectadas con el plásmido control y con el pl-HNF4α, respectivamente.

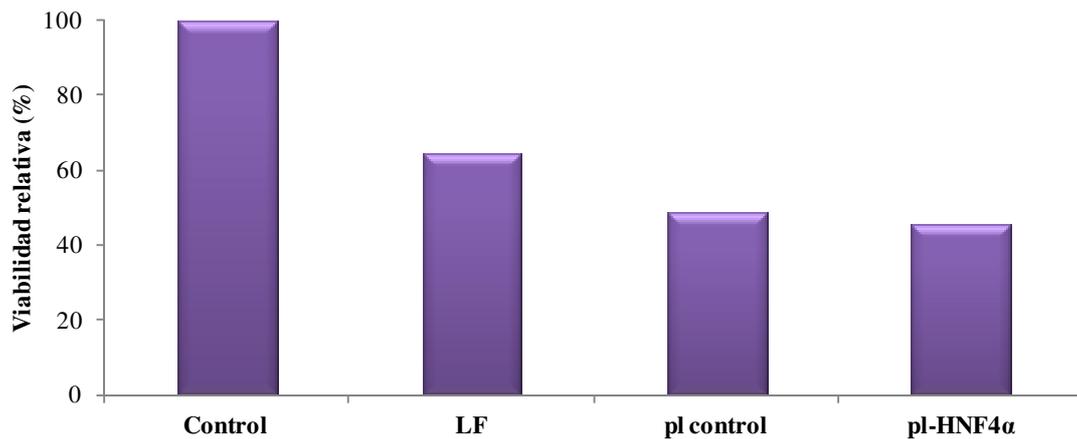


Figura 27 Efecto de la transfección sobre la viabilidad de las HepG2. Las HepG2 se transfectaron con 4 μ g de plásmido (control o pl-HNF4 α). Se observa un efecto de la viabilidad cuando las células se encuentran expuestas con la LF o cuando son transfectadas. La viabilidad relativa fue del 64,06, 48,30 y 45,31% respecto al control, para las células expuestas a la LF, transfectadas con el plásmido control y transfectadas con pl-HNF4 α , respectivamente.

4.4.3. La transfección nos permite recuperar los niveles de expresión del HNF4 α disminuido por el arsenito sódico

Una vez conseguidas las condiciones idóneas de transfección para obtener una sobreexpresión del HNF4 α , el siguiente paso fue transfectar las células y exponerlas a arsenito sódico, con la finalidad de ver si la sobreexpresión conseguida con la transfección nos mantenía los niveles de HNF4 α al exponer las células a arsenito sódico. Para ello las células HepG2 se transfectaron con 4 μ g del plásmido control (sin el gen HNF4 α) y con pl-HNF4 α . Una vez transfectadas, éstas se trataron con diferentes concentraciones de arsenito sódico: 5, 10 y 20 μ M, durante 48 horas. Los resultados obtenidos se indican en la Figura 28.

Al transfectar las células HepG2 con el plásmido control (sin el gen HNF4 α) y exponerlas a las diferentes concentraciones de arsenito sódico, se observa una disminución dosis-dependiente de la expresión del factor HNF4 α , a nivel de la proteína, con valores de expresión de 52,07, 50,99 y 16,72% respecto el control (100%), para las células expuestas a 5, 10 y 20 μ M de arsenito sódico. En cambio, si las HepG2 se transfectan con pl-HNF4 α , no se observa una disminución significativa de la expresión hasta que las células no se exponen a 20 μ M de arsenito sódico, con una expresión del 20,60% respecto el control. Las células transfectadas con pl-HNF4 α y expuestas a 5 y 10 μ M de arsenito sódico presentan una expresión de HNF4 α de 105,02 y 113,2% respecto el control, respectivamente.

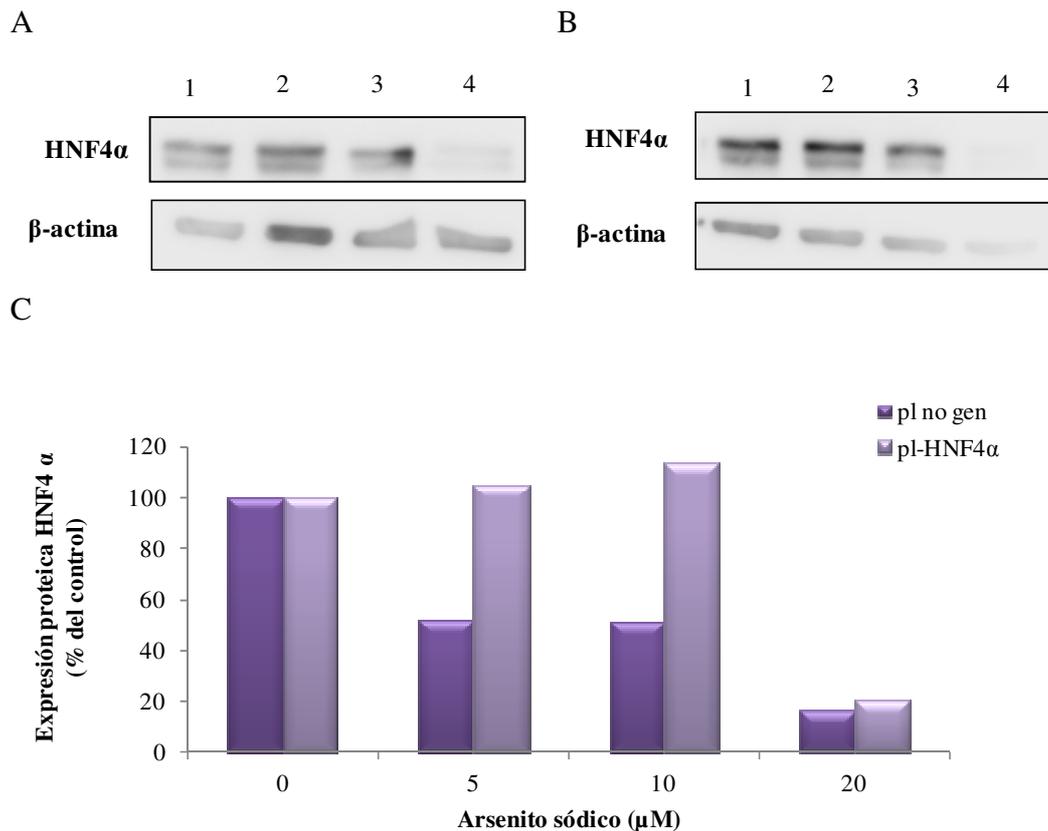


Figura 28 Expresión de HNF4 α en las HepG2 transfectadas con pl-HNF4 α y expuestas a arsenito sódico. (A) Expresión proteica del HNF4 α en células transfectadas con 4 μ g del plásmido control (sin el gen HNF4 α) y expuestas a diferentes concentraciones de arsenito sódico: 5, 10 y 20 μ M durante 48 horas. Se observa una disminución de la intensidad de las bandas dosis-dependiente. La primera banda (1) corresponde a las células control, no expuestas al arsenito de sodio, la segunda (2) a las expuestas a 5 μ M, la tercera (3) a las expuestas a 10 μ M y la última (4) a las expuestas a 20 μ M. (B) Expresión proteica del HNF4 α en células transfectadas con 4 μ g del plásmido pl-HNF4 α y expuestas a diferentes concentraciones de arsenito sódico: 5, 10 y 20 μ M durante 48 horas. En este caso sólo se observa una disminución de la intensidad en las células transfectadas y expuestas a 20 μ M de arsenito sódico. El orden de las bandas es el mismo que en la figura A, pero esta vez las células se han transfectado con el plásmido con el gen HNF4 α . Como gen de referencia se ha usado la β -actina. (C) Representación gráfica de la cuantificación de las intensidades de las bandas de las figuras A y B. La expresión a nivel de proteína de las HepG2 transfectadas con el plásmido control fue de 52,07, 50,99 y 16,72% respecto el control para las células expuestas a 5, 10 y 20 μ M de arsenito sódico. En cambio, la expresión de HNF4 α en las células transfectadas con pl-HNF4 α fue de 105,02, 113,22 y 20,60% respecto al control para las células expuestas a 5, 10 y 20 μ M de arsenito sódico.

4.4.4. La recuperación de la expresión de HNF4 α aumenta la viabilidad de las HepG2 frente al arsenito sódico

Para estudiar si parte del efecto del arsenito sódico en la viabilidad de las células expuestas era debido al afecto de este elemento en el factor HNF4 α (disminución de la expresión), se llevó a cabo un test de toxicidad de las HepG2 transfectadas con el pl-

HNF4 α y expuestas a continuación durante 48 horas a arsenito sódico. Como se puede observar en la Figura 29, la recuperación de la expresión de HNF4 α gracias a la transfección, hace las células más resistentes al arsenito sódico.

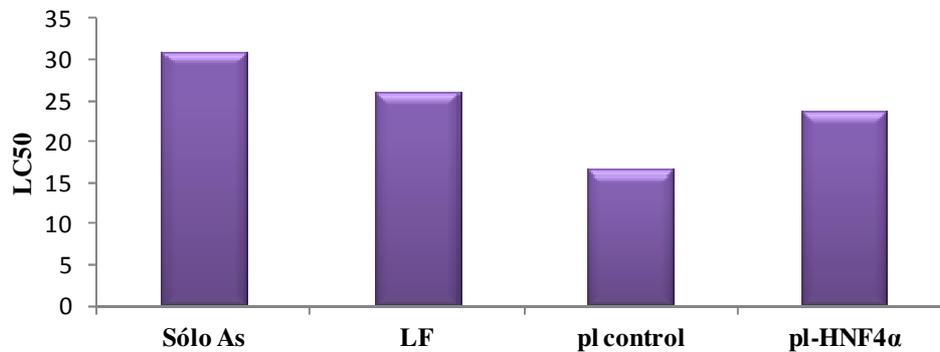


Figura 29 Las HepG2 que sobreexpresan HNF4 α son más resistentes al arsenito sódico.

Las HepG2 se expusieron a diferentes concentraciones de arsenito sódico (5, 10, 20, 40 y 80 μ M) durante 48 horas. Se realizó un ensayo de viabilidad, a partir del cual se calcularon las LC₅₀ (concentración letal del 50% de las células) de las células únicamente expuestas al arsenito sódico, células a las que previamente se les había añadido al medio LF, o que habían estado transfectadas con 4 μ g del plásmido control o del pl-HNF4 α . Los valores de la LC₅₀ fueron 30,94, 25,92, 16,57 y 23,50 μ M, respectivamente.

Para llevar a cabo este estudio se realizó un ensayo de toxicidad exponiendo las células a diferentes concentraciones de arsenito sódico: 5, 10, 20, 40 y 80 μ M. Debido a que la transfección y la LF afectan a la viabilidad se expusieron a la vez: células no transfectadas ni expuestas a la LF, células previamente expuestas a la LF, células transfectadas con el plásmido control y células transfectadas con el pl-HNF4 α .

A partir de los resultados de la viabilidad se calculó la LC₅₀. Como se ve, la LC₅₀ de las células no transfectadas ni expuestas a LF, es decir, que únicamente han estado expuestas a las diferentes concentraciones de arsenito sódico fue de 30,94 μ M. La LC₅₀ de las células expuestas a la LF fue de 25,92 μ M. La LC₅₀ de las células transfectadas con el plásmido control fue de 16,57 μ M, mientras que la de las células transfectadas con pl-HNF4 α fue de 23,50 μ M.

Estos resultados nos indican, como ya habíamos visto en Figura 27, que la LF y la transfección afectan a la viabilidad celular. Si comparamos la LC₅₀ de las células transfectadas con pl-HNF4 α con el valor de las transfectadas con el plásmido control (células control), se observa como las células transfectadas con el pl-HNF4 α , y por lo tanto con una recuperación completa de la expresión a dosis bajas de arsenito sódico y

parcial a dosis más altas, son más resistentes al arsenito sódico, ya que su LC_{50} es un 30% mayor.

4.5. Factores nucleares y exposición crónica al arsénico

Una vez visto que bajo las condiciones estudiadas hasta al momento, el arsénico estaba induciendo una alteración en la expresión de estos factores nucleares, nuestro objetivo se desplazó a estudiar si esta alteración también se observaba en células expuestas de forma prolongada (semanas) al arsénico. Hay que indicar que este protocolo nos permite acercarnos más a las condiciones de exposición en las que se encuentran sometidas las personas expuestas de forma crónica al arsénico.

4.5.1. La exposición de las células HepG2 a dosis subtóxicas de arsenito sódico de forma crónica altera la expresión de HNF1 α y HNF4 α

En este estudio nos fuimos centrando en estudiar las variaciones de expresión de únicamente los factores HNF1 α y HNF4 α , dada la sincronía existente entre la regulación de todos los factores inicialmente ensayados. Las células se expusieron de forma crónica, durante semanas, a dosis subtóxicas de arsenito sódico (5 y 10 μ M) según el protocolo indicado en el apartado de materiales y métodos. La expresión de los factores nucleares hepáticos, HNF1 α y HNF4 α , se estudió en las semanas 3, 6, 10 y 17 de exposición. En cada semana los valores obtenidos se compararon con los de las células control, células no expuestas al arsénico y correspondientes a la misma semana de tratamiento que las células expuestas.

Para los dos factores (HNF1 α y HNF4 α) y en todas las semanas estudiadas (3, 6, 10 y 17) se han observado disminuciones significativas de la expresión de éstos a nivel de proteína, mediante western blot (Figura 30 y Figura 31).

Por lo que respecta al factor nuclear HNF1 α (Figura 30), ya desde las primeras semanas de exposición se observa una disminución de la expresión siendo ésta más marcada en las células expuestas a 10 μ M de arsenito sódico durante 17 semanas. Los efectos observados son dosis- y tiempo-dependiente, con tan sólo un 20% de expresión, respecto a las células control de la misma semana de tratamiento.

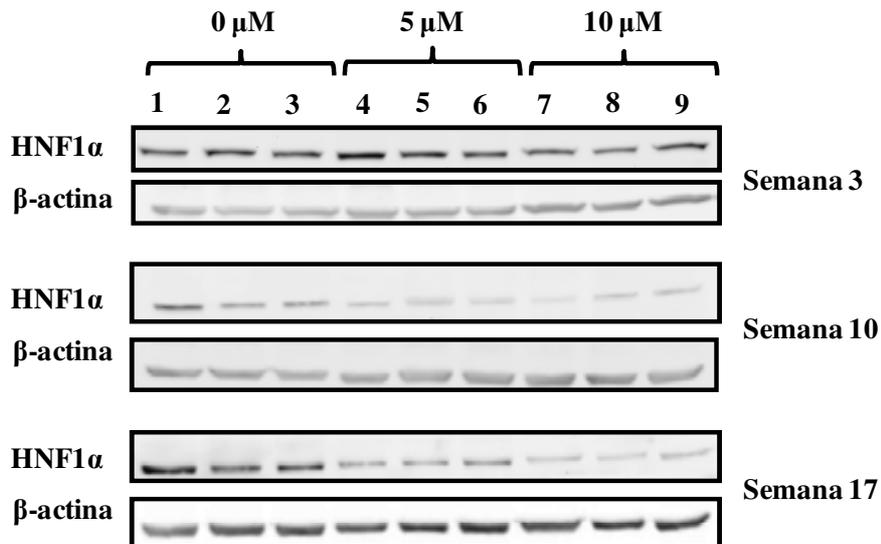
Cuando se llevó a cabo la cuantificación de las bandas observadas, los valores obtenidos fueron para la semana 3 de 100, 74,40 y 46,54%; para la semana 6 de 100, 82,41 y 36,18%; para la semana 10 de 100, 47,29 y 34,86%; mientras que para la semana 17

éstos fueron de 100, 45,92 y 15,90%; esto para cuando las células HepG2 se expusieron a 0, 5 y 10 μM de arsenito sódico, respectivamente.

Por lo que hace referencia al factor nuclear HNF4 α (Figura 31), del mismo modo que sucedía con el HNF1 α , se observa una clara disminución de la expresión ya desde las primeras semanas de exposición. Esta disminución se asocia positivamente tanto con el tiempo de exposición (semanas) como con la concentración utilizada de arsenito sódico (dosis). Aunque la tendencia general es equivalente para los dos factores estudiados, se aprecian algunas diferencias entre ellos. Así, en las primeras semanas la reducción del factor HNF4 α es más marcada; en cambio, en las últimas semanas se observa una disminución un poco mayor del factor HNF1 α . Estos efectos son seguramente debidos a la capacidad de regulación de estos dos factores entre ellos.

Cuando se llevó a cabo la cuantificación de las bandas obtenidas, los valores obtenidos fueron para la semana 3 de 100, 57,77 y 24,15%; para la semana 6 de 100, 74,10 y 29,04%; para la semana 10 de 100, 54,13 y 31,95%; mientras que para la semana 17 éstos fueron de 100, 57,31 y 47,12%. Estos valores se refieren a las exposiciones de 0, 5 y 10 μM de arsenito sódico, respectivamente.

A



B

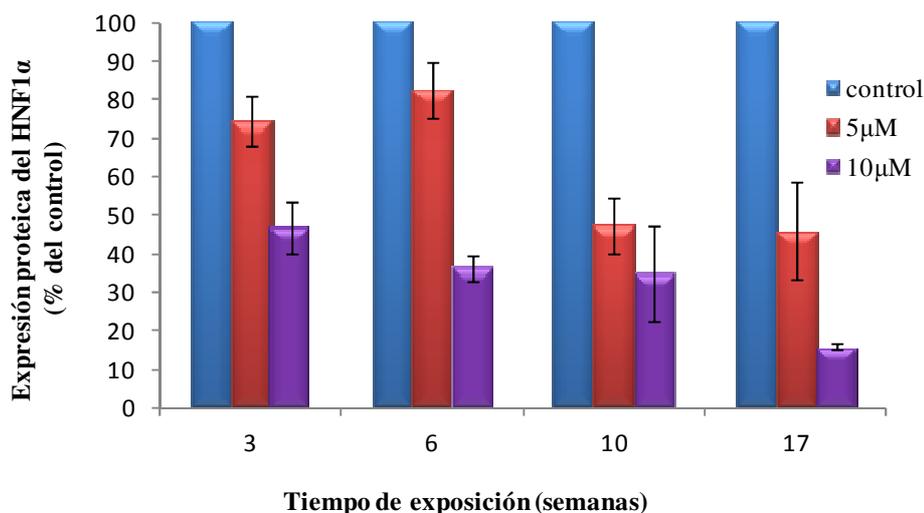
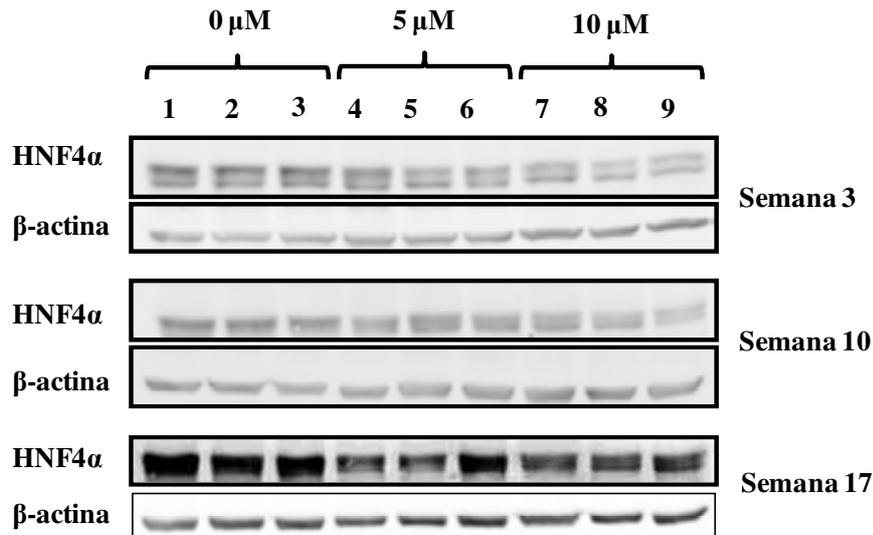


Figura 30 Disminución de la expresión de HNF1α en células expuestas a dosis subtóxicas de arsenito sódico (5 y 10 μM) de forma crónica (semanas). De forma general se observa una disminución importante en la expresión de este factor hepático tanto tiempo-dependiente como dosis-dependiente. (A) Expresión proteica del factor HNF1α cuando las células se han expuesto durante 3, 10 y 17 semanas a 5 y 10 μM de arsenito sódico. Se observa en todas las semanas estudiadas, cuando las células están expuestas tanto a 5 como a 10 μM, una disminución significativa de la expresión a nivel de proteína comparada con las células control. (1, 2, 3) HepG2 control, no expuestas a arsenito sódico; (4, 5, 6) HepG2 expuestas a 5 μM; (7, 8, 9) HepG2 expuestas a 10 μM de arsenito sódico. (B) Graficado de los valores obtenidos al cuantificar las bandas del western blot. Los niveles de expresión del HNF1α en la semana 3 fueron de 100, 74,40 y 46,54%; para la semana 6 éstos fueron 100, 82,41 y 36,18%; para la semana 10 fueron 100, 47,29 y 34,86%; y, finalmente, para la semana 17 estos fueron de 100, 45,92 y 15,90% cuando las HepG2 se expusieron a 0, 5 y 10 μM de arsenito sódico, respectivamente. Como proteína de referencia se ha usado la β-actina.

