



## **TESIS DOCTORAL**

# **ESTUDIOS *IN VITRO* DE MECANISMOS DE TRANSPORTE Y TOXICIDAD DE ESPECIES ARSENICALES A NIVEL INTESTINAL**

TESIS DOCTORAL

Marta Calatayud Arroyo

Valencia, 2012

TESIS DIRIGIDA POR

María Dinoraz Vélez Pacios

Vicenta Angela Devesa i Pérez

Programa de doctorado Bioquímica clínica-médica e inmunología  
(Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de  
Valencia)





Dinoraz Vélez Pacios y Vicenta Devesa i Pérez, ambas Científico Titular del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

HACEN CONSTAR QUE:

el trabajo de investigación titulado “**Estudios *in vitro* de mecanismos de transporte y toxicidad de especies arsenicales a nivel intestinal**” que presenta Dña. Marta Calatayud Arroyo para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC) bajo nuestra dirección y que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Valencia, octubre de 2012

Fdo: Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Dra. Vicenta Devesa i Pérez



A Llum

A Juan

A mi madre



## AGRADECIMIENTOS

---

Y al final... hasta las tesis terminan. Echando la vista atrás y tratando de acordarme de todas las personas que han sido importantes y me han ayudado en este tramo de mi vida, me planteo el valor de lo humano en este proyecto, más allá de todo el conocimiento científico que pueda haber adquirido.

Empezando por los más cercanos durante estos años, gracias a mis compañeros del 204. A Silvia, porque al final compartimos muchas más cosas de las que al inicio hubiese imaginado y por ser un ejemplo de constancia y voluntad. A Maite, por estar siempre atenta y preocuparse por mí. Gracias a Antonio por compartir tantas horas, consejos de padre y ayudarme en lo que ha estado en su mano. También agradezco su impulso, gracias a él se hicieron en el laboratorio muchos cambios que han afectado directamente a esta tesis. Gracias a Marta, Marteta, mi compañera y ayuda, por llegar al laboratorio y hacer que los días de trabajo fueran mucho mejores. También a René, por enseñarme que a veces no se consigue más yendo demasiado rápido. Gracias a todos/as los alumnos en prácticas que han hecho más llevadero el análisis de tantas muestras: Rebeca, Paula, Daniela, Josep, Blanca, Ali, Yvonne. También agradezco a Rosa Montoro por recordarme la importancia de rodearse de buenas personas y tener siempre palabras de aliento para mí. Y del 204 dejo para el final lo más importante, mis "jefas", Deni y Vicen. Gracias por haberme dejado aprender durante todos estos años, no sólo de técnicas y ciencia, sino también de cómo hacerme más fuerte y madura.

Tengo que agradecer a los vecinos del laboratorio 202, los que están y ya no, por estar siempre dispuestos a echarme una mano, por prestarme desinteresadamente reactivos, materiales, técnicas e ideas. Gracias a David, Guada, Laura, Mari Pau, Vir, Joaquín.... Especialmente agradezco a Carol y Gracia, mis socias, por su confianza en mí y su colaboración, ya que me han enseñado lo divertido y agradable que puede ser hacer ciencia en grupo. También a Rafa, que más que jefe de laboratorio ha sido siempre un igual al que acudir para pedir ayuda.

Y de todo el personal del IATA, agradezco especialmente a Moisés por estar siempre dispuesto a prestarme su conocimiento, colaboración y ayuda, por tenerme en cuenta y cuidarme en todo lo que ha podido. También agradezco las horas interminables con Ana, siempre en la cabina de al lado, por escucharme y compartir conmigo ánimo y desánimo. Indudablemente, gracias A Jose por ser mi compañero en cultivos, darme el apoyo necesario para emprender nuevos proyectos y confiar en mi trabajo. También agradezco a Fran y Alí, unas caras amables todos los días al entrar al trabajo, por esperarme temprano los sábados y domingos.

Agradezco a Isabel y Maru por haberse cruzado en mi camino y ayudarme a superar los momentos difíciles.

Y para el final, mi familia. Mamá, gracias por tu confianza en todos mis proyectos, por estar siempre atenta y cuidar de mí. Gracias por acompañarme dejándome ser. Gracias a mi hermana por escucharme y ocuparse amorosamente de Llum para darme tiempo. También a Baba agradezco todos esos ratos que ha ejercido de tío cariñoso. A mi padre, porque sé que está ahí siempre. Gracias a mis yayos y especialmente a “Manolín” por ser un ejemplo de coraje.

Y lo más importante, agradezco a Llum simplemente que exista, ya que es lo más grande que me ha pasado. Gracias por darme el impulso y alegría que me hacen verlo todo desde una perspectiva mejor, enseñándome cada día qué es lo primero. Gracias también a Juan por su apoyo continuo y su gran aporte técnico, sin el que no hubiese sido posible realizar la mayoría de ensayos de esta tesis. Por impulsarme todos estos años, por respetar mis tiempos y espacios y esforzarse en construir conmigo una familia preciosa.

## RESUMEN

---

El arsénico es un metaloide ampliamente distribuido en el medioambiente, del cual existen numerosas formas químicas con características toxicológicas muy diferentes. En la actualidad, las formas inorgánicas son la que mayor interés despiertan, ya que se consideran carcinogénicas para el hombre. Se estima que alrededor de 140 millones de personas están afectadas por consumo de agua contaminada con niveles de arsénico que superan los máximos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (10 µg/L). Los problemas de salud derivados de la exposición a este contaminante alcanzan gran magnitud en ciertas áreas geográficas de India, Bangladesh y Argentina, donde por características geológicas de los terrenos el contenido de arsénico en los acuíferos subterráneos es elevado. La principal forma de arsénico presente en el agua de bebida es el As(V).

En la presente tesis se ha corroborado que previamente a la ingesta del arsénico (procesado de los alimentos por remojo y cocción) y durante su paso a través del tracto gastrointestinal, la matriz alimentaria modifica la forma química del arsénico, dando lugar a otras especies de mayor toxicidad. Adicionalmente se ha evidenciado por primera vez la capacidad de metabolizar el arsénico inorgánico por células del epitelio intestinal, indicando que en los estudios sobre el metabolismo presistémico del arsénico inorgánico, que hasta el momento sólo consideraban el metabolismo hepático, habría que incluir las transformaciones asociadas al metabolismo intestinal. La presencia de distintos compuestos habitualmente presentes en el lumen, tales como GSH y vitamina B12, afectan a los patrones de metabolismo.

Todas estas modificaciones en las formas químicas del arsénico que se ingieren con agua o alimentos contaminados amplían la complejidad en la evaluación del riesgo asociado al consumo de este metaloide. En esta tesis se ha evidenciado que las transformaciones presistémicas del arsénico pueden influir en su absorción por el epitelio intestinal, ya que las formas trivalentes se absorben con mayor facilidad que las pentavalentes por las células Caco-2 utilizadas como modelo *in vitro*. Asimismo se han

identificado distintas vías de asimilación, poniendo de manifiesto que la ruta paracelular tiene una gran participación en la absorción intestinal de la mayoría de formas arsenicales, con excepción del MMA(III) y DMA(III). A pesar de ello, la presencia combinada de transporte transcelular y paracelular parece estar presente en la mayoría de especies arsenicales. Por otra parte, la influencia del pH en la captación de As(V) y DMA(V) indica su posible absorción en las zonas proximales del intestino.

Se han estudiado con más detalle los mecanismos de captación celular del arsénico inorgánico, al tratarse de la especie mayoritaria en agua de bebida, principal fuente de exposición a este tóxico. Se ha evidenciado la multiplicidad de transportadores implicados en este proceso [As(III): AQ10, OATPB, GLUT5; As(V): NaPiIIb]. Así mismo se han puesto de manifiesto modificaciones de los patrones de expresión génica de estos y otros transportadores presentes a nivel intestinal que participan en la absorción de sustancias esenciales y en los procesos de detoxificación celular.

Considerando la complejidad celular existente en el intestino, en esta tesis se ha evaluado la influencia de modelos celulares mixtos entre células epiteliales absorptivas (Caco-2) y células secretoras de mucus (HT29-MTX) sobre la captación y transporte de especies arsenicales. El cambio en la estructura de las uniones estrechas y la presencia de mucus en la monocapa celular mixta, influyen significativamente en el transporte de la mayoría de las especies arsenicales estudiadas, con excepción del As(III). La absorción de las especies pentavalentes se ve incrementada por la mayor apertura de las uniones estrechas en este modelo. Por el contrario la permeabilidad de las formas metiladas trivalentes se reduce debido a la presencia de mucus, aspecto que evidencia la importancia de este mecanismo de defensa frente a especies arsenicales altamente reactivas y tóxicas. Todo ello apunta a la importancia del modelo celular empleado en los estudios sobre la absorción *in vitro* de arsénico.

Así mismo las distintas transformaciones descritas tienen consecuencias a nivel toxicológico, ya que como se ha evidenciado en la presente tesis, la toxicidad de las formas arsenicales es variable, siendo baja para las formas pentavalentes a los niveles que pueden presentarse en el agua de bebida y muy superior para las formas trivalentes. El mecanismo por el cual las distintas formas arsenicales inducen toxicidad parece tener

un factor común, que es la generación de especies reactivas de oxígeno, con un desbalance en las defensas antioxidantes celulares que depende de la especie y de la concentración (descenso del GSH, modificación de la actividad de enzimas catalasa y glutatión peroxidada, cambios en la expresión génica de metalotioneínas y proteínas de choque térmico). Sin embargo, los mecanismos de muerte celular varían entre especies, indicando diferencias en los procesos de toxicidad. Adicionalmente, se ha puesto de manifiesto que el arsénico inorgánico trivalente es capaz de causar una desestructuración del citoesqueleto celular formado por actina filamentososa.

La estrecha relación entre los procesos derivados del estrés oxidativo y los procesos inflamatorios es de especial importancia a nivel entérico, donde los procesos asociados a la inflamación y la respuesta inmune están en continua regulación para mantener la homeostasis intestinal. En esta tesis se pone de manifiesto que las formas arsenicales trivalentes inducen la liberación de citoquinas proinflamatorias en los sistemas *in vitro* formados por monocultivos de células Caco-2 o por cocultivos de Caco-2/PBMC, indicando que tanto el arsénico inorgánico ingerido como las formas derivadas del metabolismo o transformaciones intestinales son capaces de inducir una respuesta proinflamatoria. La presencia adicional de un agente inmunógeno como el lipopolisacárido de *Salmonella enterica* var. *typhimurium*, aumenta la respuesta del arsénico, especialmente del As(III), indicando que en lugares donde ambos factores (arsénico + contaminación bacteriana) coexisten en agua de bebida, pueden generarse importantes respuestas inflamatorias a nivel intestinal, cuyas consecuencias deberían ser estudiadas en profundidad, especialmente en niños, cuyo sistema inmune está en desarrollo y por tanto la susceptibilidad y efectos de estos procesos inflamatorios intestinales pueden ser más graves.

La inducción de estrés oxidativo, junto con los efectos proinflamatorios y los cambios en la estructura del citoesqueleto celular en células Caco-2 expuestas a distintas formas arsenicales afecta a la permeabilidad paracelular del epitelio, indicando que este tóxico puede alterar la funcionalidad del epitelio como barrera frente a agentes externos.



# ÍNDICE GENERAL

---

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>vi-viii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>ix-xii</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>xiii-xv</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>xvi-xx</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>xxi-xxviii</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>xxix-xxx</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1-60</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>61-64</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>65-126</b>
1. Especies arsenicales	<b>67</b>
2. Mantenimiento de los cultivos celulares de Caco-2 y HT29-MTX	<b>67-68</b>
3. Cultivo celular sobre sistema Transwell®	<b>68-69</b>
4. Evaluación de cambios en la forma química de especies arsenicales durante la digestión gastrointestinal	<b>70-76</b>
5. Evaluación del metabolismo del arsénico inorgánico en las células epiteliales del intestino	<b>76-81</b>
6. Evaluación de la permeabilidad aparente, transporte y retención celular de especies arsenicales por la línea celular Caco-2	<b>81-86</b>
7. Estudio de los transportadores implicados en la absorción intestinal de As(V) y As(III)	<b>86-94</b>
8. Factores que afectan el transporte intestinal de arsénico inorgánico	<b>95-96</b>
9. Evaluación de la influencia del modelo <i>in vitro</i> de epitelio intestinal sobre la permeabilidad de las formas arsenicales	<b>96-98</b>

10. Estudios de toxicidad en células Caco-2	<b>99-108</b>
11. Estudio de la respuesta inflamatoria de las células epiteliales del intestino expuestas a especies arsenicales trivalentes	<b>108-114</b>
12. Extracción de ARN, retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	<b>114-118</b>
13. Cuantificación de proteínas	<b>119</b>
14. Cuantificación de arsénico total y especies arsenicales	<b>119-125</b>
15. Análisis estadístico	<b>126</b>
 <b>CAPÍTULO 1. Transformaciones de especies arsenicales durante la digestión gastrointestinal</b>	<b>127-150</b>
Resultados	<b>129-142</b>
Discusión	<b>143-150</b>
 <b>CAPÍTULO 2. Metabolismo de las formas inorgánicas de arsénico por el epitelio intestinal</b>	<b>151-174</b>
Resultados	<b>153-166</b>
Discusión	<b>167-174</b>
 <b>CAPÍTULO 3. Caracterización <i>in vitro</i> de la permeabilidad, acumulación celular y mecanismos de transporte de las especies arsenicales en el epitelio intestinal</b>	<b>175-220</b>
Resultados	<b>177-206</b>
Discusión	<b>207-221</b>

<b>CAPÍTULO 4. Transporte y permeabilidad de formas arsenicales pentavalentes y trivalentes empleando cocultivos Caco-2/HT29-MTX como modelo celular</b>	<b>223-244</b>
Resultados	225-238
Discusión	239-244
<b>CAPÍTULO 5. Efectos tóxicos de especies arsenicales sobre un modelo de epitelio intestinal</b>	<b>245-279</b>
Resultados	247-268
Discusión	269-279
<b>CAPÍTULO 6. Efectos inflamatorios de las especies arsenicales sobre el epitelio intestinal</b>	<b>281-326</b>
Resultados	283-316
Discusión	317-326
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>327-334</b>
<b>DIFUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>335-338</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>339-372</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

---

### INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1.</b> Formas arsenicales más frecuentes en alimentos y algunos de los metabolitos humanos más relevantes	<b>8</b>
<b>Tabla 2.</b> Contenidos de arsénico inorgánico en alimentos	<b>12</b>
<b>Tabla 3.</b> Valores de LD <sub>50</sub> en roedores dosificados oralmente	<b>14</b>
<b>Tabla 4.</b> Valores de IC <sub>50</sub> de especies arsenicales trivalentes en cultivos celulares humanos	<b>15</b>
<b>Tabla 5.</b> Estudios de biodisponibilidad de arsénico realizados <i>in vivo</i> mediante el uso de modelos animales	<b>31</b>
<b>Tabla 6.</b> Estudios de bioaccesibilidad/biodisponibilidad <i>in vitro</i> de distintas formas arsenicales desde alimentos	<b>34</b>

### METODOLOGÍA

<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos empleados para qPCR en los estudios de metabolismo del arsénico inorgánico	<b>78</b>
<b>Tabla 8.</b> Oligonucleótidos de transportadores empleadas en qPCR	<b>88-89</b>
<b>Tabla 9.</b> Secuencia de los ARN de interferencia empleados en los ensayos de transfección transitoria.	<b>94</b>
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótidos utilizada para la amplificación de metalotioneínas y proteínas de estrés térmico	<b>106</b>
<b>Tabla 11.</b> Oligonucleótidos de citoquinas empleados en qPCR	<b>113</b>
<b>Tabla 12.</b> Intervalo de cuantificación y sensibilidad de los ensayos ELISA empleados para la cuantificación de citoquinas	<b>114</b>
<b>Tabla 13.</b> Reactivos empleados en la retrotranscripción	<b>115</b>
<b>Tabla 14.</b> Programa empleado para la reacción de qPCR	<b>116</b>

<b>Tabla 15.</b> Oligonucleótidos de genes de referencia empleados en qPCR	<b>118</b>
<b>Tabla 16.</b> Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de arsénico mediante GF-AAS	<b>120</b>
<b>Tabla 17.</b> Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de arsénico mediante FI-HG-AAS	<b>121</b>
<b>Tabla 18.</b> Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de especies arsenicales mediante trampa criogénica-HG-AAS	<b>125</b>

### **CAPÍTULO 1. Transformaciones de especies arsenicales durante la digestión gastrointestinal**

<b>Tabla 1.</b> Contenidos de arsénico inorgánico en alimentos tratados con As(V) 1 mg/L (remojo o cocción) y los contenidos de arsénico inorgánico y As(III) en la fracción bioaccesible de los mismos.	<b>131</b>
<b>Tabla 2.</b> Arsénico total en el alimentos tratados con MMA(V) y DMA(V) (remojo y cocción), y en la fracción soluble obtenida tras una digestión gastrointestinal. Se indican también la bioaccesibilidad de arsénico, los contenidos de MMA(III)/MMAS y DMA(III)/DMAS existente en la fracción soluble, y el porcentaje de modificación de la especie metilada	<b>136</b>

### **CAPÍTULO 2. Metabolismo de las formas inorgánicas de arsénico por el epitelio intestinal**

<b>Tabla 1.</b> Expresión relativa de ARNm de marcadores de diferenciación celular en células Caco-2 y HT29-MTX tras 15 y 21 días postsiembra	<b>154</b>
<b>Tabla 2.</b> Arsénico total y formas arsenicales en los lisados celulares y medios tras exposición de células Caco-2 (15 días postsiembra) a 1 $\mu$ M As(III) y 10 $\mu$ M As(V) durante 24, 48 y 72 horas	<b>156</b>
<b>Tabla 3.</b> Metabolismo en células Caco-2 (15 días postsiembra) sembradas	<b>160</b>

sobre Transwell <sup>®</sup> , tras exposición a 1 $\mu\text{M}$ As(III) durante 48 horas	
<b>Tabla 4.</b> Arsénico total y formas arsenicales en los lisados celulares y medios tras exposición de células Caco-2 (5 y 21 días postsiembra) a 1 $\mu\text{M}$ As(III) durante 24, 48 y 72 horas	<b>162</b>
<b>Tabla 5.</b> Expresión de ARNm de <i>AS3MT</i> tras tratamiento de las células Caco-2 (5, 15 y 21 días postsiembra) con 1 $\mu\text{M}$ As(III) o 10 $\mu\text{M}$ As(V) a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas)	<b>164</b>
<b>CAPÍTULO 3. Caracterización in vitro de la permeabilidad, acumulación celular y mecanismos de transporte de las especies arsenicales en el epitelio intestinal</b>	
<b>Tabla 1.</b> Efecto del medio de cultivo en el transporte apical-basal de especies pentavalentes (67 $\mu\text{M}$ ) por células Caco-2	<b>180</b>
<b>Tabla 2.</b> Efecto del medio de cultivo en el transporte basal-apical de especies pentavalentes (67 $\mu\text{M}$ ) por células Caco-2	<b>182</b>
<b>Tabla 3.</b> Coeficientes de permeabilidad aparente ( $\times 10^{-6}$ cm/s) de las especies arsenicales en dirección apical-basal, basal-apical y el ratio de eliminación en medio HBSS	<b>187</b>
<b>Tabla 4.</b> Contenidos de arsénico en el interior de Caco-2 tras 60 minutos de exposición a As(V), As(III), MMA(III) y DMA(III), utilizando distintas temperaturas de ensayo	<b>193</b>
<b>Tabla 5.</b> Valores del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{\text{app}} \times 10^{-6}$ cm/s) y acumulación intracelular (ng As/ $10^6$ células) en células expuestas a As(V) (67 $\mu\text{M}$ ) en medios con y sin fosfato durante 240 minutos	<b>194</b>
<b>Tabla 6.</b> Valores del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{\text{app}}$ ) y acumulación intracelular (ng As/ $10^6$ células) en células con y sin inhibición previa, expuestas a 10 $\mu\text{M}$ de As(III) durante 60 minutos	<b>196</b>
<b>Tabla 7.</b> Valores del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{\text{app}}$ ) y	<b>203</b>

acumulación intracelular (ng As/10<sup>6</sup> células) en células expuestas a As(V) y As(III) (67 μM) con y sin coexposición a GSH (5 mM) durante 120 minutos

#### **CAPÍTULO 4. Transporte y permeabilidad de formas arsenicales pentavalentes y trivalentes empleando cocultivos Caco-2/HT29-MTX como modelo celular**

**Tabla 1.** Retención celular y transporte de As(V), MMA(V) y DMA(V) en distintas proporciones del cultivo Caco-2/HT29-MTX (100/0; 90/10; 50/50 y 30/70) **231-232**

**Tabla 2.** Retención celular y transporte de As(III), MMA(III) y DMA(III) en distintas proporciones del cultivo Caco-2/HT29-MTX (100/0; 90/10; 50/50) **233**

**Tabla 3.** Retención celular y transporte en distintas proporciones Caco-2/HT29-MTX (100/0; 90/10; 50/50) del arsénico existente en la fracción bioaccesible de alimentos **237**

#### **CAPÍTULO 5. Efectos tóxicos de especies arsenicales sobre un modelo de epitelio intestinal**

**Tabla 1.** Contenidos de GSH y GSSG (nmol/mg proteína) y ratio GSSG/GSH en células Caco-2 tratadas con As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas **255**

**Tabla 2.** Expresión relativa de ARNm de metalotioneínas y proteínas de estrés térmico de células Caco-2 tratadas con 1 μM de As(III), 0.1 μM de MMA(III) y 1 μM de DMA(III) durante 4, 6 y 24 horas **263**

## **CAPÍTULO 6. Efectos inflamatorios de las especies arsenicales sobre el epitelio intestinal**

<b>Tabla 1.</b> Niveles de TNF $\alpha$ (pg/mg proteína) tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones	<b>285</b>
<b>Tabla 2.</b> Niveles de IL8 (pg/mg proteína) tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones	<b>289</b>
<b>Tabla 3.</b> Niveles de IL6 (pg/mg proteína) tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones	<b>290</b>
<b>Tabla 4.</b> Niveles de TNF $\alpha$ (pg/mg proteína) en el medio apical del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones	<b>295</b>
<b>Tabla 5.</b> Niveles de IL8 (pg/mg proteína) en el medio apical del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones	<b>297</b>
<b>Tabla 6.</b> Niveles de IL6 (pg/mg proteína) en el medio apical del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones	<b>298</b>
<b>Tabla 7.</b> Niveles de TNF $\alpha$ (pg/mg proteína) en el medio basal del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones	<b>300</b>
<b>Tabla 8.</b> Niveles de IL8 (pg/mg proteína) en el medio basal del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones	<b>302</b>
<b>Tabla 9.</b> Niveles de IL8 (pg/mg proteína) en el medio basal del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones	<b>303</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

## INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b> Vías de exposición a arsénico en humanos	<b>9</b>
<b>Figura 2.</b> Manifestación de arsenicosis, queratoderma plantar y palmar	<b>15</b>
<b>Figura 3.</b> Efecto del arsénico sobre el potencial de membrana mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno, con la consiguiente inducción de apoptosis	<b>17</b>
<b>Figura 4.</b> Asociación entre arsénico, estrés oxidativo y cáncer	<b>20</b>
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de las diferencias morfológicas entre los procesos necróticos y apoptóticos	<b>21</b>
<b>Figura 6.</b> Vías de activación de la apoptosis	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Ambiente inmune intestinal y defensa intestinal contra las bacterias comensales	<b>24</b>
<b>Figura 8.</b> Posibles rutas metabólicas de las formas inorgánicas del arsénico.	<b>37</b>
<b>Figura 9.</b> Metilación del arsénico y asociación con el metabolismo del folato y colina	<b>39</b>
<b>Figura 10.</b> Representación esquemática de una sección transversal de intestino.	<b>45</b>
<b>Figura 11</b> Mecanismos de transporte a través de la barrera intestinal	<b>49</b>
<b>Figura 12.</b> Representación esquemática de las vías de transporte, transportadores y enzimas metabólicas en enterocitos.	<b>54</b>
<b>Figura 13.</b> Caco-2 no diferenciadas (2 días post siembra) y diferenciadas (21 días post siembra) con tinción de hematoxilina eosina	<b>55</b>

## METODOLOGÍA

<b>Figura 14.</b> Representación esquemática del sistema Transwell®	<b>69</b>
---	-----------

<b>Figura 15.</b> Voltímetro Millicell®-ERS y aplicación sobre un sistema Transwell® para la determinación de la RET	<b>69</b>
<b>Figura 16.</b> Esquema de los tratamientos aplicados durante los ensayos de las transformaciones del arsénico durante la digestión gastrointestinal	<b>72</b>
<b>Figura 17.</b> Esquema del protocolo de digestión gastrointestinal	<b>74</b>
<b>Figura 18.</b> Diseño de los estudios de transporte realizados en el sistema Transwell®	<b>82</b>
<b>Figura 19.</b> Distribución de Caco-2 en citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio y anexina V-FITC	<b>103</b>
<b>Figura 20.</b> Fracciones formadas durante el aislamiento de PBMC	<b>110</b>
<b>Figura 21.</b> Representación esquemática del sistema CT-HG-AAS	<b>124</b>

### **CAPÍTULO 1. Transformaciones de especies arsenicales durante la digestión gastrointestinal**

<b>Figura 1.</b> Cromatogramas obtenidos en la cuantificación mediante CT-HG-AAS (pH 6) de patrones arsenicales trivalentes y fracción soluble de ajo en remojo con As(V)	<b>132</b>
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de As(III) en la fracción soluble obtenidas tras la digestión gastrointestinal de alimentos en remojo con As(V)	<b>133</b>
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de As(III) en la fracción soluble obtenidas tras la digestión gastrointestinal de alimentos cocinados en presencia de As(V) 1 mg/L	<b>134</b>
<b>Figura 4.</b> Capacidad antioxidante de la fracción soluble de muestras en remojo y cocinadas, evaluada como concentración equivalente de FeSO <sub>4</sub> (mM/100 g) a los 4 y 30 minutos	<b>137</b>
<b>Figura 5.</b> Correlación entre el contenido de As(III) (ng) y el contenido de FRAP en la fracción bioaccesible de los alimentos cocinados	<b>138</b>
<b>Figura 6.</b> Contenidos de GSH y GSSG en la fracción soluble de muestras en remojo y cocinadas	<b>139</b>

<b>Figura 7.</b> Correlación entre el contenido de MMA(III)/MMAS (ng) y el contenido de GSH en la fracción bioaccesible de los alimentos cocinados	<b>140</b>
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de As(III) en alimentos en remojo con un patrón de 1 mg/L de As(V) y en alimentos cocinado con As(V) 1 mg/	<b>142</b>
<b>Figura 9.</b> Transformaciones de las especies arsenicales durante la digestión gastrointestinal de alimentos	<b>150</b>

## **CAPÍTULO 2. Metabolismo de las formas inorgánicas de arsénico por el epitelio intestinal**

<b>Figura 1.</b> Efecto de GSH y vitamina B12 sobre el metabolismo del As(III) en células Caco-2 (15 días postsiembra en placas 6 pocillos, 48 horas)	<b>159</b>
<b>Figura 2.</b> Distribución de arsénico en células HT29-MTX tras 24 horas de exposición a As(III) (1 $\mu$ M) y As(V) (10 $\mu$ M)	<b>165</b>
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática del metabolismo del arsénico inorgánico, su circulación enterohepática y eliminación	<b>174</b>

## **CAPÍTULO 3. Caracterización in vitro de la permeabilidad, acumulación celular y mecanismos de transporte de las especies arsenicales en el epitelio intestinal**

<b>Figura 1.</b> Transporte apical-basolateral en DMEMc (ng As/ $10^6$ células) de As(V) (1a), MMA(V) (1b) y DMA(V) (1c) en función de la concentración	<b>179</b>
<b>Figura 2.</b> Transporte apical-basolateral (ng As/ $10^6$ células) de As(V) (2a), MMA(V) (2b) y DMA(V) (2c) en función de la concentración.	<b>181</b>
<b>Figura 3.</b> Transporte apical-basolateral en HBSS de As(III) (ng As/ $10^6$ células) en función de la concentración	<b>183</b>
<b>Figura 4.</b> Transporte apical-basolateral (ng As/ $10^6$ células) de MMA(III) y DMA(III), ambos a la concentración de 1 $\mu$ M, en función del tiempo	<b>184</b>

<b>Figura 5.</b> Transporte basolateral-apical (ng As/10 <sup>6</sup> células) de As(III) en función de la concentración	<b>185</b>
<b>Figura 6.</b> Transporte basolateral-apical (ng As/10 <sup>6</sup> células) de MMA(III) y DMA(III), ambos a la concentración de 1 μM, en función del tiempo	<b>186</b>
<b>Figura 7.</b> Valores de permeabilidad aparente a los 120 min para el marcador paracelular LY, As(V), MMA(V), DMA(V), As(III), MMA(III) y DMA(III) con las uniones estrechas íntegras (ausencia de EDTA) y en tras la apertura de las uniones estrechas con 5mM de EDTA	<b>189</b>
<b>Figura 8.</b> Valores de permeabilidad aparente a los 120 min de exposición a As(V), MMA(V), DMA(V), As(III), MMA(III) y DMA(III) a pH 7.2/7.2 y pH 5.5/7.2	<b>190</b>
<b>Figura 9.</b> Valores de permeabilidad aparente a los 120 min de exposición a As(III), MMA(III) y DMA(III) y As(V) a 37 °C y 4 °C	<b>192</b>
<b>Figura 10.</b> Expresión relativa de transportadores en células Caco-2 transfectadas con siRNA, en relación a células no transfectadas	<b>197</b>
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de arsénico en el interior celular en células Caco-2 transfectadas con siRNA respecto a células control	<b>197</b>
<b>Figura 12.</b> Expresión relativa de transportadores [ratio de expresión (log <sub>2</sub> )] de células Caco-2 tratadas con As(V) (100 μM)	<b>199</b>
<b>Figura 13.</b> Expresión relativa de transportadores [ratio de expresión (log <sub>2</sub> )] de células Caco-2 tratadas con As(III) (10 μM)	<b>201</b>
<b>Figura 14.</b> Valores del coeficiente de permeabilidad aparente (P <sub>app</sub> ) (x 10 <sup>-6</sup> cm/s) (120 min) en medio HBSS sin sales biliares y con sales biliares	<b>204</b>
<b>Figura 15.</b> Valores de porcentaje de resistencia eléctrica transepitelial (RET) respecto al control y coeficientes de permeabilidad aparente (P <sub>app</sub> ) (x 10 <sup>-6</sup> cm/s) del As(III) y As(V) en presencia de ETV a distintos tiempos	<b>205</b>
<b>Figura 16.</b> Representación de las vías de absorción intestinal de las distintas formas arsenicales	<b>213</b>
<b>Figura 17.</b> Hipótesis sobre el transporte del arsénico inorgánico a nivel intestinal	<b>221</b>

#### **CAPÍTULO 4. Transporte y permeabilidad de formas arsenicales pentavalentes y trivalentes empleando cocultivos Caco-2/HT29-MTX como modelo celular**