A



B

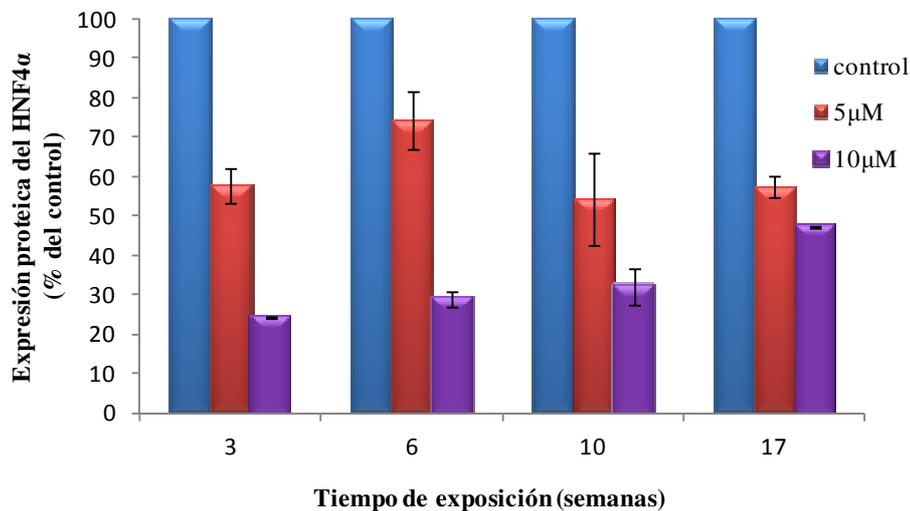


Figura 31 Disminución de la expresión de HNF4α en células expuestas a dosis subtóxicas de arsenito sódico (5 y 10 μM) de forma crónica (semanas). De forma general se observa una disminución importante en la expresión de este factor hepático al exponer las HepG2 de forma crónica (semanas) a dosis de 5 y 10 μM de arsenito sódico. (A). Expresión proteica del factor HNF4α cuando las células se han expuesto durante 3, 10 y 17 semanas a 5 y 10 μM de arsenito sódico. Se observa en todas las semanas estudiadas, independientemente del si las células han estado expuestas a 5 como a 10 μM, una disminución significativa de la expresión de la proteína, en relación con lo observado en las células control. (1, 2, 3) HepG2 control, no expuestas a arsenito sódico; (4, 5, 6) HepG2 expuestas a 5 μM; (7, 8, 9) HepG2 expuestas a 10 μM de arsenito sódico. (B) Graficado de los valores obtenidos al cuantificar las bandas del western blot. Los niveles de expresión del HNF4α en la semana 3 fueron de 100, 57,77 y 24,15%; para la semana 6 estos fueron 100, 74,10 y 29,04%; para la semana 10 fueron 100, 54,13 y 31,95%; y, finalmente, para la semana 17 estos fueron de 100, 57,31 y 47,12% cuando las HepG2 se expusieron a 0, 5 y 10 μM de arsenito sódico, respectivamente. Como proteína de referencia se ha usado la β-actina.

4.5.2. La alteración de la expresión de HNF1 α y HNF4 α es dependiente de la presencia de arsénico en el medio

Ante la pregunta de si la respuesta observada se mantenía en ausencia de arsénico en el medio o si por el contrario ésta se mantenía, se diseñó el siguiente experimento.

A las células HepG2 expuestas de forma crónica durante 10 semanas con 10 μ M de arsenito sódico, se les cambió el medio con arsénico por medio sin arsenito sódico. Los efectos en la expresión de estos dos factores nucleares hepáticos, el HNF1 α y HNF4 α , se estudiaron a nivel de proteína a lo largo del tiempo después de 48, 72, 96 y 120 horas del cambio de medio.

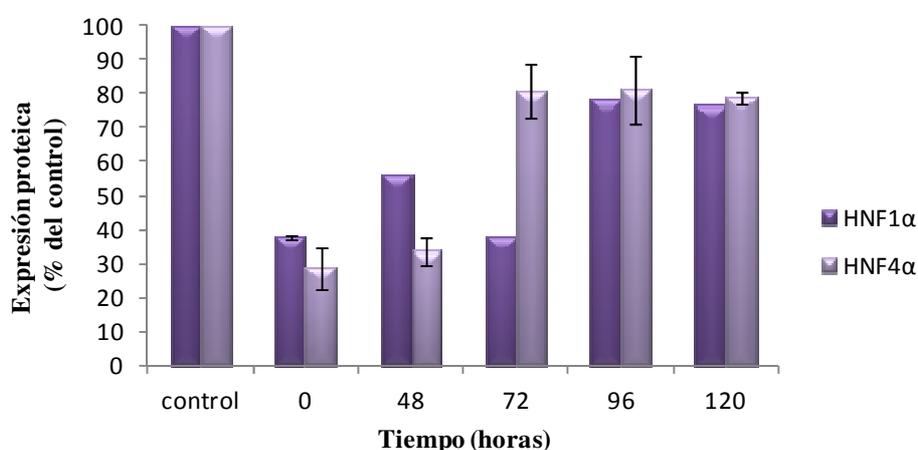


Figura 32 La disminución de la expresión de HNF1 α y HNF4 α inducida por el arsenito sódico es dependiente de la presencia de éste en el medio. Las células HepG2 expuestas de forma crónica durante 10 semanas, a una dosis subtóxica de arsenito sódico, 10 μ M, se les substituyó el medio con arsénico por medio sin este elemento y se estudió la expresión de HNF1 α y HNF4 α a lo largo del tiempo (0, 48, 72, 96 y 120 horas). A lo largo de este tiempo se observó una tendencia a la recuperación de la expresión de estos dos factores, indicando que para el mantenimiento de valores bajos de éstos es necesaria la presencia de arsenito sódico de forma continua. Específicamente los niveles de expresión del HNF1 α fueron de 37,42, 55,89, 37,65, 78,09 y 76,52% al cabo de 0, 48, 72, 96 y 120 horas, respectivamente, después de la eliminación del arsenito sódico del medio. Los niveles en el caso del HNF4 α fueron de 28,71, 33,61, 80,78, 81,12 y 78,56% a las 0, 48, 72, 96 y 120 horas, respectivamente, después de la eliminación del arsenito sódico del medio.

Los resultados de este estudio indican que los dos factores, HNF1 α y HNF4 α , sufren una tendencia a la recuperación de la expresión al retirar el arsenito sódico del medio (Figura 32). La recuperación de estos dos factores va aumentando a lo largo del tiempo, y aunque en el caso del factor HNF4 α se llega alrededor del 80% de expresión respecto a las células control (nunca expuestas al arsenito sódico) ya a las 72 horas de

eliminación del arsenito sódico del medio, en el caso del HNF1 α , para observar unos niveles de recuperación parecidos, nos tenemos que esperar a las 96 horas.

Esto nos indica que para mantener un fuerte efecto del arsenito sódico en los niveles de expresión de estos dos factores es necesaria la presencia de éste en el medio de forma permanente. Sin embargo hay que señalar que parece que la expresión no llega a recuperarse del todo, ya que los niveles alcanzados a las 96 horas se mantienen hasta las 120 horas.

4.5.3. Las células HepG2 expuestas a dosis subtóxicas de arsenito sódico de forma crónica presentan adaptabilidad a este elemento

Con la finalidad de estudiar si las células se adaptan a la exposición crónica al arsenito sódico, se realizó un ensayo de toxicidad en las células HepG2 expuestas durante 10 semanas a las dosis subtóxicas de arsenito sódico, de 5 y 10 μM . En el ensayo de toxicidad las células se expusieron a 5, 10, 50, 100 y 150 μM de arsenito sódico. Los resultados indican que las células previamente expuestas al arsenito sódico presentan una supervivencia relativa mayor que las células control (no expuestas previamente a arsenito sódico) cuando éstas se exponen a dosis tóxicas (50, 100 y 150 μM) de arsenito sódico (Figura 33).

De manera cuantitativa los valores de supervivencia relativa observados en las células control fueron de 100, 107,09, 101,67, 70,97, 56,00 y 1,86%, mientras que para las células expuestas previamente a 5 μM de arsenito sódico estos valores fueron de 100, 119,99, 99,31, 88,61, 71,57 y 20,26%. Para las expuestas a 10 μM los valores obtenidos fueron 100, 116,02, 105,12, 95,10, 76,61 y 19,96%. Todos estos valores se obtuvieron cuando se expusieron a 5, 10, 50, 100 y 150 μM de arsenito sódico, respectivamente. Si a partir de los resultados obtenidos se calculan las LC_{50} éstas son de 88,09, 114,05 y 119,14 μM , para las células control, y las expuestas a 5 μM y a 10 μM de arsenito sódico, respectivamente.

Estos resultados nos indican que las células HepG2 expuestas crónicamente a arsenito sódico presentan la capacidad de adaptarse parcialmente a la presencia de este elemento en el medio, al presentar una supervivencia significativamente mayor que las células no expuestas previamente a arsenito sódico, evaluada como una mayor LC_{50} .

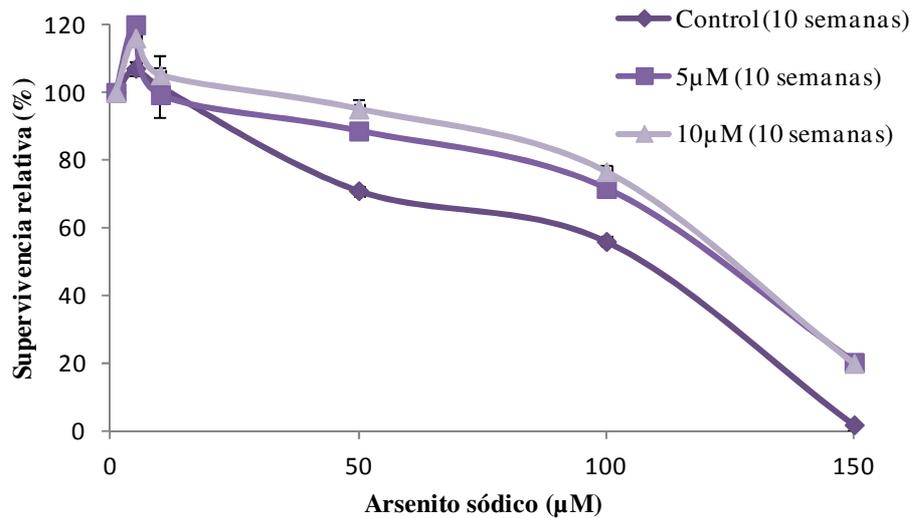


Figura 33 Adaptación de las células HepG2 a la exposición al arsenito sódico, tras la exposición crónica (10 semanas), a dosis subtóxicas de arsenito sódico (5 y 10 µM). Con las células expuestas crónicamente se hizo un ensayo de toxicidad, exponiéndolas a 0, 5, 10, 50, 100 y 150 µM de arsenito sódico durante 24 horas. En las células expuestas previamente, tanto con 5 como con 10 µM de arsenito sódico, se observa una mayor viabilidad respecto a las células control, no expuestas previamente a este elemento. Este efecto se observa de forma significativa a partir de la exposición a 50 µM de arsenito sódico. Concretamente los valores de viabilidad relativa en las células control fueron de 100, 107,09, 101,67, 70,97, 56,00 y 1,86%; para las células expuestas previamente a 5 µM de arsenito sódico los valores fueron 100, 119,99, 99,31, 88,61, 71,57 y 20,26%; mientras que para las expuestas a 10 µM fueron de 100, 116,02, 105,12, 95,10, 76,61 y 19,96%. Estos valores se obtuvieron tras la exposición a 5, 10, 50, 100 y 150 µM de arsenito sódico, respectivamente.

4.6. Disminución de la expresión HNF4α *in vivo*

Una vez observados los cambios de expresión de los factores HNF1α y HNF4α en las células HepG2 tratadas de forma crónica (semanas), se quiso ver si estos efectos se daban también *in vivo*. Tal y como ya se ha comentado, en un estudio previo realizado en nuestro Grupo se expuso a un grupo de hámsteres de forma crónica (durante 18 semanas) a arsenito sódico a través del consumo de agua de beber (0,27 mg NaAsO₂/L; pH = 7,5). Por lo tanto, en nuestro trabajo hemos utilizado tejido proveniente del hígado de tanto los animales tratados como los controles, para llevar a cabo un estudio a nivel de proteína de la expresión de HNF1α y HNF4α, con la finalidad de ver si el efecto observado *in vitro* también tenía lugar *in vivo*.

En la Figura 34 se encuentran graficados los resultados de este estudio, en el que se observa una disminución de la expresión del HNF4α, del 50%, en los animales expuestos, en comparación con los animales control. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la expresión del factor HNF1α entre los dos grupos de estudio.

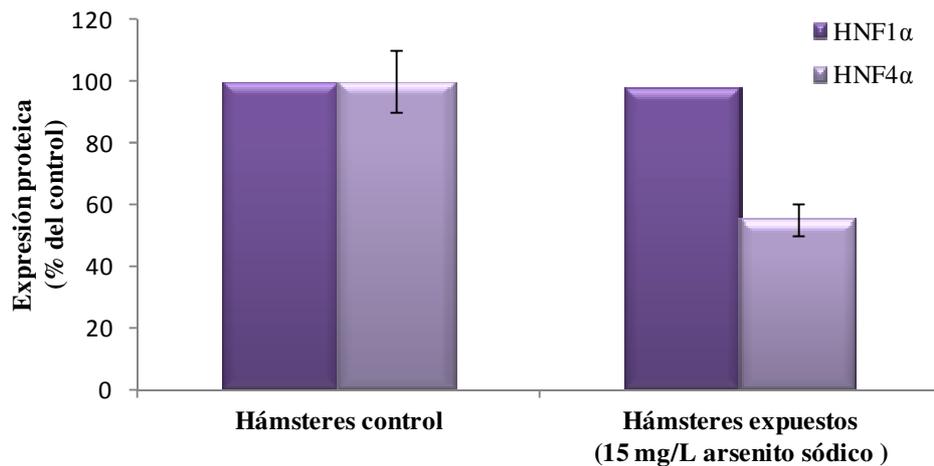


Figura 34 Disminución de la expresión del factor HNF4α in vivo. Un conjunto de 11, Golden Syrian hámsteres, se dividieron en dos grupos, los animales tratados (n=6) y los animales control (n=5). Los animales tratados se expusieron a arsenito sódico (15 mg/L) a través del consumo de agua contaminada con este elemento durante 18 semanas. Se extrajo proteína del hígado de todos los hámsteres (tratados y controles) y se estudió la expresión de HNF1α y HNF4α. Los resultados muestran diferencias significativas en la expresión del factor HNF4α entre los animales expuestos a arsenito sódico (55,10%) y los controles (100%). En cambio, no se observan diferencias por lo que hace a la expresión del factor HNF1α entre los dos grupos de estudio. Como proteína de referencia se usó la β-actina.

4.7. Efecto del arsénico en los procesos tumorales

Dado el papel que juegan los factores HNF1α y HNF4α en los procesos de desdiferenciación y carcinogénesis, nuestro estudio persigue demostrar si las variaciones en expresión se encuentran también ligadas a marcadores relacionados con el proceso tumoral. Por lo tanto, se propuso que el arsénico, a través de la alteración de la expresión de los factores HNF1α y HNF4α, podría estar induciendo desdiferenciación celular, afectando a la población de células madre cancerosas.

Los efectos en la desdiferenciación celular se estudiaron mediante el análisis de la expresión de un conjunto de marcadores hepáticos, como PEPCK2, ALDOB y Cyp1α, así como a través del análisis de la expresión de dos marcadores: Slain y Slug, de la transición epitelio-mesénquima. La motilidad se estudió a partir del análisis de las MMP, proteínas que participan en la degradación de la matriz extracelular.

4.7.1. Las células expuestas de forma crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico presentan una disminución de la expresión de un conjunto de marcadores hepáticos (PEPCK2, ALDOB y Cyp1 α)

Con el fin de estudiar si la exposición al arsénico induce desdiferenciación en las células HepG2 expuestas de forma prolongada al arsenito sódico, se estudió la expresión de 3 marcadores de diferenciación epitelial en los hepatocitos: ALDOB, PEPCK2 y Cyp1 α . Para ello, en las células HepG2 expuestas durante 17 semanas a dosis subtóxicas de arsenito sódico (5 y 10 μ M), se estudió la expresión de dichos marcadores hepáticos con la finalidad de estudiar si en las células HepG2 expuestas de forma crónica a arsenito sódico se daba una desdiferenciación celular, perdiendo de esta forma la expresión de marcadores hepáticos.

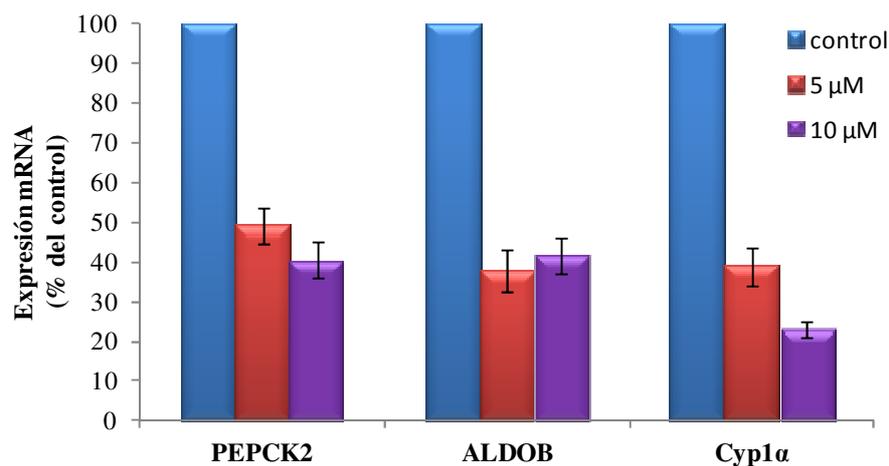


Figura 35 Disminución de la expresión de un conjunto de marcadores hepáticos (PEPCK2, ALDOB y Cyp1 α) en las células expuestas crónicamente a dosis subtóxicas de arsenito sódico. Tras 17 semanas de exposición crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico (5 y 10 μ M), se llevó a cabo un estudio de expresión de un conjunto de marcadores hepáticos observándose que las células expuestas presentan una disminución significativa de todos ellos, respecto a los valores observados en las células control. Los niveles de expresión en PEPCK2 fueron de 100, 49,11 y 40,42%; para ALDOB de 100, 37,70 y 41,72%; mientras que para Cyp1 α fueron de 100, 38,90 y 23,17%. Estos valores se obtuvieron en las células expuestas a 0, 5 y 10 μ M de arsenito sódico, respectivamente.

Tal y como se observa en la Figura 35 en las células expuestas durante 17 semanas a dosis de 5 y 10 μ M de arsenito sódico se da una disminución significativa de la expresión de los marcadores hepáticos estudiados, PEPCK2, ALDOB y Cyp1 α . Esto nos indica que existe una pérdida de diferenciación en éstas.

Hay que señalar que los niveles de expresión observados en las células expuestas para los tres marcadores estudiados son inferiores al 50% de los observados en las células control, llegando incluso a niveles del 23% de expresión del Cyp1 α en las células expuestas a 10 μ M de arsenito sódico.

4.7.2. Alteración de la expresión de *Slain* y *Slug* en las HepG2 expuestas de forma crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico

Con el objetivo de estudiar si la exposición crónica al arsénico en las células HepG2 induce la transición EMT, se estudió la expresión de dos marcadores, *Snail* y *Slug* tras la exposición de las células HepG2 durante 20 semanas a dosis subtóxicas (5 y 10 μ M) de arsenito sódico.

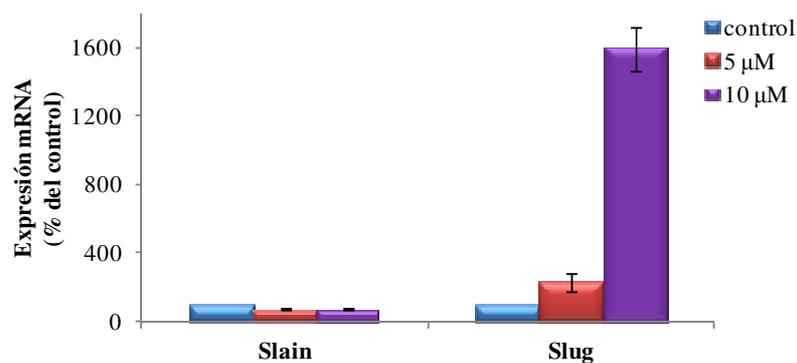


Figura 36 Alteración de la expresión de *Slain* y *Slug* a nivel de mensajero, en las células expuestas crónicamente (20 semanas) a dosis subtóxicas de arsenito sódico. Las células HepG2 se expusieron a dosis subtóxicas (5 y 10 μ M) de arsenito sódico de forma crónica, y a la semana 20 se estudiaron los niveles de expresión de *Slain* y *Slug*. Al estudiar la expresión de *Slain* se ha observado una ligera disminución de la expresión de este gen, 72,38 y 75,14% respecto a las células control, en las células expuestas a 5 y 10 μ M de arsenito sódico, respectivamente. En cambio, al estudiar la expresión de *Slug* se observa un aumento considerable de los niveles de expresión de éste, siendo del 227,28% en las células expuestas a 5 μ M y de 1592,75% en las expuestas a 10 μ M de arsenito sódico, respecto a la expresión de las células controles.

Los resultados nos muestran que las células expuestas presentan una alteración de la expresión de *Slain* y *Slug*, tal y como podemos observar en la Figura 36.

Por lo que respecta a *Slain* se ha observado una ligera disminución de su expresión, siendo ésta de alrededor del 70% respecto el control, tanto para la exposición a 5 como a 10 μ M de arsenito sódico. En cambio, al estudiar la expresión de *Slug* se ha detectado un aumento considerable de la expresión de este gen en las células expuestas al arsenito

sódico, siendo este aumento de alrededor de 230% en las células tratadas con 5 μM y del 1600% en las células tratadas con 10 μM , respecto a las células control.

4.7.3. Aumento de la actividad proteica de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) en las células expuestas de forma crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico

Un factor importante en la tumorigénesis es la capacidad de degradar la matriz celular, lo que facilita la diseminación. Con la finalidad de estudiar si la exposición prolongada de las células HepG2 a arsenito sódico estaba induciendo la progresión tumoral hemos estudiado la actividad de las MMPs como marcador de la capacidad de degradación de la matriz celular.

En este experimento sólo hemos utilizado las células HepG2 expuestas de forma crónica a 5 μM de arsenito sódico. A las 20 semanas de exposición se estudió la actividad, de MMP-2 y MMP-9, mediante la técnica de zimograma. Esta técnica permite conocer si las células HepG2 expuestas presentan una mayor actividad de estas metaloproteinasas, lo que se relaciona con la capacidad de invasión.

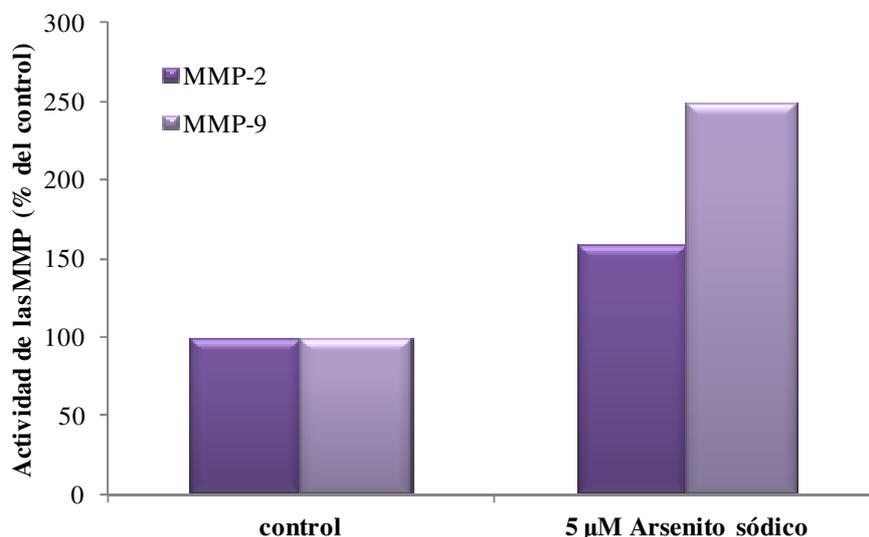


Figura 37 Aumento significativo de la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9). Las células HepG2 se expusieron crónicamente a 5 μM de arsenito sódico. A la semana 20 de exposición se estudió, utilizando el zimograma, la actividad de la MMP-2 y la MMP-9 observándose un aumento de éstas en las células expuestas respecto a las células control. El aumento de la MMP-2 fue del 158,46% y la de la MMP-9 del 248,99%, respecto a las células control.

Los resultados obtenidos nos muestran que las células expuestas a 5 μM de arsenito sódico durante 20 semanas presentan una mayor actividad de estas enzimas respecto a las células control de la misma semana de exposición (Figura 37).

Cuando se cuantifica este incremento de actividad, se ve que la de la MMP-2 en las células expuestas es del 158%, respecto las células control. En el caso de la MMP-9, las células expuestas presentan una actividad del 249%, respecto a las células control.

4.8. Efecto del arsénico en la subpoblación de células madre de la línea celular HepG2

Con la finalidad de saber si la exposición al arsénico estaba teniendo algún efecto en la subpoblación de células madre tumorales (CSCs) se estudió la expresión de dos marcadores de CSCs, el CD90 y el CD133, para poder determinar variaciones en las proporciones de esta subpoblación. Por otro lado, se utilizaron también cuatro marcadores de pluripotencia, Oct3/4, c-Myc, Lin28 y Notch2, para detectar posibles variaciones en la expresión de los mismos.

4.8.1. Las HepG2 expuestas de forma crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico presentan una disminución de la expresión de CD90 y CD133

A las 17 semanas de exposición, y a dosis subtóxicas de arsenito sódico (5 y 10 μM), se estudió la expresión de dos marcadores de células madre tumorales (CD90 y CD133) con el fin de determinar si el arsenito sódico es capaz de interaccionar sobre el subgrupo de células madre tumorales presentes en la línea HepG2.

Tal y como se observa en la Figura 38, en las células expuestas durante 17 semanas a dosis de 5 y 10 μM de arsenito sódico se da una disminución significativa de la expresión de ambos marcadores, CD90 y CD133. De manera comparativa se ve que la expresión de CD90 se ve más alterada que la de CD133; así, CD90 llega a presentar una expresión del 23% respecto las células control, mientras que los niveles de expresión del CD133 llegan a ser del 60% respecto al control.

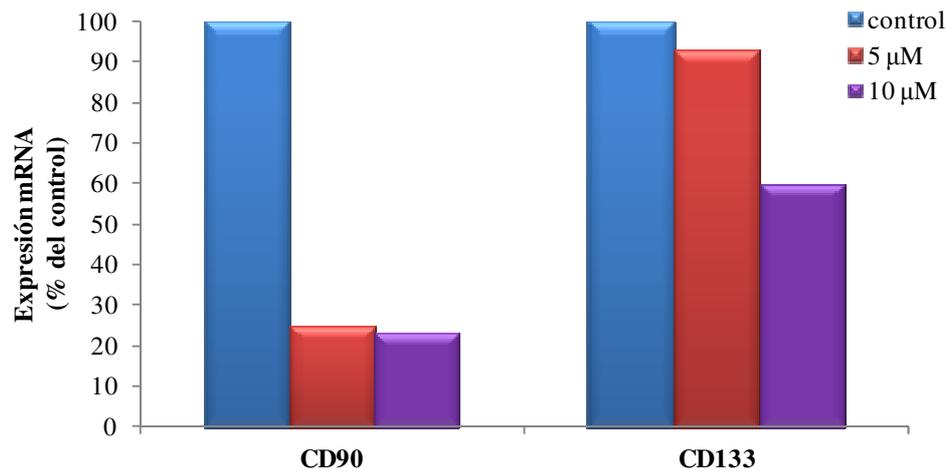


Figura 38 Disminución de la expresión de dos marcadores de células madre tumorales (CD90 y CD133) en las células expuestas crónicamente a dosis subtóxicas de arsenito sódico. Las células HepG2 se expusieron a dosis subtóxicas (5 y 10 μ M) de arsenito sódico 17 durante semanas. En ese momento se estudió la expresión de CD90 y CD133 y se observó una disminución de ambos, respecto a las células control. Los niveles de expresión de CD90 fueron de 100, 25,22 y 23,99%, y los de CD133 de 100, 92,94 y 60,34%, en las células expuestas a 0, 5 y 10 μ M de arsenito sódico, respectivamente.

4.8.2. Las células HepG2 expuestas de forma crónica a dosis subtóxicas de arsenito sódico presentan una disminución de la expresión de Lin28, c-Myc, Notch2 y Oct-3/4

La expresión de Lin28, c-Myc, Notch2 y Oct3/4 se estudió a las 6 y 17 semanas de exposición, en las células HepG2 expuestas a 5 y 10 μ M de arsenito sódico.

Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 39 (A y B). Estos resultados nos indican que las células crónicamente expuestas a dosis subtóxicas de arsenito sódico, 5 y 10 μ M, presentan una disminución de la expresión de Lin28, c-Myc, Notch2 y Oct3/4 y, por tanto, una pérdida de pluripotencia.

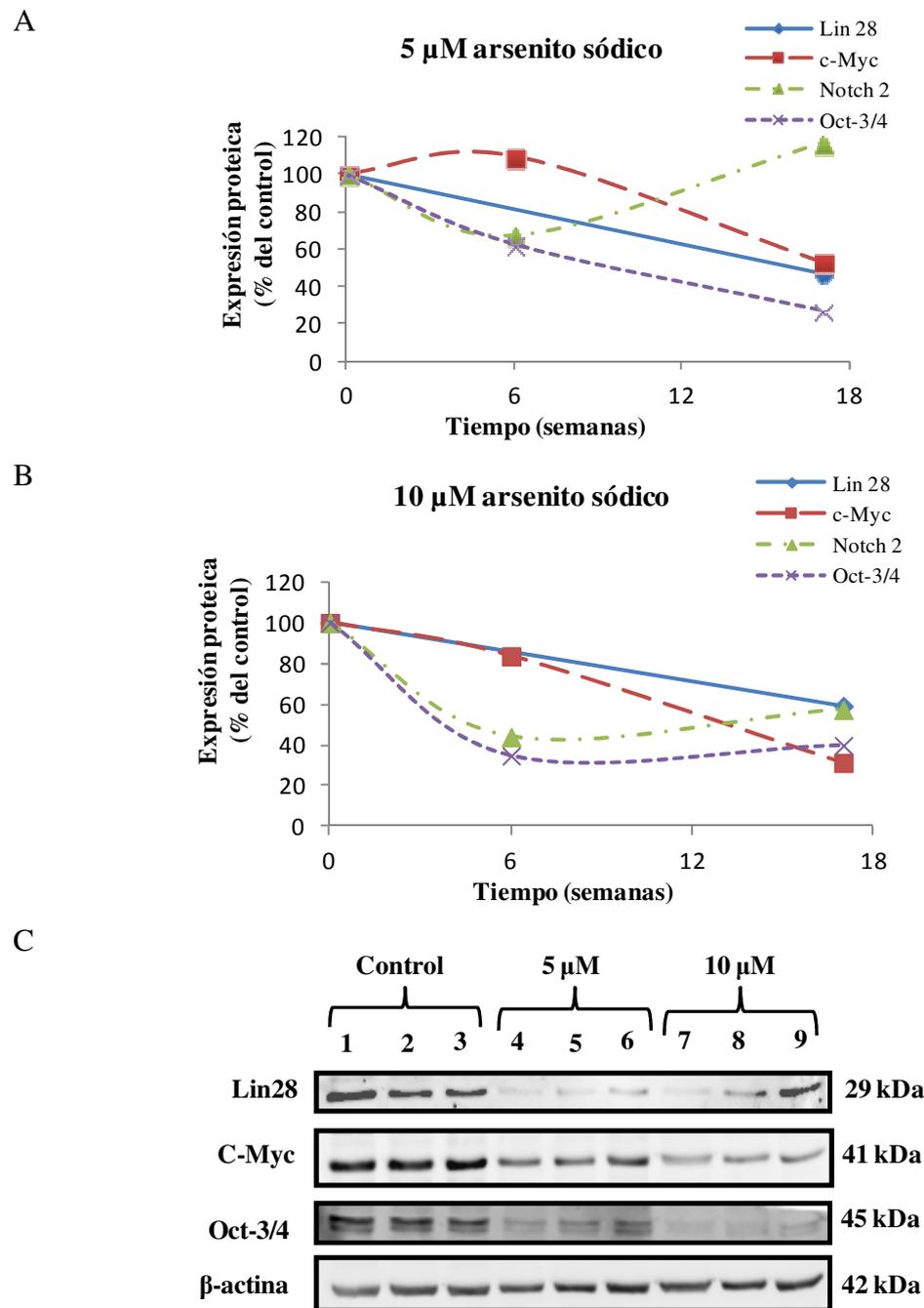


Figura 39 Alteración de la expresión de Lin28, c-Myc, Notch2 y Oct-3/4 en las células expuestas crónicamente a dosis subtóxicas de arsenito sódico. Las HepG2 se expusieron a dosis subtóxicas (5 y 10 μ M) de arsenito sódico, durante 17 semanas y se estudió la expresión de Lin28, c-Myc, Notch2 y Oct-4. Se observó en las células expuestas una disminución de todos estos genes, respecto a las células control. (A, B) Variaciones en la expresión en las semanas 6 y 17 después de los tratamientos con 5 y 10 μ M, respectivamente. (C) Bandas de expresión en la semana 17 de Lin28, c-Myc y Oct3/4, en las que se observa una clara disminución de la intensidad en las células expuestas a 5 y 10 μ M respecto a las células control. Como proteína de referencia se ha usado la β -actina.

Los niveles de expresión en Lin28 para la semana 17 fueron de 47,08 y 59,18% respecto el control, cuando las células se expusieron a 5 y 10 μM , respectivamente. Los niveles de expresión de c-Myc para la semana 6 fueron de 109,32 y 83,65% y para la semana 17 de 53,36 y 31,31% respecto el control, cuando las células fueron expuestas a 5 y 10 μM , respectivamente. Los niveles de expresión de Notch2 para la semana 6 fueron de 67,60 y 43,90% y para la semana 17 de 116,52 y 57,3% respecto el control, cuando las células fueron expuestas a 5 y 10 μM , respectivamente. Los niveles de expresión de Oct3/4 para la semana 6 fueron de 62,56 y 34,73, para la semana 17 de 27,00 y 39,80% respecto el control, cuando las células se expusieron a 5 y 10 μM , respectivamente.

Una visualización de la disminución en la expresión de los marcadores utilizados se puede contemplar en la Figura 39 (C). Aquí se representan tan sólo la expresión de Lin28, c-Myc y Oct-4 en la semana 17, tras la exposición a 5 y 10 μM de arsenito sódico. Se puede apreciar la clara disminución en la expresión de los marcadores indicados.

4.9. Alteración del metabolismo de la glucosa en las células HepG2 expuestas de forma crónica a una concentración subtóxica de arsenito sódico

Dado la asociación entre exposición a arsénico e incidencia de diabetes, además de cáncer, una de nuestros objetivos ha sido estudiar si la exposición crónica al arsenito sódico en las HepG2 tiene algún efecto en el metabolismo de la glucosa.

Para probar nuestra hipótesis las células HepG2 se expusieron de forma crónica a 5 μM de arsenito sódico y a las 20 semanas de exposición se estudió la producción de glucosa, con la finalidad de ver si la exposición al arsenito sódico estaba induciendo alguna alteración en el metabolismo de la glucosa.

Como podemos ver en la Figura 41, la exposición crónica de las células HepG2 a 5 μM de arsenito sódico da lugar a una alteración del metabolismo de la glucosa. En el medio de las células HepG2 expuestas a 5 μM de arsenito sódico durante 20 semanas se encuentra más glucosa que en las células control, con unos niveles de 220% de glucosa versus el 100% de las células control.

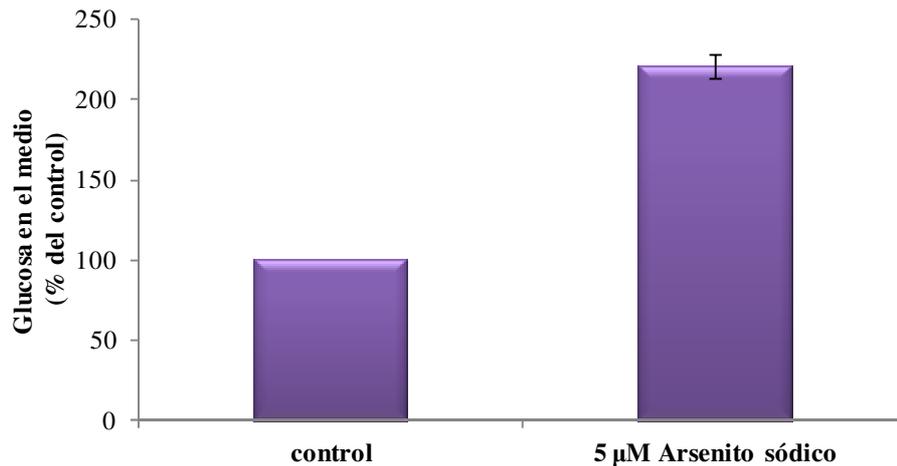


Figura 40 La exposición crónica a concentraciones subtóxicas de arsenito sódico (5 μM) de forma crónica da lugar a la alteración del metabolismo de la glucosa. Las HepG2 se expusieron de forma crónica a 5 μM de arsenito sódico y tras 20 semanas de exposición se estudió la cantidad de glucosa en el medio. Como se observa, las células HepG2 expuestas en estas condiciones presentan más glucosa en el medio (220,78%) que las células control (100%).