- Figura 1.** Valores de RET obtenidos durante el periodo de cultivo de distintas proporciones Caco-2/HT29-MTX [100/0; 90/10; 50/50 y 30/70] **226**
- Figura 2.** Caracterización de los cocultivos Caco-2/HT29-MTX transcurridos 14 días postsiembra. Valores de RET, permeabilidad aparente del LY y radio de poro estimado **227**
- Figura 3.** Coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) para As(V), MMA(V), DMA(V) (figura 3a) y As(III), MMA(III) y DMA(III) (figura 3b) en las diferentes proporciones Caco-2/HT29-MTX ensayadas: 100/0; 90/10; 50/50 y 30/70 **229**
- Figura 4.** Porcentaje de arsénico en mucus, células y medio tras la exposición de células HT29-MTX a 1  $\mu$ M de MMA(III) y DMA(III) durante 2 horas **234**
- Figura 5.** Representación esquemática del efecto del mucus y la apertura de uniones estrechas en el cocultivo de Caco-2 y HT29-MTX sobre la absorción intestinal de distintas especies arsenicales **244**

#### **CAPÍTULO 5. Efectos tóxicos de especies arsenicales sobre un modelo de epitelio intestinal**

- Figura 1.** Porcentaje de actividad mitocondrial respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(V) (1a), MMA(V) (1b) y DMA(V) (1c) durante 24, 48 y 72 horas **248**
- Figura 2.** Porcentaje de actividad mitocondrial respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III) (2a) durante 24, 48 y 72 horas; MMA(III) (2b) y DMA(III) (2c) durante 2 y 24 horas **250**

<b>Figura 3.</b> Porcentaje de fluorescencia de DCF respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas	<b>252</b>
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de equivalentes de MDA respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas	<b>253</b>
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de actividad de la GPx respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas	<b>256</b>
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de actividad de la catalasa respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas	<b>257</b>
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de necrosis, apoptosis y viabilidad respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 2 (a, c y e) y 24 (b, d y f) horas	<b>259-260</b>
<b>Figura 8.</b> Actividad caspasa-3 en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas	<b>261</b>
<b>Figura 9.</b> Microscopía de fluorescencia con tinción nuclear (DAPI) de células Caco-2 tras distintos tratamientos: A) Control; B) As(III) 10 µM C) MMA(III) 1µM; D) DMA(III) 5 µM; E) estaurosporina 2 µM, durante 24 horas	<b>265</b>
<b>Figura 10.</b> Microscopía de fluorescencia del citoesqueleto de actina filamentosa en células Caco-2. A) Control; B y C) Citocalasina B, 2 horas; D, E y F) As(III) 10 µM 24, 48 y 72 horas respectivamente	<b>266</b>
<b>Figura 11.</b> Microscopía de fluorescencia con doble tinción, núcleos (DAPI, azul) y actina filamentosa (rhodamina-faloidina, rojo) de células Caco-2 tras tratamientos con As(III) 10 µM, 72 horas (A, B)	<b>267</b>
<b>Figura 12.</b> Representación esquemática de los distintos efectos observados en células Caco-2 tras la exposición a As(III) (12a), MMA(III) (12b) y DMA(III) (12c)	<b>277-279</b>

## **CAPÍTULO 6. Efectos inflamatorios de las especies arsenicales sobre el epitelio intestinal**

<b>Figura 1.</b> Niveles de TNF $\alpha$ en el medio de cultivo y cambios en la expresión tras tratamiento con As(III), MMA(III) y DMA(III).	<b>286</b>
<b>Figura 2.</b> Niveles de IL8 en el medio de cultivo y cambios en la expresión tras tratamiento con As(III), MMA(III) y DMA(III).	<b>288</b>
<b>Figura 3.</b> Niveles de IL6 en el medio de cultivo y cambios en la expresión tras tratamiento de As(III), MMA(III) y DMA(III)	<b>291</b>
<b>Figura 4.</b> Niveles de expresión relativa de <i>IL1<math>\alpha</math></i> e <i>IL1<math>\beta</math></i> en células Caco-2 expuestas a distintos tratamientos con LPS, arsénico o combinaciones	<b>293</b>
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de liberación de TNF $\alpha$ en el medio apical, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico o combinaciones	<b>295</b>
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de liberación de IL8 en el medio apical, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico o combinaciones	<b>296</b>
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de liberación de IL6 en el medio apical, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico o combinaciones	<b>298</b>
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de liberación de TNF $\alpha$ en el medio basal, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico o combinaciones	<b>300</b>
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de liberación de IL8 en el medio basal, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico o combinaciones	<b>301</b>
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de liberación de IL6 en el medio basal, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico o combinaciones	<b>303</b>
<b>Figura 11.</b> Ratio de expresión ( $\log_2$ ) de ARNm de <i>TNF<math>\alpha</math></i> , <i>IL8</i> e <i>IL6</i> en células Caco-2 tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico o combinaciones	<b>305-306</b>
<b>Figura 12.</b> Ratio de expresión ( $\log_2$ ) de ARNm de <i>TNF<math>\alpha</math></i> , <i>IL8</i> e <i>IL6</i> en PBMC tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico o combinaciones	<b>308-309</b>

<b>Figura 13.</b> Ratio de expresión ( $\log_2$ ) de ARNm de <i>IL10</i> e <i>IL13</i> en PBMC tras exposición a LPS	<b>310</b>
<b>Figura 14.</b> Ratio de expresión ( $\log_2$ ) de ARNm de <i>IL10</i> e <i>IL13</i> en PBMC tras exposición a As(III) y As(III)/LPS	<b>311</b>
<b>Figura 15.</b> Ratio de expresión ( $\log_2$ ) de ARNm de <i>IL10</i> e <i>IL13</i> en PBMC tras exposición a MMA(III) y MMA(III)/LPS	<b>312</b>
<b>Figura 16.</b> Ratio de expresión ( $\log_2$ ) de ARNm de <i>IL10</i> e <i>IL13</i> en PBMC tras exposición a DMA(III) y DMA(III)/LPS	<b>313</b>
<b>Figura 17.</b> Valores de RET y porcentaje de transporte de lucifer yellow al compartimento basolateral tras tratamientos con LPS, especies arsenicales trivalentes y combinaciones durante 24 horas	<b>314</b>
<b>Figura 18.</b> Porcentajes de transporte de arsénico al lado basolateral a distintos tiempos, tras el tratamiento con especies arsenicales trivalentes solas o en combinación con LPS	<b>316</b>
<b>Figura 19.</b> Representación esquemática de los procesos inflamatorios asociados a la exposición a arsénico del epitelio intestinal	<b>326</b>

## ABREVIATURAS

---

**AB:** arsenobetaina

**ADNc:** ácido desoxiribonucleico complementario

**AQP:** aquaporinas

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**As:** arsénico

**Asi:** arsénico inorgánico [As(III)+As(V)]

**As(V):** arseniato

**As(III):** arsenito

**AS3MT:** arsénico 3-metiltransferasa

**BCRP:** Proteína de resistencia al cáncer de mama

**CAT:** Catalasa

**CT -HG-AAS:** espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros mediante trampa criogénica

**DAPI:** diaminofenilindol

**DMA:** suma de ácido dimetilarsínico [DMA(V)] y ácido dimetilarsónico [DMA(III)]

**DMA(III):** ácido dimetilarsinoso

**DMA(V):** ácido dimetilarsínico

**DMEM:** medio de Eagle modificado por Dulbecco

**Er:** tasa de excreción

**FI-HG-AAS:** espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros mediante inyección en flujo

**FITC:** fluoresceína isotiocianato

**GF-AAS:** espectrofotometría de absorción atómica con cámara de grafito

**GLUT:** permeasa de glucosa

**GPx:** glutatión peroxidasa

**GSH:** glutatión reducido

**GSSG:** glutatión oxidado

**HBSS:** solución salina balanceada de Hanks

**HSP:** proteínas de estrés térmico

**IL:** interleuquinas

**JECFA:** Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios

**LY:** lucifer yellow

**Log<sub>2</sub>:** escala logarítmica en base 2

**LPS:** lipopolisacárido

**MDR, MRP:** proteínas de resistencia a múltiples drogas

**MEM:** medio esencial mínimo con sales de Earle

**MMA:** suma de ácido monometilarsínico [MMA(V)] y ácido monometilarsonioso [MMA(III)]

**MMA(III):** ácido monometilarsonioso

**MMA(V):** ácido monometilarsónico

**MT:** metalotioneínas

**NaPiII:** transportadores de fosfato sodio dependientes

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPT:** oftaldialdehído

**P<sub>app</sub>:** permeabilidad efectiva aparente

**PBMC:** células mononucleares de sangre periférica

**PBS:** tampón salino fosfato

**P-gp:** glicoproteína P

**ph:** peso húmedo

**PI:** yoduro de propidio

**PiT:** transportadores de fosfato sodio independientes

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RET:** resistencia eléctrica transepitelial

**REST:** relative expression software tool

**RN18S:** gen ribosomal 18S

**RT:** retrotranscripción

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**SGLT:** transportador de glucosa sodio dependiente

**siARN:** ácido ribonucleico de interferencia

**TBARS:** sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

**TMA<sup>+</sup>:** ión tetrametilarsonio

**TMAO:** óxido de trimetilasina

**TNF:** factor de necrosis tumoral



## **INTRODUCCIÓN**

---



## **1. Arsénico**

---



La contaminación ambiental es un problema global que en los últimos años ha ido incrementando su prevalencia e importancia, con un aumento en el conocimiento y concienciación sobre el valor que tiene el medio ambiente en las posibilidades de desarrollo humano. En este ámbito, el nivel de contaminación del agua es un reflejo directo del grado de contaminación medioambiental. La provisión o acceso a un adecuado suministro de agua segura y de calidad es una condición básica para la salud humana y el estado de bienestar.

Existen sin embargo múltiples áreas geográficas donde este acceso no está garantizado. En áreas rurales de países en desarrollo, el mayor problema de salud relacionado con la calidad del agua se debe a contaminaciones bacteriológicas u otros contaminantes biológicos como protozoos o enterovirus, sin embargo también existen problemas de salud por contaminación química. En el caso del arsénico, se estima que 140 millones de personas (Ravenscroft, 2007) están afectadas por consumo de agua contaminada con niveles de arsénico que superan los valores máximos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (10 µg/L, OMS 2001).

En el año 2000, la agencia de registro de sustancias tóxicas y enfermedades (ATDR) clasificó al arsénico como una de las 20 sustancias más peligrosas presentes en el medio ambiente (ATRSD, 2000). En la actualidad, la forma inorgánica de arsénico se considera un agente carcinogénico para el hombre (IARC, 2004), siendo el único elemento que ha sido catalogado como sustancia cancerígena por su ingesta a través del agua de bebida.

En los últimos años, este metaloide y especialmente su forma inorgánica, han suscitado el interés de la comunidad científica y los organismos internacionales responsables de la seguridad alimentaria y de la salud, los cuales han emitido opiniones al respecto (EFSA, 2009; JEFCA, 2010; EPA, 2011). Estas opiniones han identificado una serie de aspectos en los que se requiere una mayor investigación. Entre ellos, y según lo apuntado por el comité JEFCA y por EFSA existe un interés por el estudio de la exposición de la población a arsénico a través del consumo de alimentos, así como de

los procesos que tienen lugar tras la ingesta del mismo, incluyendo su absorción y toxicidad.

### **1.1. Características generales y antecedentes históricos**

Desde la antigüedad el arsénico ha sido utilizado tanto con fines médicos, como homicidas y suicidas. Hipócrates (460-377 a. J. C.) y Galeno (138-201 d. J. C.) prescribían una pasta con sulfato de arsénico para el tratamiento de las úlceras (Graeme y Pollack, 1998). La posterior introducción del arsénico como agente terapéutico en la medicina moderna se debe a Thomas Fowler, que en 1786 desarrolló una solución medicinal con 1% de trióxido de arsénico, llamada solución de Fowler, que fue empleada para el tratamiento de un gran número de enfermedades: cutáneas (particularmente eczemas y psoriasis), fiebres recurrentes, asma, cólera, malaria. Otros compuestos arsenicales fueron empleados, principalmente en la primera mitad del siglo XX, para combatir una amplia gama de infecciones microbianas (Thorburn, 1983). El primer fármaco organoarsenical (atoxyl) se sintetizó por Pierre Antoine Bèchamp en 1859 tras hacer reaccionar ácido arsénico con anilina. En 1910, Paul Ehrlich desarrolló el compuesto Salvarsan (arsfenamina), empleado en el tratamiento de la sífilis y la tripanosomiasis hasta el descubrimiento de la penicilina. Durante la segunda guerra mundial, Ernst A.H. Fiedheim mejoró el tratamiento de la tripanosomiasis con derivados arsenicales, tales como el sulfato de p-metilaminofenol (Gibaud y Jaouen, 2010). A partir de la segunda mitad del siglo XX, empieza a restringirse el uso del arsénico inorgánico como agente terapéutico al ampliarse los conocimientos sobre la toxicidad de este elemento.

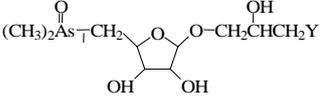
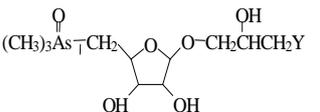
A pesar del abandono del arsénico en el tratamiento de ciertas enfermedades para las que en la actualidad existen fármacos más efectivos y seguros, en los últimos años se han desarrollado diversos estudios sobre la utilidad y aplicación del trióxido de arsénico (Trisenox<sup>®</sup>) para el tratamiento de determinadas leucemias, especialmente la leucemia promielocítica aguda o el síndrome mielodisplásico (List *et al.*, 2003; Rousselot *et al.*, 2004; Mathews *et al.*, 2010). En el año 2000 la Agencia de Alimentos y Medicamentos

de Estados Unidos de América aprobó el uso trióxido de arsénico para este uso (FDA, 2000).

## 1.2. Formas químicas del arsénico

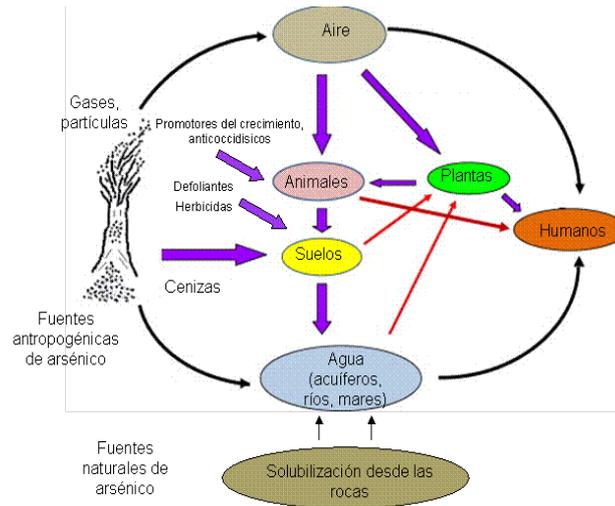
El arsénico está presente en la naturaleza en numerosas formas químicas. En 1973 el uso de la técnica de generación de hidruros por Braman y Foreback permitió por primera vez la diferenciación entre especies inorgánicas y especies metiladas. Desde ese año, los avances en química analítica han incrementado notablemente el número de especies arsenicales identificadas en la naturaleza. En la tabla 1 se detallan las formas arsenicales más comunes en alimentos y algunos de los metabolitos humanos más relevantes (EFSA 2009; JEFCA, 2011). Actualmente, el mayor interés se centra en la identificación de nuevos arsenoazúcares en los alimentos, de los cuales hay descritas más de 20 estructuras que varían en el grupo R unido al aglicón (Francesconi y Kuehnelt, 2004). También es creciente el interés por los arsenolípidos, de los que se han descritas diez estructuras diferentes (Sele *et al.*, 2012). Todos ellos contienen el grupo  $[(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})]$  unido a una o varias cadenas de ácidos grasos o a una larga cadena de hidrocarburos (EFSA, 2009).

**Tabla 1.** Formas arsenicales más frecuentes en alimentos y algunos de los metabolitos humanos más relevantes.

	Especie	Fórmula
Inorgánicas	Arsenito [As(III)]	As(O) <sub>3</sub>
	Arseniato [As(V)]	O=As(O) <sub>3</sub>
Orgánicas	Ácido monometilarsónico, MMA(V)	CH <sub>3</sub> AsO(O) <sub>2</sub>
	Ácido monometilarsonioso, MMA(III)	CH <sub>3</sub> As(O) <sub>2</sub>
	Ácido dimetilarsínico, DMA(V)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO(O)
	Ácido dimetilarsinioso, DMA(III)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO <sup>·</sup>
	Óxido de trimetilarsina, TMAO	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> AsO
	Ion tetrametilarsonio, TMA <sup>+</sup>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> As <sup>+</sup>
	Arsenobetaina, AB	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>
	Trimetilarsoniopropionato, TMAP	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>
	Arsenocolina, AC	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
	Ácido monomethylmonotioarsónico MMMTA(V) o MMAS	[CH <sub>3</sub> As(O)S]
	Ácido dimetiltioarsínico, DMMTA(V) o DMAS	[(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> As(O)S]
	Ácido dimetilditioarsínico, DMDTA(V)	[(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsS <sub>2</sub> ]
	Ácido dimetilditioarsínico, DMDTA(V)	[(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsS <sub>2</sub> ]
	Arsenoazúcares dimetilados Y= -OH -OPO <sub>3</sub> HCH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH -SO <sub>3</sub> H -OSO <sub>3</sub> H	
	Arsenoazúcares trimetilados Y= -OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	Arsenolipidos. AsFA-B	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH]

### 1.3. Arsénico en el medio ambiente y vías de exposición para la población

El arsénico es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza. Los fenómenos naturales (emisiones volcánicas, erosión de las rocas y actividad geotermal) y la actividad humana causan la dispersión de arsénico en el medioambiente. Las vías de exposición humana a arsénico se describen en la figura adjunta. Aire, agua, suelo y alimentos contribuyen a los niveles de arsénico en el organismo humano.



**Figura 1.** Vías de exposición a arsénico en humanos.

#### 1.3.1. Arsénico en aire

Los valores medios de arsénico total en la atmósfera varían en un intervalo amplio, entre 0.02 a 4 ng/m<sup>3</sup> en áreas rurales, entre 3-200 ng/m<sup>3</sup> en áreas urbanas y en niveles que pueden superar 1000 ng/m<sup>3</sup> en áreas con actividad industrial (OMS, 2001). La inhalación de arsénico es una vía de exposición puntual, restringida a exposiciones ocupacionales o a individuos que viven próximas a zonas industriales donde la concentración de arsénico en la atmósfera es elevada. Se ha estimado que los niveles de

exposición habitual en áreas urbanas se encuentran entre 0.02-0.2 µg/día en zonas rurales y entre 0.4-0.6 µg/día en zonas urbanas (ATSDR, 1991).

### 1.3.2. Arsénico en suelos

En la corteza terrestre el arsénico es el vigésimo elemento por orden de abundancia (Cullen y Reimer, 1989), con una concentración media que oscila entre 1.5 y 2 mg/Kg (Matschullat, 2000). Está presente en más de 200 minerales, de los cuales el más común es la arsenopirita (FeSAs). El suelo también presenta este metaloide en su composición, pudiendo variar el contenido entre 0.1 y 40 mg/Kg, con una media de 5-6 mg/Kg. Se han hallado elevadas concentraciones en suelos cercanos a zonas mineras o en áreas donde se han aplicado pesticidas arsenicales, con intervalos que varían desde 10 a más de 1000 mg/Kg (Williams *et al.*, 1998). La irrigación con agua contaminada aumenta los niveles de este metaloide en suelos y consecuentemente en cereales y vegetales cultivados sobre ellos (Williams *et al.*, 2005). En ambientes aeróbicos la forma predominante en suelos es el As(V), pudiendo existir también MMA derivado de la metilación por parte de microorganismos (Mandal y Suzuki, 2002).

### 1.3.3. Arsénico en agua

Los valores medios de arsénico en agua marina se encuentran entre 1-2 µg/L (OMS, 2001). Existen zonas con rocas volcánicas, depósitos minerales o actividad geotermal donde excepcionalmente se pueden alcanzar valores de hasta 6400 µg/L (Nakahara *et al.*, 1978). Las distintas especies arsenicales encontradas en agua incluyen As(III), As(V), MMA(V), MMA(III), DMA(V), DMA(III) y TMAO (IARC, 2004). En aguas subterráneas no es habitual la presencia de MMA y DMA, sin embargo estas formas pueden encontrarse en aguas de lagos y estanques (Hasegawa *et al.*, 1994). La principal forma arsenical encontrada en agua subterránea es el As(V), existiendo mayores niveles en pozos profundos (> 15 m) que superficiales (Harvey *et al.*, 2002; Polya *et al.*, 2005; Agusa *et al.*, 2009). La concentración del arsénico presente en aguas subterráneas varía en función de la geología y climatología de cada zona, pudiendo

existir variaciones considerables en un mismo pozo según la estación anual y los niveles de precipitaciones.

La exposición humana a arsénico a través del agua de bebida es la principal vía de exposición a este metaloide. En determinadas zonas del planeta, las concentraciones de arsénico en el agua pueden alcanzar concentraciones del orden de mg/L, valores que exceden considerablemente los niveles máximos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (10 µg/L, OMS, 2001). Los elevados contenidos son debidos a la presencia de rocas y minerales ricos en arsénico en los acuíferos (Taiwán, Bengal, México, Chile, Argentina, Mongolia, Finlandia, Hungría y oeste de Estados Unidos) o bien a la contaminación antropogénica (Reino Unido, Grecia, Tailandia y Ghana) (Buchet y Lison, 2000). La exposición crónica a arsénico inorgánico a través del consumo de agua contaminada constituye en la actualidad un problema grave de salud, con una estimación que supone más de 140 millones de personas afectadas (Bagchi, 2007).

#### *1.3.4. Arsénico en alimentos*

Los alimentos también son una importante fuente de arsénico (JEFCA, 2011). Los mayores contenidos de arsénico aparecen en los alimentos de origen marino, los cuales presentan concentraciones muy variables del metaloide entre 0.9 y 68 µg/g (peso seco) (Muñoz *et al.*, 2000). Recientemente, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA), ha recomendado que la evaluación de riesgo asociada al consumo de arsénico en alimentos debe establecerse en base a los niveles de arsénico inorgánico y no a los contenidos totales (EFSA, 2009), ya que la toxicidad de las distintas especies arsenicales es muy variable. Así, la especiación de arsénico en pescados y mariscos ha puesto de manifiesto que la mayoría está en forma orgánica, especialmente como AB y en menor medida como AC, TMAO, TMA<sup>+</sup>, arsenoazúcares y arsenolípidos, siendo minoritaria la presencia de formas inorgánicas (Suñer *et al.*, 2002). En general estos alimentos no se consideran un riesgo para el consumidor en lo que a los contenidos de arsénico se refiere, si bien en algunos bivalvos, mejillones y almejas principalmente, se

han cuantificado altas concentraciones de arsénico inorgánico (1.2 µg/g peso húmedo) (Muñoz *et al.*, 2000).

Otros productos alimentarios presentan sin embargo, contenidos importantes de arsénico inorgánico, tal y como se muestra en la tabla adjunta (tabla 2). Es reseñable el contenido de arsénico inorgánico encontrado en algas, especialmente en el alga parda *Hizikia fusiforme*, que actualmente es el alimento donde sistemáticamente se ha encontrado los mayores contenidos de arsénico inorgánico, pudiéndose alcanzar valores de 140 µg/g (Almela *et al.*, 2002). Otros productos con contenidos considerables de arsénico inorgánico son los cereales, especialmente el arroz (Torres-Escribano *et al.*, 2008).

Debido a que el arroz es el cereal más consumido a nivel mundial y que en muchos países la mayoría de la ingesta calórica diaria está aportada por este alimento, es una matriz que ha captado el interés de la comunidad científica, existiendo numerosos trabajos que evalúan sus contenidos. Las concentraciones de arsénico total pueden variar en un amplio intervalo (30-2050 µg/kg) (Xie y Huang, 1998; Heitkemper *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2005; Mihucz *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2009). Las especies detectadas son [As(III), As(V), DMA y MMA] (Mandal y Suzuki, 2002, Williams *et al.*, 2005) con variaciones en los ratios de formas orgánicas/inorgánicas según el origen de la muestra. Algunos estudios han descrito la existencia puntual de otras formas arsenicales como ión tetrametilarsonio y arsenobetaína (Mandal *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2011). Adicionalmente, en los productos procesados del arroz tales como el miso, amasake, leche de arroz y alimentos infantiles se ha cuantificado concentraciones elevadas de arsénico (Signes-Pastor *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009).

**Tabla 2.** Contenidos de arsénico inorgánico en alimentos (JEFCA, 2011).

Productos alimenticios	<i>n</i>	<i>n</i> < LOD*	Intervalo de concentraciones (mg/kg)
Algas marinas secas	539	4	0.1–130
Arroz	837	0	0.01–0.51
Pescado y productos pesqueros	325	1	0.001–1.2
Vegetales	36	1	0.008–0.61

\*Número de muestras en las que la concentración de arsénico inorgánico fue inferior al límite de detección de la metodología analítica utilizada.

Por otro lado, para llevar a cabo una evaluación más adecuada de la exposición al metaloide a través de la dieta es importante considerar el producto tal y como se consume, ya que se ha puesto de manifiesto que los contenidos y formas arsenicales presentes inicialmente en los alimentos pueden cambiar como consecuencia de los tratamientos previos a su consumo (cocinado, lavado y pelado) (Devesa *et al.*, 2001). Los cambios más estudiados han sido los relacionados con los procesos de cocinado, donde se ha evidenciado que dependiendo del tipo de tratamiento culinario, los contenidos de arsénico pueden aumentar o disminuir respecto al producto crudo. Las pérdidas se producen por la solubilización del arsénico y los aumentos se deben a una pérdida de peso del producto, principalmente por deshidratación (Dabeka *et al.*, 1993; Devesa *et al.*, 2001a). Además de los contenidos totales, las formas arsenicales también pueden modificarse como consecuencia del proceso culinario, si bien en este sentido, los estudios son escasos. En productos pesqueros se ha puesto de manifiesto una descarboxilación de la AB, dando lugar a otra forma orgánica, TMA<sup>+</sup>, de mayor grado de toxicidad (Devesa *et al.*, 2001b; Hanaoka *et al.*, 2001). Por otro lado, hay que destacar que en países con problemas de contaminación por arsénico, el uso de agua contaminada con As(V) para el cocinado de los alimentos incrementa de forma considerable el arsénico inorgánico en el producto que finalmente se ingiere (Bae *et al.*, 2002; Ackerman *et al.*, 2005; Torres-Escribano *et al.*, 2008).

Estudios de dieta total realizados en diferentes países, sin contaminación de arsénico en agua muestran una amplia variabilidad existente en la ingesta de arsénico, con valores que oscilan desde trazas hasta 345  $\mu\text{g}/\text{día}$  de la población japonesa (Ikebe *et al.*, 1992). Por otro lado, se sabe que en países con problemas de contaminación, la mayor parte del arsénico dietario es inorgánico (Signes *et al.*, 2008), a diferencia de lo que ocurre en los países sin contaminación ambiental por este elemento, donde las formas orgánicas son las mayoritarias en la dieta (Devesa *et al.*, 2001c). Sin embargo, tal y como indicó la EFSA en 2009, existen grupos en Europa con mayor riesgo de exposición a arsénico (niños, celíacos y diversos grupos étnicos), debido al consumo de alimentos, especialmente arroz, con elevados contenidos de este metaloide.

#### 1.4. Toxicidad del arsénico

La toxicidad del arsénico depende de la especie arsenical en la que se encuentre. En la tabla adjunta (tabla 3) se muestran los valores de la dosis letal 50 ( $\text{LD}_{50}$ ) tras administraciones orales en roedores.

**Tabla 3.** Valores de  $\text{LD}_{50}$  en roedores dosificados oralmente (Heedegard y Sloth, 2011).

Especie arsenical	$\text{LD}_{50}$ (mg/kg peso corporal)
AB	> 10100
TMAO	10600
AC	>6500
DMA	1200-2600
MMA	700-1800
TMA <sup>+</sup>	890
As(V)	20-800
As(III)	15-42

El arsénico inorgánico [As(III) y As(V)] es la forma tóxica más abundante encontrada en agua y alimentos. En la actualidad, se sabe que hay formas más tóxicas

que las inorgánicas, como son el ácido monometilarsonioso [MMA(III)] y el ácido dimetilarsinioso [DMA(III)]. Su presencia en alimentos, se limita a la identificación de la forma monometilada en zanahorias cultivadas en un área altamente contaminada (Yathavakilla *et al.*, 2008), sin embargo, son especies habituales en la orina de humanos expuestos a arsénico inorgánico (Valenzuela *et al.*, 2006), lo que indica que se trata de metabolitos intermediarios formados durante su metabolismo. Estudios en distintos tipos celulares, han puesto de manifiesto que son especies con un alto grado de toxicidad (tabla 4) y con carácter genotóxico (Kligerman *et al.*, 2003; Wnek *et al.*, 2011). Estudios *in vivo* también han demostrado la mayor toxicidad del MMA(III), con una LD<sub>50</sub> en hamsters, tras administración intraperitoneal, de 29.3 µmol/kg de peso corporal, frente a 112 µmol/kg del As(III) (Petrick *et al.*, 2001).

**Tabla 4.** Valores de IC<sub>50</sub> de especies arsenicales trivalentes en cultivos celulares humanos (Styblo *et al.*, 2000).

Tipo celular	IC <sub>50</sub> (µM)		
	As(III)	MMA(III)	DMA(III)/GSH
Hepatocitos	>20	5.5	>20
Queratinocitos	>20	2.6	8.5
Células bronquiales	3.2	2.7	6.8
Células vejiga urinaria	17.8	0.8	14.2

La exposición crónica a arsénico inorgánico aumenta la prevalencia de distintos tipos de cánceres (apartado 1.4.2), así como otras patologías: diabetes tipo II, problemas cardiovasculares (hipertensión) y cerebrovasculares (infartos), enfermedades respiratorias obstructivas crónicas y manifestaciones dérmicas no carcinogénicas (hipo e hiperpigmentaciones, queratosis palmar) (figura 2) (Saha *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2004; Kapaj *et al.*, 2006). En niños, las poblaciones más susceptibles a estas exposiciones crónicas, los efectos más reportados son los relacionados con la reducción de las capacidades cognitivas (Wasserman *et al.*, 2007; Parvez *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Manifestación de arsenicosis: queratodermia plantar y palmar. Fotografías proporcionadas por Marcelo Biaggini.

#### *1.4.1. Mecanismos de toxicidad del arsénico*

Los mecanismos celulares y moleculares implicados en la toxicidad del arsénico inorgánico y de las formas arsenicales metiladas son un tema en continuo debate. La evaluación de estos mecanismos está parcialmente dificultada por la multitud de vías de señalización que se ven afectadas y por el hecho de que los efectos observados varíen en función del tiempo, la dosis, la especie arsenical y la susceptibilidad individual. A pesar de ello, en la actualidad se acepta que el estrés oxidativo es el principal mecanismo de acción del arsénico (Flora, 2011).

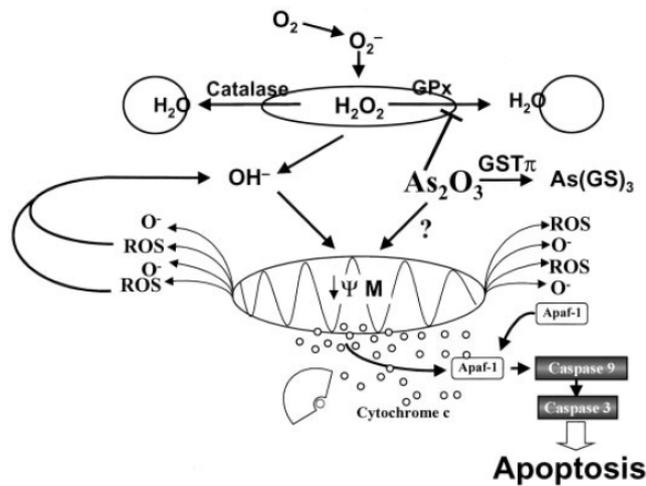
La toxicidad del As(V) se produce bien por la reducción a As(III) (Bertolero *et al.*, 1987; Ferrario *et al.*, 2008) o por interferencia directa del As(V) en distintos procesos celulares. En general, una vez se absorbe, el As(V) se reduce a As(III) principalmente en sangre e hígado, si bien parte de esta reducción también puede llevarse a cabo en el tracto gastrointestinal (Herbel *et al.*, 2002; N´emeti y Gregus, 2005). El As(V) tiene una gran similitud química con el fosfato inorgánico (Villa Bellosta y Sorribas, 2008) y es capaz de sustituirlo en las vías de glicólisis y respiración celular (Dixon, 1997). Este desacoplamiento de la fosforilación oxidativa provoca la formación de ADP-arsenato en vez de ATP, reduciendo los niveles energéticos celulares y dañando la mitocondria (Carter *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que la exposición a As(III) induce la formación de especies reactivas de oxígeno en una amplia variedad de células incluyendo células humanas de pulmón, vejiga, hígado o colon (Li *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002; Eblin *et al.*, 2006; Laparra *et al.*, 2008). Los mecanismos exactos a través de los cuales se generan distintas especies reactivas de oxígeno aún no están completamente dilucidados (Jomova y Valko, 2011). No obstante se han descrito distintas fuentes en la producción e incremento de ROS ocasionados por exposición a arsénico:

- cambios en la integridad de la membrana y descenso en el potencial de membrana mitocondrial
- generación de especies intermediarias de arsénico capaces de producir radicales libres
- liberación de hierro de la ferritina por especies arsenicales metiladas con la consiguiente generación del radical  $\cdot\text{OH}$  a partir de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$
- oxidación de As(III) a As(V)

Adicionalmente a las especies reactivas de oxígeno, la exposición a arsénico puede inducir la formación de especies reactivas de nitrógeno (Germolec *et al.*, 1996; Barchowsky *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2004; Mishra y Flora, 2008).

En la figura 3 se representa la participación de la mitocondria en la generación de especies reactivas inducidas por arsénico.



**Figura 3.** Efecto del arsénico sobre el potencial de membrana mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno, con la consiguiente inducción de apoptosis. Imagen obtenida de Miller *et al* (2002).

El As(III) se considera un elemento inerte-redox (Jomova y Valko, 2011), cuyos efectos incluyen la inducción de apoptosis o necrosis, inhibición del crecimiento, estimulación o inhibición de la diferenciación celular e inhibición de la angiogénesis (Miller *et al.*, 2002). Entre los mecanismos de acción que conducen a estos eventos está la desnaturalización de proteínas a través de interacciones con grupos sulfhidrilo (Winski *et al.*, 1995; Gebel 2000), aumento de especies reactivas de oxígeno (Ding *et al.*, 2005; Chowdhury *et al.*, 2010) y alteración de regulación génica (Rossman 2003; Mo *et al.*, 2011).

Se ha descrito que el As(III) es capaz de inhibir más de 200 enzimas (Abernathy *et al.*, 1999), entre las que cabe destacar la piruvato deshidrogenasa, cuya inhibición reduce la actividad del ciclo del ácido cítrico y la producción celular de ATP (Bergquist *et al.*, 2009). Asimismo, el As(III) es capaz de unirse directamente al receptor de glucocorticoides (GR), inhibiendo selectivamente la transcripción mediada por GR (Kaltreider *et al.*, 2001) y modificar distintas vías de señalización celular mediadas por

proteína kinasas, tirosina fosfatasas o NFκβ (Miller *et al.*, 2002). También se ha demostrado la capacidad del As(III) de activar los receptores de estrógenos y de afectar el citoesqueleto celular por interacción con los grupos sulfhidrilo de la actina y tubulina (Li y Broome, 1999; Binet *et al.*, 2006; Izdebska *et al.*, 2009).

En los últimos años, se han incorporado a los estudios de toxicidad del arsénico otras formas químicas, especialmente el MMA(III) y DMA(III), debido a su elevada toxicidad. Se ha evidenciado su participación en la generación de especies reactivas de oxígeno en diversos sistemas celulares, así como en la inducción de transformaciones y desarrollo de carcinogénesis (Mass *et al.*, 2001; Nesnow *et al.*, 2002; Kadiiska *et al.*, 2004, Naranmandura *et al.*, 2011a, 2011b). Adicionalmente a las formas metiladas trivalentes, se han identificado otros metabolitos intermediarios en los procesos de metilación del arsénico inorgánico (Suzuki *et al.*, 2004), entre ellos las formas tioladas [MMMTA(V), DMMTA(V) y DMDTA(V)]. En células humanas de vejiga urinaria se ha evidenciado que el DMMTA(V) es especialmente tóxico, principalmente por la generación de estrés oxidativo (Naranmandura *et al.*, 2011a). La reciente identificación de estas especies y la escasez de estudios que evalúen su toxicidad en distintos sistemas celulares así como en modelos *in vivo*, abren un nuevo campo de estudio para la toxicología del arsénico.

#### 1.4.2. Arsénico y cáncer

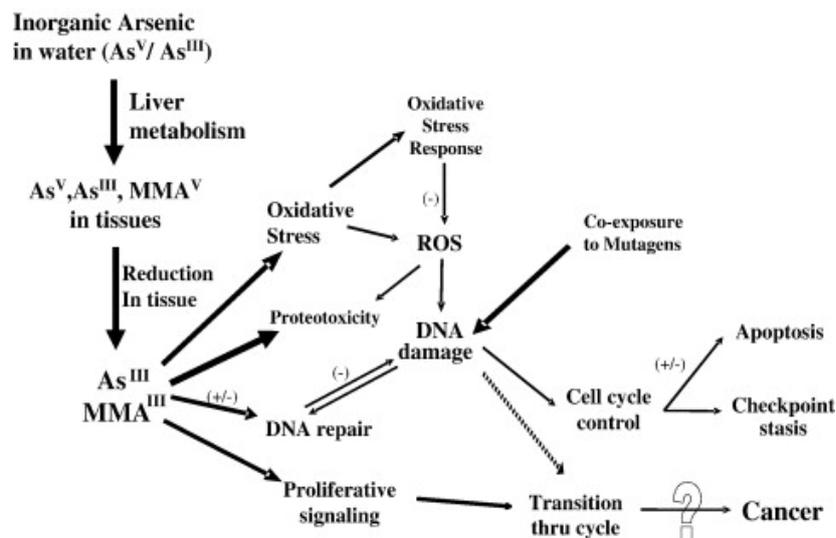
El arsénico inorgánico está considerado por la agencia internacional de investigación sobre el cáncer (IARC) como un carcinógeno para el hombre, mientras que el DMA(V) está clasificado como cancerígeno en animales (tipo 2B) (IARC, 2004).

Existen numerosos estudios epidemiológicos que han evaluado la asociación entre la exposición a arsénico a través de la ingesta de agua contaminada y el desarrollo de cáncer en distintos órganos, especialmente piel, pulmón, hígado y vejiga urinaria, aunque también se contempla un incremento en la prevalencia de cáncer de colon y riñón (Chen *et al.*, 1988, 1992; IARC, 2004; EFSA, 2009). Si bien no existen muchas referencias que reporten un aumento en la incidencia de cáncer a nivel gastrointestinal por exposición arsénico (Chen *et al.*, 1985; Acharya *et al.*, 2010), se ha observado un descenso en la mortalidad por cáncer de colon tras suministrar agua no contaminada a individuos de una zona con hidroarsenicismo crónico endémico (Yang *et al.*, 2008). Sin embargo, la asociación entre exposición a arsénico e incidencia de cáncer de colon basada en el criterio de reversibilidad, sólo se ha demostrado para hombres, indicando diferencias específicas de género en los distintos procesos relacionados con la toxicidad del arsénico (Yang *et al.*, 2008).

Otras formas arsenicales también tienen un efecto promotor de tumores, al menos en modelos animales o en sistemas *in vitro*. Así, DMA(V), MMA(V) y TMAO son promotores de tumores en diversos órganos en roedores (Yamamoto *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998, Wanibuchi *et al.*, 2004). El DMA(V) tiene, además, actividad carcinogénica completa sobre la vejiga urinaria de ratas expuestas crónicamente a través de agua o alimentos contaminados (Wei *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2006). Los estudios a largo plazo en roedores dosificados con MMA(V) muestran toxicidad gastrointestinal, con procesos inflamatorios, ulceraciones y metaplasias (Lu *et al.*, 2003), sin embargo, no han mostrado efectos cancerígenos. En cuanto a la forma monometilada trivalente, Escudero-Lourdes *et al.* (2010, 2012) demostraron la capacidad del MMA(III) de producir transformación maligna de células de vejiga urinaria (UROtsa) tras exposiciones crónicas a este metabolito del arsénico inorgánico.

Debido a los efectos pleiotrópicos del arsénico y las variaciones observadas en distintas condiciones experimentales existe un amplio campo de estudio en el que profundizar.

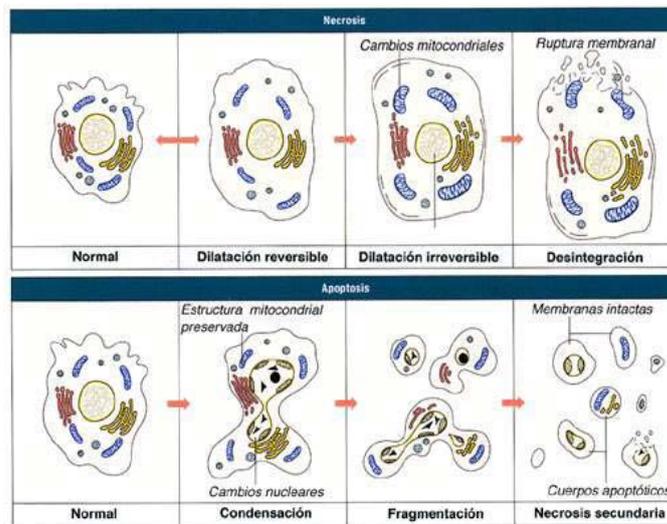
A pesar de estar ampliamente reconocida esta capacidad carcinogénica, especialmente del arsénico inorgánico, los mecanismos de acción que conducen al desarrollo del cáncer en individuos expuestos a arsénico todavía no están completamente descritos (Rossman, 2003). Hasta el momento se sabe que la inducción de tumores por el arsénico inorgánico se produce a través de múltiples efectos sobre vías de transducción de señales, activación de factores de transcripción y cambios en la expresión de genes relacionados con la proliferación y crecimiento celular (Singh *et al.*, 2011). Asimismo se ha descrito la capacidad de este metaloide de afectar directamente al ADN o a los procesos de reparación del mismo, dando lugar a deleciones, daños cromosómicos, aneuploidía, formación de micronúcleos, entrecruzamientos ADN-proteína o intercambio de cromátidas hermanas (Lage *et al.*, 2006). La figura 4 muestra la asociación descrita por Clewell *et al.* (2007) entre arsénico inorgánico, estrés oxidativo y cáncer.



**Figura 4.** Asociación entre arsénico, estrés oxidativo y cáncer (Clewell *et al.*, 2007).

1.4.3. Muerte celular

La muerte celular se puede definir como una pérdida irreversible de la integridad de la membrana plasmática. Generalmente, en función de diferencias morfológicas, los tipos de muerte celular se clasifican en apoptosis o muerte celular programada (condensación y fragmentación de la cromatina, disminución del volumen celular, condensación y vacuolización del citoplasma, fragmentación nuclear), necrosis (dilatación de las organelas citoplasmáticas, ruptura de la membrana celular, liberación de factores que generan inflamación local) y autofagia (formación de vesículas autofágicas que se degradan por la propia célula a través del sistema lisosomal). En los últimos años se han definido otros tipos de muerte celular tales como paraptosis, catástrofe mitótica, muerte celular programada similar a la necrosis (*necrosis-like* PCD) o muerte celular programada similar a la apoptosis (*apoptosis-like* PCD). La figura 5 muestra un esquema de los cambios morfológicos en las células durante los procesos de apoptosis y necrosis.



**Figura 5.** Representación esquemática de las diferencias morfológicas entre los procesos necróticos y apoptóticos. Imagen obtenida de <http://retina.umh.es>.

Entre las principales moléculas implicadas en los procesos apoptóticos están las caspasas, cisteín proteasas que según la especificidad de sustrato y función se organizan en iniciadoras (caspasas-2, -8, -9 y -10) y de ejecución (-3, -6, y -7) (Pulido y Parrish, 2003). Las caspasas iniciadoras presentes en forma de procaspasas, son activadas por distintos factores externos o señales intracelulares (Kaufmann y Hengartner, 2001). Las caspasas ejecutoras, también en forma de procaspasas, se activan por proteólisis de alguna de sus subunidades y, una vez activadas, degradan específicamente componentes vitales de la célula. Entre las caspasas ejecutoras, una de las más importantes es la caspasa-3 (Pulido y Parrish, 2003).

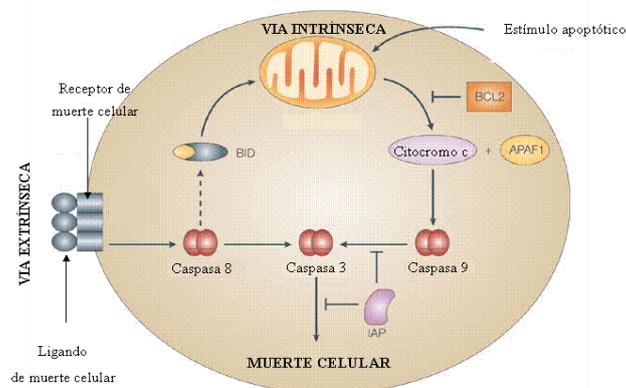
Están descritas dos vías principales de inducción de la apoptosis, la vía extrínseca y la intrínseca. Ambas convergen en la activación de caspasas-3 y -7 (Tait y Green, 2010). En la vía extrínseca, distintas señales o ligandos interactúan con receptores de muerte celular localizados en la membrana de la célula y se produce la activación de la caspasa-8, que a su vez activa a las caspasas 3 y 7 (figura 6).

La vía intrínseca implica una disrupción de la homeostasis intracelular que afecta especialmente a la mitocondria, con cambios en el potencial de membrana y liberación de citocromo c y factor inductor de la apoptosis (AIF). El citocromo c interactúa con el factor de activación de apoptosis (APAF-1) para formar el apoptosoma, que activa finalmente a la caspasa-9, que a su vez activa a las caspasas-3 y -7. El AIF activa enzimas que degradan el ADN y conducen a la muerte celular programada de forma independiente a la activación de caspasas (figura 7).

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial están controlados principalmente por interacciones entre miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia de genes de linfoma de células B 2 (BCL2). BAX y BID, entre otros, son factores apoptóticos, mientras que entre los factores anti-apoptóticos podemos encontrar BCL2, BCL-XL y MCL1. Adicionalmente, BCL2 interactúa con IAP (proteínas inhibidoras de apoptosis) para regular este proceso de muerte celular (Tait y Green, 2010).

El efecto apoptótico del arsénico, especialmente del As(III), se ha descrito en multitud de trabajos, asociándolo principalmente al estrés oxidativo y a la regulación de la vía mitocondrial o intrínseca de la apoptosis (Franco *et al.* 2009). También se ha evidenciado la inducción de factores pro-apoptóticos de la familia BCL2, así como la activación de receptores de muerte celular (vía extrínseca) por el As(III) (Franco *et al.* 2009). Recientemente, Naranmandura *et al.* (2011b), han puesto de manifiesto la importancia de la mitocondria en el efecto tóxico del MMA(III) y DMA(III).

A pesar de considerarse la apoptosis como uno de los principales mecanismos efectores del arsénico, se ha descrito la inducción de necrosis (Scholz *et al.*, 2005; Lew *et al.*, 1999) y autofagia (Kanzawa *et al.*, 2003, 2005; Yang *et al.* 2008).



**Figura 6.** Vías de activación de la apoptosis. Imagen modificada de Andersen et al. (2005).

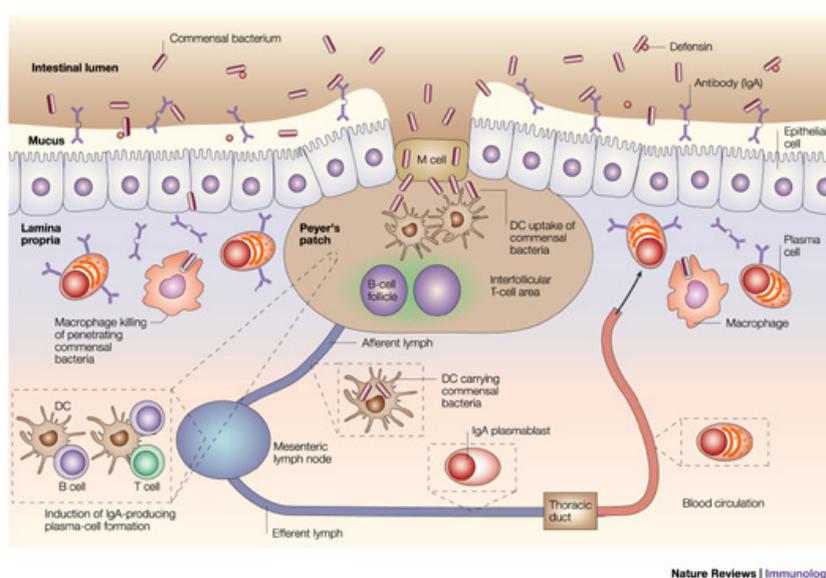
## 1.5. Arsénico y respuesta inmune

### 1.5.1. Una visión general de la respuesta inmune intestinal

El tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT) supone la mayor masa de tejido linfoide del organismo y se distribuye en tejidos linfoides agregados (folículos asociados a las placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos) o en tejido linfoide

difuso distribuido en la lámina propia de la mucosa o en el epitelio intestinal (linfocitos intraepiteliales).

Las células epiteliales intestinales, debido a su localización anatómica juegan una importante función en la modulación de la respuesta inmune, ya que suponen la puerta de entrada para los antígenos luminales, con los que están permanentemente en contacto. Uno de los aspectos clave en la regulación inmunológica intestinal consiste en la adecuada interacción entre la célula epitelial y las células del sistema inmune. La célula epitelial procesa y transporta los antígenos hacia la lámina propia y puede actuar también como célula presentadora de antígeno. En la figura 7 se representa el ambiente inmune y los distintos tipos celulares presentes en el intestino que participan en la respuesta inmune. En condiciones normales, la presentación de antígenos luminales normales por parte de células epiteliales provoca una supresión o inactivación de la respuesta inmunitaria, concepto que se ha descrito como tolerancia oral (MacDonald, 2001).



**Figura 7.** Ambiente inmune intestinal y defensa intestinal contra las bacterias comensales. Imagen obtenida de MacPherson y Harris (2004).

### 1.5.2. Respuesta inmune innata y adaptativa

La respuesta frente a patógenos o sustancias potencialmente dañinas para el organismo se ha dividido en respuesta inmune innata y específica, si bien en los últimos años se ha incrementado el conocimiento sobre la complejidad de las interacciones entre ambos procesos y su estrecha conexión.

La inmunidad innata se caracteriza por una falta de especificidad frente al patógeno, ausencia de memoria inmunológica y respuesta rápida sin necesidad de maduración o inducción de linfocitos. Está formada por las barreras epiteliales (piel, membranas mucociliares) que separan el ambiente externo del interno y que a través de distintos mecanismos (acidificación pH, secreción de péptidos antimicrobianos, tasas de renovación celular elevadas, movimientos ciliares y peristálticos) impiden la entrada de sustancias o microorganismos patógenos. Si estas barreras se dañan y los agentes infecciosos entran en el organismo se desencadena un proceso de inflamación aguda que combina factores humorales y celulares.

Íntimamente asociada a la inmunidad innata se desarrolla también la inmunidad adquirida o adaptativa. En este caso se trata de una inmunidad específica contra el antígeno y capaz de generar memoria inmunológica. Durante el desarrollo de la inmunidad adquirida, a nivel intestinal, los linfocitos de las placas de Peyer tras su activación por contacto con antígenos proliferan con especificidad clonal y pasan a sangre, desde donde migran de nuevo a la lámina propia. Aquí se alojan los linfocitos T CD4+ (linfocitos T colaboradores activados) y los linfocitos B se transforman a células plasmáticas productoras de IgA específica contra los distintos antígenos (MacDonald, 2001). Ante un nuevo contacto con el antígeno, los linfocitos T proliferan y se desencadena una respuesta inmunológica celular y un estímulo para que los linfocitos B se transformen en células plasmáticas (Borruell *et al.*, 2003).

Una de las claves fundamentales para el correcto funcionamiento del sistema inmune consiste en la diferenciación entre lo propio y lo extraño (Medzhitov, 2002). Especialmente importante en este proceso es el reconocimiento de estructuras o productos del metabolismo microbiano. Estas estructuras, llamadas patrones

moleculares asociados a patógenos (PAMPs) incluyen el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de bacterias gram-negativas, entre otras muchas moléculas. El reconocimiento de PAMPs se lleva a cabo a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), presentes en macrófagos, linfocitos, células dendríticas, endoteliales y epiteliales (Bianchi, 2007). Uno de los PRRs más importantes en el reconocimiento de patógenos e iniciación de la respuesta inmune son los *toll like receptors* (TLR) (Takeda y Akira, 2004). Las células epiteliales intestinales expresan concentraciones bajas de este tipo de receptores como mecanismo para mantener una situación de ausencia de respuesta o respuesta limitada frente al estímulo continuo de LPS de bacterias comensales (Abreu, 2001, 2002).

### 1.5.3. Citoquinas

Las citoquinas, glicoproteínas de bajo peso molecular, agrupan interleuquinas, quimioquinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral. Todos estos compuestos actúan de forma autocrina o paracrina, modulando la respuesta inmune, el crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas, la regeneración tisular y la angiogénesis, entre otras (Lage *et al.*, 2006).

Funcionalmente, estas moléculas presentan retroregulaciones positivas y negativas y actúan en general en combinación con otras citoquinas que también modulan su acción. Al actuar sobre diferentes tipos celulares ejercen múltiples efectos (pleiotrópicas) e igualmente comparten muchos de ellos (redundantes).

La correcta regulación entre las citoquinas que inducen la inflamación o proinflamatorias y las que reducen o bloquean el proceso inflamatorio (antiinflamatorias) es fundamental para evitar alteraciones patológicas asociadas con la respuesta inmune. Las citoquinas proinflamatorias, en conjunto, son capaces de inducir una cascada de productos génicos, tales como fosfolipasa A2 (PLA2), ciclooxigenasa-2 (COX-2) y sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), en respuesta a distintos estímulos. Otros genes proinflamatorios son los que dan lugar a quimiocinas, moléculas

que provocan un incremento de la adhesión y/o activación de eosinófilos, linfocitos T y B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos. Su función es crítica en la iniciación y promoción de la respuesta inflamatoria, ya que regulan la afluencia de los leucocitos al sitio de la inflamación. Una de las quimiocinas más estudiadas es la quimiocina atrayente de neutrófilos o IL8 (Dinarello, 2000). Se conoce que en respuesta a la invasión o colonización del epitelio intestinal por microorganismos, las células epiteliales secretan principalmente IL8 con el fin de reclutar de células inmunes, especialmente neutrófilos, que traslocan a través del epitelio y realizan su actividad antibacteriana a nivel luminal (Sansonetti 2004). Asimismo, se ha evidenciado su importante participación en la regulación del microambiente tumoral, promoviendo la angiogénesis, la proliferación y la migración celular (Waugh y Wilson, 2008).

Distintos factores pueden desencadenar la expresión de genes proinflamatorios, entre ellos las endotoxinas, pero también IL1 y TNF $\alpha$  (Van de Walle *et al.*, 2010). Estas dos citoquinas, en respuesta a infección, trauma, isquemia, toxinas o células T activadas, inician la cascada de mediadores de la inflamación y son capaces de inducir la producción de IL6, -8 y -12 (Sewnath *et al.*, 2000; Sands, 1997).

Adicionalmente se ha descrito que en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) los niveles de TNF $\alpha$ , IL8 e IL6 en la mucosa intestinal están elevados, asociándose los niveles de estas citoquinas con la patogénesis y el nivel de daño tisular (Reimund *et al.*, 1996a, 1996b; Atreya *et al.*, 2000; Dube *et al.*, 2004).

Las citoquinas antiinflamatorias bloquean o suprimen la intensidad de la cascada inflamatoria. Así, IL4, IL10, IL13 y TGF- $\beta$  suprimen la producción de IL1, TNF $\alpha$  e IL8 (Dinarello 2000). El equilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del individuo. Se ha demostrado que la delección del gen de la IL10 en ratón induce espontáneamente al desarrollo de inflamación intestinal grave, demostrando la importancia y complejidad de la regulación de todos los componentes que participan en la respuesta inmune.

#### 1.5.4. Arsénico e inmunidad.

La forma arsenical más evaluada en este campo ha sido el arsénico inorgánico. La afectación de la actividad de linfocitos, monocitos y macrófagos por este metaloide, con la consiguiente inmunosupresión, se ha descrito en múltiples estudios epidemiológicos, *in vivo* o *in vitro* (Gonsebatt *et al.*, 1994; Lantz *et al.*, 1994; Duker *et al.*, 2005; Sakurai *et al.*, 2004; Soto-Peña *et al.*, 2006, 2008; Bourdonnay *et al.*, 2009a; Banerjee *et al.*, 2009). También se ha puesto de manifiesto que el arsénico inhibe la activación y proliferación de células T a través del eje TNF $\alpha$  (Chu *et al.* 2010), así como la respuesta mediada por anticuerpos en ratones (Burns *et al.*, 1991). Fry *et al.*, (2007), a través de una aproximación transcriptómica, han evidenciado que la exposición prenatal a arsénico actúa como un estímulo inflamatorio capaz de activar la cascada de activación mediada por NF $\kappa$ B, mientras que Raqib *et al.* (2009) han observado que la exposición durante el periodo prenatal a arsénico reduce el desarrollo del timo y aumenta la morbilidad debida a infecciones respiratorias. Otros estudios han propuesto la activación de respuestas inmunes por arsénico (Yoshida *et al.*, 1987), no quedando clara la relación de dosis dependencia en la respuesta inmunotóxica de este metaloide (Lage *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha comprobado el incremento en la secreción de diversas citoquinas proinflamatorias tras exposición a MMA(III) en células de vejiga urinaria (Escudero-Lourdes, 2010; 2011).

A pesar de los numerosos estudios al respecto, los efectos del arsénico sobre el sistema inmune todavía tienen multitud de aspectos desconocidos, especialmente relacionados con el efecto dosis-respuesta y las consecuencias debidas a exposiciones crónicas a bajas concentraciones del tóxico.

## 1.6. Toxicocinética

### 1.6.1 Absorción

#### 1.6.1.1. Concepto de biodisponibilidad oral

La biodisponibilidad oral se puede definir como la fracción de elemento absorbida en el tracto gastrointestinal que llega a la circulación sistémica (Caussy, 2003). Como primera aproximación en el estudio de la biodisponibilidad de nutrientes, fármacos o tóxicos se evalúa la bioaccesibilidad, máxima fracción del compuesto que es capaz de solubilizarse desde de la matriz en el tracto gastrointestinal (fracción bioaccesible) y por tanto está disponible para su absorción (Oomen *et al.*, 2002). Adicionalmente, la biodisponibilidad depende del proceso de absorción en la mucosa gástrica y/o intestinal y de las posibles transformaciones debidas al metabolismo intestinal o hepático, que pueden modificar la forma química del compuesto absorbido antes de que este alcance los órganos diana (Ruby *et al.*, 1999). Existen numerosos factores que pueden afectar a la biodisponibilidad, tanto intrínsecos (variabilidad interindividual, edad, estado fisiológico y nutricional, patologías, flora intestinal) como extrínsecos (aporte dietético, forma química, solubilidad, interacciones con alimentos) (Barberá y Farré, 1992).

#### 1.6.1.2. Distintas aproximaciones al estudio de la biodisponibilidad oral

La evaluación de la biodisponibilidad puede llevarse a cabo mediante estudios *in vivo* y/o *in vitro*. Los métodos *in vivo* consisten en la administración oral de la sustancia a evaluar a humanos o a modelos animales. El análisis de la sustancia que alcanza la circulación sistémica mediante la extracción de sangre a distintos tiempos y la comparación con el nivel en sangre tras la administración intravenosa permite conocer la biodisponibilidad absoluta del compuesto.

El sistema *in vivo* aporta la mejor estimación de la biodisponibilidad de micronutrientes (Van Campen y Glahn, 1999), sin embargo, debido al carácter tóxico del arsénico, los estudios realizados en humanos son escasos (Bettley y O'Shea, 1975; Crecelius, 1977; Mappes, 1977; Hollins *et al.*, 1979; Tam *et al.*, 1979; Pomroy *et al.*, 1980; Buchet *et al.*, 1981; Johnson y Farmer, 1991; Koch *et al.*, 2007; He y Zheng,

2010). Estos estudios indican una elevada absorción del arsénico en distintas formas, en la mayoría de casos superior al 50%. En estos estudios, la biodisponibilidad del arsénico se calcula de forma indirecta, evaluando la tasa de excreción de arsénico en orina y/o heces tras la administración de soluciones de arsénico o dietas controladas. Esta aproximación puede realizarse debido a que el arsénico se elimina de forma rápida de la circulación sanguínea y se excreta principalmente por orina (He y Zheng 2010). El balance de masas puede subestimar la biodisponibilidad ya que parte del arsénico absorbido se elimina por heces (Tam *et al.*, 1979) y se acumula en uñas (Karagas *et al.*, 2000, 2001), pelo y piel (Koch *et al.*, 2007), así como en distintos órganos.

Como alternativa a los estudios en humanos se han empleado animales de experimentación para estudiar la biodisponibilidad del arsénico, si bien hay que tener en cuenta las diferencias entre el metabolismo animal y humano (Wienk *et al.*, 1999), factor que puede afectar significativamente a los resultados obtenidos y a la posibilidad de interpolar datos entre especies. A este respecto se ha demostrado que los monos títi y los chimpancés no son capaces de metilar el arsénico inorgánico (Vahter, 1999), mientras que Drobna *et al.* (2010a) observaron distintos patrones de metilación en hepatocitos de perros, macacos y ratas frente a hepatocitos de conejos, ratones y humanos.

Diversos estudios han evaluado la biodisponibilidad de arsénico en modelos animales (primates, cerdos, perros, conejos y roedores). Algunos de los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5. Los primates se consideran el modelo más cercano a los humanos, si bien las consideraciones éticas y el elevado coste que implica su mantenimiento han hecho que los estudios en esta especie sean escasos (Roberts *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 1995). Con modelos porcinos se ha evaluado la biodisponibilidad de arsénico desde suelos, matriz sobre la que se han realizado el mayor número de estudios de biodisponibilidad de arsénico, así como desde distintos alimentos.