Aunque la medición de glucosa del medio nos indica que el arsénico está induciendo una alteración de su metabolismo, otro aspecto también interesante es ver si el arsénico también induce resistencia a la insulina en las células HepG2. Para probar esta hipótesis se añadió insulina en el medio y posteriormente se midieron los niveles de glucosa.

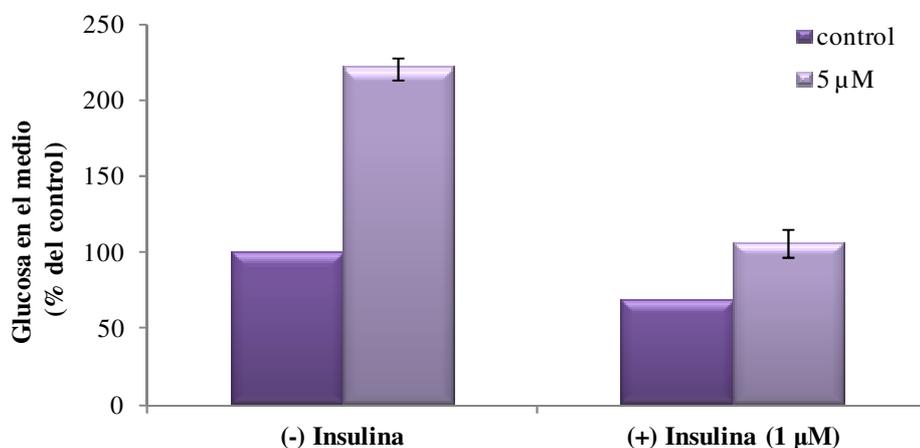


Figura 41 La exposición crónica a concentraciones subtóxicas (5 μM) de arsenito sódico no supone una pérdida de capacidad de responder a la insulina. Las HepG2 se expusieron de forma crónica a 5 μM de arsenito sódico. Tras 20 semanas de exposición se les añadió 1 μM de insulina y se midieron los niveles de glucosa en el medio. En respuesta a la insulina las células control pasaron a producir menos glucosa, 68,43%, respecto las células control (100%). Las células expuestas también responden a la presencia de la insulina, reduciendo la producción de glucosa al 106,33% respecto a las células control (100%).

Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 41. Así, cuando se añade insulina (1 μM) a las células control (no expuestas al arsenito sódico) se observa una disminución

de los niveles de glucosa en el medio. Las células expuestas a la insulina presentan unos niveles del 68,43% de glucosa en el medio, respecto a las células control (no expuestas al arsenito sódico y sin insulina en el medio). Se observa que las células HepG2 expuestas al arsenito sódico no pierden su capacidad de responder a la presencia de insulina en el medio, ya que el porcentaje de glucosa en el medio disminuye a 106,33% respecto al control, el cual era de 220,78% sin la adición de la insulina en el medio. Así, éstas recuperan casi los niveles normales de glucosa (100%, nivel de las células control sin adición de insulina) al estar presente la insulina en el medio.

Como resumen, tanto las células expuestas como las controles respondieron a la insulina de forma parecida, por lo que en las condiciones estudiadas el arsenito sódico induce una alteración de la homeostasis de la glucosa, pero no resistencia a la insulina.

Los niveles de expresión en Lin28 para la semana 17 fueron de 47,08 y 59,18% respecto el control, cuando las células se expusieron a 5 y 10 μM , respectivamente. Los niveles de expresión de c-Myc para la semana 6 fueron de 109,32 y 83,65% y para la semana 17 de 53,36 y 31,31% respecto el control, cuando las células fueron expuestas a 5 y 10 μM , respectivamente. Los niveles de expresión de Notch2 para la semana 6 fueron de 67,60 y 43,90% y para la semana 17 de 116,52 y 57,3% respecto el control, cuando las células fueron expuestas a 5 y 10 μM , respectivamente. Los niveles de expresión de Oct3/4 para la semana 6 fueron de 62,56 y 34,73, para la semana 17 de 27,00 y 39,80% respecto el control, cuando las células se expusieron a 5 y 10 μM , respectivamente.

Una visualización de la disminución en la expresión de los marcadores utilizados se puede contemplar en la Figura 39 (C). Aquí se representan tan sólo la expresión de Lin28, c-Myc y Oct-4 en la semana 17, tras la exposición a 5 y 10 μM de arsenito sódico. Se puede apreciar la clara disminución en la expresión de los marcadores indicados.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta Tesis nos muestran que las células HepG2 son un material apropiado para realizar estudios sobre el papel carcinogénico y diabetogénico del arsénico. Éstas expresan los principales transportadores del arsénico y la enzima fundamental (AS3MT) para la metabolización del arsénico inorgánico; además, mediante el análisis de las especies de arsénico presentes tanto en las células como en el medio, tras su exposición con arsénico inorgánico, se ha podido comprobar cómo esta línea celular es capaz de metabolizarlo.

También hemos podido demostrar que la exposición al arsénico induce la alteración de la expresión de los factores nucleares hepáticos seleccionados, tanto en tratamientos agudos como en crónicos y, que el efecto sobre el factor HNF4 α por parte del arsénico compromete la viabilidad celular. El aspecto más destacado de este trabajo ha sido la demostración de que la exposición prolongada a arsénico supone la inducción de procesos tumorales tales como la desdiferenciación, la transición epitelio-mesénquima y la remodelación de la matriz, así como efectos específicos sobre la subpoblación de células madre cancerosas de la línea celular HepG2. Además, y de manera preliminar, esta Tesis muestra que el arsénico altera el metabolismo de la glucosa y que esta respuesta es independiente de la insulina.

Después de esta descripción general de los resultados obtenidos pasaremos a discutir, punto por punto, los distintos resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis.

5.1. La línea celular HepG2 es un buen modelo para el estudio in vitro de los mecanismos de acción del arsénico

El primer paso antes de empezar los estudios sobre los mecanismos de acción de este metaloide fue conocer si esta línea celular era capaz de incorporar el arsénico inorgánico del medio. Para ello, mediante una RT-PCR se estudió la expresión a nivel del mensajero de un conjunto de genes relacionados con el transporte del arsénico hacia dentro y hacia fuera de la célula. Los transportadores estudiados fueron: *AQP3*, *AQP9*, *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*, *MRP1* y *MRP2*. También se estudió la expresión de *AS3MT*, cuya enzima es fundamental para la bio-metabolización del arsénico (Nicolis et al., 2009, Drobna et al., 2010).

El análisis de la expresión de estos transportadores nos muestra como las células HepG2 expresan todos los transportadores estudiados: *MRP1*, *MRP2*, *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*,

AQP3 y *AQP9*. La expresión de los transportadores *AQP3* y *AQP9* en las células HepG2 ha sido también observada en un reciente trabajo (Rodríguez et al., 2011), reforzando nuestras observaciones. Por lo que hace a la expresión de *GLUT1* y *GLUT2* en las células HepG2, ésta ya había sido observada con anterioridad a este trabajo (Chung et al., 2003, Burkhardt et al., 2005), pero no hay ningún estudio en el que se haya confirmado la presencia de *GLUT3*, siendo por lo tanto éste el primer trabajo en el que se muestra su expresión en esta línea celular. Finalmente, y por lo que hace a la expresión de los transportadores *MRP1* y *MRP2*, nuestros resultados confirman lo previamente observado por Le Vee et al. (2006). La expresión de todos estos transportadores de arsénico en las células HepG2 nos indica que éstas poseen la capacidad de transportar los compuestos de arsénico a través de su membrana convirtiéndose, por tanto, en un buen modelo para llevar a cabo estudios con este elemento. También hemos demostrado que esta línea celular expresa el gen *AS3MT*, requisito fundamental para la metilación del arsénico y, por lo tanto, para su metabolización. La expresión de este gen en las células HepG2 y en otras líneas hepáticas ya se había detectado en otros estudios (Drobna et al., 2006), aunque no todas las líneas celulares expresan este gen; así, por ejemplo, la línea celular UROtsa (células uroteliales) no lo expresa y, por lo tanto, no tienen la capacidad de metabolizar el arsénico (Drobna et al., 2005).

Una conclusión de estos resultados es que la línea celular HepG2 es potencialmente capaz de captar el arsenito sódico y de metabolizarlo; sin embargo, para estar seguros hay que demostrar de manera directa que esto realmente sucede. Es por esto que procedimos a detectar la presencia de las distintas especies de arsénico tanto en el medio como en las células, mediante el análisis de éstas con HPLC. Los resultados de este análisis nos muestran que un 98,33% del arsénico total se encuentra en estado inorgánico y un 1,67% en estado orgánico, lo que nos confirma tanto la capacidad de transportar el arsénico al interior de las células HepG2 como su metabolización. Estos resultados concuerdan con lo recientemente publicado (Watanabe et al., 2011) donde tras la exposición de las células HepG2 a 5 μM de arsenito sódico durante 24 horas, se observó la presencia de las diferentes especies de arsénico, tanto a partir de la lisis celular como del medio. Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos en el estudio citado, en ambos casos se encuentra más arsénico total en el medio que en el interior de la célula, siendo el compuesto predominante en el medio el iAs^{III} . Esto nos indica que las células sólo son capaces de captar parte del arsénico añadido en el medio,

y que la mayoría del arsenito sódico añadido mantiene su valencia trivalente. Por lo que hace a las especies de arsénico detectadas en el medio, aunque en el mencionado artículo sólo son capaces de detectar las especies inorgánicas estudiadas, en cambio en nuestro estudio, aparte de las especies inorgánicas, también hemos podido detectar las especies orgánicas, lo que nos muestra que está teniendo lugar un transporte de las especies de arsénico metabolizadas por las células HepG2 hacia el exterior, principalmente MMA^{III} y MMA^{V} , aunque también hemos detectado la presencia de DMA^{V} . Por lo que hace al arsénico internalizado, hemos detectado tanto las especies inorgánicas como las orgánicas, aunque la mayoría del arsénico dentro de las células es arsénico inorgánico, principalmente As^{III} . Por lo que hace las especies orgánicas, el compuesto mayoritariamente detectado es el DMA^{V} , que hay que recordar que, según el esquema clásico del metabolismo del arsénico, es el producto final de la ruta. La conclusión que extraemos de todos estos resultados es que las células HepG2 llevan a cabo la metabolización del arsenito sódico de manera eficiente, independientemente de si los tratamientos han sido de 24 ó de 48 horas.

5.2. Efectos tóxicos del arsénico en la línea celular HepG2

Una vez demostrada la eficiencia de la línea celular HepG2 para transportar y metabolizar el arsénico, se trató de ver el efecto de diferentes dosis sobre la viabilidad celular, con la finalidad de poder seleccionar concentraciones subtóxicas a las que poder realizar los distintos experimentos diseñados en esta Tesis.

Es obvio que los resultados pueden diferir dependiendo del sistema utilizado para medir la viabilidad. Así, cuando se utilizó el sistema XTT se obtuvieron valores de LC_{50} de 67,50 y 54,50 μM tras exposiciones de 24 y 48 horas, respectivamente. Al utilizar el recuento celular la LC_{50} observada tras 24 horas de exposición fue de 88,76 μM . Por último, el valor de LC_{50} observado con el NucleoCounter fue de 48,54 μM tras 24 horas de exposición. Como se ve, el valor de la LC_{50} obtenido al utilizar el recuento celular es más elevado que los valores resultantes al utilizar los otros dos sistemas, lo que puede deberse a que, aunque antes de llevar a cabo el recuento de las células éstas se lavan con PBS, se pueden llegar a contar tanto células muertas como vivas. Por otro lado, el valor LC_{50} usando el sistema de NucleoCounter es menor que el obtenido usando el sistema XTT, esta diferencia se puede asociar a un posible efecto del arsénico en la mitocondria lo que podría alterar los resultados al usar el sistema XTT, ya que este sistema se basa

en la medida de la actividad mitocondrial para cuantificar el número de células vivas. De todas maneras, ya que cada técnica mide aspectos distintos de la viabilidad, estos valores se deben tomar tan sólo como valores de referencia. Es por esto que en todos los estudios posteriores llevados a cabo hemos utilizado como tope el valor de 10 μM , valor significativamente más bajo que el obtenido en cualquiera de las estimas de toxicidad llevadas a cabo. Por lo tanto, el rango de dosis subtóxicas escogidas ha sido de 0,5, 2, 5 y 10 μM . La bondad de esta decisión se sustenta en el hecho de que nuestros resultados de toxicidad concuerdan con los valores obtenidos en un estudio reciente en el que también se utilizaron células HepG2 y arsenito sódico (Yamazaki et al., 2010).

Es obvio que la toxicidad puede depender de la línea celular escogida; así, los resultados de nuestro estudio indican que las células HepG2 son más sensibles al arsenito sódico que las células Chang (células hepáticas humanas), en las que se consideran dosis subtóxicas hasta los 30 μM (Wang et al., 2009). De todos modos si hacemos un repaso bibliográfico sobre la sensibilidad de las células HepG2 respecto a otras líneas celulares vemos que éstas son bastante resistentes al arsénico, al compararlas por ejemplo con las células BEAS-2B (células humanas de pulmón) o las HELAS3 (células humanas cancerosas del cérvix), con una LC_{50} de 10 μM para las células BEAS-2B (Liao et al., 2007, Yamazaki et al., 2010).

Para confirmar que las células están respondiendo al tratamiento con arsénico sódico hemos estudiado la expresión de la metalotioneína (*MT*) y de la hemo-oxigenasa (*HMOX*), ya que se sabe que la expresión de estos genes se ve inducida en presencia de arsénico. La *MT* es una proteína que se une a metales y actúa protegiendo la célula contra metales tóxicos y, aunque la expresión de esta proteína se ve inducida por diferentes compuestos (como hormonas y metales), se ha visto que el arsénico la induce de manera significativa (Kreppel et al., 1993). Por otra parte, la *HMOX* es un enzima hemo-oxigenasa que degrada grupos hemo, participando así en la degradación de la hemoglobina y su expresión también se ve inducida por distintos compuestos, incluido el arsénico (Zhao et al., 2011). Por lo tanto, los elevados incrementos observados en la expresión de ambos genes, *MT* y *HMOX*, lo consideramos como un buen indicador de respuesta a la exposición al arsénico, de la misma manera que lo han utilizado otros autores que estudian diversos aspectos ligados con la exposición al arsénico (Liu et al., 2008b, Lu et al., 2011).

Se ha observado que el arsénico es capaz de inducir una parada en el punto de control localizado al final de la fase G2, antes de que las células entren en mitosis (McCabe et

al., 2000, Rossman 2003, Tsou et al., 2006). Dada la finalidad de nuestro estudio nos interesaba confirmar que las concentraciones subtóxicas seleccionadas no producían ningún tipo de toxicidad, como podía representar la alteración del ciclo celular. Así, en este trabajo hemos estudiado si en las condiciones de exposición utilizadas se produce alguna alteración del ciclo celular en las células HepG2. Los resultados obtenidos nos muestran que en las células expuestas no se han observado diferencias significativas en el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, con respecto a lo observado en las células control. Esto nos confirma que la selección de dosis ha sido adecuada. De hecho en el estudio de Li et al, (2011) se observa que las alteraciones del ciclo celular se dan cuando las células HepG2 se exponen a concentraciones de trióxido de arsénico a partir de 20 μM . De acuerdo con estudios llevados a cabo en nuestro grupo (Soriano et al., 2007) el trióxido de arsénico es más tóxico que el arsenito sódico, por lo que la concentración de 20 μM correspondería al rango de dosis superiores a la LC_{50} .

Al igual que sucede con el ciclo celular la literatura también indica que los compuestos de arsénico también promueven la apoptosis, que sería otra indicación de toxicidad. Así, el trióxido de arsénico, que se usa como anti-cancerígeno para tratar la leucemia promielocítica aguda (Desagher et al., 2000, Kilbride et al., 2010) induce apoptosis en las células HepG2 a partir de la concentración de 10 μM (Kang et al., 2003). Por lo que hace al efecto del arsénico sódico, las concentraciones que producen apoptosis son bastante elevadas (100 μM), como encontraron (Yamazaki et al., 2010).

En base a los resultados anteriores se puede concluir que en las condiciones de exposición utilizadas en las HepG2 no se induce ni apoptosis ni alteración en el ciclo celular. Dada la estrecha relación que existe entre ambos parámetros, la parada en G2 está relacionada con la apoptosis (McCabe et al., 2000), ambos resultados se refuerzan y apoyan la buena selección de las dosis escogidas.

5.3. Relación entre distintos factores nucleares seleccionados y la exposición al arsénico

Dado el objetivo principal de esta Tesis, ha sido necesario comprobar que la línea celular HepG2 expresa los distintos factores nucleares seleccionados y que la expresión de éstos se puede modular bajo la acción del arsénico en tratamientos agudos.

Que la línea HepG2 expresa los factores HNF1 α , HNF4 α , HNF6 α , PXR y FOXM1 ya había sido indicado por distintos autores (Yu et al., 2001, Pramfalk et al., 2005, Yoshida et al., 2006, Naspinski et al., 2008, Xia et al., 2009), pero referente a la existencia de trabajos en los que se estudie la expresión de estos factores frente a la exposición al arsénico sólo hay un artículo que relaciona esta exposición con una alteración de la expresión del factor HNF4 α (Yu et al., 2001).

Así, una vez comprobada su expresión se estudió si había algún efecto en la expresión de éstos en las células expuestas durante 24 horas frente un rango amplio de concentraciones de arsenito sódico (5, 10, 20, 50 y 100 μ M). Los resultados nos indican que el arsenito sódico tiene un efecto sobre la expresión de los dos factores finalmente estudiados, HNF1 α y HNF4 α . Aunque hemos observado un efecto dosis-dependiente, en ningún momento la expresión de los dos factores ha sido inferior al 10%. El hecho de que la expresión de estos dos factores no llegue a desaparecer podría tener una relación con la gran importancia que tienen éstos para la supervivencia de las células (Ryffel 2001, Lannoy et al., 2002, Odom et al., 2004, Gao et al., 2010, Ning et al., 2010, Ouyang et al., 2010, Pelletier et al., 2011, Koo et al., 2012, Wang et al., 2012). Además, el hecho de que la alteración en la expresión de estos factores depende de la dosis de arsénico administrado nos indica que realmente el arsénico tiene un papel relevante en su expresión.

Los resultados obtenidos en los tratamientos de 24 horas se repiten cuando las células HepG2 se tratan durante 48 horas. En este caso, además de confirmar los resultados con HNF1 α y HNF4 α se comprobó que esta variación en la expresión era extensiva a los otros factores (HNF6 α , PXR y FOXM1). Estos resultados se obtuvieron tanto a nivel del mensajero como de la proteína, y de forma dosis-dependiente. Cabe destacar que el efecto en la expresión a nivel del mensajero de todos los factores estudiados concuerda con lo observado a nivel de proteína. El hecho de que hayamos observado una disminución de todos ellos coinciden con lo esperado ya que como se ha comentado todos estos factores interaccionan entre ellos y, por lo tanto, puede ser que veamos alterada la expresión de alguno de ellos sin que el arsénico tenga un efecto directo sobre él y que su efecto sea debido a la participación de otro de los factores en el control de su expresión. Referente a la interacción entre estos factores la bibliografía nos indica que HNF4 α participa en el control de la expresión a nivel del mensajero de HNF1 α , HNF6 α , PXR y HNF4 α (auto-regulación). Por su parte, HNF6 α participa en la regulación de HNF4 α , HNF1 α y FOXM1; mientras que HNF1 α lo hace en la regulación de HNF4 α y

HNF1 α (auto-regulación). El factor PXR participa en la regulación de HNF4 α y, por último, FOXM1 participa en la regulación de HNF6 α (Li et al., 2000, Odom et al., 2004, Lazarevich et al., 2008, Chen et al., 2010, Gao et al., 2010, Pelletier et al., 2011, Koo et al., 2012).