**Tabla 5.** Estudios de biodisponibilidad de arsénico realizados *in vivo* mediante el uso de modelos animales.

Referencia	Especie animal	Exposición realizada	% arsénico biodisponible
<b>SUELOS</b>			
Freeman <i>et al.</i> , 1993	Conejo blanco de Nueva Zelanda	Suelo (3900)	48
Groen <i>et al.</i> , 1994	Perros	Suelo (339)	8.3
Freeman <i>et al.</i> , 1995	Macacos	Suelo (410)	13.8
Ng <i>et al.</i> , 1998	Ratas Wistar macho	Media de 16 suelos (1136)	27.5±13.2
Casteel <i>et al.</i> , 2001	Cerdos	Suelos	18-45
<b>SOLUCIONES ACUOSAS</b>			
Fullmer y Wasserman, 1985	Pollos White Leghorn	Soluciones de As(V) (1 mM; 75 ppm)	59.7±2.1 (% en sangre) y 31±1 (% en mucosa intestinal)
González, Aguilar y Martínez, 1995	Ratas Wistar macho	Soluciones de As(V) (3-240 µg/mL)	4-93.7 (% en sangre) 68.5-82.6 (% excreción)
Juhasz <i>et al.</i> , 2006	Cerdos	Soluciones de MMA, DMA, As(III) y As(V) (20 µg As/kg)	Biodisponibilidad absoluta para MMA, DMA, As(III) y As(V): 16.7±5, 33.3±1.7, 103.9±25.8, 92.5±22.3
<b>ALIMENTOS</b>			
Juhasz <i>et al.</i> , 2008	Cerdos	Acelga (dosis: 2.2-2.3 µg As/kg) Rábano (38.8-72.2 µg As/kg) Lechuga (1.9-4 µg As/kg) Judías (9.0-19.9 µg As/kg)	Biodisponibilidad absoluta Acelga: 52 ± 18 Rábano: 77 ± 20 Lechuga: 50 ± 13 Judías: 98 ± 23
Juhasz <i>et al.</i> , 2006	Cerdos	Arroz (3.3-20.2 µg As/kg)	Biodisponibilidad absoluta 33-89%

Debido a los inconvenientes que presentan los estudios *in vivo*, tales como el elevado coste, dificultades técnicas, reducido número de datos y controversia ética, se han desarrollado métodos *in vitro* como alternativa al empleo de animales de experimentación. En 1996, Ruby *et al.*, desarrollaron un sistema para determinar la bioaccesibilidad oral del arsénico y plomo en suelos. La biodisponibilidad oral *in vivo* de estas mismas muestras se había testado previamente en conejos (Freeman y col, 1993) y macacos (Freeman y col, 1995), observándose una buena correlación de los estudios *in vivo* con los *in vitro*. El sistema *in vitro* desarrollado se denominó test de extracción fisiológico o *physiologically based extraction test* (PBET) (Ruby *et al.*, 1996) y simulaba parámetros fisiológicos tales como pH gástrico e intestinal, masa de muestra, volumen de fluido, tasa de vaciado estomacal y tiempo de tránsito intestinal.

Desde entonces se han desarrollado nuevos métodos basados en modificaciones de PBET, consistentes en tratamientos secuenciales enzimáticos en dos etapas, gástrica con pepsina a pH 1.8-2.5, e intestinal con pancreatina y sales biliares a pH 5-6.5 y posterior estimación de la fracción soluble del componente estudiado (fracción bioaccesible) o dializable a través de una membrana de determinado tamaño de poro. Los distintos modelos *in vitro* (SBET, DIN, RIVM, SHIME, TIM, IVG, Artificial Biofluid, GFE) modifican parámetros como cantidad de muestra, adición de componentes alimentarios, presencia o no de saliva o microorganismos, enzimas empleadas en la etapa gástrica e intestinal, volumen y tiempos de ensayo.

Terminado el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* se estima la fracción soluble del componente estudiado o la fracción dializable a través de una membrana con un determinado tamaño de poro. Estas aproximaciones basadas en la solubilidad miden la cantidad de componente en el sobrenadante obtenido por centrifugación (Crews *et al.*, 1983) o filtración (Narasingarao y Prabhavathi, 1978) y representa la fracción máxima del compuesto disponible para ser absorbido (Versantvoort *et al.*, 2005). La incorporación de esta fracción soluble a células del epitelio intestinal crecidas sobre soportes microporosos sólidos y la determinación de la retención o transporte a través de esta monocapa celular proporciona una aproximación a la biodisponibilidad oral (Moreda-Piñeiro *et al.*, 2011).

El empleo de estos modelos ha sido propiciado por su rapidez, relativo bajo coste, sencillez, posibilidad de un gran número de réplicas y mejor control de las variables experimentales. Estos métodos proporcionan estimaciones relativas de la biodisponibilidad (tabla 6), ya que no tienen en cuenta determinados factores fisiológicos intrínsecos del organismo (estado nutricional, secreción gastrointestinal, flora intestinal, transporte activo, interacciones con la mucosa, cinética del tránsito intestinal) (Van Campen y Glahn, 1999; Wienk *et al.*, 1999).

**Tabla 6.** Estudios de bioaccesibilidad/biodisponibilidad *in vitro* de distintas formas arsenicales desde alimentos. Tabla modificada de Moreda-Piñeiro *et al.* (2011).

Referencia	Especies arsenicales	Muestra	Resultados
Laparra <i>et al.</i> , 2003; 2004	As total, iAs [As(III) y As(V)]	Algas comestibles	Bioaccesibilidad As total y iAs: 32-77.2% y se incrementa tras el cocinado (65.7-87.9%) Bioaccesibilidad: As(III): 36-94%, As(V): 5-51%
Almela <i>et al.</i> , 2005	Glicerol ribosa, ribosa fosfato, ribosa sulfonato y ribosa sulfato	Algas comestibles	As total bioaccesible en algas crudas y cocinadas: 38-87% y 57-106% respectivamente. Glicerol, fosfato, sulfonato y sulfato ribosa en algas crudas: 80-124%
Laparra <i>et al.</i> , 2005b	iAs [As(III) y As(V)]	Arroz	Bioaccesibilidad: iAs en arroz cocinado (63-100%), As(III): 3-20%, As(V): 60-90% % de retención y transporte en células Caco-2 (3.9-71.8%)
Koch <i>et al.</i> , 2007	iAs, MA, DMA, formas orgánicas	Algas y almejas	Bioaccesibilidad del As total (44±7% y 78±15%) y iAs (86±42% y 45±7%) en almejas y algas, respectivamente.
Laparra <i>et al.</i> , 2007	MMA, DMA, AB, TMAO, TETRA	Pescados (lenguado, halibut y DORM-2)	Bioaccesibilidad del As total (79.2-102%). Bioaccesibilidad de AB (68-124%) Bioaccesibilidad de DMA (32%) y TMAO (80%) Transporte de AB en células Caco-2: 12%
Dufailly <i>et al.</i> , 2008	As(III), As(V), MMA, DMA, AB, AC, TMAO	Muestras de referencia de pescado y marisco	Arsénico total bioaccesible en el método de liberación continuo en línea: 42-59% y en el método estático: 52-69%
Williams <i>et al.</i> , 2009	As(III) y As(V)	Cangrejo	Bioaccesibilidad del arsénico > 69%
Torres-Escribano <i>et al.</i> , 2011	Arsénico total	Muestra de referencia de alga y pescado	Bioaccesibilidad del arsénico total el alga y pescado, respectivamente, en método estático (SM) (72% y 71%) y dinámico (TIM-1) (47-67%)

Además de los procesos de absorción, durante el tránsito a lo largo del tracto intestinal pueden producirse transformaciones de las especies arsenicales. Varios trabajos han puesto de manifiesto que el contenido del ciego intestinal de roedores o la flora aislada de heces de animales, reducen el As(V) a As(III) y/o modifican el arsénico inorgánico dando lugar a especies de mayor grado de metilación (Hall *et al.*, 1997). Sólo recientemente se ha reportado resultados del efecto de la flora intestinal humana sobre las formas químicas de arsénico a nivel intestinal. Van de Wiele *et al.* (2010) observaron una elevada capacidad de metilación del arsénico inorgánico por parte de microflora colónica, con la consiguiente formación de distintos metabolitos monometilados [MMA(V), MMA(III) y (MMATA(V))], siendo la forma tiolada la mayoritaria. El mismo grupo ha demostrado la presencia de MMA(III), DMA(III) y MMMTA(V) tras incubar arroz contaminado con arsénico con microorganismos cecales humanos, demostrando la importancia de las biotransformaciones a este nivel y la necesidad de estudiar los procesos de absorción y toxicidad de formas arsenicales hasta el momento no evaluadas (Alava *et al.*, 2012). Estas transformaciones de la flora bacteriana entérica pueden conllevar a su vez cambios importantes en la absorción y en el efecto que el arsénico puede ejercer en el organismo y en el propio sistema gastrointestinal.

### **1.6.2. Distribución y excreción**

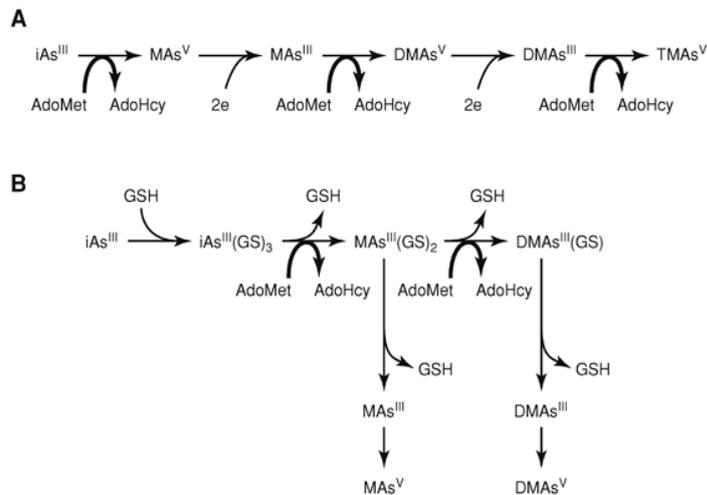
La distribución del arsénico en sangre es la principal forma de transporte a los distintos órganos y su eliminación de la misma es un proceso relativamente rápido. En sangre, las especies inorgánicas de arsénico se encuentran unidas a grupos sulfhidrilo de proteínas y moléculas de bajo peso molecular como el GSH (NRC, 1999). En humanos, los músculos, huesos, riñones y pulmones presentan los mayores contenidos de arsénico, junto con las uñas, pelo y piel, debido a su acumulación en estos tejidos ricos en proteínas con grupos SH. El mayor tiempo de retención del arsénico inorgánico se ha evidenciado en piel (Marafante *et al.*, 1987), pelo, epitelio escamoso del tracto gastrointestinal superior, epidermis, tiroides, esqueleto (Lindgren *et al.*, 1982). El As(III) y As(V), así como sus derivados

metilados son capaces de atravesar la placenta en distintos modelos animales (EPA, 2009). Los niveles de arsénico en cordón umbilical de neonatos son similares a los de la madre en sangre, indicando que la transferencia transplacentaria de arsénico también se produce en humanos (Concha *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2007). Los niveles de retención en riñones, hígado, bilis, cerebro, huesos, piel y sangre son 2-25 veces superiores tras exposición a la forma trivalente frente a la pentavalente (EPA, 2009). La eliminación del arsénico inorgánico en humanos presenta un comportamiento trifásico, con la principal vía de excreción por orina y con una excreción minoritaria a través de heces y sudor. Estudios llevados a cabo en humanos indican que aproximadamente un 66% del arsénico administrado se excreta renalmente con una vida media de 2.1 días, el 30% con una vida media de 9.4 días y el 4% restante con una vida media de 38.4 días (Pomroy *et al.*, 1980).

### **1.6.3. Metabolismo**

El estudio del metabolismo de las formas arsenicales presentes en agua y alimentos se ha centrado en el arsénico inorgánico, debido a su elevada toxicidad. En la actualidad, existen dos vías propuestas de metabolismo del arsénico inorgánico (Figura 8, Drobna *et al.*, 2009). En ambos casos, se forman intermediarios mono [MMA(III), MMA(GS)<sub>2</sub> o MMA(V)] y dimetilados [DMA(III), MMA(GS) o DMA(V)]. Los procesos de metilación, comunes en ambas vías (A y B), requieren la S-adenosilmetionina (SAM) como dador de grupos metilo.

En la primera vía (A), propuesta en la década de los 30 por Challenger, hay una reducción previa a la metilación que requiere de un dador de electrones. Waters *et al.* (2004a) pusieron de manifiesto en un estudio *in vitro* la posible participación en el proceso de reducción de distintos sistemas endógenos (Trx/TR/NADPH, Grx/GR/NADPH y DHLA/TR/NADPH) y de sustancias reductoras de origen exógeno [ditiotreitól y tris(2-carboxietil)fosfina]. En la segunda vía (B), las formas arsenicales forman complejos con GSH previo a su metilación, sin necesidad de que tengan lugar procesos de reducción (Hayakawa *et al.*, 2005).

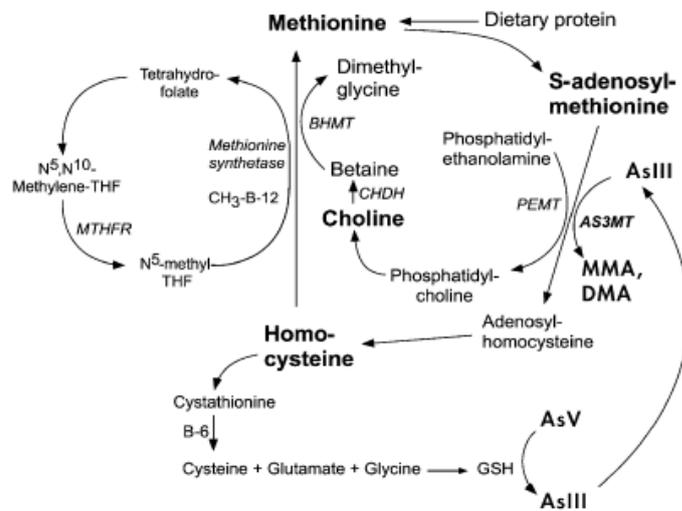


**Figura 8.** Posibles rutas metabólicas de las formas inorgánicas del As (Drobna *et al.*, 2009). AdoMet, S-adenosilmetionina; AdoHcy, S-adenosilhomocisteína.

Durante muchos años ha existido debate sobre los enzimas responsables de llevar a cabo este proceso metabólico. En la actualidad, se acepta que la arsénico-3 metiltransferasa (AS3MT), caracterizada por Lin *et al.* (2002), es el principal enzima en el proceso de metilación del arsénico inorgánico. Estudios posteriores (Waters *et al.*, 2003, Thomas *et al.*, 2007) han mostrado que este enzima es la responsable de las transformaciones desde el As(III) hasta las formas dimetiladas o trimetiladas. En algunos sistemas celulares, se ha podido constatar que el silenciamiento génico de este enzima reduce de forma considerable la metilación del arsénico inorgánico (Drobna *et al.*, 2006), aunque no de forma completa. También Drobna *et al.* (2009), tras silenciar el gen de la As3mt en ratón no observaron una completa inhibición de la metilación, sugiriendo vías alternativas que participan en este proceso. A este respecto, un estudio reciente ha demostrado la capacidad de transformar MMA(III) a DMA por parte de la enzima DNA metiltransferasa-1 (N6AMT1) (Ren *et al.*, 2011). También se ha descrito *in vitro* la capacidad de metilación no enzimática del arsénico inorgánico (Buchet y Lauwers, 1985; Zakharyan y Aposhian 1999) en presencia de un ambiente reductor y metilvitamina B12.

Adicionalmente, existen evidencias que los procesos de reducción del arsénico pentavalente a formas trivalentes se llevan a cabo por múltiples vías. Por ejemplo, la GSH transferasa omega (GSTO) cataliza *in vitro* la reducción del MMA(V) a MMA(III) (Zakharyan *et al.*, 2001), a pesar que este proceso no se ha podido corroborar en estudios *in vivo* con ratones (Chowdhury *et al.*, 2006). Otro ejemplo es la purina nucleósido fosforilasa (PNP), enzima que puede catalizar la reacción de reducción del As(V) a As(III) por tioles (Nemeti *et al.*, 2010). Estos datos apuntan a la multiplicidad y redundancia de vías en los procesos de reducción y metabolismo del arsénico y cómo ambos procesos requieren todavía de profundización para poder entender completamente las bases moleculares del metabolismo de este metaloide.

Debido al papel fundamental en el proceso de metilación de S-adenosilmetionina (SAM) como dador de grupos metilo se ha sugerido la interacción entre el metabolismo del arsénico y compuestos como el ácido fólico, metionina, colina, vitamina B6 y vitamina B12, sustancias necesarias para restaurar y mantener los niveles de SAM. En la figura 9 se representan las interacciones entre compuestos asociados al metabolismo del folato y la colina y la metilación del arsénico inorgánico. Spiegelstein *et al.* (2003) observaron en modelos animales que la ingesta insuficiente de folato provocaba una disminución en la biotransformación y excreción del arsénico inorgánico, aumentando con ello su retención a nivel tisular y por tanto su toxicidad. Estos datos se corroboran con estudios poblacionales (Gamble *et al.*, 2006), que correlacionan los niveles de folato en plasma con incrementos en el porcentaje de DMA urinario. Los niveles de metionina o colina, así como la ingesta proteica (Steinmaus *et al.*, 2005; Smith *et al.* 2012) o la vitamina B12 (Heck *et al.*, 2007), también son capaces de modificar el perfil metabólico del arsénico inorgánico en orina.



**Figura 9.** Metilación del arsénico y asociación con el metabolismo del folato y colina. AS3MT, As(III) metiltransferasa; PEPT, fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa, CHDH; colina deshidrogenasa; BHMT, betaína homocisteína metiltransferasa; THF, tetrahydrofolato; MTHFR, metil tetrahydrofolato reductasa; CH<sub>3</sub>-B-12, metilcobalamina; GSH, glutatión reducido. Imagen obtenida de Vather 2007.

Inicialmente se creyó que el metabolismo del arsénico inorgánico era una ruta de detoxificación, ya que los metabolitos aislados de orina de animales expuestos eran las especies mono y dimetiladas pentavalentes [MMA(V) y DMA(V)], formas menos tóxicas que el arsénico inorgánico ingerido. Con el desarrollo de técnicas analíticas más sensibles y métodos de extracción menos agresivos, que permitían conservar los estados de oxidación, se puso de manifiesto que las formas trivalentes [MMA(III) y DMA(III)] eran intermediarios estables, ya que aparecían en orina de poblaciones expuestas (Valenzuela *et al.*, 2006), y que por tanto podían ejercer su efecto tóxico en el organismo. Diversos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que individuos expuestos crónicamente a arsénico inorgánico, la mayor prevalencia de determinadas patologías está correlacionada con un mayor porcentaje de MMA(III) en la orina (Valenzuela *et al.*, 2006). Adicionalmente, un trabajo reciente de Kojima *et al.* (2009) muestra como la capacidad de metilar As(III) de determinadas células favorece la

inducción al daño oxidativo del ADN y acelera la transición celular hacia un fenotipo canceroso. Estos estudios han abierto el debate de si los efectos tóxicos observados en poblaciones expuestas son debidos al arsénico inorgánico que ingiere la población o a los metabolitos generados tras la ingesta, que dependen del propio individuo.

A pesar que el proceso de metilación del arsénico inorgánico conlleva la formación de especies más tóxicas que las de partida, se ha demostrado que en organismos con una elevada capacidad de metabolismo, la eliminación del arsénico en forma de MMA y DMA a través de la orina es mayor que en especies que no metilan (Drobna *et al.*, 2010a). Asimismo, las células capaces de metilar acumulan menos arsénico que las que no tienen esta capacidad (Dopp *et al.*, 2010; Drobna *et al.*, 2005). La mayor permanencia del arsénico en organismos que no metilan conlleva una mayor toxicidad debido a un mayor tiempo de contacto de las células con el tóxico.

Teniendo en cuenta la elevada toxicidad de los metabolitos intermediarios en la ruta de transformación del arsénico inorgánico y sus contenidos elevados en muestras biológicas, el concepto que se tenía de la ruta metabólica del arsénico inorgánico se ha modificado y en la actualidad, se considera tanto un proceso de detoxificación como de activación de la toxicidad.

Los procesos de metabolismo del arsénico están condicionados por la especie animal considerada. Así se sabe que determinadas especies no son capaces de metilar el arsénico inorgánico (*Pan troglodites* y *Callithrix jacchus*), mientras que otras (*Rattus* spp.), aún presentando una eficiente metilación, acumulan el DMA formado en los eritrocitos, con la consecuente disminución en la excreción de arsénico a través de la orina (Vahter, 1999). Por otra parte, en humanos, se han observado diferencias en los ratios de metilación de arsénico en función de la edad, sexo y estado fisiológico (Vahter *et al.*, 1999).

Los estudios *in vitro* de metabolismo de arsénico inorgánico se han centrado en órganos diana, especialmente células de la vejiga urinaria (Drobna *et al.*, 2005) y células hepáticas o preparados citosólicos de hígado de roedores (Buchet y Lauwerys, 1985; Drobna *et al.*, 2004, 2010a). Sin embargo, se desconoce qué ocurre en el epitelio intestinal. El metabolismo de primer pasotiene lugar a lo largo del tracto

gastrointestinal y el hígado, y supone que parte del compuesto ingerido llegue a la circulación sistémica modificado, variando el efecto beneficioso o tóxico que pueda ejercer. Aunque el metabolismo hepático se considera más relevante, en la pared intestinal también se producen numerosas reacciones metabólicas (Lin *et al.*, 1999). Muchos enzimas presentes en el hígado también se encuentran en el intestino delgado, aunque los niveles entéricos de estos enzimas son inferiores a los hepáticos (Lin *et al.*, 1999). Una transformación del arsénico inorgánico a nivel entérico podría afectar a los procesos de absorción y a sus efectos tóxicos a nivel local y sistémico.

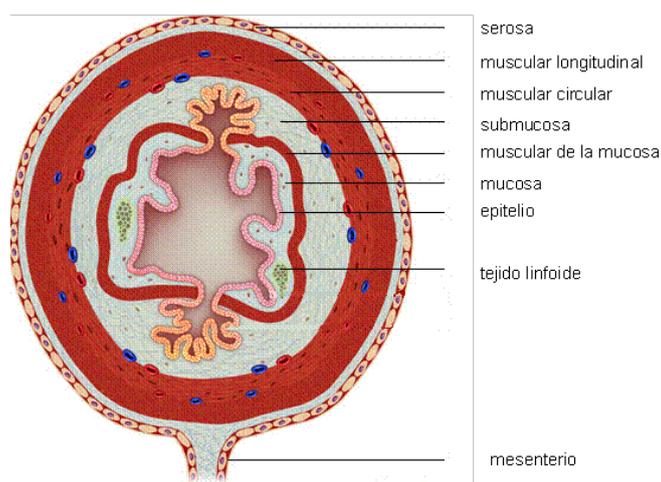
## **Fisiología intestinal**

---



El intestino es una estructura tubular que se extiende desde el píloro gástrico hasta el ano, localizada en la cavidad abdominal y rodeada de peritoneo. Longitudinalmente, el intestino se divide en intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) e intestino grueso (ciego, colon y recto). En su organización transversal (figura 10) presenta 5 capas que son, empezando por la más próxima al lumen:

- Capa mucosa, formada por un epitelio columnar que la lámina propia (matriz de colágeno que contiene vasos linfáticos y sanguíneos) y una capa muscular (*muscularis mucosae*).
- Capa submucosa, formada por un tejido conjuntivo denso atravesado por capilares y vasos sanguíneos y linfáticos que drenan y dan alimento a la mucosa y muscular externa.
- Capa muscular externa, compuesta por 2 bandas de musculatura lisa.
- Capa conjuntiva externa, formada por la serosa peritoneal o adventicia, según el tramo intestinal.



**Figura 10.** Representación esquemática de una sección transversal de intestino. Fuente: <http://www.virtualmedicalcentre.com/anatomy/gastrointestinal-system/7>.

Así, cualquier sustancia que llega al intestino y se absorbe hasta la circulación sanguínea, debe atravesar el epitelio, parte de la lámina propia y la pared del capilar sanguíneo, siendo la capa epitelial la limitante en el proceso de absorción intestinal (Pitman y Blumberg, 2000). La superficie intestinal en contacto con el lumen está plegada en vellosidades que aumentan significativamente la superficie intestinal, facilitando con ello los procesos de absorción (Langerholc *et al.*, 2011). Entre cada vellosidad se encuentran las criptas de Lieberkühn, invaginaciones de forma tubular del epitelio intestinal donde se sitúan las células madre que dan lugar a la mayoría de tipos celulares que componen el intestino (Porter *et al.*, 2002). En las criptas se producen enzimas digestivas, sustancias bactericidas y péptidos reguladores. Respecto a los enterocitos, sufren un periodo de diferenciación conforme van ascendiendo hacia el extremo de la vellosidad (migración en eje basal-apical o migración cripta-*villi*). Durante esta migración se produce una salida del ciclo celular y la activación de programas de expresión génica característicos. En el extremo de la vellosidad finalmente, las células mueren por apoptosis y/o desprendimiento hacia el lumen (Hall *et al.*, 1994).

## 2.1. Tipos celulares intestinales

Los enterocitos o células absortivas, son junto con las caliciformes, los tipos celulares más abundantes en el epitelio intestinal. Aproximadamente, un 90% de la población celular del intestino está compuesta por enterocitos (Hermiston *et al.*, 1995), mientras que las células mucosecretoras suponen entre un 10 y 25% (Hilgendorf *et al.*, 2000).

Estos dos tipos celulares están polarizados, con el dominio apical en contacto con el lumen intestinal y el dominio basal conectado con la lámina propia y la circulación sanguínea. Otros tipos celulares intercalados en el epitelio intestinal (células enteroendocrinas, células de Paneth) son especialmente importantes en funciones no absortivas, tales como la regulación endocrina y de la respuesta inmune.

La membrana apical del enterocito presenta microvellosidades que forman un borde en cepillo y que contiene la mayoría de enzimas (glicosidasas, peptidasas y lipasas) y transportadores esenciales para la digestión y absorción de nutrientes. Muchas de estas enzimas, tales como la sucrasa-isomaltasa, la lactasa, la aminopeptidasa, la dipeptidilpeptidasa IV y la fosfatasa alcalina se emplean como marcadores de diferenciación celular (Pinto *et al.*, 1983; Darmoul *et al.*, 1991a, 1991b; Wang y Evers, 1999). La polarización de estas células se mantiene por una estructura compleja de uniones intercelulares formadas por uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas.

Las células mucosecretoras o células caliciformes se caracterizan por la secreción del moco que recubre la superficie del epitelio intestinal. Este moco está compuesto fundamentalmente por mucinas. Las mucinas son glicoproteínas de elevado peso molecular, formadas por un centro proteico (apomucina) con numerosas cadenas laterales de carbohidratos unidos por enlaces O-glucosídicos, con gran cantidad de residuos de serina, treonina, prolina y cisteína. Según su estructura y función, las mucinas pueden clasificarse como mucinas transmembrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC17) y mucinas de secreción formadoras de geles extracelulares (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) (Leteurtre *et al.*, 2004; Lesuffleur *et al.*, 1993). Los patrones de expresión de las distintas mucinas varían en función del tejido y en muchas ocasiones se encuentra alterado en procesos neoplásicos. La mucina MUC2 se expresa mayoritariamente en células caliciformes de colon e intestino delgado (Allen *et al.*, 1998). En numerosos adenocarcinomas colorectales se ha observado una reducción en su expresión, junto con la síntesis de MUC5AC, mucina gástrica que no se expresa normalmente en el colon (Sylvester *et al.*, 2001, Myerscough *et al.*, 2001; Byrd y Bresalier, 2004). Otras mucinas presentes en el epitelio colónico normal son MUC4, MUC3 y MUC1.

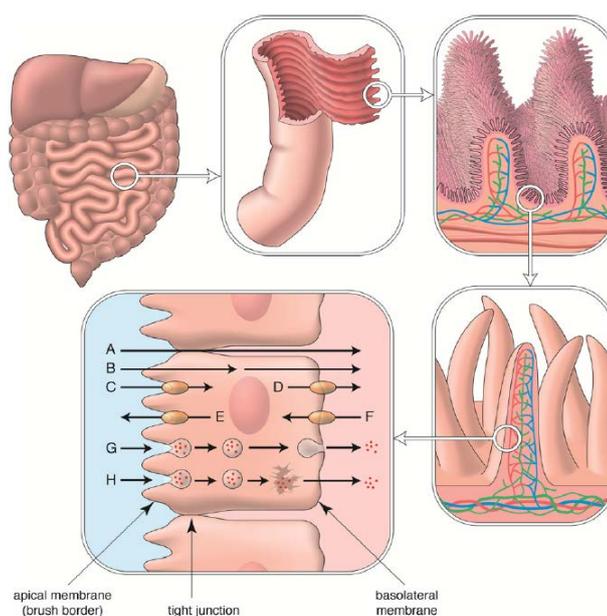
El tejido linfoide asociado al intestino (GALT) consiste en células inmunes aisladas o formando folículos linfoides (linfocitos B, T, macrófagos) y supone el mayor órgano linfoide del cuerpo humano, con más del 70% de las células del sistema inmune del organismo (Jung *et al.*, 1995).

En las placas de Peyer, folículos linfoides rodeados por epitelio asociado al folículo, se encuentran las células M o *microfold*, especializadas en la transcitosis de sustancias lumenales tales como proteínas, antígenos, bacterias y virus para que sean procesados y puestos en contacto con células presentadoras de antígenos localizadas en el GALT (Nagler-Anderson, 2001, Makala *et al.*, 2004). Los macrófagos a nivel intestinal se localizan predominantemente en la lámina propia y placas de Peyer (Hume *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 2005) y actúan como células fagocíticas, presentadoras de antígenos y secretoras de citoquinas. Los linfocitos intestinales que se encuentran entre las células epiteliales, en la lámina y en las placas de Peyer actúan como centinelas frente a posibles agresiones procedentes de la luz intestinal (Kato y Owen, 2005).

## **2.2. Funciones del intestino**

Entre las funciones principales del intestino se encuentra continuar con la digestión de alimentos que se ha iniciado en la boca y estómago y absorber los nutrientes derivados, procesos que se producen especialmente en el intestino delgado (Vanbeers *et al.*, 1995). En el intestino grueso se produce mayoritariamente la absorción de agua y electrolitos (Kunzelmann y Mall, 2002), provocando la compactación de las heces y su almacenamiento. El epitelio intestinal está continuamente en contacto con microorganismos, sustancias derivadas de la digestión de los alimentos y tóxicos, por lo que actúa como una barrera selectiva que protege de la entrada de elementos perjudiciales para el organismo.

La absorción intestinal se lleva a cabo principalmente por los enterocitos, existiendo diversas rutas implicadas en este proceso (Shimizu, 2010), tal y como muestra la figura 11.



**Figura 11** Mecanismos de transporte a través de la barrera intestinal (de Buckley *et al.*, 2012; imagen procedente de Dr. Roy Lysaa). (A) Difusión pasiva paracelular; (B) difusión pasiva transcelular; (C–F) transporte facilitado (activo primario o secundario) por proteínas de membrana (entrada/salida); (G) transcitosis y (H) endocitosis.

En función de los requerimientos energéticos del proceso de absorción de nutrientes, fármacos o tóxicos, el transporte puede clasificarse en activo o pasivo. El transporte pasivo se produce por difusión, proceso caracterizado por realizarse siempre a favor de gradiente de concentración y sin consumo de energía. Las moléculas que se transportan de este modo siguen la ley de Fick, que define la tasa de transporte de una sustancia a través de una membrana como proporcional al gradiente de concentración de esa sustancia a través de dicha membrana. Adicionalmente, las sustancias con carga dependen no sólo del gradiente de concentración sino también del gradiente eléctrico definido por el potencial de membrana. Este transporte pasivo puede producirse a través de la membrana de las células epiteliales (transporte transcelular) o a través de los espacios intercelulares (transporte paracelular). El transporte transcelular pasivo, a su

vez, puede llevarse a cabo mediante difusión simple [moléculas no polares (oxígeno, hormonas esteroideas) o polares sin carga de pequeño tamaño (agua, CO<sub>2</sub>, urea)] o difusión facilitada a través de proteínas transmembrana (canales iónicos o permeasas). Adicionalmente a los procesos pasivos, existen mecanismos activos que participan en la absorción de distintos compuestos a nivel intestinal. El transporte activo se caracteriza por realizarse en contra de gradiente químico o electroquímico y requerir energía, bien por empleo directo de ATP por el transportador (transporte activo primario) o por el empleo de la energía generada por el gradiente de concentración de iones a ambos lados de la membrana (transporte activo secundario). Otros procesos tales como la endocitosis son empleados por las células para captar macromoléculas, fluidos y partículas que pasan a formar parte del interior celular en forma de pequeñas vesículas o vacuolas que generalmente se unen a los lisosomas para degradar el contenido captado.

La ruta paracelular es especialmente importante para sustancias de pequeño tamaño e hidrofílicas, mientras que el transporte transcelular a través de la bicapa lipídica es el que se produce para la mayoría de moléculas, como consecuencia de la extensiva superficie de las células comparada con los espacios intercelulares (Artursson *et al.*, 1996).

Los procesos de difusión pasiva a nivel intestinal se consideran mayoritarios en los procesos de absorción, sin embargo la coexistencia con otros mecanismos y complejidad del proceso de absorción de distintos compuestos tiene cada vez más relevancia (Sugano *et al.*, 2010). Los distintos mecanismos de transporte implicados en la permeabilidad de sustancias dependen de sus características fisicoquímicas, tales como estereoquímica, coeficiente de partición, peso y radio molecular, volumen, pK<sub>a</sub>, solubilidad, estabilidad química y distribución de cargas. Las características de las membranas biológicas también son relevantes en el proceso absorptivo, así como los factores fisiológicos (pH intestinal, motilidad intestinal, presencia de alimento, interacciones entre sustancias, presencia de mucus) (Le Ferrec *et al.* 2001)

## **Modelos celulares *in vitro* de epitelio intestinal**

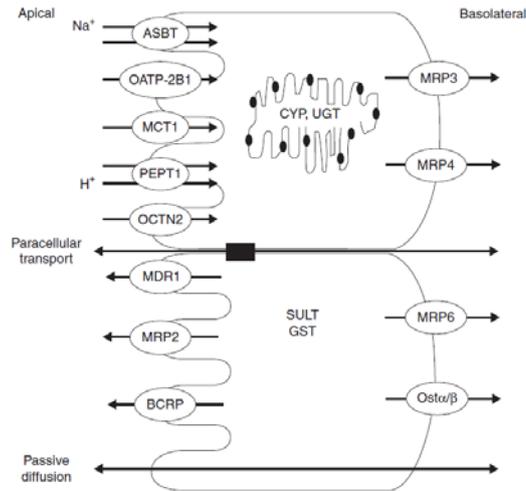
---



El desarrollo de líneas celulares estables ha proporcionado una herramienta muy útil para la evaluación de distintos procesos relacionados con la función barrera del intestino. Se han utilizado distintos tipos celulares para la evaluación de los mecanismos de transporte de diversos compuestos. Entre los modelos celulares más empleados se encuentran las células derivadas de adenocarcinoma humano Caco-2 y HT29 (Artursson, 1990, Lesuffleur *et al.*, 1991; Sambuy *et al.* 2005). El uso mayoritario de estos tipos celulares se debe, en parte a su capacidad de formación de monocapas de células polarizadas que se diferencian tras confluencia y que expresan la mayoría de genes presentes en el epitelio intestinal o colónico, dando lugar a células semejantes a enterocitos (Caco-2) o a células caliciformes (HT29). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el empleo de células transformadas puede afectar al modelo empleado, ya que estas células pueden presentar patrones de glicosilación alterados, falta de respuesta a hormonas o citoquinas o modificaciones en la expresión de proteínas. Las ventajas económicas y éticas de los sistemas *in vitro* frente al empleo de animales de experimentación superan en muchos casos las limitaciones de estos modelos.

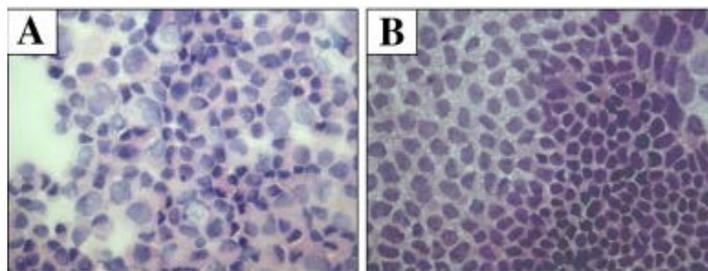
### **3.1. Línea celular Caco-2**

La línea celular Caco-2 fue establecida por Fogh (1977) a partir de adenocarcinoma de colon humano. Estas células crecen en cultivo adheridas a un sustrato formando monocapa. Cuando alcanzan la confluencia se diferencian espontáneamente, formando una monocapa polarizada que presenta muchas de las características morfológicas y funcionales de los enterocitos humanos maduros: polarización celular, formación de domas, uniones intercelulares estrechas, microvellosidades en el lado apical, transportadores de membrana típicos del intestino (Figura 12), enzimas metabólicas (figura 13) y de secreción propias de la membrana del borde en cepillo (fosfatasa alcalina, sucrasa-isomaltasa, aminopeptidasa) (Zweibaum *et al.*, 1983; Pinto *et al.*, 1983; Jalal *et al.*, 1992; Englund *et al.*, 2006; Hilgendorf *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Schnabl *et al.*, 2009; Visco *et al.*, 2009).



**Figura 12.** Representación esquemática de las vías de transporte, transportadores y enzimas metabólicas en enterocitos.

De acuerdo con el grado de diferenciación de las células Caco-2 en cultivo se pueden observar varias poblaciones celulares: células homogéneamente no diferenciadas (población subconfluente en fase de crecimiento); células heterogéneamente diferenciadas y polarizadas (fase intermedia) y células homogéneamente diferenciadas y polarizadas (población diferenciada en fase estacionaria) (Delie y Rubas, 1997). La figura 13 muestra una imagen de microscopia óptica del cultivo celular formado por Caco-2 tras distintos tiempos postsiembra. Si bien el programa de diferenciación de Caco-2 se activa tras confluencia, siempre existe en el cultivo heterogeneidad en la composición, siendo muy importante el mantenimiento de las condiciones de ensayo que afectan al proceso de diferenciación para reducir la variabilidad experimental (densidad inicial de siembra, número de pase, composición del medio, tiempo tras la siembra hasta la realización del ensayo).



**Figura 13.** Caco-2 no diferenciadas (2 días post siembra) (A) y diferenciadas (21 días post siembra) (B) con tinción de hematoxilina eosina. Imagen obtenida de Biasi *et al.* (2009).

Se han llevado a cabo multitud de estudios empleando este tipo celular con el fin de evaluar la tasa y procesos de absorción intestinal de distintas sustancias, especialmente fármacos (Artursson *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002; Ueno *et al.*, 2012) pero también nutrientes (Mahler *et al.*, 2009, Rubio *et al.*, 2009) o tóxicos (Aspenström-Fagerlund *et al.*, 2009; Vasiluk *et al.*, 2011). En estos estudios, para reproducir las condiciones existentes en el intestino, las células Caco-2 se siembran sobre soportes permeables que permiten el acceso a iones y nutrientes por ambos lados de la monocapa celular. Una de las ventajas que presenta el cultivo celular sobre soporte permeable es la facilidad de cultivo y la posibilidad de aplicación de HTS (*high-throughput screening*), permitiendo de forma reproducible realizar un gran número de ensayos de forma simultánea.

Existen diversos trabajos que han demostrado una buena correlación entre la fracción absorbida de distintos fármacos en humanos y los valores de permeabilidad aparente o efectiva calculada mediante el empleo de células Caco-2 diferenciadas (Bailey *et al.*, 1996; Artursson y Karlsson., 1991; Rubas *et al.*, 1993; Pade y Stavchansky, 1998; Yamashita *et al.*, 2000). A grandes rasgos, esta aproximación es adecuada para compuestos con determinadas características (elevada solubilidad, transporte rápido y pasivo), sin embargo, los compuestos hidrofílicos y con una absorción más lenta o aquellos que requieren transportadores o permeasas se transportan más lentamente y/o en menor medida en el modelo Caco-2 que en el intestino humano (Lennernas *et al.*, 1996). Así las limitaciones del modelo *in vitro* empleado deben

tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados. En primer lugar, el origen colónico de la línea celular Caco-2 hace que las uniones intercelulares sean más estrechas que en el intestino delgado (Artursson *et al.*, 2001). En segundo lugar, a pesar que la expresión de transportadores es semejante a la observada en el intestino delgado, los patrones de distribución y niveles de determinados transportadores pueden variar significativamente, tal y como es el caso de la glicoproteína P, mucho más abundante en el cultivo Caco-2 que en el intestino (Sun *et al.*, 2002). En tercer lugar, las diferencias inter o intralaboratorio pueden influir notablemente en los resultados obtenidos, especialmente en el caso de sustancias que se transportan vía paracelular.

En el caso del arsénico, existen referencias bibliográficas previas que describen el empleo de este modelo celular para estudios de absorción intestinal, tanto de patrones acuosos como de fracciones bioaccesibles de distintos alimentos obtenidas tras una digestión gastrointestinal *in vitro* y para estudios de toxicidad (Davis *et al.*, 2000; Hershko *et al.*, 2002; Laparra *et al.*, 2005a, 2005b, 2006, 2007, 2008).

### **3.2. Línea celular HT-29**

La línea celular HT-29 se aisló de un adenocarcinoma de colon humano en 1964 (Cencic y Langerholc, 2010). A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de diferenciación. La población original de HT29 contiene solamente una pequeña proporción de células mucosecretoras (< 0.5%) (Augeron y Laboisse, 1984; Lesuffleur *et al.*, 1990), sin embargo, bajo condiciones de crecimiento que someten a las células a una presión selectiva, se han aislado clones de células capaces de producir diferentes tipos de mucinas a partir de esta población original (Louvard *et al.*, 1984). El tratamiento prolongado de HT-29 con  $10^{-7}$  M de MTX más el tratamiento con  $10^{-6}$  M de la población resistente obtenida permitió la selección de una población con capacidad de diferenciación hacia un fenotipo mucosecretor, a la cual se le llamó HT-29 M6 o HT29-MTX (Lesuffleur *et al.*, 1990).

Estas células forman una monocapa homogénea de células caliciformes polarizadas con un núcleo basal, numerosas vacuolas de moco acumuladas en el citoplasma de la región apical de las células y algunas microvellosidades apicales que no llegan a formar un borde en cepillo maduro (Lesuffleur *et al.*, 1993). A diferencia de lo que ocurre en el colon normal, la principal mucina secretada que se expresa en estas células es la mucina gástrica MUC5AC, aunque también es posible detectar MUC1, MUC5B y MUC2 (Lesuffleur *et al.*, 1993, 1995). A nivel de las microvellosidades, las HT-29 M6 presentan, además, hidrolasas típicas del borde en cepillo de epitelio adulto (dipeptidilpeptidasa, aminopeptidasa N), si bien la principal característica de la diferenciación de este tipo celular es la producción de mucina. A este nivel, en la superficie apical de la célula, la mucina mayoritaria es MUC1, mientras que el resto de mucinas se encuentran en vesículas intracelulares que aumentan conforme avanza el estado de diferenciación del cultivo (Lesuffleur *et al.*, 1993). Otros clones derivados de HT29 se obtuvieron tras el tratamiento con concentraciones mayores de MTX, sin embargo, los niveles de expresión de mucinas como MUC2 y MUC5AC, son mucho más bajos que en HT-29 M6 y no se producen vesículas de moco (Lesuffleur *et al.*, 1991; 1998).

Se han empleado distintos clones de HT29 para la evaluación *in vitro* del efecto del mucus sobre la absorción de distintas sustancias (Karlsson *et al.* 1993; Carriere *et al.*, 1994; Behrens *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2007), si bien el monocultivo de este tipo celular no refleja la proporción de células caliciformes presentes en el intestino delgado (10-25%) o colon (25-55%) (Wickman-Lahred y Artursson, 1995).

### 3.3. Cocultivos

El empleo de cocultivos con distintos tipos celulares se ha propuesto como una aproximación a la heterogeneidad celular existente en el epitelio intestinal (Nolleaux *et al.*, 2006).

### 3.3.1 Cocultivos Caco-2/HT29 mucosecretoras

El empleo de este modelo *in vitro* ofrece la posibilidad de estudiar la influencia de las células caliciformes en los procesos de absorción, así como el efecto de la presencia de la capa de mucus. Las células caliciformes, después de los enterocitos, son las células más abundantes del epitelio intestinal, por lo que el modelo de cocultivo entre enterocitos y células mucosecretoras permite una aproximación más adecuada a la situación *in vivo*. Se ha descrito que las uniones estrechas formadas entre Caco-2/HT29 son más laxas que las formadas por el monocultivo Caco-2, tal y como ponen de manifiesto los valores de resistencia eléctrica transepitelial y transporte de marcadores paracelulares (Pontier *et al.*, 2001; Karlsson *et al.*, 1993; Wikman-Larhed y Artursson, 1995; Hilgendorf *et al.*, 2000). Asimismo, el mucus secretado por diversos clones de células HT29 forma una capa glicoproteica sobre la monocapa celular que actúa como barrera frente a distintas moléculas (Karlsson *et al.*, 1993).

La permeabilidad de distintos compuestos empleando el cocultivo Caco-2/HT29-H se ha correlacionado con la fracción absorbida en humanos, demostrando que la permeabilidad paracelular de este modelo es más semejante a la situación humana *in vivo* (Wickman-Lared y Artursson 1995).

Al igual que en el modelo formado solamente por Caco-2 existe una elevada variabilidad interlaboratorios en los valores de resistencia transepitelial y permeabilidad de moléculas paracelulares, debido a que la formación de las uniones estrechas, tanto en monocultivos como en cocultivos, se encuentra influenciada por las condiciones de cultivo (medio, número de pase, tiempo de cultivo) así como por la composición de las subpoblaciones celulares (Balimane y Chong, 2005; Chen *et al.*, 2010; Wood *et al.*, 2010). Por otra parte, la presencia de mucinas gástricas mayoritariamente en el cocultivo Caco-2/HT29-MTX, puede afectar específicamente a la permeabilidad de ciertas sustancias, ya que la reactividad de las distintas mucinas y los patrones de glicosilación son diferentes.

### 3.3.2. Cocultivos Caco-2/células mononucleares de sangre periférica

La barrera intestinal conforma, además de una barrera física, una barrera de inmunidad innata y adaptativa (Sansoneetti, 2004). Tal y como se ha descrito en los apartados 1.5 y 2.1 existe una importante interacción entre los enterocitos y las células del sistema inmune.

Con el fin de mejorar las características funcionales de los sistemas *in vitro* que emulan el epitelio intestinal, diversos estudios han cultivado células epiteliales intestinales sobre membranas microporosas y han cocultivado en el compartimento basal distintos tipos celulares o células inmunes, tales como monocitos, macrófagos o células T. Entre los distintos modelos desarrollados se puede diferenciar los que emplean líneas celulares del sistema inmune y los que emplean células mononucleares primarias aisladas de sangre. Como ejemplos, Satsu y Simizu (2006) aplicaron un cocultivo Caco-2/células similares a macrófagos humanos (THP-1) para evaluar el efecto de distintos factores presentes en los alimentos sobre la inflamación intestinal. Con el propósito de evaluar la absorción de moléculas de gran tamaño y nanopartículas, otros estudios han empleado el cocultivo Caco-2/linfocitos Raji B (des Rieux *et al.*, 2005, 2007; Gullberg *et al.*, 2000).

A pesar que la composición celular de aislados sanguíneos no representa con exactitud las células inmunes presentes en la mucosa intestinal, tales como los linfocitos de la lámina propia o intraepiteliales, las células T de la lámina propia tienen un ratio CD4:CD8 similar al encontrado en sangre. Los cúmulos de diferenciación o moléculas CD se encuentran en la superficie celular y se han empleado para la identificación y clasificación de las células del sistema inmune. La molécula CD4 se expresa en células T colaboradoras y en células dendríticas, mientras que la CD8 está presente en células T citotóxicas. Adicionalmente, a nivel de ARNm de IL8, se ha observado que la respuesta de las células epiteliales intestinales en contacto con linfocitos de la lámina propia o PBMC no difiere significativamente (Haller *et al.*, 2004). Así, los PBMC obtenidos de muestras sanguíneas se pueden considerar como parcialmente representativos de linfocitos de la lámina propia y se han empleado previamente en otros estudios en

cocultivo con células intestinales. Así, McKay y Perdue. (1993), Haller *et al.* (2000) y Parlesak *et al.* (2004) caracterizaron las interacciones entre células del sistema inmune y células epiteliales de intestino capaces de modular la inflamación en este modelo *in vitro*, especialmente tras el contacto de las células epiteliales, inmunes o ambas a estímulos bacterianos.

Existen trabajos previos que emplean células inmunes primarias para evaluar distintos efectos del arsénico (Bourdonnay *et al.*, 2009; Banjeree *et al.*, 2009; Kozul *et al.*, 2009; Morzadec *et al.*, 2012a, 2012b), si bien no existen antecedentes bibliográficos que empleen el sistema de cocultivo descrito para evaluar los procesos inflamatorios que pueden desencadenarse tras la exposición a arsénico a nivel intestinal.

## **OBJETIVOS**

---



La presente tesis tiene como objetivo general evaluar mediante sistemas *in vitro* las transformaciones a nivel intestinal de distintas formas arsenicales, así como su absorción y efectos tóxicos a nivel entérico.

Para la realización de este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Biotransformaciones de distintas especies arsenicales durante su paso a través del tracto gastrointestinal.
  - Transformaciones de las especies arsenicales durante los procesos de digestión gastrointestinal *in vitro* en presencia de distintas matrices alimentarias.
  - Procesos de metabolismo del arsénico inorgánico por las células del epitelio intestinal.
  
- Caracterización *in vitro* del transporte intestinal de especies arsenicales.
  - Estudios *in vitro* de los coeficientes de permeabilidad aparente de las especies arsenicales más tóxicas en alimentos o de las especies derivadas de su metabolismo, en distintos modelos celulares (monocultivo Caco-2 y cocultivo Caco-2/HT29-MTX).
  - Evaluación de posibles mecanismos y transportadores implicados en los procesos de absorción del arsénico inorgánico. Efectos del arsénico inorgánico sobre la expresión génica de distintos transportadores intestinales.
  
- Efectos tóxicos de las distintas especies arsenicales a nivel intestinal.
  - Estudios de viabilidad y mecanismos de toxicidad en células Caco-2.
  - Cambios en la expresión génica de proteínas de estrés térmico y metalotioneínas tras exposiciones a distintas formas arsenicales.

- Evaluación de los efectos del arsénico sobre los niveles proteicos de citoquinas proinflamatorias secretados al medio y cambios en la expresión de ARNm de diversas citoquinas, mediante el empleo de diversos modelos celulares *in vitro* (monocultivo Caco-2 y cocultivo Caco-2/PBMC).

## **METODOLOGÍA**

---



## 1. Especies arsenicales

El patrón de As(V) (1000 mg/L,  $\text{As}_2\text{O}_5$ ) fue adquirido a Merck. El patrón de As(III) (1000 mg/L) se preparó por disolución de 1.320 g de  $\text{As}_2\text{O}_3$  (Riedel de Haën) en 25 mL de 20% (m/v) KOH (Panreac), neutralizado con 20% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck) y diluyendo a 1 litro con 1% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Las disoluciones patrón de MMA(V) y DMA(V) se prepararon disolviendo en agua la cantidad necesaria de  $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{ONa})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Carlo Erba) y  $(\text{CH}_3)_2\text{AsNaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Fluka), respectivamente. Las disoluciones patrón de MMA(III) y DMA(III), se prepararon a partir de patrones de  $\text{CH}_3\text{AsI}_2$  y  $(\text{CH}_3)_2\text{AsI}$  respectivamente (Argus Chemicals).

Para las especies pentavalentes y el As(III) se prepararon patrones intermedios (100 mg/L) que se almacenaron a 4 °C durante un máximo de 2 meses. Los patrones de menor concentración se prepararon diariamente a partir de los patrones intermedios. Las especies MMA(III) y DMA(III) son muy inestables y rápidamente se oxidan a su análogo pentavalente, por lo cual los patrones de estas especies utilizados en los ensayos se prepararon a partir de las sales comerciales el mismo día de la experiencia.

## 2. Mantenimiento de los cultivos celulares de Caco-2 y HT29-MTX

Las células Caco-2 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; número 86010202, Reino Unido). El mantenimiento de estas células se llevó a cabo en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a los que se adicionaron 10 mL de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con L-glutamina (0.6 g/L) y un alto contenido de glucosa (4.5 g/L) a pH 7.4. El DMEM se suplementó con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomina, 0.0025 mg/mL de anfotericina B, 1 mM de piruvato de sodio, 10 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico) (DMEMc). Todos los ensayos se realizaron con células entre los pases 5 y 45.

Las células HT29-MTX fueron donadas por la Dra. Thécla Lesuffleur (Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM UMR S938, Francia) en el pase 15 y se emplearon entre los pases 16 y 25. El mantenimiento rutinario de las

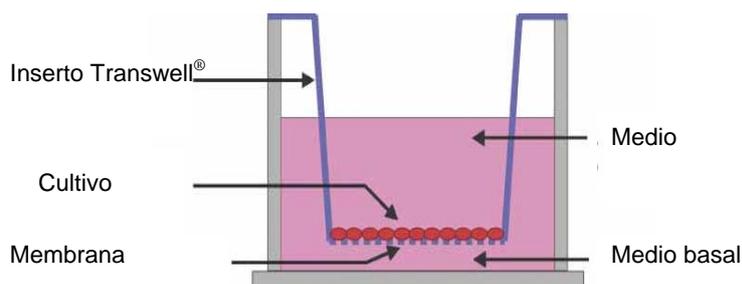
células se llevó a cabo en frascos de 25 cm<sup>2</sup>, a los que se adicionaron 5 mL de medio DMEM con L-glutamina (0.6 g/L) y un alto contenido de glucosa (4.5 g/L) a pH 7.4, suplementado con un 10% (v/v) de FBS, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomicina, 0.0025 mg/mL de anfotericina B y 1 mM de piruvato de sodio para obtener HT-DMEM completo (HT-DMEMc). Los reactivos utilizados para el mantenimiento de los cultivos fueron adquiridos a PAA Laboratories GMBH y a Gibco BRL Life Technologies.

Ambas líneas celulares se incubaron a 37 °C, en atmósfera controlada con una humedad relativa del 95% y un flujo de CO<sub>2</sub> del 5%. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Cuando la monocapa celular alcanzó el 80% de confluencia, las células se tripsinizaron y se sembraron en frascos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

Para la tripsinización de las células, se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular tres veces con tampón fosfato (PBS, PAA). A continuación se adicionó una disolución de tripsina (PAA) y ácido etilendiamino tetracético (EDTA, PAA) (0.5 mg/L-0.22 g/L) que se mantuvo en contacto con las células durante 10 minutos a 37 °C. Posteriormente se inactivó la tripsina con medio DMEMc y tras centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, se recuperaron las células. Este procedimiento es común a todos los tratamientos de tripsinización aplicados en la presente tesis doctoral.

### **3. Cultivo celular sobre sistema Transwell®**

El sistema Transwell® posibilita el crecimiento del cultivo celular sobre una membrana semipermeable de poliéster que separa en dos compartimentos el pocillo, el compartimento superior o apical, que simularía el lumen intestinal y el inferior o basal, que emularía los vasos linfáticos-circulación sanguínea (figura 14). En la presente tesis se han empleado insertos Transwell® de 24 mm diámetro y un tamaño de poro de 0.4 µm (Costar Corporation, EEUU).



**Figura 14.** Representación esquemática del sistema Transwell®. Imagen modificada de Saunders (2009).

Durante el tiempo de crecimiento y diferenciación celular en el sistema Transwell®, se monitoreó la confluencia y desarrollo de la monocapa celular mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) cada 2 días, empleando para ello un voltímetro Millicell®-ERS (Millipore Corporation, figura 15).



**Figura 15.** Voltímetro Millicell®-ERS y aplicación sobre un sistema Transwell® para la determinación de la RET.

Debido a que los valores de RET son altamente dependientes de la temperatura, este parámetro se midió inmediatamente después de sacar las células del incubador. En esta tesis, todos los valores de RET están reportados por diámetro efectivo de membrana y han sido corregidos por la resistencia del filtro ( $80 \pm 20 \text{ Ohms cm}^2$ ). En las células Caco-2 se consideró que la monocapa estaba formada cuando los valores de RET fueron estables y superiores a  $200 \text{ Ohms cm}^2$ .

#### **4. Evaluación de cambios en la forma química de especies arsenicales durante la digestión gastrointestinal**

Se han evaluado los cambios en la forma química de As(V), MMA(V) y DMA(V) como consecuencia del proceso de digestión gastrointestinal en presencia de distintas matrices vegetales.

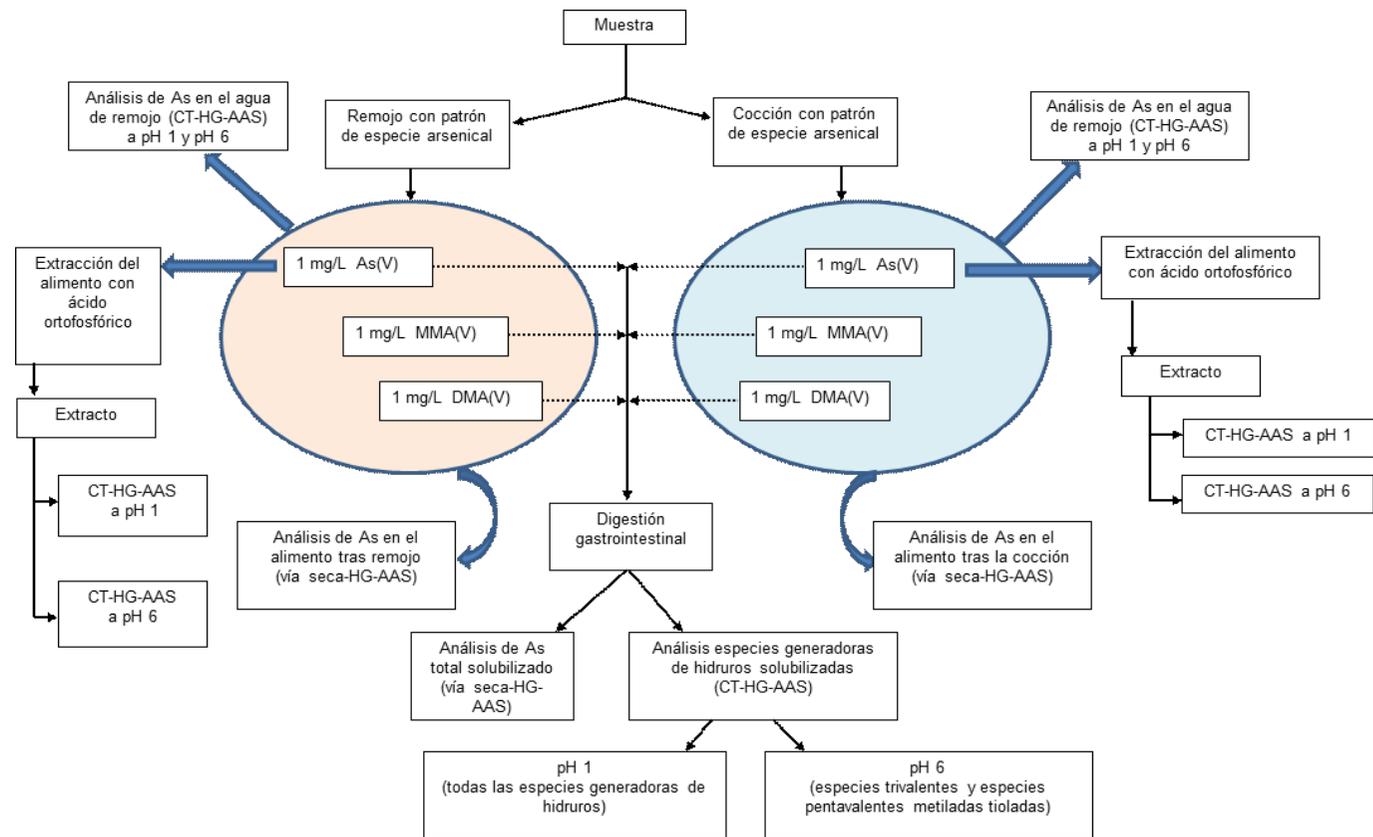
Se han utilizado muestras de ajo (*Allium sativum*), brócoli (*Brassica oleracea itálica*), espárrago (*Asparagus officinalis*) y espinacas (*Spinacia oleracea*), adquiridas en comercios de la ciudad de Valencia (España). Para el estudio con MMA(V) y DMA(V) se utilizaron dos muestras (lotes de comercialización diferentes) de ajo, brócoli, y espárrago. En el estudio con As(V) se utilizaron, además, muestras de espinacas, y el número de muestras de cada producto ascendió a tres. Las muestras se trocearon, se homogenizaron y cada una de ellas se separó en varias submuestras destinadas a los posteriores análisis.

- Submuestra A. Alimento crudo. Destinado al análisis de los contenidos basales de arsénico y especies arsenicales.
- Submuestra B. Alimento en remojo. La muestra se puso en contacto con una disolución acuosa de las especies pentavalentes As(V), MMA(V) o DMA(V) (1 mg/L, 24 horas, temperatura ambiente). Cada especie se adicionó de forma independiente.
- Submuestra C. Alimento cocinado. La muestra se cocinó por ebullición en una disolución acuosa de As(V), MMA(V) o DMA(V), todas ellas a una concentración de 1 mg/L. La relación muestra-agua adicionada (g-mL) fue 1-3. Tras la cocción se eliminó el exceso de líquido por centrifugación (10000 rpm, 10 min). Cada especie se adicionó de forma independiente.

A las submuestras B (remojo) y C (cocción) obtenidas tras el tratamiento con todas las especies arsenicales se les aplicó posteriormente un proceso de digestión gastrointestinal simulada. Únicamente en las submuestras B y C obtenidas del tratamiento con As(V) se realizó una extracción con ácido ortofosfórico del alimento

resultante del remojo y la cocción. En la figura 16 se muestra un esquema de los tratamientos aplicados.

También se ha evaluado el efecto de la digestión gastrointestinal y de la extracción con ácido ortofosfórico sobre patrones acuosos de las distintas formas arsenicales.



**Figura 16.** Esquema de los tratamientos aplicados durante los ensayos de las transformaciones del arsénico durante la digestión gastrointestinal.