Por lo que hace a la existencia de estudios que relacionen la expresión de estos factores con la exposición al arsénico, sólo hay un estudio en el que se exponen las células HepG2 a trióxido de arsénico y en el que se observó una disminución en la expresión del factor HNF4 α (Yu et al., 2001). Aunque ya hemos comentado que el trióxido de arsenito es más tóxico que el arsenito sódico, ambos compuestos son inorgánicos y con valencia 3, por lo que, en un sentido amplio nuestros estudios concordarían con los del artículo citado, reforzando nuestra hipótesis de que los distintos factores estudiados son un blanco de la actividad del arsénico.

5.4. Papel del factor HNF4 α en la viabilidad celular

De todos los factores nucleares estudiados, se considera que el HNF4 α es el principal desencadenante de la cascada de interacciones, y es por esta razón que lo hemos escogido como factor modelo; además, se sabe que este factor actúa regulando el 12% de los genes que se expresan en los hepatocitos (Lemaigre et al., 2004). Dada la gran importancia de este factor en la homeostasis de los hepatocitos, proponemos que al menos parte del efecto tóxico inducido por el arsénico puede ser debido a la alteración inducida por este metaloide en la expresión del HNF4 α . Con el fin de comprobar nuestra hipótesis, transfectamos las células HepG2 con plásmidos portadores de HNF4 α . El objetivo de esta transfección era conseguir mayores niveles de expresión del HNF4 α en las células expuestas al arsenito y evaluar mediante un ensayo de viabilidad si éstas se veían menos afectadas a las mismas concentraciones de arsenito sódico que las células no transfectadas.

Los resultados claramente demuestran que las células HepG2 transfectadas muestran un aumento significativo en la expresión de este factor, y que tras la exposición a arsenito sódico mantenían los niveles de expresión del factor HNF4 α a diferencia de lo que les sucede a las células no transfectadas. Hay que señalar, que el mantenimiento de la expresión se observó sólo tras el tratamiento con concentraciones menores de 20 μ M, ya que a partir de esta concentración el aumento de la expresión por el plásmido era insuficiente para mantener niveles de expresión iguales a los de las células no tratadas con arsénico.

Por lo que hace referencia a los estudios de viabilidad, nuestros resultados nos muestran que la LC_{50} de las células transfectadas con pl-HNF4 α es mayor que la de las células control, lo que indica que éstas pasan a ser más resistentes al arsénico al recuperar la expresión del factor HNF4 α . No podemos contrastar los resultados obtenidos, dado que en la literatura existente no hay publicados estudios parecidos en los que se relacionen los niveles de expresión del factor HNF4 α con la viabilidad celular frente a la exposición al arsénico. Sin embargo, sí que hay un estudio en el que se pone de manifiesto que la expresión de ATF5, modula el efecto tóxico del arsenito sódico, siendo éste un factor de transcripción de respuesta al estrés relacionado con el efecto tóxico del arsénico. Sin embargo, en ese estudio se disminuye la expresión del gen ATF5 mediante siRNA en vez que incrementar la expresión, como ha sido el objetivo de nuestro estudio. Sin embargo, lo que es interesante es que la modulación de la expresión de este factor es capaz de cambiar los niveles de toxicidad, como sucede en nuestro estudio (Majumder et al., 2011). Lo que proponemos en esta Tesis es que el efecto del arsénico en la expresión de HNF4 α , de forma parecida al efecto de ATF5, también sería un mecanismo a través del cual el arsénico afectaría a la viabilidad de las células.

De este estudio también se extrae que las células, por el hecho de haber sido transfectadas, son más sensibles a la exposición al arsenito sódico. Seguramente esto es debido a que la transfección es un proceso que afecta a la viabilidad de las células y las que consiguen sobrevivir quedan más sensibles a cualquier agente externo. De hecho los efectos observados en la viabilidad de las células HepG2 transfectadas y tratadas con arsenito sódico, respecto las no transfectadas, se han observado también en otros estudios donde la LC_{50} de las HepG2 transfectadas tiene un valor parecido a los obtenidos en este trabajo (Watanabe et al., 2011). Sin embargo, hay que recordar que este factor ya se ha tenido en cuenta, tanto en el diseño del experimento como con la evaluación de los resultados, al incorporar los casos de células transfectadas con el vector “vacío”.

5.5. Factores nucleares y exposición crónica al arsénico

Una vez visto que bajo las condiciones de exposición aguda, el arsénico es capaz de inducir alteraciones en la expresión de los factores nucleares de interés, el objetivo se desplazó a estudiar que sucedía en células expuestas de forma prolongada (semanas) al arsénico. Este diseño nos permite acercarnos más a las condiciones de exposición a las

que se encuentran expuestas las personas que viven en ambientes contaminados con arsénico. La utilización de exposiciones prolongadas en el estudio de los efectos del arsénico es una metodología muy poco utilizada y, como hemos indicado, pretende mimetizar las exposiciones naturales.

Esta aproximación metodológica permite conocer la dinámica de la disminución de la expresión de los factores estudiados. Para ello, nos hemos centrado en el estudio de la expresión de tan sólo los factores HNF1 α y HNF4 α , ya que son éstos los que se encuentran principalmente relacionados con el proceso cancerígeno y diabetogénico, que es el objetivo de esta Tesis. Además, como ya se ha comentado, hay estudios que proponen que el HNF4 α es el factor principal de la cascada de señales en la red de interacción de los factores nucleares hepáticos (Ryffel 2001, Odom et al., 2004, Lucas et al., 2005, Lazarevich et al., 2008, Pelletier et al., 2011).

Una conclusión de este estudio es que la expresión de HNF1 α y HNF4 α se ve afectada por la exposición prolongada a concentraciones subtóxicas de arsénico. De igual manera que sucedía en los estudios agudos, en estos estudios crónicos tampoco se llega a inducir una desaparición completa de la expresión de los factores. Por lo tanto, ambos resultados apuntan a que se requieren unos niveles basales de estos dos factores para la supervivencia de las células. Estos niveles mínimos de expresión son de aproximadamente el 20 y el 25% para HNF1 α y HNF4 α , respectivamente.

La confirmación de que los niveles de expresión de HNF1 α y HNF4 α se ven afectados por la exposición al arsenito sódico plantea la pregunta de si dicha variación es dependiente o no de la presencia de éste en el medio, o dicho de otra manera si la alteración en la expresión es o no reversible. Los resultados indican que el cambio de medio con arsénico por medio sin arsénico, a las células expuestas durante 10 semanas, induce una tendencia a recuperar los niveles de expresión de los factores, HNF1 α y HNF4 α . Sin embargo, la recuperación de la expresión no es completa, llegando a ser ésta de alrededor de un 80% de la expresión inicial. Esto nos indica que los efectos del arsenito sódico sobre los niveles de expresión de los factores estudiados requieren la presencia de éste en el medio de forma permanente, mostrando que el arsénico en parte debe de estar afectando la expresión de estos factores a través de un mecanismo dinámico y dependiente de su presencia. Trasladando esto a las condiciones de exposición de los grupos humanos expuestos, esto indicaría la posibilidad de una recuperación de los efectos inducidos en las personas expuestas de forma crónica si dejaran de estarlo. Sin embargo, es posible que esta visión no sea aplicable a todos los

efectos inducidos por el arsénico en la salud de las personas expuestas, ya que hay estudios que muestran que la exposición al arsénico durante la vida fetal tiene efectos en la vida adulta, aun habiendo dejado de estar expuestos al arsénico (Tokar et al., 2011). Otro aspecto que plantean nuestros resultados es si las células HepG2 expuestas a dosis subtóxicas de arsenito sódico de forma prolongada presentan una adaptabilidad a la toxicidad del arsénico. Los resultados de viabilidad utilizando las células previamente expuestas al arsénico durante 10 semanas, muestran que las células previamente expuestas presentan una mayor supervivencia relativa que las células control (no expuestas previamente a arsenito sódico), cuando éstas se exponen de manera aguda a dosis tóxicas de este compuesto. Esto nos indica que las células HepG2 expuestas crónicamente a arsenito sódico presentan la capacidad de adaptarse en parte a la presencia de este elemento en el medio, presentando una supervivencia significativamente mayor que las células no expuestas previamente a éste. Esto se traduce en LC_{50} mayores. Estos resultados de adaptabilidad también se han observado en otros estudios (Liu et al., 2001, Tokar et al., 2010), y se podrían explicar asumiendo que, en respuesta a la exposición al arsénico, la célula activa toda una serie de mecanismos para protegerse de este elemento; mecanismos que ya tendrían activados las células expuestas crónicamente a bajas dosis de arsénico, lo que les permite ser más resistentes a la exposición aguda a dosis tóxicas que aquellas células que no han estado previamente expuestas al arsénico. Algunos autores proponen que este efecto de adaptabilidad podría ser debido a un aumento en la expresión de proteínas transportadoras de arsénico, que harían aumentar el eflujo de éste, reduciendo así la acumulación de arsénico de las células (Liu et al., 2001).

5.6. Disminución de la expresión HNF4 α *in vivo*

Una vez confirmados los cambios de expresión en los factores HNF1 α y HNF4 α en las células HepG2, tras la exposición crónica con arsenito sódico, se trata de demostrar que estos efectos se dan también *in vivo* y no es un “artefacto” causado por las condiciones de cultivo *in vitro*.

Para ello se utilizó el material generado en un estudio previo (Hernández et al., 2011) en el que hámsteres se expusieron de forma crónica (durante 18 semanas) a arsenito sódico a través de agua de beber. El análisis de los hígados (tanto los animales tratados como controles) nos muestra que *in vivo* también se observa una disminución de la expresión a nivel de proteína del factor HNF4 α , llegando a ser esta disminución de un 50% en los

animales tratados, respecto a los controles. Así, el efecto sobre el factor HNF4 α por parte del arsenito sódico *in vivo* concuerda con lo observado en el estudio *in vitro* con las células HepG2, en las que también se observa una disminución significativa de la expresión de este factor, siendo ésta de alrededor del 50% en la última semana estudiada (semanas 17).

En el hígado de los hámsteres tratados no se han observado diferencias significativas en los niveles de expresión de HNF1 α a nivel de la proteína, aunque en el estudio previo, utilizando la técnica DD-PCR, se observó una disminución de la expresión de este factor a nivel del mensajero (Hernández et al., 2011). El hecho de que la expresión a nivel del mensajero y a nivel de proteína concuerden en los estudios *in vitro* pero no en los llevados a cabo *in vivo*, en el caso del factor HNF1 α , podría ser debido a la alta variabilidad observada entre los animales o al aumento de la complejidad en los animales respecto a la línea celular, en los que podría estar interactuando algún otro mecanismo en la regulación de la traducción del factor HNF1 α , quizá debido a alguna señal externa, la cual no existiría al trabajar *in vitro*. Esto nos muestra la importancia de estudiar lo que sucede a nivel de proteína, no tan sólo a nivel de mensajero. Aunque esta discordancia refleja las limitaciones del estudio *in vitro*, respecto al estudio *in vivo*, los estudios *in vitro* nos dan la oportunidad de estudiar ciertos aspectos que *in vivo* son más difícilmente alcanzables (Staton et al., 2004, Johnston et al., 2010).

5.7. Indicadores del potencial carcinogénico del arsénico *in vitro*

Nuestra hipótesis era que el arsénico a través de la alteración de la expresión de los factores HNF1 α y HNF4 α podría estar induciendo la génesis de un proceso tumoral. Por ello es necesario demostrar la aparición de marcadores de dichos procesos, fundamentalmente desdiferenciación celular y motilidad, en las células expuestas de forma prolongada a dosis subtóxicas de arsenito sódico.

Para detectar que el proceso de desdiferenciación se estaba originando, se estudió la expresión de un conjunto de marcadores hepáticos, *PEPCK2*, *ALDOB* y *Cyp1 α* , así como de dos marcadores de la transición epitelio-mesénquima (EMT) como son el *Slain* y el *Slug*. La inducción de motilidad se estudió a partir del análisis de las metaloproteinasas (MMPs), que son proteínas que participan en la degradación de la matriz extracelular.

Los resultados del estudio de la desdiferenciación, a partir del análisis de la expresión de los marcadores hepáticos, *PEPCK2*, *ALDOB* y *Cyp1 α* , muestran como el arsénico promueve la disminución de la expresión de estos tres marcadores, lo que nos indica que el arsénico está induciendo la desdiferenciación en las células expuestas. Esta disminución de los niveles de expresión llega a alcanzar valores inferiores al 50% en las células expuestas, respecto a lo que se observa en las células control.

Dado a que los factores HNF1 α y HNF4 α son clave en el mantenimiento de la diferenciación celular (Pelletier et al., 2011), y que en las células en las que se ha observado una tendencia a la desdiferenciación, se da una disminución mantenida en el tiempo de estos dos factores, nuestra propuesta es que el efecto en la diferenciación de las células HepG2 puede ser debido, al menos en parte, a la alteración de la expresión de HNF1 α y HNF4 α inducida por el arsénico. Esta propuesta se sustenta en otros estudios que muestra una relación entre la alteración de la expresión de factores de transcripción enriquecidos en el hígado, como los estudiados en este trabajo, con la desdiferenciación asociada en procesos tumorales (Martínez-Jiménez et al., 2006).

Para el estudio del efecto de la exposición prolongada al arsénico en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) se ha estudiado la expresión de los genes *Snail* (*Snail1*) y *Slug* (*Snail2*), que participan en la EMT a través de la inhibición directa de la transcripción del gen de la *E-cadherina* (Santangelo et al., 2011). Los resultados obtenidos muestran un considerable aumento de la expresión de *Slug*, pero no de *Snail*. Tanto *Slug* como *Snail* son indicadores del proceso EMT, por lo que esperaríamos un cambio de la expresión en ambos al inducirse la EMT por parte del arsénico. No obstante, en el cáncer de mama ya se han detectado diferencias en la expresión de estos dos genes, por lo que se propone que el hecho de que *Snail* y *Slug* actúen reprimiendo la *E-cadherina* depende del tipo de cáncer y del contexto tumoral (Martin et al., 2005).

De todas maneras, se ha indicado que *Slug* no es tan potente como *Snail* en su papel de reprimir la *E-cadherina* (Bolos et al., 2003). Independientemente de esta discrepancia, los resultados obtenidos nos indican que el arsénico en las condiciones utilizadas induce la transición EMT en las células HepG2. Al igual que en el caso anterior, proponemos que el efecto del arsénico en la transición EMT podría ser debido, en parte, a la alteración de la expresión de los factores nucleares HNF1 α y HNF4 α por parte del arsénico. Esta propuesta se sustenta en el hecho de que en las células expuestas de forma prolongada al arsenito sódico se observa una disminución de estos dos factores nucleares a lo largo del tiempo, y de que hay literatura que muestra que HNF4 α y

HNF1 α tienen un papel importante en la transición EMT (Pelletier et al., 2011, Santangelo et al., 2011). De hecho, se ha observado que al silenciar la expresión de *HNF1 α* las células pierden el contacto, se promueve la migración, disminuye la expresión de marcadores epiteliales y se induce la EMT (Pelletier et al., 2011). En otros estudios se ha visto como *HNF4 α* , de forma cooperativa con *HNF1 α* , actúa inhibiendo la expresión de genes relacionados con la EMT, como *Snail* y *Slug*, a la vez que actúan induciendo la expresión de genes que promueven la transición mesénquima-epitelio (MET) (Santangelo et al., 2011). Los resultados obtenidos en el estudio de la transición EMT concuerdan con otros trabajos en los que se observa una pérdida del fenotipo hepático al detectarse una disminución de la expresión de marcadores hepáticos. Esto nos muestra una clara tendencia hacia la desdiferenciación celular en respuesta a la exposición al arsenito sódico de forma prolongada. (Santangelo et al., 2011).

Otro factor importante en la tumorigénesis es la degradación de la matriz celular y su consecuente diseminación celular. Con la finalidad de estudiar si la exposición prolongada de las células HepG2 a arsenito sódico estaba induciendo la progresión tumoral, se ha estudiado la actividad de las MMPs como indicador de que se está produciendo la degradación de la matriz celular. Los resultados nos muestran que la exposición prolongada de las células HepG2 al arsenito sódico induce un aumento de la actividad de *MMP-2* y de *MMP-9*, lo que nos sugiere que este compuesto actúa induciendo la degradación de la matriz celular, promoviendo así la progresión tumoral.

Nuestros resultados son concordantes con lo observado en otros estudios, además del hecho de que el aumento de la expresión de *Snail* y *Slug* se correlaciona con el aumento de la expresión de *MMP-2* y *MMP-9* (Peinado et al., 2007). Así, el hecho de haber observado una inducción de la transición EMT concuerda con los resultados que nos indican que también está teniendo lugar un aumento de la actividad de las MMPs. De manera más específica, se ha observado que el arsenito sódico aumenta la expresión de *MMP-9*, tras una exposición prolongada al mismo, observándose también un aumento de la actividad de *MMP-9* en respuesta al arsenito sódico (Tokar et al., 2010b). Además, se ha citado que la inhibición de *HNF1 α* da lugar a la pérdida de adhesión entre células y un aumento de la expresión de genes involucrados en la motilidad, como las MMPs (Pelletier et al., 2011). Todo esto nos sugiere que el efecto del arsénico en la actividad de las MMPs podría ser consecuencia, al menos en parte, de la desregulación de los factores nucleares hepáticos estudiados, principalmente el *HNF1 α* .

Tomados en su conjunto nuestros resultados soportan el papel tumorigeno del arsénico, fundamentalmente tras exposiciones continuadas. Así, en este trabajo se han estudiado tres procesos relacionados con la tumorigénesis y en todos ellos se han obtenido resultados que nos indican como el arsenito sódico en las células HepG2 actúa promoviendo procesos ligados con el desarrollo tumoral.

5.8. Efecto del arsénico en la subpoblación de células madre en la línea celular HepG2

En los últimos años han crecido las evidencias que dan soporte a la idea de que los tumores están organizados en poblaciones heterogéneas, de células con diferentes propiedades biológicas, y que la capacidad de formación, crecimiento y progresión del tumor recae en una porción pequeña de células, que son las denominadas células madre cancerosas (CSCs) (Ma et al., 2007, Tokar et al., 2011).

Dado que las HepG2 presentan un cierto porcentaje de CSCs, que se ha cuantificado como de un 8% (Ma et al., 2007), esta línea ofrece la oportunidad de estudiar si la exposición al arsénico tiene algún efecto específico en las CSCs. Para ello se estudió la expresión proteica de dos marcadores de CSCs como son el CD90 y el CD133, además de cuatro marcadores de pluripotencia como son el Oct3/4, el c-Myc, el Lin28 y el Notch2 (Tokar et al., 2011, Xue et al., 2012) en las células expuestas de forma prolongada a concentraciones subtóxicas de arsenito sódico.

Los resultados obtenidos nos indican que el arsenito sódico tiene un marcado efecto sobre las células CSCs, ya que se observa una disminución significativa de la expresión de CD90 y CD133, siendo los valores de CD90 y de CD133 del 23 y del 60%, respectivamente, respecto a los observados en el control.

Ya que CD90 y CD133 son marcadores específicos de células madre cancerosas, su disminución inducida por el arsénico nos está indicando que este metaloide, en las condiciones estudiadas, está promoviendo la disminución de éstas.