#### 4.1. Digestión gastrointestinal de alimentos

El modelo *in vitro* empleado es un modelo estático descrito previamente por Laparra *et al.* (2004) con ciertas modificaciones. Las muestras frescas (10 g) o el patrón acuoso se pesaron en un matraz erlenmeyer y se adicionó agua (B Braun Medical) hasta un peso aproximado de 90 g. Tras homogenizar la muestra, se ajustó el pH a 2 con HCl 6 mol/L (Merck). Posteriormente se adicionó una disolución de pepsina (1 g de pepsina en 10 mL de HCl 0.1 mol/L, Sigma), en cantidad suficiente para proporcionar 0.002 g de pepsina/g muestra, y se completó el volumen de la mezcla hasta 100 g con agua de MilliQ. Los matraces se cubrieron con parafilm y se llevaron a 37 °C durante 2 horas con agitación de 60 rpm/min (Jenway 1000 calefactor). Transcurrido este tiempo se sumergieron en un baño de hielo para detener la digestión gástrica.

Tras 10 minutos se ajustó el pH a 6.5 mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub> 1 mol/L (Panreac) y se adicionó una disolución de pancreatina-extracto biliar (Sigma) (0.2 g de pancreatina y 1.25 g de extracto biliar en 50 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 mol/L) en cantidad suficiente para proporcionar 0.0005 g de pancreatina/g muestra y 0.003 g de extracto biliar/g muestra. La mezcla se mantuvo a 37 °C durante 2 horas con agitación (60 rpm/min). Transcurrido este tiempo, la digestión se detuvo sumergiendo los matraces en un baño de hielo durante 10 minutos.

Una vez finalizada la etapa intestinal el pH de la mezcla se ajustó a 7.2 con NaOH 0.5 mol/L y se centrifugó a 10000 rpm (Sorvall Pont) durante 30 minutos a 4 °C, con el objetivo de separar la fracción soluble (fracción bioaccesible) del residuo sólido. La bioaccesibilidad, porcentaje de solubilización del analito respecto a su contenido en la muestra, se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Bioaccesibilidad} = [S/C] \times 100$$

Donde:

S es el contenido de arsénico o especie arsenical solubilizada

C es el contenido arsénico o especie arsenical existente en la muestra.

En la fracción soluble se analizó el contenido de arsénico total y de especies generadoras de hidruros siguiendo las metodologías descritas el apartado 14. Se analizó también el contenido de arsénico total en el residuo de la digestión gastrointestinal.

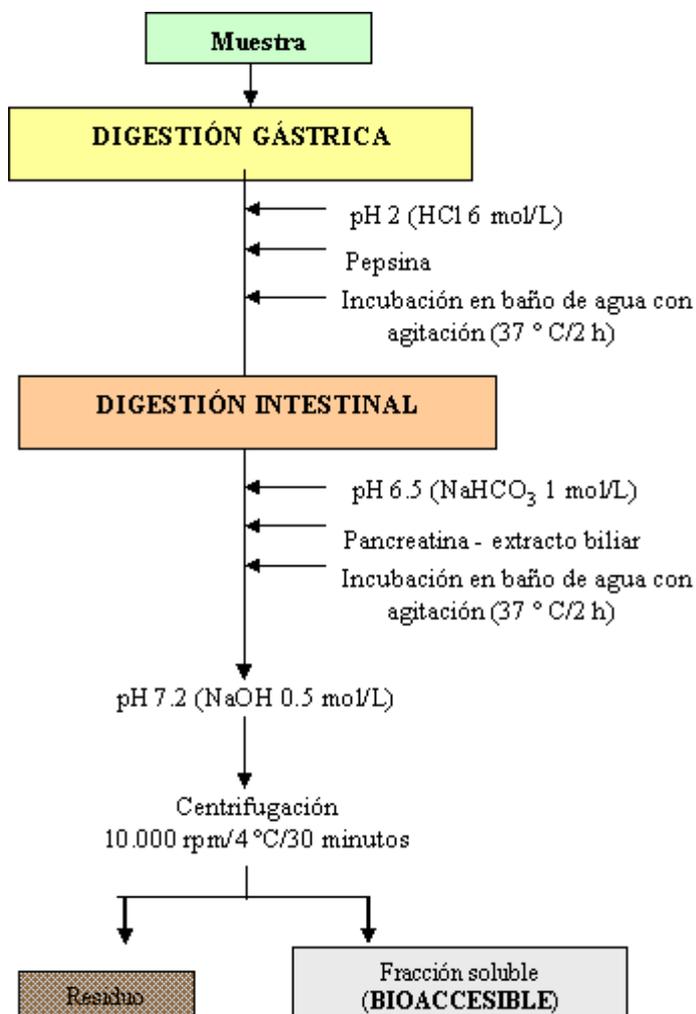


Figura 17. Esquema del protocolo de digestión gastrointestinal

#### 4.2. Determinación de la capacidad antioxidante de la fracción bioaccesible

La determinación de la capacidad antioxidante de la fracción bioaccesible se llevó a cabo empleando el método de la capacidad reductora de hierro férrico (FRAP) con ligeras modificaciones (Benzie y Strain, 1996). Este método colorimétrico se basa en la reducción de un complejo de hierro y tripiridil-s-triazina. A bajo pH y en presencia de antioxidantes (reductores), la forma férrica del complejo hierro-tripiridil-triazina ( $\text{FeIII-TPTZ}$ ), se reduce a su forma ferrosa ( $\text{FeIITPTZ}$ ). El complejo reducido posee una coloración azul intensa que presenta su máxima absorción a 593 nm. La aparición del color indica la capacidad reductora de la muestra, proporcional a la concentración de antioxidantes en la misma.

El reactivo de FRAP se preparó diariamente a partir de 25 mL de tampón acetato 0.3 M (Panreac) a pH 3.6, 2.5 mL de disolución de 2,4,6-tripiridil-s-triazina 10 mM (Panreac) en HCl 40 mM (Merck) y 2.5 mL de cloruro férrico 20 mM (Panreac). La disolución se mantuvo a 37 °C durante su uso.

Para el análisis se utilizaron microplacas de 96 pocillos. Se adicionaron 180  $\mu\text{L}$  de reactivo de FRAP a 20  $\mu\text{L}$  de muestra o de patrón ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Prolabo). Se cuantificaron blancos tanto del medio de digestión gastrointestinal como del reactivo de FRAP. Transcurridos 4 min y 30 min desde el inicio de la reacción se procedió a la lectura de la absorbancia a 593 nm mediante un lector de microplacas (PolarSTAR OPTIMA, BMG-Labtech). Las concentraciones se calcularon por interpolación frente a una curva de calibrado en el intervalo 100 - 2000  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresan como concentración equivalente de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (mM)/100 g muestra.

#### 4.3. Determinación de los niveles GSH/GSSG en la fracción bioaccesible

Los niveles de GSH y GSSG se determinaron aplicando el método descrito por Hissin y Hilf (1976). Para la cuantificación de GSH, se incubaron 10  $\mu\text{L}$  de la fracción soluble con 10  $\mu\text{L}$  de tampón formaldehído [formaldehído 37-40%; 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (Sigma)] en proporción 1:4 v/v; pH 8], 170 mL de 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -5 mM EDTA y 10  $\mu\text{L}$  de solución 1 mg/mL de o-ftaldialdehído (OPT, Fluka). Tras mezclar e incubar a

temperatura ambiente durante 45 min, se midió la intensidad de fluorescencia a longitudes de onda de excitación/emisión de 355/460 nm en un lector de microplacas (PolarSTAR OPTIMA).

Para la cuantificación de GSSG, la fracción soluble (10  $\mu$ L) se incubó a temperatura ambiente con 10  $\mu$ L de tampón formaldehído y 4  $\mu$ L de 40 mM N-etilmaleimida (Sigma) durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añadió 0.1 M NaOH (176  $\mu$ L) y OPT (10  $\mu$ L) y tras mezclar e incubar 45 min a temperatura ambiente se procedió a la lectura de fluorescencia en las condiciones descritas anteriormente. Las concentraciones de GSH y GSSG se calcularon mediante interpolación en curvas de calibrado independientes (0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200  $\mu$ g/mL; Sigma).

#### *4.4. Extracción con ácido ortofosfórico de alimentos tratados con As(V)*

Los alimentos que se trataron con As(V) mediante un proceso de remojo o de cocción fueron posteriormente extraídos con ácido ortofosfórico para la evaluación de las especies arsenicales que contienen. Se adicionó a la muestra (1 g), 4 mL de ácido ortofosfórico 3 mol/L (Panreac) y se calentó a 90 °C durante 4 horas. Posteriormente se centrifugó la muestra (4000 rpm; 10 min) y el sobrenadante se llevó a pH 6 mediante la adición de NaOH 8 mol/L (Panreac). Las formas arsenicales generadoras de hidruros existentes en el sobrenadante se cuantificaron mediante espectrofotometría de absorción atómica acoplada a la generación selectiva de hidruros mediante trampa criogénica siguiendo el protocolo descrito en el apartado 14.4.

### **5. Evaluación del metabolismo del arsénico inorgánico en las células epiteliales del intestino**

El estudio de las posibles transformaciones de las formas arsenicales inorgánicas [As(III) y As(V)] durante su contacto con el epitelio intestinal se llevó a cabo empleando células Caco-2 y HT29-MTX. El metabolismo se evaluó en función del tipo celular, el estadio de diferenciación, el tiempo de exposición, el soporte empleado para el crecimiento celular y la presencia de componentes dietéticos. Adicionalmente se

---

evaluó la expresión diferencial de ARNm de la arsénico-3-metiltransferasa (*AS3MT*), enzima responsable del metabolismo del arsénico inorgánico, y la expresión génica de los marcadores de diferenciación celular de ambas líneas celulares.

La densidad de siembra en todos los casos, salvo que se indique lo contrario, fue de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

### 5.1. Expresión relativa de ARNm de marcadores de diferenciación celular en Caco-2 y HT29-MTX

Los estudios se realizaron en células Caco-2 y HT29-MTX tras 5, 15 y 21 días postsiembra sembradas en placas de 12 pocillos. En células Caco-2 se evaluó la expresión de fosfatasa alcalina intestinal (*ALPI*), sucrosa isomaltasa (*SI*) y dipeptidil peptidasa IV (*DDP4*) y en células HT29-MTX se evaluó la expresión de mucina *MUC5AC*. Tras los distintos tiempos en cultivo, las células se lavaron 3 veces con PBS y se recuperaron por rascado para la extracción del ARN total y posterior obtención del ADNc. Los protocolos de extracción de ARN, transcripción reversa (RT) y PCR cuantitativa (qPCR) se detallan en el apartado 12. Los datos obtenidos se normalizaron empleando el gen de referencia 18S ribosomal (*RN18S*) y se analizaron mediante el software *relative expression software tool*, versión 2006 (REST, 2006; Pfaffl, 2002). Los valores de expresión obtenidos a los 15 y 21 días postsiembra se relativizaron respecto a los valores hallados a los 5 días postsiembra. Los oligonucleótidos empleados y sus eficacias se describen en la tabla 7.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos empleados para qPCR en los estudios de metabolismo del arsénico inorgánico.

Gen	GenBank	Secuencias 5'-3'	Eficacia	Tamaño del amplicon (bp)	Referencia
<i>AS3MT</i>	NM_020682.3	F:CGTCTATACGAGCCTTGAAC R: CATGTGCAAGGCCGGCTTCG	1.81 ± 0.3	200	Drobná <i>et al.</i> , 2004
<i>ALPI</i>	NM_001631	F: GTGCGACCAGACGTGAATGA R: CCATGACATGCGCTACGAA	1.88 ± 0.21	175	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>DPP4</i>	NM_001935	F: GTGGCGTGTTCAAGTGTGG R:CAAGGTTGTCTTCTGGAGTTGG	2.01 ± 0.32	111	Varona <i>et al.</i> , 2010
<i>SI</i>	NM_001041	F:AAATCAGACACCCAATCGTTTCC R: GGGCAACCTTCACATCATACAA	2.12 ± 0.17	134	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>MUC5AC</i>	XM_001130382	F: CCTTCGACGGACAGAGCTAC R: TCTCGGTGACAACACGAAAG	1.84 ± 0.25	111	Ohuchida <i>et al.</i> , 2006
<i>RN18S1</i>	NR_003286.2	F: CCATCCAATCGGTAGTAGCG R: GRAACCCGTTGAACCCATT	151	1.94 ± 0.08	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>

## 5.2. Evaluación de factores que pueden afectar al metabolismo en células intestinales diferenciadas (15 días postsiembra)

### 5.2.1. Influencia del tiempo de exposición

Los estudios se realizaron en células Caco-2 y HT29-MTX sembradas en placas de 6 pocillos con su medio correspondiente (DMEMc para Caco-2 y HT-DMEMc para HT29-MTX). Transcurrido el tiempo postsiembra estipulado, las células se expusieron a 10  $\mu\text{M}$  de As(V) o 1  $\mu\text{M}$  de As(III) durante 4, 6, 24, 48 y 72 horas en Medio Esencial Mínimo con sales de Earle (MEM, PAA).

Se evaluaron los ratios de metabolismo:

$$\text{Primer ratio de metabolismo (MMA/Asi)} = \frac{\text{MMA (células+medio)}}{\text{As inorgánico (células+medio)}}$$

$$\text{Segundo ratio de metabolismo (DMA/MMA)} = \frac{\text{DMA (células+medio)}}{\text{MMA (células+medio)}}$$

### 5.2.2. Efecto del soporte de cultivo

Se evaluó la influencia del soporte empleado durante el crecimiento y diferenciación celular. El metabolismo en células diferenciadas en placas de 6 pocillos se comparó con el obtenido en sistemas Transwell<sup>®</sup>. Estos ensayos se llevaron a cabo en células Caco-2 diferenciadas tras 15 días postsiembra y expuestas a As(III) 1  $\mu\text{M}$  durante 48 horas.

### 5.2.3. Efecto de componentes dietéticos

El estudio del efecto la vitamina B12 y del GSH sobre el metabolismo de As(III) y As(V) se llevó a cabo adicionando estos compuestos (100  $\mu\text{g/mL}$  vitamina B12 o 1 mM GSH) junto al arsénico [As(III) 1  $\mu\text{M}$  o As(V) 10  $\mu\text{M}$ ] durante 48 horas a células Caco-

2 mantenidas 15 días postsiembra en placas 6 pocillos. Se evaluaron los ratios de metabolismo.

### 5.3. Influencia del estadio de diferenciación

Los estudios se realizaron en células Caco-2 y HT29-MTX con 5, 15 y 21 días postsiembra. El estudio en 5 días postsiembra se llevó a cabo en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, mientras que el estudio a 15 y 21 días postsiembra se realizó en placas de 6 pocillos. Cada línea celular se sembró en su medio correspondiente (DMEMc para Caco-2 y HT-DMEMc para HT29-MTX). Transcurridos los tiempos postsiembra estipulados, las células se expusieron a 10 µM de As(V) o 1 µM de As(III) durante 24, 48 y 72 horas en Medio Esencial Mínimo con sales de Earle (MEM, PAA).

### 5.4. Expresión relativa de ARNm de As-3-metiltransferasa (AS3MT)

Se evaluó la expresión diferencial de la *AS3MT* en células Caco-2 y HT29-MTX tratadas con el tóxico. A los 5, 15 o 21 días postsiembra, las células se expusieron a 10 µM de As(V) o 1 µM de As(III) en MEM durante 24, 48 y 72 horas. Se utilizaron como control las células no tratadas con arsénico mantenidas en cultivo los mismos tiempos de tratamiento. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla 7.

### 5.5. Efecto del mucus en el metabolismo y retención celular de HT29-MTX.

Con el fin de evaluar la influencia de la capa de mucus secretada por las HT29-MTX (15 días postsiembra) en la captación y metabolismo de especies arsenicales inorgánicas, las células se sembraron en placas de 6 pocillos y transcurridos 15 días se expusieron durante 24 horas a As(III) 1 µM y As(V) 10 µM en medio MEM. Tras la exposición, se recuperó el medio y el mucus fue separado de la monocapa celular siguiendo el método descrito por Mahler *et al.* (2008) con modificaciones. Brevemente, la monocapa celular se mantuvo en contacto durante 1 hora con 1.5 mL de 10 mM N-acetilcisteína (NAC, Sigma) preparada en HBSS a 37 °C y con agitación (135 rpm). Transcurrido este tiempo, el medio (HBSS+NAC) se recuperó por aspiración.

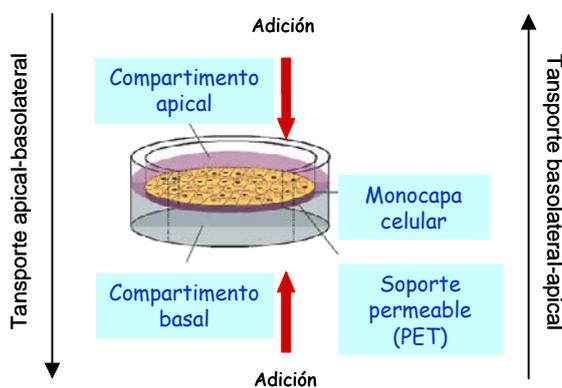
Tras aplicar cada uno de los tratamientos que se describen en este apartado, se recuperó el medio de cultivo y las células se lavaron 3 veces con PBS, se rascaron y lisaron con Tritón X-100 0.1% (m/v) (Merck). En el medio de cultivo se determinó el contenido total de arsénico mediante espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito (apartado 14.1). La metodología de espectrometría de absorción atómica con generación selectiva de hidruros mediante trampa criogénica (apartado 14.4) se utilizó a pH 1 para el análisis de metabolitos en las células y en los medios de todos los ensayos, así como para la cuantificación de arsénico en mucus (pH 1). Adicionalmente, esta metodología se utilizó a pH 6 para el análisis de especies trivalentes o tioladas pentavalentes, únicamente en células Caco-2 con 15 días postsiembra expuestas a 1  $\mu\text{M}$  de As(III) o 10  $\mu\text{M}$  de As(V) 48 horas.

## **6. Evaluación de la permeabilidad aparente, transporte y retención celular de especies arsenicales por la línea celular Caco-2**

Se ha estudiado la retención celular, transporte y permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) de especies arsenicales a través de la monocapa formada por las células Caco-2 diferenciadas. Esta investigación se aplicó a las formas inorgánicas [As(V) y As(III)], monometiladas [MMA(V) y MMA(III)] y dimetiladas [DMA(V) y DMA(III)], utilizando el sistema Transwell® para el cultivo. A continuación se describen los protocolos de trabajo para la realización de estos estudios tanto en las condiciones estándar de trabajo (pH 7.2, 37 °C), como en las condiciones específicas aplicadas para evaluar los posibles mecanismos implicados en el transporte intestinal (apertura de las uniones intercelulares, pH, temperatura). Los medios de cultivo, las concentraciones de especies arsenicales y los tiempos de exposición utilizados varían entre los estudios realizados. Por este motivo, y con el objeto de facilitar la interpretación de los resultados obtenidos, las condiciones particulares de cada ensayo se detallan en el correspondiente apartado de resultados.

6.1. *Ensayos de transporte, acumulación celular y permeabilidad en condiciones estándar*

Los ensayos se llevaron a cabo en dirección apical-basolateral (sentido absorbivo) y en dirección basolateral-apical (sentido secretorio) del sistema Transwell® (Figura 18). Se empleó como medio de cultivo la solución salina de Hanks con NaCO<sub>3</sub> (Sigma) (HBSS), suplementada con 10 mM HEPES (pH 7.2). Para las especies arsenicales pentavalentes [As(V), MMA(V) y DMA(V)], se realizaron también ensayos en medio DMEMc.



**Figura 18.** Diseño de los estudios de transporte realizados en el sistema Transwell®.

Antes de iniciar las experiencias, las células diferenciadas en Transwell® se acondicionaron durante 15 minutos con el medio de ensayo, HBSS o DMEMc. Posteriormente, se retiró el medio y se adicionaron 1.5 mL (apical) o 2 mL (basal) de los patrones de especies arsenicales preparados en HBSS o DMEMc al compartimento dador (apical, para el transporte apical-basolateral o basal para el transporte basolateral-apical) y 1.5 o 2 mL de medio HBSS o DMEMc al compartimento receptor. Los Transwell® se introdujeron en el incubador (37 °C, 95% de humedad relativa, 5% de CO<sub>2</sub>). A los tiempos que se detallan en el correspondiente apartado de resultados, las

células se sacaron del incubador y se procedió a retirar del compartimento aceptor una alícuota del medio (300-400  $\mu\text{L}$ ), que se sustituyó por el mismo volumen de medio sin adición de arsénico. En las alícuotas obtenidas se procedió a la cuantificación de arsénico total por espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito, tal y como se describe en el apartado 14.1.

Los coeficientes de permeabilidad aparente se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$P_{\text{app}} = (dC/dt) (V_r/AC_o)$$

Donde:

$dC/dt$  es el flujo ( $\mu\text{M/s}$ ) determinado por la pendiente lineal de la ecuación que rige la variación de las concentraciones de arsénico, corregidas con la dilución, frente al tiempo.

$V_r$  es el volumen del compartimento aceptor (apical: 1.5 mL, basal: 2 mL).

$A$  es la superficie ocupada por la monocapa celular ( $4.67 \text{ cm}^2$ ).

$C_o$  es la concentración inicial de arsénico en el compartimento dador.

Se calculó el ratio de eliminación ( $E_r$ ) mediante la siguiente ecuación:

$$E_r = \frac{P_{\text{app}} (\text{basal-apical})}{P_{\text{app}} (\text{apical-basal})}$$

Para el transporte de MMA(V) en DMEMc se calculó la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ). Se utilizó para ello el programa GraphPad Prism 5.

Finalizados los ensayos de permeabilidad y transporte, se cuantificó el contenido de arsénico y/o especies arsenicales en las células. Los datos de transporte se expresaron como cantidad de arsénico total (ng) normalizado por el número total de células o por el contenido total de proteína determinado por el método Bradford (apartado 13).

### 6.2. Estudio del transporte paracelular

La participación de la vía paracelular en la absorción de las formas arsenicales se estudió mediante la modulación de las uniones intercelulares. Para ello, se adicionó una disolución 5 mM de EDTA preparada en PBS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  a los compartimentos apical y basal del sistema Transwell<sup>®</sup>, y se mantuvo en contacto durante 5 minutos. Posteriormente, se retiró el EDTA, se lavó la monocapa con HBSS y se añadieron al lado apical 1.5 mL de las disoluciones patrón de especies arsenicales preparadas en medio HBSS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y al lado basolateral 2 mL de HBSS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . La evaluación de la acumulación celular y de la  $P_{\text{app}}$  en dirección apical-basal se realizó tal y como se describe en el apartado 6.1. Los resultados obtenidos se compararon con los hallados en células no tratadas con EDTA.

### 6.3. Efecto del pH

Se evaluó el efecto de la diferencia de pH entre el compartimento apical y basal (5.5/7.2) sobre la absorción de las formas arsenicales. Este estudio se llevó a cabo en dirección apical-basal empleando medio HBSS ajustado a pH 5.5 mediante la adición de 5 mM de ácido 2-o-(N-morpholino) etanesulfónico (MES, Sigma) en el compartimento apical, y HBSS-HEPES a pH 7.2 en el compartimento basal. El cálculo de la  $P_{\text{app}}$  y de la retención celular de las distintas especies arsenicales se realizó según lo descrito en el apartado 6.1. Los resultados obtenidos se compararon con los valores hallados en condiciones de igualdad de pH en ambos compartimentos (7.2/7.2).

### 6.4. Efecto de la temperatura

Se evaluaron los parámetros de transporte y acumulación celular a 4 y 15 °C en dirección apical-basal para patrones de especies arsenicales preparados en medio HBSS a pH 7.2. Los Transwell<sup>®</sup> se mantuvieron en cámaras con temperatura controlada durante el tiempo de ensayo.

El cálculo de la acumulación celular y de la  $P_{\text{app}}$  se realizó según lo descrito en el apartado 6.1. Los resultados obtenidos se compararon con los valores de  $P_{\text{app}}$  hallados a

37 °C. Adicionalmente se calculó la energía de activación de las especies arsenicales para lo cual se aplicó la ecuación de Arrhenius a los datos de  $P_{app}$  obtenidos:

$$P_{app} = P_0 e^{-E_p/RT}$$

donde:

$P_{app}$  es el coeficiente de permeabilidad aparente

$P_0$  es un factor pre exponencial

R es la constante de los gases

T es la temperatura absoluta en grados Kelvin

### 6.5. Integridad de la monocapa celular

La integridad de la monocapa celular Caco-2 en el transcurso de los ensayos se evaluó mediante: a) la determinación de la RET, b) la determinación de la  $P_{app}$  o del transporte del marcador de transporte paracelular lucifer yellow (LY, Sigma) y c) la evaluación de la viabilidad celular.

Se fijaron los siguientes criterios para considerar la monocapa celular de Caco-2 íntegra:

- Valores de RET con variaciones menores al 20% respecto al valor inicial y al control.
- $P_{app}$  del LY  $\leq 0.5 \times 10^{-6}$  cm/s y transporte de LY  $\leq 2\%$ .
- Viabilidad celular  $\geq 80\%$  de la viabilidad existente en el control.

En los ensayos de transporte y retención celular, la RET se midió al inicio y final del ensayo. En los experimentos de permeabilidad, la RET se midió, además, en todos los tiempos de toma de muestra estipulados.

Respecto a la utilización de LY para evaluar la integridad de la monocapa, este compuesto se adicionó a una concentración de 100  $\mu$ M al compartimento dador tanto de los pocillos control como de los pocillos tratados con arsénico. En los ensayos de permeabilidad, se calculó la  $P_{app}$  del LY en base a la concentración hallada a los distintos tiempos de toma de muestra. En los ensayos de transporte y retención celular,

se calculó el transporte de LY a tiempo final. Con el fin de evaluar posibles interacciones del LY sobre la captación de las especies arsenicales se realizaron experiencias paralelas con y sin marcador paracelular, que demostraron la ausencia de interferencias debidas a la presencia de LY en el medio. La cuantificación de LY se evaluó tras el análisis de la fluorescencia del LY transportado ( $\lambda_{\text{emisión}} = 485 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{excitación}} = 535 \text{ nm}$ ; PolarSTAR OPTIMA) e interpolación frente a una curva de calibrado de LY (0-100  $\mu\text{M}$ ) preparada en HBSS.

Al finalizar los ensayos, la viabilidad celular se evaluó mediante una tinción de exclusión con azul tripán 0.4% v/v.

## **7. Estudio de los transportadores implicados en la absorción intestinal de As(V) y As(III)**

Para las formas inorgánicas [As(III) y As(V)] se han investigado posibles proteínas implicadas en el transporte transcelular en células Caco-2. Con este objetivo se han realizado estudios de expresión diferencial, inhibición química y silenciamiento génico de transportadores presentes en el intestino y que pertenecen a familias que en otras líneas celulares se han relacionado con el transporte de estas formas arsenicales.

Como en apartados anteriores, se describen a continuación los protocolos generales de trabajo para la realización de estos estudios, mientras que las condiciones particulares de cada ensayo (especies, concentraciones y tiempos) se detallan en el correspondiente apartado de resultados.

### *7.1. Expresión diferencial de transportadores en células expuestas a As(V) y As(III).*

La densidad de siembra fue de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pocillos en medio DMEMc. Tras 13-15 días de diferenciación, se expusieron a patrones de As(V) y As(III) preparados en MEM durante 24, 48 y 72 horas. Transcurrido estos tiempos, las células se lavaron tres veces con PBS y se recuperaron para la extracción de ARN y posterior obtención de ADNc según el protocolo descrito en el apartado 12.

---

La evaluación de la expresión diferencial se realizó mediante qPCR, tal y como se describe en el apartado 12.4. Los transportadores evaluados en las células expuestas tanto a As(III) y As(V) fueron:

- Transportadores de glucosa: dependientes de sodio (SGLT1) o permeasas (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT5).
- Polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP): OATPB, OATPE.
- Aquaporinas (AQP): AQP1, AQP3, AQP4, AQP10.
- Proteínas de resistencia a múltiples drogas (MDR, MRP): P-gp, MRP2 y MRP3.
- Proteína de resistencia al cáncer de mama: BCRP.

Adicionalmente, en las células expuestas a As(V) se evaluaron los siguientes transportadores de fosfato: PiT1, PiT2, NaPiIIa, NaPiIIb.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla 8. Los datos obtenidos para los distintos genes se normalizaron empleando como gen de referencia el *RN18S* y se analizaron mediante el programa REST 2006.

**Tabla 8.** Oligonucleótidos de transportadores empleadas en qPCR.

Gen	GenBank	Secuencia de primers 5'-3'	Longitud del amplicon (bp)	Eficacia	Referencia
<i>OATPB</i> ( <i>SLC02B1</i> )	NM_001145211.1	F: TCAAGCTGTTCGTTCTGTGC R: GTGTTCCCCACCTCGTTGAA	154	1.89 ± 0.08	Sai <i>et al.</i> , 2006
<i>OATPE</i> ( <i>SLC04A1</i> )	NM_016354.3	F: CTGCCAGCCAGAACACTACA R: AGAAGGAGGGGCTTTCTCTG	216	1.95 ± 0.1	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>GLUT1</i> ( <i>SLC2A1</i> )	NM_006516.2	F: CCAGCTGCCATTGCCGTT R: GACGTAGGGACCACACAGTTGC	99	1.89 ± 0.05	
<i>GLUT2</i> ( <i>SLC2A2</i> )	NM_000340.1	F: CACACAAGACCTGGAATTGACA R: CGGTCATCCAGTGGAAGAC	198	2 ± 0.05	
<i>GLUT3</i> ( <i>SLC2A3</i> )	NM_006931.2	F: CAATGCTCCTGAGAAGATCATAA R: AAAGCGGTTGACGAAGAGT	172	1.9 ± 0.1	
<i>GLUT5</i> ( <i>SLC2A5</i> )	NM_003039.2	F: CATCACTGTTGGCATCCTTGTG R: AGGATCGGCCAGCCATCTAC	78	2 ± 0.1	
<i>SGLT1</i> ( <i>SLC5A1</i> )	NM_000343.3	F: TCGGACTGTGGGCTATGTTTT R: GCCACTTCCAATGTTACTAGCA	122	1.87 ± 0.1	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>AQP1</i>	NM_198098.2 (tr.1)	F: TGGCTGTGGGATTAACCCTG R: GGTTGCTGAAGTTGTGTGTGATC	65	1.8 ± 0.06	
<i>AQP3</i>	NM_004925.3	F: GGAATAGTTTTTGGGCTGTA R: GGCTGTGCCTATGAACTGGT	159	1.85 ± 0.07	

**Tabla 8.** Oligonucleótidos de transportadores empleadas en qPCR. Continuación.

Gen	GenBank	Secuencia de primers 5'-3'	Longitud del amplicon (bp)	Eficacia	Referencia
<i>AQP4</i>	NM_001650.4	F: GGAATTTCTGGCCATGCTTA R: AGACTTGGCGATGCTGATCT	226	1.83 ± 0.05	
<i>AQP10</i>	NM_080429.2	F: GGGTCAAGCTCCCCATTTACATC R:TGTATAGTTCTGTAGGGCATCATGGTAGA	101	1.9 ± 0.04	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>P-gp</i> ( <i>ABCB1</i> )	NM_000927.3	F: AGGAAGACATGACCAGGTATGC R: CCAACATCGTGCACATCAAAC	184	1.78 ± 0.03	Nishimura <i>et al.</i> , 2002
<i>MRP2</i> ( <i>ABCC2</i> )	NM_000392.3	F: ACTGTTGGCTTTGTTCTGTCCA R: CAACAGCCACAATGTTGGTCTCTA	100	1.85 ± 0.05	Pfrunder <i>et al.</i> , 2003
<i>MRP3</i> ( <i>ABCC3</i> )	NM_001144070.1	F: GCACCATTGTCGTGGCTACA R: GCAGGACACCCAGGACCAT	68	1.79 ± 0.02	Steinbach <i>et al.</i> , 2003
<i>BCRP</i> ( <i>ABCG2</i> )	NM_004827.2	F: CAGGTCTGTTGGTCAATCTCACA R: TCCATATCGTGAATGCTGAAG	77	1.84 ± 0.06	Gutman <i>et al.</i> , 2005
PiT1 ( <i>SLC20A1</i> )	NM_005415.3	F: CCAACTGTGCAGGCATAGAA R: TTCTTCCTGGTTCGTGCATT	92	1.78 ± 0.08	<a href="http://primerdepot.nci.nih.gov">http://primerdepot.nci.nih.gov</a>
PiT2 ( <i>SLC20A2</i> )	NM_006749.3	F: TCTGTTGGTGCAAACGATGTT R: GGAGCCGGTGGTTTCAAAT	111	1.75 ± 0.04	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
NaPiIIa ( <i>SLC34A1</i> )	NM_003052.4	F: GGTGCATGACTGCTTTAACTGG R: CACAAGTCGAGTGATGTGGTG	91	1.85 ± 0.07	
NaPiIIb ( <i>SLC34A2</i> )	NM_006424.2	F: AAGACCCAGATTAACGTCCTGT R: GTAGGTCACATTCTTCATGGTCC	105	1.9 ± 0.09	

### 7.2. *Inhibición química del transporte de As(V)*

Se evaluó el efecto del fosfato sobre la permeabilidad y retención celular de As(V). El estudio en ausencia de fosfato se llevó a cabo en un medio salino a pH 7.2 elaborado con las siguientes sales: 130 mM de NaCl (Scharlau), 10 mM de KCl (Panreac), 1 mM de CaCl<sub>2</sub> (Scharlau), 1 mM de MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O (Scharlau), 4 mM de NaHCO<sub>3</sub> (Scharlau), 5.5 mM de D-glucosa (Scharlau) y 20 mM de HEPES (PAA). Los medios con fosfato (1.1 mM y 10 mM) se prepararon adicionando NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) al medio salino descrito anteriormente.

Para el estudio de permeabilidad, las células Caco-2 se sembraron en Transwell® utilizando medio DMEMc y se incubaron hasta su diferenciación. Para el ensayo en ausencia de fosfato, el medio salino se adicionó al compartimento apical y basal, y tras 15 minutos de acondicionamiento se procedió a la adición de As(V). Para el ensayo en presencia de fosfato, tras 15 minutos de acondicionamiento en medio salino con fosfato en el medio apical y medio salino sin fosfato en el compartimento basal, se adicionó As(V) al lado apical. En ambos ensayos el cálculo de la P<sub>app</sub> se realizó según el procedimiento descrito en el apartado 6.1.

Para el estudio de retención celular se utilizaron células Caco-2 diferenciadas sembradas en placas de 6 pocillos. Se adicionó el patrón de As(V) preparado en medio salino sin fosfato o en medio con 1.1 mM o 10 mM de fosfato inorgánico. Tras 24 horas de exposición, el medio se retiró y las células se tripsinizaron. Se determinó el número de células, la proteína total y se procedió a la cuantificación de arsénico mediante espectrometría de absorción atómica con generación selectiva de hidruros mediante trampa criogénica (apartado 14.4).

### 7.3. *Inhibición química de los transportadores de As(III)*

Se estudió el efecto de la inhibición de determinados transportadores sobre la permeabilidad aparente y la retención celular de As(III) por las células Caco-2. Los inhibidores ensayados fueron:

- rifamicina SV (sal sódica, Fluka Chemika)

- phloridzin (Phloretin 2'- $\beta$ -D-glucopiranosido, Sigma)
- phloretin ( $\beta$ -2',4',6'-trihidroxi-3-(4-hidroxifenil)propiofenona, Sigma)
- sulfato de cobre ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ , Panreac)

Para el estudio de permeabilidad, las células se sembraron en Transwell<sup>®</sup> y se cultivaron hasta alcanzar la diferenciación celular. Posteriormente se adicionó al compartimento apical el inhibidor preparado a una concentración 100  $\mu\text{M}$  en medio HBSS con piruvato de sodio (1 mM) y HEPES (1 mM). Todos los inhibidores se mantuvieron en contacto con las células durante 15 minutos. Adicionalmente, para la rifamicina SV y el phloridzin se ensayó un tiempo de preincubación superior (60 minutos). Transcurrido este tiempo se retiró el inhibidor y se adicionó el patrón de As(III) preparado en medio HBSS. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de permeabilidad según lo descrito en el apartado 6.1. Los resultados obtenidos se compararon con los valores de  $P_{\text{app}}$  hallados en ausencia de inhibidores.

Los ensayos de retención celular se llevaron a cabo en células Caco-2 sembradas en placas de 12 pocillos. Transcurrido el tiempo de diferenciación, las células se sometieron a los tratamientos con inhibidores y As(III) descritos con anterioridad. Una vez transcurridos los tiempos estipulados, las monocapas celulares se tripsinizaron y se determinó el número de células y la proteína total. Se procedió también a la cuantificación de arsénico mediante espectrometría de absorción atómica con generación selectiva de hidruros mediante trampa criogénica, según se describe en el apartado 14.4.

#### 7.4. Silenciamiento del ARNm de transportadores específicos mediante la técnica de siARN (ARN pequeño de interferencia)

La transfección se realizó empleando siARN y reactivo de transfección de Qiagen (Izasa, España), siguiendo las recomendaciones descritas en *Qiagen's HiPerFect Transfection Reagent Handbook*, con modificaciones. Los genes seleccionados fueron *OATPB*, *AQP10*, *GLUT5* y *NaPiIIIb*.

Los ensayos de silenciamiento génico con siARN se llevaron a cabo inicialmente en células Caco-2 diferenciadas (13-14 días postsiembra), con el fin trabajar con células en las mismas condiciones que las empleadas en el resto de estudios de transporte realizados en la tesis. Tras varias pruebas se evidenció que las células Caco-2 diferenciadas son poco sensibles a la transfección. Un incremento de la concentración del reactivo de transfección o del siARN no mejoró la eficacia del proceso y produjo efectos tóxicos sobre el cultivo celular. Se ensayó como posible alternativa el uso de transfecciones secuenciales. Para ello se sembraron las células y tras 24 horas en cultivo se realizaron transfecciones consecutivas cada 48 horas. Tras la segunda transfección se observaron efectos tóxicos que no permitieron mantener el cultivo en estas condiciones.

Dado que la transfección sólo pudo llevarse a cabo en células no diferenciadas (24 horas postsiembra), fue necesario evaluar la expresión de los transportadores de interés a los tiempos de aplicación de la transfección. Así, las células Caco-2 se sembraron a una densidad de  $7.5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 12 pocillos utilizando DMEMc como medio de cultivo. Transcurridas 24 horas desde la siembra, se llevó a cabo un estudio de expresión génica en el que se evaluó la posibilidad de detectar *GLUT5*, *AQP10*, *OATPB* y *NaPiIIB* bajo estas condiciones. Tras este primer ensayo, en el que confirmó la expresión de los genes a estudiar, se llevó a cabo la transfección con los distintos siARN (Tabla 9).

Para la transfección, las células se tripsinizaron, contaron y diluyeron en DMEMc sin antibióticos ni antifúngicos. Se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $7.5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron 24 horas en las condiciones estándar de cultivo. Posteriormente se procedió al silenciamiento. Para ello, se diluyó el correspondiente siARN a una concentración final de 50 nM en 100 µL de DMEM sin ningún suplemento, se adicionó el reactivo de transfección (10 µL) y se agitó en un vórtex durante 1 minuto. La mezcla se incubó durante 15 minutos para permitir la formación de complejos de transfección y transcurrido este tiempo se adicionó al cultivo celular. El silenciamiento se evaluó a las 24 horas para *GLUT5* y *NaPiIIB*, y a las 48 horas para *OATPB* y *AQP10*. Los tiempos de transfección se seleccionaron en base a los datos de viabilidad. Se utilizó qPCR cuantitativa en las condiciones descritas en el apartado 12.4.

El silenciamiento se monitoreó adicionalmente mediante la observación en el microscopio óptico del cultivo celular transfectado con un control de muerte celular (*All Start HS Cell Death Control siARN*, Qiagen). La observación se realizó a las 2, 4, 6, 24 y 48 horas. En todos los ensayos se sembraron en paralelo controles con reactivos de transfección, controles siARN sin reactivo de transfección y controles de células cultivadas en medio DMEMc sin reactivo de transfección ni siARN. En ellos se evaluó la expresión de los distintos transportadores por qPCR.

En las células transfectadas y en los controles se llevaron a cabo estudios de captación celular de arsénico a las 48 horas postransfección para *OATPB* y *AQP10*, y a las 24 horas postransfección para *GLUT5* y *NaPiIib*. Para ello, tras retirar el medio y lavar las células con HBSS se adicionó al cultivo As(III) o As(V) durante 2 horas, tiempo tras el cual se lavó la monocapa tres veces con PBS. Las células se recuperaron y se lisaron con Tritón X-100 (0.1%, m/v). La retención celular de arsénico se cuantificó mediante la metodología descrita en el apartado 14.4 (CT-HT-AAS).

**Tabla 9.** Secuencia de los ARN de interferencia empleados en los ensayos de transfección transitoria.

siARN	GenBank	Gen	Secuencia 5'-3'
Hs_SLCO2B1_7	NM_001145211	<i>SLCO2B1</i> ( <i>OATPB</i> )	F: GGAGCAAGAGGGUCUUCUUTT R: AAGAAGACCCUCUUGCUCAG
Hs_SLCO2B1_10	NM_001145211	<i>SLCO2B1</i> ( <i>OATPB</i> )	F: CAGGUAUGCUUGUCAUCCATT R: UGGAUGACAAGCAUACCUGGG
Hs_AQP10_4	NM_080429	<i>AQP10</i>	F: GUUGGCACAGCCACUUATT R: UAAGUGGCUGUGCCAACGGTG
Hs_SLC34A2_5	NM_001177998	<i>SLC34A2</i> ( <i>NaPiIb</i> )	F: CAUGACCUUCAUCGUACATT R: UGUACGAUGAAGGUCAUGCCT
Hs_SLC2A5_3	NM_001135585	<i>SLC2A5</i> ( <i>GLUT5</i> )	F: GAAUCUCCUUGCAAACGUATT R: UACGUUUGCAAGGAGAUCCG

## 8. Factores que afectan el transporte intestinal de arsénico inorgánico

En este apartado, y siguiendo con los estudios sobre el transporte intestinal, se ha evaluado el efecto de algunos compuestos sobre la  $P_{app}$  y la retención celular de As(III) y As(V) por células Caco-2 diferenciadas en sistemas Transwell®. Como en apartados anteriores, se describen a continuación los protocolos generales de trabajo mientras que las condiciones particulares de cada ensayo se detallan en el correspondiente apartado de resultados. En todos los ensayos, la integridad de la membrana se monitoreó como se describe en el apartado 6.5.

### 8.1. Efecto del GSH

Se evaluó la  $P_{app}$  y la retención celular de As(V) y As(III) en presencia de GSH. Los patrones se prepararon en medio HBSS con 5 mM de GSH, ajustando el pH a 7.2 con 1 M de  $\text{NaHCO}_3$  (PAA). Los estudios se llevaron a cabo en dirección apical-basal y basal-apical con un tiempo de exposición de 120 min. El cálculo de la  $P_{app}$  y de la retención celular se realizó según lo descrito en el apartado 6.1. Los resultados obtenidos se compararon con los valores de  $P_{app}$  hallados en ausencia de GSH.

### 8.2. Efecto de sales biliares.

Se evaluó la influencia de las sales biliares (25 mg/mL, Sigma), en la  $P_{app}$  y en la retención celular de As(III) y As(V). Las sales biliares se diluyeron en HBSS y se adicionaron al compartimento apical durante 15 minutos para acondicionar la monocapa celular. Posteriormente se adicionó la cantidad de As(V) o As(III) necesaria para alcanzar la concentración deseada y se llevó a cabo el estudio de permeabilidad en dirección apical-basal durante 120 min de exposición. El cálculo de la  $P_{app}$  y de la retención celular se realizó según lo descrito en el apartado 6.1. Los resultados obtenidos se compararon con los valores de  $P_{app}$  hallados en ausencia de sales biliares.

### 8.3. Efecto del extracto de té verde

El efecto del extracto de té verde (ETV, Plantextrakt, Alemania) sobre el transporte y la retención celular de As(III) y As(V) fue ensayado en dirección apical-basal. Para ello se preparó una disolución de 10 µg/mL de ETV en HBSS-HEPES a pH 7.2. Este medio se adicionó sobre la monocapa celular y se mantuvo en contacto durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio apical la disolución de As(III) o As(V) preparada en HBSS-HEPES a pH 7.2 y ETV (10 µg/mL) y se procedió al estudio del transporte durante 240 minutos de exposición. El cálculo de la  $P_{app}$  y de la retención celular se realizó según lo descrito en el apartado 6.1. Los resultados obtenidos se compararon con los valores de  $P_{app}$  hallados en ausencia del extracto de té verde.

## 9. Evaluación de la influencia del modelo *in vitro* de epitelio intestinal sobre la permeabilidad de las formas arsenicales

En este apartado se ha evaluado la influencia del modelo *in vitro* de epitelio intestinal (Caco-2 y cocultivos Caco-2/HT29-MTX) sobre el coeficiente de permeabilidad aparente, la tasa de transporte y la retención celular de las especies arsenicales pentavalentes y trivalentes.

### 9.1. Estudio de permeabilidad y acumulación celular en cocultivos Caco-2/HT29-MTX

La siembra de los cocultivos Caco-2/HT29-MTX se realizó a una densidad de  $6.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, ensayándose distintas proporciones de ambas líneas celulares (90/10, 50/50 y 30/70). Se utilizó medio HT-DMEMc, adicionando 1.5 mL al compartimento apical y 2 mL al compartimento basal. Las células se mantuvieron en Transwell<sup>®</sup> hasta alcanzar la diferenciación (12-14 días postsiembra). Posteriormente se acondicionaron durante 15 minutos con HBSS suplementado con 10 mM de HEPES y durante 120 minutos se expusieron de forma independiente a las distintas especies arsenicales [As(V), MMA(V), DMA(V), As(III), MMA(III) y DMA(III)]. El cálculo de la  $P_{app}$  y la

retención celular se realizó según lo descrito en el apartado 6.1. Los resultados obtenidos se compararon con los valores hallados para el monocultivo Caco-2.

En todos los ensayos se evaluó la integridad de la monocapa celular mediante la medida de la RET, el cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente o transporte del LY, y la viabilidad celular, tal y como se describe en el apartado 6.5. Se fijaron los siguientes criterios para considerar la membrana íntegra:

- Valores de RET y transporte de LY con variaciones inferiores al 20% respecto al valor inicial y al control, para cada una de las proporciones de Caco-2/HT29-MTX.
- Valores de viabilidad celular al finalizar el ensayo  $\geq 80\%$  respecto al control.

En los cocultivos y en el monocultivo Caco-2 se estimó el radio de poro de las uniones estrechas mediante la ecuación

$$R = 2.96 \times 10^6 \times P_{LY} + 4.94 \text{ (Saitoh } \textit{el al.}, 2004)$$

Donde: R es el radio de poro de la unión estrecha

$P_{LY}$  es el coeficiente de permeabilidad aparente del LY

## 9.2. Efecto del mucus sobre la retención celular de MMA(III) y DMA(III) en HT29-MTX

La influencia de la presencia de la capa de mucus secretada por las HT29-MTX en la captación de especies arsenicales metiladas trivalentes se llevó a cabo en células sembradas en placas de 6 pocillos y mantenidas 13-14 días. Transcurrido este tiempo se expusieron a MMA(III) y DMA(III)  $1 \mu\text{M}$  en medio MEM. Tras la exposición, se recuperó el medio y el mucus fue separado de la monocapa celular siguiendo el método descrito por Mahler *el al.* (2008) con modificaciones, tal y como se describe en el apartado 5.3.3.

### 9.3. Estudio del transporte del arsénico presente en alimentos por distintos modelos celulares de epitelio intestinal

El estudio se realizó empleando muestras de arroz (*Oryza sativa*), ajo (*Allium sativum*) y alga parda (*Hizikia fusiforme*). Las muestras de arroz y alga se cocinaron en agua Mili-Q (18.2 MΩ cm), mientras que el ajo se cocinó con un patrón acuoso de As(V) (1 mg/L).

Tras el cocinado, los alimentos se sometieron a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* tal y como se describe en el apartado 4.1. La fracción soluble obtenida tras la digestión gastrointestinal se empleó para el estudio del transporte y retención de arsénico en las monocapas celulares formadas por distintas proporciones Caco-2/HT29-MTX.

La fracción soluble no puede adicionarse directamente al cultivo celular. Previamente es necesario inactivar los enzimas proteolíticos utilizados en el proceso y ajustar el pH y la osmolalidad de las fracciones solubles a valores fisiológicos que permitan conservar la integridad de la monocapa celular. Para inactivar las proteasas, la fracción soluble se sometió a un tratamiento térmico a 100 °C durante 4 minutos y posteriormente se sumergió en un baño de hielo durante 10 minutos. A la fracción soluble inactivada, se le adicionó glucosa (5 mM concentración final; Sigma) y HEPES (50 mM concentración final), componentes necesarios para mantener la viabilidad y actividad celular durante los ensayos, ajustando el pH entre 7.2-7.5 mediante la adición de HCl 3 mol/L (Merck) o NaOH 0.5 mol/L (Panreac). Finalmente la osmolaridad se ajustó a valores entre 300-310 osmol/Kg, mediante la adición de NaCl (Panreac) o agua desionizada. Se utilizó para la determinación de la osmolaridad un osmómetro crioscópico (Osmomat 030-D, Alemania).

Una vez tratadas las fracciones bioaccesibles de ajo, arroz y alga según se ha descrito, se adicionó 1.5 mL de cada una de ellas al cultivo Caco-2 y a los cocultivos Caco-2/HT29-MTX en las proporciones 90/10 y 50/50. Se evaluó la captación celular y el transporte al lado basal a los 120 min de exposición. Durante los ensayos de transporte se evaluó la integridad de la monocapa mediante la determinación de la RET

a tiempo inicial y final de ensayo, y mediante la determinación del transporte de LY a los 120 min (apartado 6.5).

## 10. Estudios de toxicidad en células Caco-2

Los ensayos de toxicidad en células Caco-2 se llevaron a cabo en distintas condiciones. Con el objeto de facilitar la interpretación posterior de los resultados obtenidos, las concentraciones y tiempos utilizados en cada uno de los ensayos se han detallado en el correspondiente apartado de resultados. Las células se sembraron a una densidad de  $7.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en DMEMc, y tras su diferenciación celular se llevó a cabo la exposición a especies arsenicales para valorar los siguientes parámetros: actividad mitocondrial, generación de especies reactivas de oxígeno, tasa de peroxidación lipídica, niveles de glutatión oxidado/reducido, actividades enzimáticas relacionadas con la maquinaria antioxidante, viabilidad celular, tipo de muerte celular, actividad caspasa-3 y expresión diferencial de metaloteoneínas (*MT*) y proteínas de choque térmico (*HSP*).

### 10.1. Evaluación de la actividad mitocondrial

Para los ensayos se empleó resazurina sódica (10-óxido de 7-hidroxi-3hidro-fenoxacin-3-ona sal sódica, Sigma). Las células diferenciadas durante 11-12 días postsiembra en placas 96 pocillos, se expusieron a las especies arsenicales pentavalentes [As(V), MMA(V) y DMA(V)] y trivalentes [As(III), MMA(III) y DMA(III)] preparadas en medio MEM. Tras la exposición, se retiró el medio y el cultivo se lavó con PBS. Posteriormente, se añadieron 500 µL de disolución de resazurina (10 µg/mL en MEM) y se incubó durante 4 horas a 37 °C, 95% humedad relativa y flujo de CO<sub>2</sub> del 5%. La reducción de la resazurina se determinó por espectrofotometría con lecturas a longitudes de onda de 570 y 600 nm (lector de microplacas PowerWave HT, Bio-Tek). Los resultados se expresaron como porcentajes respecto a la absorbancia de las células no tratadas con arsénico.

### 10.2. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Se evaluó la generación de especies reactivas producida por las células Caco-2 crecidas en placas de 96 pocillos (11-12 días), expuestas a especies pentavalentes [As(V), MMA(V) y DMA(V)] y trivalentes [As(III), MMA(III) y DMA(III)] preparadas en MEM, durante 24 horas. Como control positivo se emplearon células tratadas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Prolabo).

Tras los tratamientos, el medio fue eliminado y las células se lavaron con PBS. Se adicionaron 100 µL de 2', 7'- diclorofluoresceína diacetato 100 µM (DCFDA, Sigma) preparada en PBS y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Tras este tiempo, el medio se eliminó, las células se lavaron con PBS, se lisaron utilizando Tritón X-100 (0.1% m/v en PBS, 150 µL) y determinó la fluorescencia ( $\lambda_{\text{excitación}} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisión}} = 530 \text{ nm}$ ) utilizando un lector de microplacas PolarSTAR OPTIMA. Los valores de fluorescencia obtenidos se normalizaron por mg de proteína cuantificada por el método Bradford (apartado 13) y se expresaron como porcentajes frente al control no tratado.

### 10.3. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El método colorimétrico empleado para la determinación de TBARS en células Caco-2 se basó en el protocolo descrito por Aviello *et al.* (2011), con ligeras modificaciones. Brevemente, las células Caco-2 se sembraron en placas de 6 pocillos y tras un periodo de diferenciación de 14-15 días las células se trataron con As(III), MMA(III) y DMA(III) en MEM durante 24 horas. Tras este tiempo, las células se lavaron con PBS y se recuperaron en Tritón X-100 (0.1% m/v, 0.5 µL) en PBS. Sobre el lisado celular se adicionó 0.5 mL de ácido tricloroacético (TCA, 10% m/v, Merck). Tras centrifugación a 11000 rpm durante 10 min, se añadieron 0.5 mL de ácido tiobarbitúrico 0.67% m/v (Fluka). La mezcla se calentó a 80 °C durante 30 minutos y posteriormente se enfrió en hielo. Los equivalentes de malondialdehído (MDA) se midieron a una longitud de onda de 532 nm, mediante un lector de microplacas PolarSTAR OPTIMA. La cuantificación se realizó frente a una curva de calibración de malondialdehído, MDA (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 25 y 50 µM; Sigma). Los resultados se expresaron como porcentaje de equivalentes de MDA respecto al control.

#### 10.4. Cuantificación de los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH)

Los niveles de GSH y GSSG se determinaron aplicando el método descrito por Hissin y Hilf (1976). Las células Caco-2 se sembraron en placas de 96 pocillos y se mantuvieron durante 11-12 días, hasta su diferenciación. Posteriormente se trataron 24 horas con As(V), MMA(V), DMA(V), As(III), MMA(III) y DMA(III) en MEM. Como control positivo se emplearon células tratadas con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tras los distintos tiempos de exposición se retiraron los tratamientos y se lavó la monocapa con PBS. Se lisaron las células con 0.1 mL de Tritón X-100 (0.1% m/v) en tampón Tris 20 mM pH 7.2 (Sigma). Para la cuantificación de GSH y GSSG se utilizaron 10 µL de lisado celular y se aplicó el protocolo descrito en el apartado 4.3. Las concentraciones de GSH y GSSG se calcularon mediante interpolación en curvas de calibrado independientes (0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL; Sigma). Los valores obtenidos se normalizaron por mg de proteína.

#### 10.5. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

Las células Caco-2 se sembraron en placas de 6 pocillos y tras su diferenciación (14-15 días) se trataron 24 horas con especies arsenicales trivalentes [As(III), MMA(III) y DMA(III)]. Tras el tratamiento las células se recuperaron y se incubaron en hielo durante 30 minutos en tampón de lisis [1 mM EDTA, 1 mM fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF, Sigma), Tritón X-100 (0.1% m/v) y 1 mM ditioneitol (DTT, Sigma)]. Tras la centrifugación a 11000 rpm durante 4 minutos, se separó el sobrenadante y se determinó la actividad glutatión peroxidada (GPX) y catalasa (CAT). Como control positivo se emplearon células tratadas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos obtenidos en los distintos ensayos se normalizaron por mg de proteína.

La actividad de la enzima GPX se evaluó siguiendo el protocolo descrito por Esworthy *et al.* (2001) con ligeras modificaciones. Brevemente, en placas de 96 pocillos se añadieron 20 µL de lisado celular, 5 µL de glutatión reductasa 46 U/mL (Sigma), 20 µL de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) 2 mM (Sigma), 20 µL de GSH 10 mM y 5 µL azida sódica 2.25 mM (Panreac), completando hasta 200 µL con

tampón fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05 M, pH 7.0). Se cuantificó la absorbancia de esta mezcla (340 nm durante 5 minutos) utilizando un lector de placas PolarSTAR OPTIMA. Posteriormente se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM a cada uno de los pocillos y se realizó una nueva lectura a 340 nm durante 30 minutos. Los cambios en la absorbancia a 340 nm se determinaron mediante la representación de los valores de absorbancia en función del tiempo. La actividad enzimática se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad Gpx (nmol/min/mL)} = [\Delta A_{340}/\text{min}/0.00373 \mu\text{M}^{-1}] \times [0.2 \text{ mL}/0.02 \text{ mL}]$$

El coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ( $0.00622 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) se ajustó a la longitud del paso del pocillo (0.6 cm).

La actividad de la enzima CAT se determinó según el método descrito por Li y Schellhorn (2007) con ligeras modificaciones. Brevemente, en un volumen de reacción de 250  $\mu\text{L}$  se añadieron 230  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05 M, pH 7.0), 10  $\mu\text{L}$  de lisado celular y 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para una concentración final de 10 mM. Inmediatamente se realizó una lectura espectrofotométrica a 240 nm cada 10 segundos durante 3 minutos (25 °C) (lector de placas PolarSTAR OPTIMA). Adicionalmente, se realizaron lecturas de enzima purificada (Sigma, 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 unidades) y de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en un intervalo entre 5-50 mM. Las muestras se diluyeron con tampón fosfato en caso de ser necesario. La actividad de la catalasa se calculó en base a la tasa de descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , proporcional a la reducción en la absorbancia a 240 nm, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad catalasa (nmol/min/mL)} = [\Delta A_{240}/\text{min}/0.000028 \mu\text{M}^{-1}] \times [0.25 \text{ mL}/0.01 \text{ mL}] \times \text{dilución de la muestra.}$$

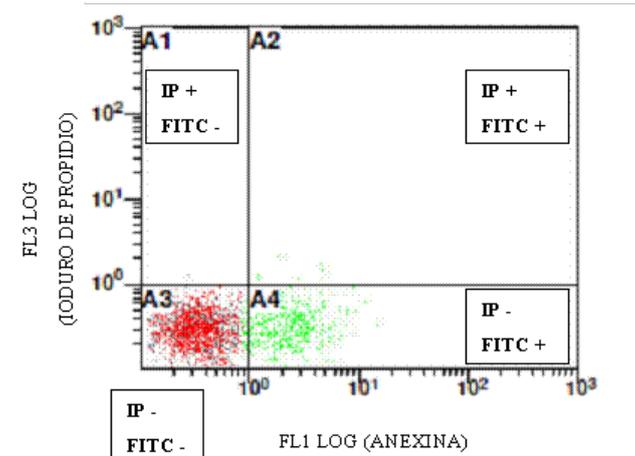
El coeficiente de extinción molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm ( $0.00004 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) se ajustó a la longitud del paso del pocillo (0.7 cm).

#### 10.6. Evaluación de viabilidad, apoptosis y necrosis mediante citometría de flujo

Los niveles de células apoptóticas, necróticas y viables se midieron por citometría de flujo, empleando una doble tinción de anexina conjugada con fluoresceína isotiocianato (anexina V-FITC) y yoduro de propidio (IP).

Tras 14-15 días de diferenciación en placas de 24 pocillos, las monocapas celulares se trataron durante 2 y 24 horas con disoluciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) preparadas en medio MEM. Se realizaron tratamientos con estaurosporina 2  $\mu$ M (Sigma) como control positivo de apoptosis. Transcurridos los tiempos estipulados, las células se trataron con tripsina-EDTA y se centrifugaron (2000 rpm; 5 minutos). A continuación se eliminó el sobrenadante, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de tampón de unión de anexina [10 mM HEPES pH 7.4; 140 mM NaCl (Panreac); 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> (Panreac)]. Posteriormente se adicionaron 5  $\mu$ L de anexina V-FITC (Gibco, Invitrogen, España) y 10  $\mu$ L IP (1  $\mu$ g/mL, Sigma) a 100  $\mu$ L de esta suspensión. Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se adicionó tampón de unión a anexina hasta completar el volumen a 400  $\mu$ L y las muestras se analizaron por citometría de flujo (Beckman Coulter Epics XL-MCL). Todos los ensayos se realizaron por triplicado dos días independientes y se analizaron en cada lectura 10000 eventos.

En la figura 19 se presenta una imagen de citometría de flujo con la distribución de las poblaciones celulares tras la doble tinción IP/Anexina-FITC. Las células del cuadrante inferior izquierdo [(FITC (-), IP (-)] representan las células viables. Las células necróticas [FITC (-), (IP(+)] se localizan en el cuadrante superior izquierdo, mientras que células en estadio temprano [(FITC (+), IP (-)] y avanzado [(FITC (+), IP (-)] de apoptosis se localizan en los cuadrantes derechos y se cuantifican sin distinción en células apoptóticas.



**Figura 19.** Distribución de Caco-2 en citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio y anexina V-FITC.

#### 10.7. Determinación de la actividad caspasa-3

La determinación se basó en la detección del compuesto coloreado *p*-nitroanilina (*p*NA) formado tras la ruptura de un sustrato cromogénico de esta enzima, Ac-DEVD-*p*NA (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilina, Sigma).

Las células Caco-2 sembradas en placas de 6 pocillos se diferenciaron durante 14-15 días y transcurrido este tiempo se expusieron 24 horas a As(III), MMA(III) y DMA(III) en MEM. Se realizaron tratamientos con estaurosporina 2  $\mu$ M (Sigma) como control positivo de apoptosis. Tras los tratamientos, las células se tripsinizaron y se lavaron tres veces con PBS. Al residuo celular se le adicionó tampón de lisis [50 mM HEPES, 5 mM 3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato (CHAPS, Sigma), 5 mM DTT] y se incubó 20 minutos en hielo. La mezcla se centrifugó a 11000 rpm durante 4 minutos y el sobrenadante (5  $\mu$ L) se incubó con 85  $\mu$ L del tampón de ensayo [20 mM HEPES, 0.1% CHAPS, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7.4] y 10  $\mu$ L del sustrato de la caspasa (2 mM). Las placas se incubaron a 37 °C y se procedió a la lectura a 405 nm durante 180 minutos (PolarSTAR OPTIMA) cada 5 minutos durante la primera hora, y a intervalos de 15 minutos el tiempo restante. Los valores se interpolaron frente a una

curva de *p*-nitroanilina (0, 10, 20, 50, 100 y 200  $\mu$ M; Sigma). Los valores obtenidos se normalizaron por mg de proteína.