Por otro lado, al estudiar los niveles de expresión de los cuatro marcadores de pluripotencia, Oct3/4, c-Myc, Lin28 y Notch2, se ha visto que el arsenito sódico también actúa sobre ellos induciendo una disminución significativa de su expresión, de entre el 50 y el 80% de expresión respecto al control, según sea el marcador analizado. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que el arsénico está induciendo así una disminución de las células pluripotentes, que se corresponde con la subpoblación de

CSCs. La disminución de la expresión de estos marcadores concuerda con la disminución de la expresión de los marcadores CD90 y CD133, por lo que unos resultados refuerzan a los otros, confirmando el efecto del arsénico en la población de las CSCs.

Con los resultados obtenidos en esta Tesis por lo que respecta al efecto del arsénico sobre las CSCs sólo podemos afirmar que este compuesto está teniendo un efecto sobre esta subpoblación de células en la línea celular HepG2. Resultados que según la bibliografía del momento podrían ser interpretados de dos maneras:

1. Hay varios estudios tanto *in vivo* como *in vitro* en los que se ha visto como el arsénico tiene un efecto en la dinámica de las SCs. Concretamente hay un estudio en el que se ha visto como la exposición prolongada del arsénico da lugar a la transformación de células SCs a CSCs y como durante este proceso de transformación se da inicialmente una disminución de la capacidad de auto-renovación de las células seguido de un aumento marcado de esta capacidad (Tokar et al., 2010b). Por lo que podríamos interpretar nuestros resultados (disminución de los marcadores de pluripotencia y de las células madre cancerosas) como una supresión inicial de la auto-renovación de esta subpoblación de células, que podría estar seguida de un aumento de la capacidad de auto-renovación. Por lo que el arsénico actuaría aumentando la población de CSCs.
2. Por otro lado, aunque el arsénico de forma natural actúa induciendo la aparición de cáncer, éste también se utiliza como anticancerígeno (Evens et al., 2004, Nicolis et al., 2009, Otlis et al., 2010). En este contexto, nuestros resultados nos hacen pensar que los efectos observados en las CSCs de las células HepG2, pueden estar relacionados con el efecto anticancerígeno del arsénico, debido a la disminución de la presencia de éstas, tal y como se ha observado en las células HepG2 expuestas al arsenito sódico. Desde este punto de vista, el arsénico podría estar actuando de manera específica sobre la población de CSCs de una masa tumoral. Esta propuesta, de ser cierta, sería de gran importancia, sobre todo teniendo en cuenta que la gran mayoría de compuestos antitumorales actúa sobre la gran masa del tumor, sin afectar a las CSCs.

5.9. Alteración del metabolismo de la glucosa en las células HepG2 expuestas de forma crónica al arsenito sódico

Uno de los factores ambientales considerados de riesgo para la diabetes de tipo II es el arsénico (Joshi et al., 2010). Es por esto que, aunque no haya sido el tema principal de la Tesis, se ha tratado de dar alguna explicación a esta asociación, teniendo en cuenta el material conseguido (células largamente expuestas a la acción del arsénico).

Aunque se sabe que el arsénico es un factor de riesgo para la diabetes, los efectos detallados y los mecanismos moleculares por los que el arsénico se relaciona con la DM no están claros y, dada la complejidad del proceso que genera la diabetes de tipo II, el arsénico podría estar induciendo la aparición de esta enfermedad de diferentes formas (Díaz-Villasenor et al., 2007, Huang et al., 2011a). Se ha visto que la presencia de ciertos polimorfismos de los genes *HNF1 α* y *HNF4 α* favorece la aparición de la diabetes de tipo II. Además, la alteración en estos factores también se ha relacionado con la *MODY1* y la *MODY3*, respectivamente (Ryffel 2001, Anuradha et al., 2005). Dada la especificidad de nuestro trabajo (estudios *in vitro*), se han buscado estudios *in vitro*, que indiquen que el arsénico contribuye al desarrollo de la diabetes. De esta búsqueda se concluye que los experimentos realizados hasta el momento *in vitro* se han hecho con tiempos de exposición cortos y con células β del páncreas, con células musculares y con adipocitos (Huang et al., 2011a). Dada esta falta de información en el material generado en esta Tesis (células HepG2), es por lo que se propuso estudiar si la exposición crónica al arsenito sódico en las células HepG2 tiene algún efecto en el metabolismo de la glucosa. Así, el primer paso fue medir los niveles de glucosa en el medio de las células tratadas durante 20 semanas con concentraciones subtóxicas de arsenito sódico y compararlos con sus controles concurrentes. Los resultados obtenidos nos indican que las células expuestas al arsenito sódico presentan más glucosa en el medio que las células controles, siendo estos valores de un 220% si consideramos un 100% para el control. Por tanto, nuestros resultados muestran claramente que el arsénico estaría induciendo una alteración del metabolismo de la glucosa. Resultado que concuerda con los diferentes estudios epidemiológicos que muestran un aumento en la incidencia de padecer diabetes de tipo II en las personas expuestas crónicamente al arsénico tanto a través del consumo de agua de beber como a través de la exposición ocupacional (Rahman et al., 1995, Rahman et al., 1998, Lewis et al., 1999, Joshi et al., 2010, Huang et al., 2011a).

Además, estos resultados *in vitro* se pueden asociar con lo observado en distintos estudios *in vivo*, en los que se ha observado una desregulación de la expresión de genes involucrados en la homeostasis de la glucosa en sus hígados (Díaz-Villasenor et al., 2007, Hernández et al., 2011).

Dado el papel que la insulina tiene en la modulación del nivel de glucosa nos planteamos estudiar si el arsénico inducía resistencia a la insulina en la HepG2. Para ello se añadió insulina en el medio y se midieron los niveles de glucosa.

En este caso, tanto las células expuestas como las células controles respondieron a la insulina de forma parecida. Por lo que, en las condiciones estudiadas, el arsenito sódico induce una alteración de la homeostasis de la glucosa, pero no resistencia a la insulina. Aunque la respuesta a la insulina por parte del hígado frente a la exposición del arsénico no varíe, en otros estudios se ha visto como la exposición al arsénico induce una disminución de la segregación de la insulina por parte de las células β pancreáticas y resistencia a la insulina en los adipocitos y en las células musculares (Díaz-Villasenor et al., 2007). El hecho de que las células HepG2 muestren una alteración de la homeostasis de la glucosa, a la vez que una disminución de la expresión de los factores HNF1 α y HNF4 α , podría indicar que el arsénico induce la alteración de la homeostasis de la glucosa vía la desregulación de la expresión de estos dos factores.

De forma general los resultados obtenidos en esta Tesis nos muestran como la línea celular HepG2 es un buen modelo para el estudio de los mecanismos de acción del arsénico. En esta Tesis se ha observado la alteración de la expresión de todo un conjunto de factores nucleares hepáticos, tanto en exposiciones cortas como prolongadas, cuando las células se han expuesto a concentraciones subtóxicas de arsenito sódico, efecto dependiente de la presencia de este compuesto en el medio. Con las concentraciones subtóxicas de arsénico usadas, escogidas a partir de la realización de ensayos de toxicidad, no se ha observado ninguna alteración del ciclo celular ni ha tenido lugar una inducción de la apoptosis, lo que nos confirma que las dosis utilizadas no son tóxicas para la línea celular utilizada. Los efectos en estos factores nucleares también se han observado *in vivo*, aunque no en todos los casos, e *in vitro* se ha comprobado la importancia de la expresión del factor HNF4 α en la viabilidad de las células cuando estas se encuentran expuestas a distintas dosis de arsenito sódico. También se ha observado como las células previamente expuestas al arsénico son más resistentes que las que no lo habían estado previamente. Por otro lado, la exposición prolongada de las

células HepG2 al arsenito sódico nos han permitido observar que el arsénico tiene un potencial carcinogénico y diabetogénico, papel seguramente debido en parte a la alteración observada de la expresión de los factores HNF1 α y HNF4 α en respuesta a la exposición al arsénico.

6. CONCLUSIONES

Después del análisis de los datos obtenidos en este estudio, en respuesta a los objetivos propuestos, y tras la discusión de los resultados se puede concluir lo siguiente:

1. Las células HepG2 son un buen material para el estudio de los mecanismos de acción del arsénico. Éstas expresan los principales transportadores de arsénico y la enzima As3MT, enzima fundamental para la metabolización del arsénico, y además son capaces de metabolizar el i-As en sus diferentes compuestos inorgánicos y orgánicos metilados.
2. De los estudios de toxicidad con arsenito sódico, se desprende que en la línea celular HepG2 el rango de concentraciones subtóxicas es el que abarca concentraciones hasta 10 μM .
3. Los tratamientos agudos con concentraciones de hasta 10 μM de arsenito sódico no afectan al ciclo celular ni a la apoptosis, pero suponen aumentos en la expresión de HMOX y MT, indicando que el sistema respondía a la exposición de arsénico a concentraciones subtóxicas.
4. El tratamiento agudo con concentraciones subtóxicas de arsenito sódico induce una disminución de la expresión de los factores nucleares HNF1 α , HNF4 α , HNF6 α , FOXM1 y PXR siendo este efecto dependiente de la dosis.
5. El tratamiento de larga duración (semanas) con dosis subtóxicas de arsenito sódico induce una disminución de la expresión de los factores clave HNF1 α y de HNF4 α . La naturaleza de la disminución de cada factor nos muestra como la inhibición del factor nuclear HNF1 α es más robusta a medida que se aumenta el tiempo de tratamiento, mientras que la inhibición del factor HNF4 α no supera el 40%, lo que sugiere la necesidad de una expresión mínima de este factor para la integridad de la línea celular HepG2.
6. La inhibición que se observa en la exposición de los factores HNFs tras el tratamiento de larga duración es dependiente de la presencia del arsénico en el

- medio. La expresión de los factores HNFs se recupera hasta niveles del 80% respecto al control una vez transcurridas 96 horas desde su eliminación del medio.
7. Las células expuestas durante 10 semanas a concentraciones subtóxicas de arsenito sódico adquieren resistencia a este agente por lo que respecta a su toxicidad (comparadas con células control no expuestas). Indicando que la adaptación a la apoptosis pudiera jugar un papel importante en los procesos de transformación celular que ocurren bajo exposiciones crónicas a este elemento.
 8. La exposición prolongada *in vivo* de hámster al arsenito sódico a través del consumo de agua contaminada con dosis de 15 mg/L, induce en el hígado de estos animales una disminución en la expresión a niveles de proteína de HNF4 α y de mRNA de HNF1 α , confirmando el comportamiento observado *in vitro*.
 9. En tratamiento prolongado de las células HepG2 con concentraciones subtóxicas de arsenito sódico favorece diversos procesos tumorales como la pérdida de diferenciación, la transición epitelio-mesénquima, y un aumento de la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9, facilitando así el proceso invasivo.
 10. Las células expuestas durante periodos de larga duración al arsénico sódico presentan una pérdida de propiedades específicas de tejido (sobreexpresión de ALDOB, PEPCCK, CYP1A, inicio de transición epitelio-mesénquima e hipersecreción de las MMPs 2 y 9).
 11. Las células expuestas durante periodos de larga duración al arsénico sódico no pudieron mantener equilibrados su programa de autorenovación (desregulación de C-MYC, Oct3/4, Lin28 y Notch2).
 12. Las células expuestas durante periodos de larga duración al arsénico sódico presentan una alteración en el metabolismo de la glucosa no debido a la aparición de resistencia a la insulina.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abelev, G.I. and Lazarevich, N.L. Control of Differentiation in Progression of Epithelial Tumors. *Adv.Cancer Res.*, vol. 95, pp. 61-113, 2006.

Ai, Z.,Lu, W.,Ton, S.,Liu, H.,Sou, T.,Shen, Z. and Qin, X. Arsenic Trioxide-Mediated Growth Inhibition in Gallbladder Carcinoma Cells Via Down-Regulation of Cyclin D1 Transcription Mediated by Sp1 Transcription Factor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, vol. 3603, pp. 684-689, 2007.

Andersson, L.,Wingren, G. and Axelson, O. Some Hygienic Observations from the Glass Industry. *Int.Arch.Occup.Environ.Health.*, vol. 623, pp. 249-252, 1990.

Antman, K.H. Introduction: The History of Arsenic Trioxide in Cancer Therapy. *Oncologist.*, vol. 6 Suppl 2, pp. 1-2, 2001.

Anuradha, S.,Radha, V.,Deepa, R.,Hansen, T.,Carstensen, B.,Pedersen, O. and Mohan, V. A Prevalent Amino Acid Polymorphism at Codon 98 (Ala98Val) of the Hepatocyte Nuclear Factor-1alpha is Associated with Maturity-Onset Diabetes of the Young and Younger Age at Onset of Type 2 Diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care.*, vol. 2810, pp. 2430-2435, 2005.

Anuradha, S.,Radha, V. and Mohan, V. Association of Novel Variants in the Hepatocyte Nuclear Factor 4A Gene with Maturity Onset Diabetes of the Young and Early Onset Type 2 Diabetes. *Clin.Genet.*, vol. 806, pp. 541-549, 2011.

Basu, A.,Mahata, J.,Gupta, S. and Giri, A.K. Genetic Toxicology of a Paradoxical Human Carcinogen, Arsenic: A Review. *Mutat.Res.*, vol. 4882, pp. 171-194, 2001.

Bolos, V.,Peinado, H.,Perez-Moreno, M.A.,Fraga, M.F.,Esteller, M. and Cano, A. The Transcription Factor Slug Represses E-Cadherin Expression and Induces Epithelial to Mesenchymal Transitions: A Comparison with Snail and E47 Repressors. *J.Cell.Sci.*, vol. 116Pt 3, pp. 499-511, 2003.

Bomken, S.,Fiser, K.,Heidenreich, O. and Vormoor, J. Understanding the Cancer Stem Cell. *Br.J.Cancer.*, vol. 1034, pp. 439-445, 2010.

Burkhardt, B.R.,Parker, M.J.,Zhang, Y.C.,Song, S.,Wasserfall, C.H. and Atkinson, M.A. Glucose Transporter-2 (GLUT2) Promoter Mediated Transgenic Insulin Production Reduces Hyperglycemia in Diabetic Mice. *FEBS Lett.*, vol. 57925, pp. 5759-5764, 2005.

Chen, M.L.,Lee, K.D.,Huang, H.C.,Tsai, Y.L.,Wu, Y.C.,Kuo, T.M.,Hu, C.P. and Chang, C. HNF-4alpha Determines Hepatic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow. *World J.Gastroenterol.*, vol. 1640, pp. 5092-5103, 2010.

Chen, W.S.,Manova, K.,Weinstein, D.C.,Duncan, S.A.,Plump, A.S.,Prezioso, V.R.,Bachvarova, R.F. and Darnell, J.E.,Jr. Disruption of the HNF-4 Gene, Expressed

in Visceral Endoderm, Leads to Cell Death in Embryonic Ectoderm and Impaired Gastrulation of Mouse Embryos. *Genes Dev.*, vol. 820, pp. 2466-2477, 1994.

Chung, J.H., Park, K.H., Seo, B.M., Kim, E.S., Hong, J.R., Chung, I.H., Kang, N., Baek, J.H., Min, B.M., Choung, Y.H., Akaike, T. and Choung, P.H. Determination of Specific Interactions between Glucose Ligand Carrying Polymer and Glucose Transporter Type-1 (GLUT-1) using Different Cell Types. *J.Biomed.Mater.Res.A.*, vol. 673, pp. 1055-1059, 2003.

Cui, X., Wakai, T., Shirai, Y., Hatakeyama, K. and Hirano, S. Chronic Oral Exposure to Inorganic Arsenate Interferes with Methylation Status of p16INK4a and RASSF1A and Induces Lung Cancer in A/J Mice. *Toxicol.Sci.*, vol. 912, pp. 372-381, 2006a.

Cui, X., Wakai, T., Shirai, Y., Yokoyama, N., Hatakeyama, K. and Hirano, S. Arsenic Trioxide Inhibits DNA Methyltransferase and Restores Methylation-Silenced Genes in Human Liver Cancer Cells. *Hum.Pathol.*, vol. 373, pp. 298-311, 2006b.

De Vizcaya-Ruiz, A., Barbier, O., Ruiz-Ramos, R. and Cebrian, M.E. Biomarkers of Oxidative Stress and Damage in Human Populations Exposed to Arsenic. *Mutat.Res.*, vol. 6741-2, pp. 85-92, 2009.

Desagher, S. and Martinou, J.C. Mitochondria as the Central Control Point of Apoptosis. *Trends Cell Biol.*, vol. 109, pp. 369-377, 2000.

Díaz-Villasenor, A., Burns, A.L., Hiriart, M., Cebrian, M.E. and Ostrosky-Wegman, P. Arsenic-Induced Alteration in the Expression of Genes Related to Type 2 Diabetes Mellitus. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, vol. 2252, pp. 123-133, 2007.

Diepart, C., Karroum, O., Magat, J., Feron, O., Verrax, J., Buc Calderon, P., Gregoire, V., Leveque, P., Stockis, J., Dauguet, N., Jordan, B.F. and Gallez, B. Arsenic Trioxide Treatment Decreases the Oxygen Consumption Rate of Tumor Cells and Radiosensitizes Solid Tumors. *Cancer Res.*, 2011.

Drobna, Z., Walton, F.S., Paul, D.S., Xing, W., Thomas, D.J. and Styblo, M. Metabolism of Arsenic in Human Liver: The Role of Membrane Transporters. *Arch.Toxicol.*, vol. 841, pp. 3-16, 2010.

Drobna, Z., Waters, S.B., Devesa, V., Harmon, A.W., Thomas, D.J. and Styblo, M. Metabolism and Toxicity of Arsenic in Human Urothelial Cells Expressing Rat Arsenic (+3 Oxidation State)-Methyltransferase. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, vol. 2072, pp. 147-159, 2005.

Drobna, Z., Xing, W., Thomas, D.J. and Styblo, M. ShRNA Silencing of AS3MT Expression Minimizes Arsenic Methylation Capacity of HepG2 Cells. *Chem.Res.Toxicol.*, vol. 197, pp. 894-898, 2006.

Druwe, I.L. and Vaillancourt, R.R. Influence of Arsenate and Arsenite on Signal Transduction Pathways: An Update. *Arch.Toxicol.*, vol. 848, pp. 585-596, 2010.

- Duker, A.A., Carranza, E.J. and Hale, M. Arsenic Geochemistry and Health. *Environ.Int.*, vol. 315, pp. 631-641, 2005.
- Ebert, F., Weiss, A., Bultemeyer, M., Hamann, I., Hartwig, A. and Schwerdtle, T. Arsenicals Affect Base Excision Repair by several Mechanisms. *Mutat.Res.*, vol. 7151-2, pp. 32-41, 2011.
- EFSA. Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal.*, vol. 710, pp. 1351, 2009.
- Evens, A.M., Tallman, M.S. and Gartenhaus, R.B. The Potential of Arsenic Trioxide in the Treatment of Malignant Disease: Past, Present, and Future. *Leuk.Res.*, vol. 289, pp. 891-900, 2004.
- Frau, M., Biasi, F., Feo, F. and Pascale, R.M. Prognostic Markers and Putative Therapeutic Targets for Hepatocellular Carcinoma. *Mol.Aspects Med.*, vol. 312, pp. 179-193, 2010.
- Gao, J. and Xie, W. Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor at the Crossroads of Drug Metabolism and Energy Metabolism. *Drug Metab.Dispos.*, vol. 3812, pp. 2091-2095, 2010.
- Guan, H., Piao, F.Y., Li, X.W., Li, Q.J., Xu, L. and Yokoyama, K. Maternal and Fetal Exposure to Four Carcinogenic Environmental Metals. *Biomed.EnvIRON.Sci.*, vol. 236, pp. 458-465, 2010.
- Guha Mazumder, D. and Dasgupta, U.B. Chronic Arsenic Toxicity: Studies in West Bengal, India. *Kaohsiung J.Med.Sci.*, vol. 279, pp. 360-370, 2011.
- Guha Mazumder, D.N. Chronic Arsenic Toxicity & Human Health. *Indian J.Med.Res.*, vol. 1284, pp. 436-447, 2008a.
- Guha Mazumder, D.N. Chronic Arsenic Toxicity & Human Health. *Indian J.Med.Res.*, vol. 1284, pp. 436-447, 2008b.
- Habano, W., Gamo, T., Terashima, J., Sugai, T., Otsuka, K., Wakabayashi, G. and Ozawa, S. Involvement of Promoter Methylation in the Regulation of Pregnane X Receptor in Colon Cancer Cells. *BMC Cancer.*, vol. 11, pp. 81, 2011.
- Hernández, A., Sampayo-Reyes, A. and Marcos, R. Identification of Differentially Expressed Genes in the Livers of Chronically i-as-Treated Hamsters. *Mutat.Res.*, vol. 7131-2, pp. 48-55, 2011.
- Hernández, A., Xamena, N., Surralles, J., Sekaran, C., Tokunaga, H., Quinteros, D., Creus, A. and Marcos, R. Role of the Met(287)Thr Polymorphism in the AS3MT Gene on the Metabolic Arsenic Profile. *Mutat.Res.*, vol. 6371-2, pp. 80-92, 2008.
- Huang, C.F., Chen, Y.W., Yang, C.Y., Tsai, K.S., Yang, R.S. and Liu, S.H. Arsenic and Diabetes: Current Perspectives. *Kaohsiung J.Med.Sci.*, vol. 279, pp. 402-410, 2011a.

- Huang, N.C., Wann, S.R., Chang, H.T., Lin, S.L., Wang, J.S. and Guo, H.R. Arsenic, Vinyl Chloride, Viral Hepatitis, and Hepatic Angiosarcoma: A Hospital-Based Study and Review of Literature in Taiwan. *BMC Gastroenterol.*, vol. 11, pp. 142, 2011b.
- Hughes, M.F., Beck, B.D., Chen, Y., Lewis, A.S. and Thomas, D.J. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicol.Sci.*, vol. 1232, pp. 305-332, 2011.
- IARC. , 2004a. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*, pp. 39-267.
- IARC. *Some Drinking-Water Disinfectants and Contaminants, Including Arsenic*. 84, 2004b.
- IARC. Arsenic and Arsenic Compounds. *IARC Monogr.Eval.Carcinog.Risk Chem.Hum.*, vol. 23, pp. 39-141, 1980.
- Ihunnah, C.A., Jiang, M. and Xie, W. Nuclear Receptor PXR, Transcriptional Circuits and Metabolic Relevance. *Biochim.Biophys.Acta.*, vol. 18128, pp. 956-963, 2011.
- Ishiyama, T., Kano, J., Minami, Y., Iijima, T., Morishita, Y. and Noguchi, M. Expression of HNFs and C/EBP Alpha is Correlated with Immunocytochemical Differentiation of Cell Lines Derived from Human Hepatocellular Carcinomas, Hepatoblastomas and Immortalized Hepatocytes. *Cancer.Sci.*, vol. 949, pp. 757-763, 2003.
- Islam, K., Haque, A., Karim, R., Fajol, A., Hossain, E., Salam, K.A., Ali, N., Saud, Z.A., Rahman, M., Rahman, M., Karim, R., Sultana, P., Hossain, M., Akhand, A.A., Mandal, A., Miyataka, H., Himeno, S. and Hossain, K. Dose-Response Relationship between Arsenic Exposure and the Serum Enzymes for Liver Function Tests in the Individuals Exposed to Arsenic: A Cross Sectional Study in Bangladesh. *Environ.Health.*, vol. 10, pp. 64, 2011.
- Jafar-Mohammadi, B., Groves, C.J., Gjesing, A.P., Herrera, B.M., Winckler, W., Stringham, H.M., Morris, A.P., Lauritzen, T., Doney, A.S., Morris, A.D., Weedon, M.N., Swift, A.J., Kuusisto, J., Laakso, M., Altshuler, D., Hattersley, A.T., Collins, F.S., Boehnke, M., Hansen, T., Pedersen, O., Palmer, C.N., Frayling, T.M., DIAGRAM Consortium, Gloyn, A.L. and McCarthy, M.I. A Role for Coding Functional Variants in HNF4A in Type 2 Diabetes Susceptibility. *Diabetologia.*, vol. 541, pp. 111-119, 2011.
- Jiang, X., McDermott, J.R., Ajees, A.A., Rosen, B.P. and Liu, Z. Trivalent Arsenicals and Glucose use Different Translocation Pathways in Mammalian GLUT1. *Metallomics.*, vol. 23, pp. 211-219, 2010.
- Johnston, H.J., Hutchison, G., Christensen, F.M., Peters, S., Hankin, S. and Stone, V. A Review of the in Vivo and in Vitro Toxicity of Silver and Gold Particulates: Particle Attributes and Biological Mechanisms Responsible for the Observed Toxicity. *Crit.Rev.Toxicol.*, vol. 404, pp. 328-346, 2010.

- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C.J. and Valko, M. Arsenic: Toxicity, Oxidative Stress and Human Disease. *J.Appl.Toxicol.*, vol. 312, pp. 95-107, 2011.
- Joshi, S.K. and Shrestha, S. Diabetes Mellitus: A Review of its Associations with Different Environmental Factors. *Kathmandu Univ.Med.J.(KUMJ)*, vol. 829, pp. 109-115, 2010.
- Kang, S.H., Song, J.H., Kang, H.K., Kang, J.H., Kim, S.J., Kang, H.W., Lee, Y.K. and Park, D.B. Arsenic Trioxide-Induced Apoptosis is Independent of Stress-Responsive Signaling Pathways but Sensitive to Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase in HepG2 Cells. *Exp.Mol.Med.*, vol. 352, pp. 83-90, 2003.
- Kilbride, S.M., Farrelly, A.M., Bonner, C., Ward, M.W., Nyhan, K.C., Concannon, C.G., Wollheim, C.B., Byrne, M.M. and Prehn, J.H. AMP-Activated Protein Kinase Mediates Apoptosis in Response to Bioenergetic Stress through Activation of the Pro-Apoptotic Bcl-2 Homology Domain-3-Only Protein BMF. *J.Biol.Chem.*, vol. 28546, pp. 36199-36206, 2010.
- Koo, C.Y., Muir, K.W. and Lam, E.W. FOXM1: From Cancer Initiation to Progression and Treatment. *Biochim.Biophys.Acta.*, vol. 18191, pp. 28-37, 2012.
- Kreppel, H., Bauman, J.W., Liu, J., McKim, J.M., Jr and Klaassen, C.D. Induction of Metallothionein by Arsenicals in Mice. *Fundam.Appl.Toxicol.*, vol. 202, pp. 184-189, 1993.
- Kriebel, D., Tickner, J., Epstein, P., Lemons, J., Levins, R., Loechler, E.L., Quinn, M., Rudel, R., Schettler, T. and Stoto, M. The Precautionary Principle in Environmental Science. *Environ.Health Perspect.*, vol. 1099, pp. 871-876, 2001.
- Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T. and Ferdinandy, P. Matrix Metalloproteinase Activity Assays: Importance of Zymography. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods.*, vol. 612, pp. 205-209, 2010.
- Landry, C., Clotman, F., Hioki, T., Oda, H., Picard, J.J., Lemaigre, F.P. and Rousseau, G.G. HNF-6 is Expressed in Endoderm Derivatives and Nervous System of the Mouse Embryo and Participates to the Cross-Regulatory Network of Liver-Enriched Transcription Factors. *Dev.Biol.*, vol. 1922, pp. 247-257, 1997.
- Lannoy, V.J., Decaux, J.F., Pierreux, C.E., Lemaigre, F.P. and Rousseau, G.G. Liver Glucokinase Gene Expression is Controlled by the Onecut Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor-6. *Diabetologia.*, vol. 458, pp. 1136-1141, 2002.
- Lazarevich, N.L. and Fleishman, D.I. Tissue-Specific Transcription Factors in Progression of Epithelial Tumors. *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 735, pp. 573-591, 2008.
- Lemaigre, F. and Zaret, K.S. Liver Development Update: New Embryo Models, Cell Lineage Control, and Morphogenesis. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, vol. 145, pp. 582-590, 2004.

- Leslie, E.M. Arsenic-Glutathione Conjugate Transport by the Human Multidrug Resistance Proteins (MRPs/ABCCs). *J.Inorg.Biochem.*, 2011.
- Lewis, D.R.,Southwick, J.W.,Ouellet-Hellstrom, R.,Rench, J. and Calderon, R.L. Drinking Water Arsenic in Utah: A Cohort Mortality Study. *Environ.Health Perspect.*, vol. 1075, pp. 359-365, 1999.
- Li, J.,Ning, G. and Duncan, S.A. Mammalian Hepatocyte Differentiation Requires the Transcription Factor HNF-4alpha. *Genes Dev.*, vol. 144, pp. 464-474, 2000.
- Liao, W.T.,Lin, P.,Cheng, T.S.,Yu, H.S. and Chang, L.W. Arsenic Promotes Centrosome Abnormalities and Cell Colony Formation in p53 Compromised Human Lung Cells. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, vol. 2252, pp. 162-170, 2007.
- Lin, S.,Shi, Q.,Nix, F.B.,Styblo, M.,Beck, M.A.,Herbin-Davis, K.M.,Hall, L.L.,Simeonsson, J.B. and Thomas, D.J. A Novel S-Adenosyl-L-Methionine:Artenic(III) Methyltransferase from Rat Liver Cytosol. *J.Biol.Chem.*, vol. 27713, pp. 10795-10803, 2002.
- Lin, X.,Alber, D. and Henkelmann, R. Elemental Contents in Napoleon's Hair Cut before and After His Death: Did Napoleon Die of Arsenic Poisoning? *Anal.Bioanal Chem.*, vol. 3792, pp. 218-220, 2004.
- Liu, D.,Guo, H.,Li, Y.,Xu, X.,Yang, K. and Bai, Y. Association between Polymorphisms in the Promoter Regions of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Risk of Cancer Metastasis: A Meta-Analysis. *PLoS One.*, vol. 72, pp. e31251, 2012.
- Liu, J.,Chen, H.,Miller, D.S.,Saavedra, J.E.,Keefer, L.K.,Johnson, D.R.,Klaassen, C.D. and Waalkes, M.P. Overexpression of Glutathione S-Transferase II and Multidrug Resistance Transport Proteins is Associated with Acquired Tolerance to Inorganic Arsenic. *Mol.Pharmacol.*, vol. 602, pp. 302-309, 2001.
- Liu, J. and Waalkes, M.P. Liver is a Target of Arsenic Carcinogenesis. *Toxicol.Sci.*, vol. 1051, pp. 24-32, 2008a.
- Liu, J.,Yu, L.,Tokar, E.J.,Bortner, C.,Sifre, M.I.,Sun, Y. and Waalkes, M.P. Arsenic-Induced Aberrant Gene Expression in Fetal Mouse Primary Liver-Cell Cultures. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, vol. 1140, pp. 368-375, 2008b.
- Liu, J.,Zheng, B.,Aposhian, H.V.,Zhou, Y.,Chen, M.L.,Zhang, A. and Waalkes, M.P. Chronic Arsenic Poisoning from Burning High-Arsenic-Containing Coal in Guizhou, China. *Environ.Health Perspect.*, vol. 1102, pp. 119-122, 2002.
- Liu, L.L.,Fu, D.,Ma, Y. and Shen, X.Z. The Power and the Promise of Liver Cancer Stem Cell Markers. *Stem Cells Dev.*, vol. 2012, pp. 2023-2030, 2011.
- Liu, Z.,Sanchez, M.A.,Jiang, X.,Boles, E.,Landfear, S.M. and Rosen, B.P. Mammalian Glucose Permease GLUT1 Facilitates Transport of Arsenic Trioxide and Methylarsonous Acid. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, vol. 3512, pp. 424-430, 2006.

- Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J.M., Mukhopadhyay, R., Agre, P. and Rosen, B.P. Arsenite Transport by Mammalian Aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 999, pp. 6053-6058, 2002.
- Liu, Z.M., Tseng, J.T., Hong, D.Y. and Huang, H.S. Suppression of TG-Interacting Factor Sensitizes Arsenic Trioxide-Induced Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biochem.J.*, vol. 4382, pp. 349-358, 2011.
- Lu, P., Liu, J., Melikishvili, M., Fried, M.G. and Chi, Y.I. Crystallization of Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha (HNF4 Alpha) in Complex with the HNF1 Alpha Promoter Element. *Acta Crystallogr.Sect.F.Struct.Biol.Cryst.Commun.*, vol. 64Pt 4, pp. 313-317, 2008.
- Lu, Y.F., Wu, Q., Yan, J.W., Shi, J.Z., Liu, J. and Shi, J.S. Realgar, Cinnabar and an-Gong-Niu-Huang Wan are Much Less Chronically Nephrotoxic than Common Arsenicals and Mercurials. *Exp.Biol.Med.(Maywood)*, vol. 2362, pp. 233-239, 2011.
- Lucas, B., Grigo, K., Erdmann, S., Lausen, J., Klein-Hitpass, L. and Ryffel, G.U. HNF4alpha Reduces Proliferation of Kidney Cells and Affects Genes Deregulated in Renal Cell Carcinoma. *Oncogene*, vol. 2442, pp. 6418-6431, 2005.
- Ma, S., Chan, K.W., Hu, L., Lee, T.K., Wo, J.Y., Ng, I.O., Zheng, B.J. and Guan, X.Y. Identification and Characterization of Tumorigenic Liver Cancer stem/progenitor Cells. *Gastroenterology*, vol. 1327, pp. 2542-2556, 2007.
- Majumdar, S., Karmakar, S., Maiti, A., Choudhury, M., Ghosh, A., Das, A.S. and Mitra, C. Arsenic-Induced Hepatic Mitochondrial Toxicity in Rats and its Amelioration by Dietary Phosphate. *Environ.Toxicol.Pharmacol.*, vol. 311, pp. 107-118, 2011.
- Majumder, S., Siamwala, J.H., Srinivasan, S., Sinha, S., Sridhara, S.R., Soundararajan, G., Seerapu, H.R. and Chatterjee, S. Simulated Microgravity Promoted Differentiation of Bipotential Murine Oval Liver Stem Cells by Modulating BMP4/Notch1 Signaling. *J.Cell.Biochem.*, vol. 1127, pp. 1898-1908, 2011.
- Mann, K.K., Wallner, B., Lossos, I.S. and Miller, W.H., Jr. Darinaparsin: A Novel Organic Arsenical with Promising Anticancer Activity. *Expert Opin.Investig.Drugs*, vol. 1811, pp. 1727-1734, 2009.
- Martin, T.A., Goyal, A., Watkins, G. and Jiang, W.G. Expression of the Transcription Factors Snail, Slug, and Twist and their Clinical Significance in Human Breast Cancer. *Ann.Surg.Oncol.*, vol. 126, pp. 488-496, 2005.
- Martínez, V.D., Vucic, E.A., Adonis, M., Gil, L. and Lam, W.L. Arsenic Biotransformation as a Cancer Promoting Factor by Inducing DNA Damage and Disruption of Repair Mechanisms. *Mol.Biol.Int.*, vol. 2011, pp. 718974, 2011.
- Martínez-Jiménez, C.P., Gomez-Lechon, M.J., Castell, J.V. and Jover, R. Underexpressed Coactivators PGC1alpha and SRC1 Impair Hepatocyte Nuclear Factor

4 Alpha Function and Promote Dedifferentiation in Human Hepatoma Cells. *J.Biol.Chem.*, vol. 28140, pp. 29840-29849, 2006.

Mazumder, D.N. Effect of Chronic Intake of Arsenic-Contaminated Water on Liver. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, vol. 2062, pp. 169-175, 2005.

McCabe, M.J., Jr, Singh, K.P., Reddy, S.A., Chelladurai, B., Pounds, J.G., Reiners, J.J., Jr and States, J.C. Sensitivity of Myelomonocytic Leukemia Cells to Arsenite-Induced Cell Cycle Disruption, Apoptosis, and Enhanced Differentiation is Dependent on the Inter-Relationship between Arsenic Concentration, Duration of Treatment, and Cell Cycle Phase. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, vol. 2952, pp. 724-733, 2000.

McDermott, J.R., Jiang, X., Beene, L.C., Rosen, B.P. and Liu, Z. Pentavalent Methylated Arsenicals are Substrates of Human AQP9. *Biometals.*, vol. 231, pp. 119-127, 2010.

Moller, A.M., Ek, J., Durviaux, S.M., Urhammer, S.A., Clausen, J.O., Eiberg, H., Hansen, T., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P. and Pedersen, O. Hepatocyte Nuclear Factor-6: Associations between Genetic Variability and Type II Diabetes and between Genetic Variability and Estimates of Insulin Secretion. *Diabetologia.*, vol. 428, pp. 1011-1016, 1999.

Naiki, T., Nagaki, M., Shidoji, Y., Kojima, H., Imose, M., Kato, T., Ohishi, N., Yagi, K. and Moriwaki, H. Analysis of Gene Expression Profile Induced by Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha in Hepatoma Cells using an Oligonucleotide Microarray. *J.Biol.Chem.*, vol. 27716, pp. 14011-14019, 2002.

Naspinski, C., Gu, X., Zhou, G.D., Mertens-Talcott, S.U., Donnelly, K.C. and Tian, Y. Pregnane X Receptor Protects HepG2 Cells from BaP-Induced DNA Damage. *Toxicol.Sci.*, vol. 1041, pp. 67-73, 2008.

Nauck, M.A., Weber, I., Bach, I., Richter, S., Orskov, C., Holst, J.J. and Schmiegel, W. Normalization of Fasting Glycaemia by Intravenous GLP-1 ([7-36 Amide] Or [7-37]) in Type 2 Diabetic Patients. *Diabet.Med.*, vol. 1511, pp. 937-945, 1998.

Navalon-García, K., Mendoza-Alcantar, L., Diaz-Vargas, M.E., Martinez-Godinez, M.A., Reyna-Garfias, H., Aguilar-Salinas, C.A., Riba, L., Canizales-Quinteros, S., Villarreal-Molina, T., Gonzalez-Chavez, A., Argueta-Villamar, V., Tusie-Luna, M.T. and Miliar-Garcia, A. HNF-1alpha G574S is a Functional Variant with Decreased Transactivation Activity. *Diabet.Med.*, vol. 2312, pp. 1295-1300, 2006.

Nicolis, I., Curis, E., Deschamps, P. and Benazeth, S. Arsenite Medicinal use, Metabolism, Pharmacokinetics and Monitoring in Human Hair. *Biochimie.*, vol. 9110, pp. 1260-1267, 2009.

Ning, B.F., Ding, J., Yin, C., Zhong, W., Wu, K., Zeng, X., Yang, W., Chen, Y.X., Zhang, J.P., Zhang, X., Wang, H.Y. and Xie, W.F. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Suppresses the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.*, vol. 7019, pp. 7640-7651, 2010.

- Noreault-Conti, T.L., Fellows, A., Jacobs, J.M., Trask, H.W., Strom, S.C., Evans, R.M., Wrighton, S.A., Sinclair, P.R., Sinclair, J.F. and Nichols, R.C. Arsenic Decreases RXR α -Dependent Transcription of CYP3A and Suppresses Immune Regulators in Hepatocytes. *Int.Immunopharmacol.*, vol. 124, pp. 651-656, 2012.
- Odom, D.T., Zizlsperger, N., Gordon, D.B., Bell, G.W., Rinaldi, N.J., Murray, H.L., Volkert, T.L., Schreiber, J., Rolfe, P.A., Gifford, D.K., Fraenkel, E., Bell, G.I. and Young, R.A. Control of Pancreas and Liver Gene Expression by HNF Transcription Factors. *Science.*, vol. 3035662, pp. 1378-1381, 2004.
- Ooe, H., Kon, J., Miyamoto, S., Ozone, Y., Ninomiya, S. and Mitaka, T. Cytochrome p450 Expression of Cultured Rat Small Hepatocytes After Long-Term Cryopreservation. *Drug Metab.Dispos.*, vol. 3410, pp. 1667-1671, 2006.
- Otles, S. and Cagindi, O. Health Importance of Arsenic in Drinking Water and Food. *Environ.Geochem.Health.*, vol. 324, pp. 367-371, 2010.
- Ouyang, N., Ke, S., Eagleton, N., Xie, Y., Chen, G., Laffins, B., Yao, H., Zhou, B. and Tian, Y. Pregnane X Receptor Suppresses Proliferation and Tumourigenicity of Colon Cancer Cells. *Br.J.Cancer.*, vol. 10212, pp. 1753-1761, 2010.
- Park, D., Yang, H., Jeong, J., Ha, K., Choi, S., Kim, C., Yoon, C., Park, D. and Paek, D. A Comprehensive Review of Arsenic Levels in the Semiconductor Manufacturing Industry. *Ann.Occup.Hyg.*, vol. 548, pp. 869-879, 2010.
- Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A. Snail, Zeb and bHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance Against the Epithelial Phenotype? *Nat.Rev.Cancer.*, vol. 76, pp. 415-428, 2007.
- Pelletier, L., Rebouissou, S., Paris, A., Rathahao-Paris, E., Perdu, E., Bioulac-Sage, P., Imbeaud, S. and Zucman-Rossi, J. Loss of Hepatocyte Nuclear Factor 1 α Function in Human Hepatocellular Adenomas Leads to Aberrant Activation of Signaling Pathways Involved in Tumorigenesis. *Hepatology.*, vol. 512, pp. 557-566, 2010.
- Pelletier, L., Rebouissou, S., Vignjevic, D., Bioulac-Sage, P. and Zucman-Rossi, J. HNF1 α Inhibition Triggers Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Liver Cancer Cell Lines. *BMC Cancer.*, vol. 11, pp. 427, 2011.
- Pierce, B.L., Kibriya, M.G., Tong, L., Jasmine, F., Argos, M., Roy, S., Paul-Brutus, R., Rahaman, R., Rakibuz-Zaman, M., Parvez, F., Ahmed, A., Quasem, I., Hore, S.K., Alam, S., Islam, T., Slavkovich, V., Gamble, M.V., Yunus, M., Rahman, M., Baron, J.A., Graziano, J.H. and Ahsan, H. Genome-Wide Association Study Identifies Chromosome 10q24.32 Variants Associated with Arsenic Metabolism and Toxicity Phenotypes in Bangladesh. *PLoS Genet.*, vol. 82, pp. e1002522, 2012.
- Pramfalk, C., Davis, M.A., Eriksson, M., Rudel, L.L. and Parini, P. Control of ACAT2 Liver Expression by HNF1. *J.Lipid Res.*, vol. 469, pp. 1868-1876, 2005.

- Qu, W.,Bortner, C.D.,Sakurai, T.,Hobson, M.J. and Waalkes, M.P. Acquisition of Apoptotic Resistance in Arsenic-Induced Malignant Transformation: Role of the JNK Signal Transduction Pathway. *Carcinogenesis.*, vol. 231, pp. 151-159, 2002.
- Rahman, M. and Axelson, O. Diabetes Mellitus and Arsenic Exposure: A Second Look at Case-Control Data from a Swedish Copper Smelter. *Occup.Environ.Med.*, vol. 5211, pp. 773-774, 1995.
- Rahman, M.,Tondel, M.,Ahmad, S.A. and Axelson, O. Diabetes Mellitus Associated with Arsenic Exposure in Bangladesh. *Am.J.Epidemiol.*, vol. 1482, pp. 198-203, 1998.
- Ratnaike, R.N. Acute and Chronic Arsenic Toxicity. *Postgrad.Med.J.*, vol. 79933, pp. 391-396, 2003.
- Raychaudhuri, P. and Park, H.J. FoxM1: A Master Regulator of Tumor Metastasis. *Cancer Res.*, vol. 7113, pp. 4329-4333, 2011.
- Ren, X.,McHale, C.M.,Skibola, C.F.,Smith, A.H.,Smith, M.T. and Zhang, L. An Emerging Role for Epigenetic Dysregulation in Arsenic Toxicity and Carcinogenesis. *Environ.Health Perspect.*, vol. 1191, pp. 11-19, 2011.
- Reya, T.,Morrison, S.J.,Clarke, M.F. and Weissman, I.L. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature.*, vol. 4146859, pp. 105-111, 2001.
- Rodriguez, A.,Catalan, V.,Gomez-Ambrosi, J.,Garcia-Navarro, S.,Rotellar, F.,Valenti, V.,Silva, C.,Gil, M.J.,Salvador, J.,Burrell, M.A.,Calamita, G.,Malagon, M.M. and Fruhbeck, G. Insulin- and Leptin-Mediated Control of Aquaglyceroporins in Human Adipocytes and Hepatocytes is Mediated Via the PI3K/Akt/mTOR Signaling Cascade. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, vol. 964, pp. E586-97, 2011.
- Rossman, T.G. Mechanism of Arsenic Carcinogenesis: An Integrated Approach. *Mutat.Res.*, vol. 5331-2, pp. 37-65, 2003.
- Rossman, T.G.,Meyn, M.S. and Troll, W. Effects of Arsenite on DNA Repair in Escherichia Coli. *Environ.Health Perspect.*, vol. 19, pp. 229-233, 1977.
- Roy, S.K.,Chen, Q.,Fu, J.,Shankar, S. and Srivastava, R.K. Resveratrol Inhibits Growth of Orthotopic Pancreatic Tumors through Activation of FOXO Transcription Factors. *PLoS One.*, vol. 69, pp. e25166, 2011.
- Ryffel, G.U. Mutations in the Human Genes Encoding the Transcription Factors of the Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)1 and HNF4 Families: Functional and Pathological Consequences. *J.Mol.Endocrinol.*, vol. 271, pp. 11-29, 2001.
- Saif-Ali, R.,Harun, R.,Al-Jassabi, S. and Wan Ngah, W.Z. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha P2 Promoter Variants Associate with Insulin Resistance. *Acta Biochim.Pol.*, vol. 582, pp. 179-186, 2011.

Santangelo, L., Marchetti, A., Cicchini, C., Conigliaro, A., Conti, B., Mancone, C., Bonzo, J.A., Gonzalez, F.J., Alonzi, T., Amicone, L. and Tripodi, M. The Stable Repression of Mesenchymal Program is Required for Hepatocyte Identity: A Novel Role for Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha. *Hepatology.*, vol. 536, pp. 2063-2074, 2011.

Sell, S. Stem Cell Origin of Cancer and Differentiation Therapy. *Crit.Rev.Oncol.Hematol.*, vol. 511, pp. 1-28, 2004.

Shankar, S., Nall, D., Tang, S.N., Meeker, D., Passarini, J., Sharma, J. and Srivastava, R.K. Resveratrol Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics in Human and KrasG12D Transgenic Mice by Inhibiting Pluripotency Maintaining Factors and Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS One.*, vol. 61, pp. e16530, 2011.

Singh, A.P., Goel, R.K. and Kaur, T. Mechanisms Pertaining to Arsenic Toxicity. *Toxicol.Int.*, vol. 182, pp. 87-93, 2011.

Smeester, L., Rager, J.E., Bailey, K.A., Guan, X., Smith, N., Garcia-Vargas, G., Del Razo, L.M., Drobna, Z., Kelkar, H., Styblo, M. and Fry, R.C. Epigenetic Changes in Individuals with Arsenicosis. *Chem.Res.Toxicol.*, vol. 242, pp. 165-167, 2011.

Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Bates, M.N., Goeden, H.M., Hertz-Picciotto, I., Duggan, H.M., Wood, R., Kosnett, M.J. and Smith, M.T. Cancer Risks from Arsenic in Drinking Water. *Environ.Health Perspect.*, vol. 97, pp. 259-267, 1992.

Staton, C.A., Stribbling, S.M., Tazzyman, S., Hughes, R., Brown, N.J. and Lewis, C.E. Current Methods for Assaying Angiogenesis in Vitro and in Vivo. *Int.J.Exp.Pathol.*, vol. 855, pp. 233-248, 2004.

Stepanian, S.V., Huyn, S.T., McCabe, E.R. and Dipple, K.M. Characterization of the Human Glycerol Kinase Promoter: Identification of a Functional HNF-4alpha Binding Site and Evidence for Transcriptional Activation. *Mol.Genet.Metab.*, vol. 804, pp. 412-418, 2003.

Straif, K., Benbrahim-Tallaa, L., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Coglian, V. and WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A Review of Human Carcinogens--Part C: Metals, Arsenic, Dusts, and Fibres. *Lancet Oncol.*, vol. 105, pp. 453-454, 2009.

Straub, A.C., Stolz, D.B., Ross, M.A., Hernandez-Zavala, A., Soucy, N.V., Klei, L.R. and Barchowsky, A. Arsenic Stimulates Sinusoidal Endothelial Cell Capillarization and Vessel Remodeling in Mouse Liver. *Hepatology.*, vol. 451, pp. 205-212, 2007.

Styblo, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R. and Thomas, D.J. Comparative Toxicity of Trivalent and Pentavalent Inorganic and Methylated Arsenicals in Rat and Human Cells. *Arch.Toxicol.*, vol. 746, pp. 289-299, 2000.

- Sykora, P. and Snow, E.T. Modulation of DNA Polymerase Beta-Dependent Base Excision Repair in Cultured Human Cells After Low Dose Exposure to Arsenite. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, vol. 2283, pp. 385-394, 2008.
- Tan, Y.,Yoshida, Y.,Hughes, D.E. and Costa, R.H. Increased Expression of Hepatocyte Nuclear Factor 6 Stimulates Hepatocyte Proliferation during Mouse Liver Regeneration. *Gastroenterology.*, vol. 1304, pp. 1283-1300, 2006.
- Thomas, D.J. Molecular Processes in Cellular Arsenic Metabolism. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, vol. 2223, pp. 365-373, 2007.
- Tokar, E.J.,Benbrahim-Tallaa, L.,Ward, J.M.,Lunn, R.,Sams, R.L.,2nd and Waalkes, M.P. Cancer in Experimental Animals Exposed to Arsenic and Arsenic Compounds. *Crit.Rev.Toxicol.*, vol. 4010, pp. 912-927, 2010a.
- Tokar, E.J.,Diwan, B.A. and Waalkes, M.P. Arsenic Exposure Transforms Human Epithelial stem/progenitor Cells into a Cancer Stem-Like Phenotype. *Environ.Health Perspect.*, vol. 1181, pp. 108-115, 2010b.
- Tokar, E.J.,Diwan, B.A.,Ward, J.M.,Delker, D.A. and Waalkes, M.P. Carcinogenic Effects of "Whole-Life" Exposure to Inorganic Arsenic in CD1 Mice. *Toxicol.Sci.*, vol. 1191, pp. 73-83, 2011.
- Tokar, E.J.,Qu, W.,Liu, J.,Liu, W.,Webber, M.M.,Phang, J.M. and Waalkes, M.P. Arsenic-Specific Stem Cell Selection during Malignant Transformation. *J.Natl.Cancer Inst.*, vol. 1029, pp. 638-649, 2010.
- Tokar, E.J.,Qu, W. and Waalkes, M.P. Arsenic, Stem Cells, and the Developmental Basis of Adult Cancer. *Toxicol.Sci.*, vol. 120 Suppl 1, pp. S192-203, 2011.
- Torres-Avila, M.,Leal-Galicia, P.,Sanchez-Pena, L.C.,Del Razo, L.M. and Gonsebatt, M.E. Arsenite Induces Aquaglyceroporin 9 Expression in Murine Livers. *Environ.Res.*, vol. 1105, pp. 443-447, 2010.
- Troeberg, L. and Nagase, H. Zymography of Metalloproteinases. *Curr.Protoc.Protein Sci.*, vol. Chapter 21, pp. Unit 21.15, 2004.
- Tsou, T.C.,Tsai, F.Y.,Yeh, S.C. and Chang, L.W. ATM/ATR-Related Checkpoint Signals Mediate Arsenite-Induced G2/M Arrest in Primary Aortic Endothelial Cells. *Arch.Toxicol.*, vol. 8012, pp. 804-810, 2006.
- Tweedie, E.,Artner, I.,Crawford, L.,Poffenberger, G.,Thorens, B.,Stein, R.,Powers, A.C. and Gannon, M. Maintenance of Hepatic Nuclear Factor 6 in Postnatal Islets Impairs Terminal Differentiation and Function of Beta-Cells. *Diabetes.*, vol. 5512, pp. 3264-3270, 2006.
- Vahter, M. Effects of Arsenic on Maternal and Fetal Health. *Annu.Rev.Nutr.*, vol. 29, pp. 381-399, 2009.

van Zijl, F., Zulehner, G., Petz, M., Schneller, D., Kornauth, C., Hau, M., Machat, G., Grubinger, M., Huber, H. and Mikulits, W. Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma. *Future Oncol.*, vol. 58, pp. 1169-1179, 2009.

Waalkes, M.P., Liu, J. and Diwan, B.A. Transplacental Arsenic Carcinogenesis in Mice. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, vol. 2223, pp. 271-280, 2007.

Waalkes, M.P., Liu, J., Germolec, D.R., Trempus, C.S., Cannon, R.E., Tokar, E.J., Tennant, R.W., Ward, J.M. and Diwan, B.A. Arsenic Exposure in Utero Exacerbates Skin Cancer Response in Adulthood with Contemporaneous Distortion of Tumor Stem Cell Dynamics. *Cancer Res.*, vol. 6820, pp. 8278-8285, 2008.

Waalkes, M.P., Liu, J., Ward, J.M. and Diwan, B.A. Enhanced Urinary Bladder and Liver Carcinogenesis in Male CD1 Mice Exposed to Transplacental Inorganic Arsenic and Postnatal Diethylstilbestrol Or Tamoxifen. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, vol. 2153, pp. 295-305, 2006.

Wang, K. and Holterman, A.X. Pathophysiologic Role of Hepatocyte Nuclear Factor 6. *Cell.Signal.*, vol. 241, pp. 9-16, 2012.

Wang, Y., Xu, Y., Wang, H., Xue, P., Li, X., Li, B., Zheng, Q. and Sun, G. Arsenic Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis by Reactive Oxygen Species Generation rather than Glutathione Depletion in Chang Human Hepatocytes. *Arch.Toxicol.*, vol. 8310, pp. 899-908, 2009.

Watanabe, T., Ohta, Y., Mizumura, A., Kobayashi, Y. and Hirano, S. Analysis of Arsenic Metabolites in HepG2 and AS3MT-Transfected Cells. *Arch.Toxicol.*, vol. 856, pp. 577-588, 2011.

WHO. Evaluation of Certain Contaminants in Food. *World Health.Organ.Tech.Rep.Ser.*, vol. (959)959, pp. 1-105, back cover, 2011.

Wu, J., Henderson, C., Feun, L., Van Veldhuizen, P., Gold, P., Zheng, H., Ryan, T., Blaszkowsky, L.S., Chen, H., Costa, M., Rosenzweig, B., Nierodzik, M., Hochster, H., Muggia, F., Abbadessa, G., Lewis, J. and Zhu, A.X. Phase II Study of Darinaparsin in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Invest.New Drugs.*, vol. 285, pp. 670-676, 2010a.

Wu, Q.F., Liu, C., Tai, M.H., Liu, D., Lei, L., Wang, R.T., Tian, M. and Lu, Y. Knockdown of FoxM1 by siRNA Interference Decreases Cell Proliferation, Induces Cell Cycle Arrest and Inhibits Cell Invasion in MHCC-97H Cells in Vitro. *Acta Pharmacol.Sin.*, vol. 313, pp. 361-366, 2010b.

Xia, L.M., Huang, W.J., Wang, B., Liu, M., Zhang, Q., Yan, W., Zhu, Q., Luo, M., Zhou, Z.Z. and Tian, D.A. Transcriptional Up-Regulation of FoxM1 in Response to Hypoxia is Mediated by HIF-1. *J.Cell.Biochem.*, vol. 1062, pp. 247-256, 2009.

Xue, B., Oldfield, C.J., Van, Y.Y., Dunker, A.K. and Uversky, V.N. Protein Intrinsic Disorder and Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol.Biosyst.*, vol. 81, pp. 134-150, 2012.

- Yamazaki, T., Ohmi, A., Kurumaya, H., Kato, K., Abe, T., Yamamoto, H., Nakanishi, N., Okuyama, R., Umemura, M., Kaise, T., Watanabe, R., Okawa, Y., Takahashi, S. and Takahashi, Y. Regulation of the Human CHOP Gene Promoter by the Stress Response Transcription Factor ATF5 Via the AARE1 Site in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Life Sci.*, vol. 879-10, pp. 294-301, 2010.
- Yoshida, Y., Hughes, D.E., Rausa, F.M., 3rd, Kim, I.M., Tan, Y., Darlington, G.J. and Costa, R.H. C/EBPalpha and HNF6 Protein Complex Formation Stimulates HNF6-Dependent Transcription by CBP Coactivator Recruitment in HepG2 Cells. *Hepatology.*, vol. 432, pp. 276-286, 2006.
- Yu, D., Wang, Z.H., Cheng, S.B., Li, H.K., Chan, H.B. and Chew, E.C. The Effect of Arsenic Trioxide on the Expression of Hsc and HNF4 in Nuclear Matrix Proteins in HepG2 Cells. *Anticancer Res.*, vol. 214A, pp. 2553-2559, 2001.
- Yu, H.T., Yu, M., Li, C.Y., Zhan, Y.Q., Xu, W.X., Li, Y.H., Li, W., Wang, Z.D., Ge, C.H. and Yang, X.M. Specific Expression and Regulation of Hepassocin in the Liver and Down-Regulation of the Correlation of HNF1alpha with Decreased Levels of Hepassocin in Human Hepatocellular Carcinoma. *J.Biol.Chem.*, vol. 28420, pp. 13335-13347, 2009.
- Zamule, S.M., Strom, S.C. and Omiecinski, C.J. Preservation of Hepatic Phenotype in Lentiviral-Transduced Primary Human Hepatocytes. *Chem.Biol.Interact.*, vol. 1733, pp. 179-186, 2008.
- Zhao, R., Hou, Y., Xue, P., Woods, C.G., Fu, J., Feng, B., Guan, D., Sun, G., Chan, J.Y., Waalkes, M.P., Andersen, M.E. and Pi, J. Long Isoforms of NRF1 Contribute to Arsenic-Induced Antioxidant Response in Human Keratinocytes. *Environ.Health Perspect.*, vol. 1191, pp. 56-62, 2011.
- Zhuang, W., Jia, Z., Feng, H., Chen, J., Wang, H., Guo, Y. and Meng, C. The Mechanism of the G0/G1 Cell Cycle Phase Arrest Induced by Activation of PXR in Human Cells. *Biomed.Pharmacother.*, vol. 657, pp. 467-473, 2011.
- Zimmet, P., Alberti, K.G. and Shaw, J. Global and Societal Implications of the Diabetes Epidemic. *Nature.*, vol. 4146865, pp. 782-787, 2001.