#### *10.8. Expresión diferencial de metalotioneínas y proteínas de choque térmico*

Las células Caco-2 sembradas en placas de 6 pocillos se diferenciaron durante 14-15 días y transcurrido este tiempo se expusieron a As(III), MMA(III) y DMA(III) en MEM durante 2, 4, 6, 24 y 48 horas. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS y se recuperaron para la extracción de ARN y posterior obtención de ADNc siguiendo el protocolo descrito en el apartado 12.

La evaluación de la expresión diferencial se realizó mediante qPCR tal y como se describe en el apartado 12.4. La secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de estos genes se muestra en la tabla 10. Los genes evaluados fueron los siguientes:

- Metalotioneínas (MT): *MT1A*, *MT1B* y *MT2A*.
- Proteínas de choque térmico (HSP): *HSP27*, *HSP70* y *HSP90*.

**Tabla 10.** Oligonucleótidos utilizada para la amplificación de metalotioneínas y proteínas de estrés térmico.

<b>Gen</b>	<b>GenBank</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Longitud del amplicón (bp)</b>	<b>Eficacia</b>	<b>Referencia</b>
<i>MT1A</i>	NM_005946.2	F: CTCGAAATGGACCCCAACT R: ATATCTTCGAGCAGGGCTGTC	219	1.85 ± 0.21	Yamasaki <i>et al.</i> , 2007
<i>MT1B</i>	NM_005947.2	F: GCCCTGACTTCTCATATCTTG R: GGCACTTCTCTGATGAGCCTT	224	1.94 ± 0.32	Oppermann <i>et al.</i> , 2001
<i>MT2A</i>	NM_005953.3	F: AAAGGGGCGTCGGACAAGT R: TAGCAAACGGTCACGGTCAG	126	1.88 ± 0.22	Song and Freedman, 2005
<i>HSPB1</i> ( <i>HSP27</i> )	NM_001540.3	F: ATGGCTACATCTCCCGGTGC R: ACAGGGAGGAGGAAACTTGGG	81	1.81 ± 0.15	Hu <i>et al.</i> , 2008
<i>HSPA1A</i> ( <i>HSP70</i> )	NM_005345.5	F:GGAAGGACCGAGCTTCTCGC R:AGGAGTAGGTGGTCCCCAGGTC	136	2.01 ± 0.19	Alard <i>et al.</i> , 2009
<i>HSP90AB1</i> ( <i>HSP90</i> )	NM_007355.2	F:GGCAGTCAAGCACTTTTCTGTAG R: GTCAACCACACCACGGATAA	199	1.97 ± 0.37	Yao <i>et al.</i> , 2010

### *10.9. Evaluación de la morfología nuclear y del citoesqueleto mediante microscopia de fluorescencia*

Las células Caco-2 se sembraron en DMEMc sobre cubreobjetos redondos (20 mm de diámetro) colocados sobre placas de plástico de 6 pocillos. Los cubreobjetos se esterilizaron previamente mediante inmersión en etanol. La densidad de siembra fue de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en cultivo durante 8-9 días, cambiando el medio cada 2-3 días. Transcurrido este tiempo se retiró el medio DMEMc y la monocapa se lavó con MEM.

Para la evaluación de la morfología nuclear, las células se trataron con As(III) 10 µM, MMA(III) 1 µM y DMA(III) 5 µM durante 24 horas en MEM. Se realizaron preparaciones por triplicado y en todos los ensayos se incluyeron células control sin ningún tratamiento con arsénico pero mantenidas el mismo tiempo en cultivo. Transcurrido el tiempo de tratamiento las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (4% m/v) en PBS durante 15 minutos. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% (m/v) en PBS durante 5 minutos. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS y se secó la monocapa celular. La tinción de núcleos se llevó a cabo con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma), 5 µg/mL, en oscuridad durante 10 minutos. El exceso de colorante se retiró lavando la monocapa con PBS.

La evaluación de la distribución de la actina filamentosa y la estructura del citoesqueleto celular se llevó a cabo en células Caco-2 tratadas con As(III) 10 µM en MEM durante 24, 48 y 72 horas. Adicionalmente se realizaron controles sin arsénico mantenidos el mismo tiempo en cultivo y tratamientos con citocalasina B (5 µg/mL) (Sigma) durante 4 horas. Este compuesto es un inhibidor de la polimerización de la actina globular que evita su agregación y la formación de la actina filamentosa. El procedimiento de fijación y permeabilización fue el mismo que el descrito anteriormente. La tinción fluorescente se llevó a cabo con 400 µL de faloidina conjugada con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC; Sigma) (100 µg/mL) durante 20 minutos en oscuridad. Tras este tiempo se lavó la monocapa 2 veces con PBS y se aplicó una disolución de DAPI, 5 µg/mL, durante 10 minutos.

Finalmente las muestras se montaron en glicerol-PBS (1:1) y se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon eclipse 90i (DAPI:  $\lambda_{\text{excitación}} = 340 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisión}} = 485 \text{ nm}$ ; faloidina-TRITC:  $\lambda_{\text{excitación}} = 540 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisión}} = 605 \text{ nm}$ ).

## **11. Estudio de la respuesta inflamatoria de las células epiteliales del intestino expuestas a especies arsenicales trivalentes**

Los estudios sobre respuesta inflamatoria se llevaron a cabo en monocultivos Caco-2 en estado diferenciado y en cocultivos Caco-2 diferenciadas/células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). En ambos casos, tras la exposición a las formas arsenicales trivalentes [As(III), MMA(III) y DMA(III)] a distintos tiempos, se evaluó la expresión diferencial de citoquinas proinflamatorias y la liberación de éstas al medio de cultivo. Así mismo se evaluó el efecto inflamatorio de la co-exposición de estas formas arsenicales con el lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella enterica* subgrupo *enterica* serotipo *typhimurium* (Sigma).

### *11.1. Estudios de respuesta inflamatoria en monocultivos Caco-2*

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 12 pocillos. Las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en DMEMc y se mantuvieron durante 12-14 días hasta su diferenciación. Transcurrido este tiempo se realizaron las adiciones de 1  $\mu\text{M}$  As(III) y DMA(III), y 0.1  $\mu\text{M}$  de MMA(III) solos o en combinación con LPS (10 ng/mL). Las disoluciones se prepararon en MEM suplementado con HEPES (1 mM) y piruvato sódico (1 mM). A distintos tiempos (2, 4, 6, 24 y 48 horas) se retiró el sobrenadante y se almacenó a -80 °C para el posterior análisis de los contenidos de citoquinas. La monocapa celular se lavó 3 veces con PBS, se recuperó por rascado y se centrifugó a 11000 rpm durante 1 min. Posteriormente se procedió a la extracción del ARN total del precipitado celular según el protocolo descrito en el apartado 12. Se realizaron controles no tratados con arsénico ni con LPS.

### 11.2. Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

El aislamiento de los PBMCs se realizó sobre muestras sanguíneas obtenidas en el Centro de Transfusión de Valencia. El tipo de hemoderivado empleado fue *Buffy Coat*-citrato fosfato dextrosa (BC-CPD). Las muestras procedieron de pacientes sanos y su selección fue aleatoria.

Se utilizaron 15 muestras de BC-CPD para la optimización de las condiciones de estudio (densidad celular de siembra, estudios de viabilidad, concentraciones de tóxico y tiempos de exposición). Una vez optimizado el método de trabajo, se utilizaron entre 4 y 6 muestras para llevar a cabo los estudios de respuesta inflamatoria ante la exposición a arsénico de los cocultivos Caco-2/PBMC.

El método empleado para la obtención de células mononucleares se basó en la separación por gradiente, empleando para ello el reactivo Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare). Las muestras sanguíneas se diluyeron 1/1 (v/v) con PBS. Se colocaron 20 mL de Ficoll-Paque en tubos estériles Falcon de 50 mL y sobre esta solución se vertieron lentamente 20 mL de la sangre diluida (Figura 20, tubo izquierdo). Se procedió posteriormente a una centrifugación a 4 °C y 2000 rpm durante 30 min, con acelerado y frenado suave. Tras este tiempo, se retiró el sobrenadante (suero) y el anillo celular formado sobre la solución de Ficoll se aspiró y trasvasó a un nuevo tubo (Figura 20, tubo derecho). El sedimento celular se sometió a tres lavados consecutivos con PBS (1/1, v/v), tras cada uno de los cuales se realizó una centrifugación durante 10 minutos a 1800, 1200 y 800 rpm respectivamente.



**Figura 20.** Fracciones formadas durante el aislamiento de PBMC. El tubo de la izquierda muestra las dos fases previas a las centrifugación (B, sangre diluida 1/2; F, Ficoll-Paque). El tubo de la derecha presenta las tres fases existentes tras la centrifugación (P, plasma; W, capa de células; R, residuo). Imagen obtenida de <http://hipc.stanford.edu/sops/pbmc-isolation-accuspin-conical-method>.

Una vez obtenido un sedimento celular limpio, se procedió al recuento celular en un hematocitómetro. Para ello se realizó una tinción de exclusión con azul tripán 0.4% v/v. Las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pocillos (Corning® CellBIND®) empleando medio RPMI 1640 medium (PAA) suplementado con 10% de suero fetal bovino.

### *11.3. Estudios de respuesta inflamatoria en cocultivo Caco-2/PBMCs.*

Para llevar a cabo el cocultivo Caco-2/PBMC, las células Caco-2 sembradas sobre los insertos permeables Transwell® tal y como se describe en el apartado 3, se incorporaron sobre los pocillos que contenían los PBMC aislados según el apartado

11.2. El medio DMEMc del cultivo Caco-2 se sustituyó por RPMI suplementado. El cocultivo Caco-2/PBMC se mantuvo durante 24 horas en contacto antes de realizar los tratamientos.

Transcurrido el tiempo de contacto, el medio apical fue eliminado y las células Caco-2 se lavaron con RPMI sin suero. Posteriormente se adicionaron al compartimento apical los tratamientos con LPS y/o especies arsenicales todos ellos preparados en medio RPMI sin suero, antibióticos ni antifúngicos. Se realizaron exposiciones a distinto tiempo final (2, 4, 6 y 24 horas), tras los cuales el medio apical se recuperó para el posterior análisis de los niveles de citoquinas. Las células Caco-2 sembradas en los insertos se lavaron con PBS y se recuperaron por raspado y centrifugación (11000 rpm, 1 min), para la extracción de ARN total. El medio basal también se recuperó, centrifugó (2000 rpm, 5 min, 4 °C) y el sobrenadante se almacenó a -80 °C para el posterior análisis de citoquinas y arsénico total (apartado 14.1). Los PBMCs recuperados tras la centrifugación del medio basal se combinaron con los obtenidos por raspado de las placas de seis pocillos y sobre ellos también se llevó a cabo la extracción de ARN.

Los tratamientos se realizaron como mínimo por triplicado. Se realizaron controles no tratados con arsénico ni con LPS. La integridad de la monocapa formada por las células Caco-2 se evaluó mediante la lectura de la RET al principio y al final de las experiencias, y mediante la cuantificación del transporte del marcador LY, tal y como se describe en el apartado 6.5.

#### *11.4. Expresión diferencial de citoquinas proinflamatorias en monocultivos Caco-2 y en cocultivos Caco-2/PBMC*

Los ensayos de expresión diferencial se llevaron a cabo sobre las células tratadas con arsénico y/o LPS, y recuperadas como se describe en el apartado 11.1 para los ensayos con monocultivos Caco-2 y en el apartado 11.3 para los ensayos con cocultivos Caco-2/PBMCs. La extracción de ARN y posterior obtención de ADNc se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 12.

La evaluación de la expresión diferencial se llevó a cabo mediante qPCR tal y como se describe en el apartado 12.4. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se muestra en la tabla 11. Los genes evaluados fueron los siguientes:

- Monocultivos Caco-2: *IL1 $\alpha$* , *IL1 $\beta$* , *IL6*, *IL8*, *TNF $\alpha$* .
- Cocultivos Caco-2/PBMCs: *IL6*, *IL8*, *TNF $\alpha$* , *IL10* e *IL13*.

**Tabla 11.** Oligonucleótidos de citoquinas empleados en qPCR.

<b>Gen</b>	<b>Genbank</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>	<b>Tamaño amplicon (bp)</b>	<b>Eficacia</b>	<b>Referencia</b>
<i>IL1<math>\alpha</math></i>	NM_000575.3	F: ATCATGTAAGCTATGGCCCACT R: CTTCCCGTTGGTTGCTACTAC	131	1.81 $\pm$ 0.3	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>IL1<math>\beta</math></i>	NM_000576.2	F: TCCCAGCCCTTTTGTGTA R: TTAGAACCAAATGTGGCCGTG	91	1.93 $\pm$ 0.1	Locati <i>et al.</i> , 2002
<i>IL6</i>	NM_000600.3	F: AACCTGAACCTTCCAAAGATGG R: TCTGGCTTGTTCCTCACTACT	159	2.03 $\pm$ 0.3	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>IL8</i>	NM_000584.3	F: GAACTGAGAGTGATTGAGAGTGGA R: CTCTTCAAAAACCTTCTCCACAAC	134	1.86 $\pm$ 0.1	Ohki <i>et al.</i> , 2002
<i>IL10</i>	NM_000572.2	F: GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG R: TCACATGCGCCTTGATGTCTG	112	1.79 $\pm$ 0.1	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>IL13</i>	NM_002188.2	F: CCTCATGGCGCTTTTGTGAC R: TCTGGTTCTGGGTGATGTTGA	134	1.88 $\pm$ 0.4	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	NM_000594.3	F: CCCAGGGACCTCTCTAATCA R: GCTACAGGCTTGTCACTCGG	80	1.98 $\pm$ 0.2	Uray <i>et al.</i> , 2002

*11.5. Determinación de los niveles de IL6, IL8 Y TNF $\alpha$  en monocultivos Caco-2 y en cocultivos Caco-2/PBMCs*

La liberación de las citoquinas proinflamatorias IL6, IL8 y TNF $\alpha$  se cuantificó en los medios obtenidos tal y como se describe en el apartado 11.1 para Caco-2 y en el apartado 11.3 para el cocultivo Caco-2/PBMCs. Las determinaciones se llevaron a cabo, empleando kits comerciales específicos para cada una de ellas (Gen Probe Human ELISA Kits, Diaclone). En cada ensayo se testaron las muestras de referencia incluidas en el kit para verificar el correcto funcionamiento de la técnica. El intervalo de cuantificación y los límites de sensibilidad establecidos por el fabricante se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla 12.** Intervalo de cuantificación y sensibilidad de los ensayos ELISA empleados para la cuantificación de citoquinas.

<b>Citoquina</b>	<b>Intervalo de cuantificación (pg/mL)</b>	<b>Sensibilidad (pg/mL)</b>
IL6	6.25-200	< 2
IL8	62.5-2000	< 25
TNF $\alpha$	25-800	< 10

**12. Extracción de ARN, retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)**

*12.1. Extracción del ARN total de los cultivos celulares*

Para la extracción del ARN de las células en cultivo se utilizó un kit comercial (NucleoSpin ARN II kit; Macherey-Nagel, Alemania), y se siguió el protocolo indicado por el fabricante.

### 12.2. Cuantificación del ARN

El ARN se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se comprobó la calidad del mismo por la relación de absorbancias 260/280 nm (Nanodrop ND-1000). Adicionalmente, la calidad del ARN se verificó visualmente tras una electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v), comprobándose la presencia de las bandas de ARN ribosómico (18S y 28S).

### 12.3. Retrotranscripción (RT)

Para realizar la transcripción del ARN total a ADNc se utilizó un kit comercial (*Reverse Transcriptase Core Kit*, Eurogentec Headquarters), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para un volumen final de reacción de 10  $\mu$ L se llevó a cabo la mezcla que aparece en la tabla adjunta. La mezcla de reacción se sometió a una etapa inicial de calentamiento a 25 °C durante 10 minutos. La retrotranscripción se llevó a cabo a 48 °C durante 30 min. Por último, la inactivación del enzima se realizó por calentamiento a 95 °C durante 5 min.

**Tabla 13.** Reactivos empleados en la retrotranscripción.

Componente	Volumen ( $\mu$ L)	Concentración final
10X tampón de reacción	1	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2	5 mM
2.5 mM dNTP	2	500 $\mu$ M cada dNTP
Oligo dT	0.5	2.5 $\mu$ M
Inhibidor ARNsas	0.2	0.4 U/ $\mu$ L
Retrotranscriptasa (EuroScript RT)	0.25	1.25 U/ $\mu$ L
Agua libre de ARNsas	3.05	—
Muestra (100 ng/ $\mu$ L)	1	100 ng ARN total

#### 12.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

A partir del ADNc obtenido en el apartado anterior, se amplificó el gen de interés mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), empleando para ello el equipo LightCycler® 480 Real-Time q-PCR System (Roche Diagnostics).

Los reactivos y volúmenes empleados para un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$  fueron los siguientes:

- LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (2X) (Roche): 10  $\mu\text{L}$
- Oligonucleótidos (10  $\mu\text{M}$ ) (Biolegio): 2  $\mu\text{L}$
- Agua libre de ARNsas y DNAsas (Roche). 1  $\mu\text{L}$
- ADNc (muestra): 5  $\mu\text{L}$

Las condiciones utilizadas para la reacción qPCR se describen en la tabla 14.

**Tabla 14.** Programa empleado para la reacción de qPCR.

Programa	Modo de análisis	Modo de adquisición	Ciclo	Temperatura (°C)	Calentamiento (hh:mm:ss)	Rampa (°C/s)
Pre-incubación	Ninguno	Ninguno	1	95	00:05:00	4.4
Amplificación	Cuantificación	Ninguno	40	95	00:00:10	4.4
		Ninguno		55	00:00:10	2.2
		Puntual		72	00:00:20	4.4
Curvas de disociación	Curvas de disociación	Ninguno	1	95	00:00:05	4.4
		Ninguno		65	00:01:00	2.2
		Continua		97	00:00:20	0.11
Enfriamiento		Ninguno	1	40	00:00:10	0.15

En cada ensayo se evaluaron controles sin ADNc para verificar la ausencia de DNA genómico. Las curvas de disociación fueron analizadas tras cada ensayo para confirmar la especificidad del producto obtenido en la reacción.

La elección del gen de referencia se llevó a cabo tras la evaluación de  $\beta$ -actina (*ACTB*), 18S ribosómico (*18SRN*) y gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (*GAPDH*) (Tabla 15). Tanto *ACTB* como *GAPDH* mostraron cambios significativos en su expresión tras los tratamientos aplicados, por lo que se descartaron como genes normalizadores. El gen normalizador seleccionado fue el *18SRN*. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado al menos en dos ensayos independientes. Las curvas de eficiencia para cada gen se calcularon empleando 5 diluciones seriadas de  $\frac{1}{2}$  sobre una mezcla de muestras control de cada tipo celular, ensayando 3 réplicas en 3 ensayos independientes. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software REST 2006.

**Tabla 15.** Oligonucleótidos de genes de referencia empleados en qPCR.

<b>Gen</b>	<b>GenBank</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Tamaño del amplicón (bp)</b>	<b>Eficacia</b>	<b>Referencia</b>
<i>RN18S1</i>	NR_003286.2	F: CCATCCAATCGGTAGTAGCG R: GTAACCCGTTGAACCCCAT	151	1.94 ± 0.1	http://pga.mgh.harvard.edu/ primerbank
<i>ACTB</i>	NM_001101.3	F: CTGGCGGCACCACCATGTACCCT R: GGAGGGGCCGACTCGTCATACT	205	1.98 ± 0.3	
<i>GADPH</i>	NM_002046.4	F:CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT R:AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	307	1.80 ± 0.2	Cario <i>et al.</i> , 2000

### 13. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas en las células se llevó cabo mediante el método Bradford. Se siguió el protocolo especificado por el fabricante (Bio-Rad laboratorios). Brevemente, se preparó el reactivo de tinción mediante dilución 1:4 de la solución concentrada en agua Mili-Q y posterior filtración a través de un filtro Whatman 1. Se pipetearon 10  $\mu\text{L}$  de muestra y 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de tinción diluido en los pocillos de una placa de 96. Se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm mediante un lector de microplacas (PolarSTAR OPTIMA). Los resultados se interpolaron frente a una curva de calibrado de albúmina de suero bovino (100 mg/mL BSA, Sigma), preparada en el intervalo 0.05-0.5 mg/mL.

### 14. Cuantificación de arsénico total y especies arsenicales

#### *14.1. Cuantificación de arsénico total mediante espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito*

El contenido de arsénico en las muestras obtenidas de los ensayos con cultivos celulares (medio apical, basal y células) se cuantificaron mediante espectrofotometría de absorción atómica en cámara de grafito (GF-AAS) (Modelo AAnalyst 600, Perkin Elmer). Los medios se cuantificaron sin tratamiento adicional mientras que las células se trataron con 200  $\mu\text{L}$  de Tritón X-100 (0.1% m/v) en PBS antes de su análisis. Las condiciones instrumentales empleadas se detallan en la tabla adjunta.

El control del adecuado funcionamiento de la cuantificación se realizó a través del análisis de muestras de agua con un contenido de arsénico certificado: *EnviroMAT* drinking water (EP-H-2) y RTC QCI-049-1, ambas adquiridas a LGC Standards.

**Tabla 16.** Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de arsénico mediante GF-AAS.

Longitud de onda	193.7 nm			
Rendija	0.7 nm			
Corrección de fondo	Zeeman			
Modo de medida	Absorción integrada calculada por el software			
Tubos	Tubos de grafito pirolizados con plataforma de L'Vov			
Método de calibración	Curva calibrado externa de As(V) en medio de cultivo			
Volumen de muestra	10 $\mu$ L			
Modificador de matriz	Pd (0.05-0.065 mg) y Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (0.003-0.004 mg) en 10 $\mu$ L de HNO <sub>3</sub> al 1% (v/v).			
<b>Programa del horno de grafito</b>				
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo incremento de T <sup>a</sup> (s)	Tiempo permanencia (s)	Flujo de Ar (mL/min)
Secado	120	10	20	250
Secado	300	5	15	250
Mineralización	900	10	20	250
Atomización	2100	0	5	0
Limpieza	2450	1	3	250

#### 14.2. Cuantificación de arsénico total mediante espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros con inyección en flujo

Para el análisis de arsénico total en los alimentos utilizados en esta tesis se procedió a su mineralizaron por vía seca y posterior cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros mediante inyección en flujo (FI-HG-AAS). Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, modelo 3300) acoplado a un sistema de inyección en flujo (Perkin Elmer, modelo FIAS-400) y a un muestreador automático (Perkin Elmer, modelo AS-90).

La muestra (1-5 g) se trató con 2.5 mL de agente de mineralización [mezcla al 20% m/v de MgNO<sub>3</sub> (Panreac) y 2% m/v de MgO (Merck)] y 5 mL de HNO<sub>3</sub> 7 mol/L

(Merck). La mezcla se evaporó a sequedad en un baño de arena (Raypa, modelo PL 5125) y posteriormente se mineralizó en un horno mufla (Heraeus, modelo K1253), aplicando un ciclo temperatura-tiempo en el que tras una subida paulatina de la temperatura (50 °C/hora), las muestras se mantuvieron 12 horas a 450 °C. Si tras el ciclo de mufla se obtuvieron cenizas blancas se procedió a su disolución. En caso contrario, las cenizas se trataron con 5 mL de HNO<sub>3</sub> (50% v/v), se secaron en un baño de arena y fueron sometidas nuevamente al programa temperatura-tiempo indicado anteriormente.

Las cenizas blancas obtenidas tras la mineralización se disolvieron en HCl 6 mol/L (Merck) y en una disolución reductora [5% m/v KI (Panreac) y 5% m/v ácido ascórbico (Merck)]. Transcurridos 30 minutos, la disolución se filtró a través de papel Whatman No. 1 y se llevó a un volumen final, 10 mL o 25 mL en función de la muestra analizada, mediante la adición de HCl 6 mol/L. La proporción de reductor adicionado respecto al volumen final de disolución fue de 1:5.

La cuantificación del arsénico total mediante FI-HG-AAS se llevó a cabo empleando las condiciones instrumentales descritas en la tabla adjunta.

**Tabla 17.** Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de arsénico mediante FI-HG-AAS.

<b>Generación de hidruros</b>	
Muestra	0.5 mL
Disolución reductora	NaBH <sub>4</sub> 0.2% (m/v) en NaOH 0.05% (m/v) Flujo 5 mL/min
Disolución ácida	HCl 10% (v/v). Flujo 10 mL/min
Gas transportador	Argón. Flujo 100 mL/min
<b>Espectroscopía de absorción atómica</b>	
T <sup>a</sup> de atomización	900 °C
Longitud de onda	193.7 nm
Rendija	0.7 nm
Lámpara de As	Lámpara de descarga sin electrodos; 400 mA

El control del adecuado funcionamiento de la cuantificación mediante FI-HG-AAS se realizó a través del análisis de muestras de agua con un contenido certificado de arsénico total: *EnviroMAT drinking water* (EP-H-2) y RTC QCI-049-1. El control de calidad del procedimiento de digestión y posterior redisolución, se realizó con materiales de referencia certificados de alimentos: *Fucus* sp. IAEA 140/TM (IAEA); Rice flour SRM1568a (NIST).

#### *14.3. Determinación de arsénico inorgánico mediante extracción selectiva con cloroformo y cuantificación mediante FI-HG-AAS*

En algunas de las muestras de alimentos utilizados en esta tesis se llevó a cabo la determinación de arsénico inorgánico [As(III)+As(V)]. Para ello se aplicó una digestión ácida, extracción del arsénico inorgánico con solventes orgánicos, retroextracción en medio ácido y cuantificación mediante FI-HG-AAS.

Se pesó la muestra (1-2 g) en un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL. Posteriormente se adicionaron 4.1 mL de agua Mili-Q y la mezcla se agitó mecánicamente durante 10 minutos hasta la completa humectación de la muestra. Finalmente se adicionaron 18.4 mL de HCl 12 mol/L (Merck) y tras agitar, se dejó en reposo durante toda la noche (12-15 horas).

Posteriormente se adicionaron a la digestión ácida, 1 mL de una disolución de sulfato de hidracina (1.5% m/v, Merck) y 2 mL de HBr concentrado (48%, Fluka), agitándose mecánicamente la mezcla durante 1 minuto. A continuación se adicionaron 10 mL de cloroformo (Merck), se agitó la mezcla mecánicamente durante 10 minutos y se centrifugó (2000 rpm/5 minutos) para separar la fase ácida de la fase clorofórmica. La fase clorofórmica se recuperó por aspiración y se depositó en un nuevo tubo de plástico de 50 mL. El proceso de extracción con cloroformo se repitió dos veces más. Al final de esta etapa del proceso, se recuperó un volumen de fase clorofórmica de aproximadamente 30 mL.

El conjunto de las fases clorofórmicas se filtró (filtros de politetrafluoroetileno con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ; Whatman GD/X). El arsénico inorgánico presente en la fase clorofórmica se extrajo empleando HCl 1.2 mol/L. En una primera fase se

adicionaron 10 mL de HCl 1.2 mol/L, y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Las fases se separaron por centrifugación (2000 rpm/5 minutos), y la fase ácida se recuperó por aspiración y se depositó en un vaso de precipitado. El proceso de extracción se repitió una vez más.

Finalmente se procedió a la mineralización de la fase ácida en la que se encuentra el arsénico inorgánico. Para ello, se adicionaron 2.5 mL de agente de mineralización [mezcla de al 20% m/v de  $MgNO_3$  y al 2% m/v de  $MgO$ ] y 10 mL de  $HNO_3$  concentrado (14 mol/L), y la mezcla se evaporó a sequedad en un baño de arena. Posteriormente, se aplicó el proceso de mineralización en horno mufla, disolución de las cenizas blancas y cuantificación mediante FI-HG-AAS descrito para la determinación de arsénico total.

Debido a la inexistencia de muestras certificadas para arsénico inorgánico, el control de la metodología se realizó comparando los valores de arsénico inorgánico hallados en la muestra de referencia certificada para arsénico total, Rice flour SRM1568a (NIST), con el intervalo de valores de arsénico inorgánico hallados previamente en dicha muestra, tanto por nuestro laboratorio como por otros grupos de investigación.

#### *14.4. Cuantificación de arsénico mediante espectrometría de absorción atómica con generación selectiva de hidruros mediante trampa criogénica*

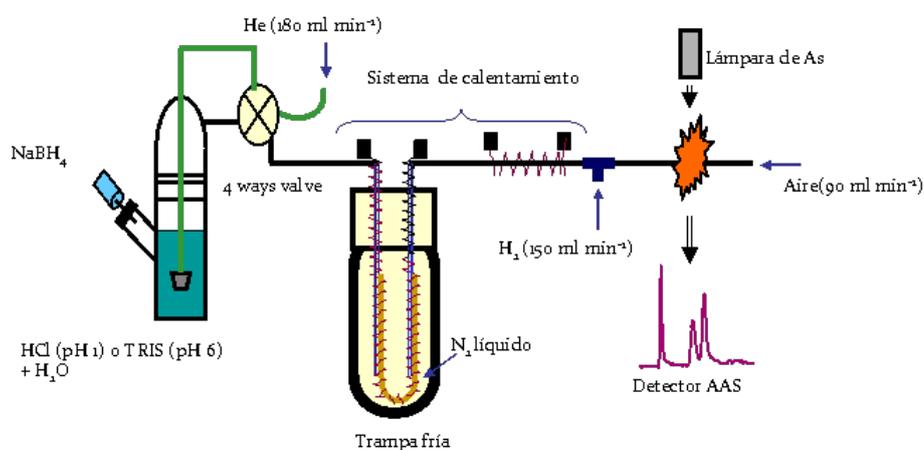
Las especies arsenicales inorgánicas [As(III), As(V)], monometiladas (MMA) y dimetiladas (DMA) presentes en las muestras tanto procedentes de los ensayos con cultivos celulares (células, medios apical, medio basal, mucus) como de los estudios de digestión gastrointestinal (fracción soluble o digestión de los alimentos con ácido ortofosfórico), fueron cuantificadas mediante espectrofotometría de absorción atómica acoplada a la generación selectiva de hidruros mediante trampa criogénica (CT-HG-AAS).

La generación de arsinas se realizó a pH 1 y a pH 6. Para el ensayo a pH 1, en el frasco de reacción se mezcló la muestra, en un volumen variable en función de la concentración de arsénico existente en la misma, con 1 mL de disolución acuosa de antiespumante B al 1% (v/v) (Sigma) y 1 mL de HCl 6 mol/L. El volumen restante hasta

alcanzar 10 mL se completó con agua desionizada. Para el ensayo a pH 6, el HCl 6 mol/L fue sustituido por 1 mL de 2.5 mol/L Tris-HCl (Sigma).

El frasco de reacción se conectó al separador gas-líquido y se inyectó 1 mL de NaBH<sub>4</sub> al 4% m/v (Panreac) en NaOH 0.02 mol/L. Tras la adición de NaBH<sub>4</sub>, el canal de reacción se purgó con 200 mL/min de He durante 2 minutos.

Los hidruros de las arsinas generados en el frasco de reacción y transportados por una corriente de He, fueron retenidos en una resina Chromosorb WAW-dimetildiclorosilano 46/60 (Sigma) colocada en un tubo de vidrio en forma de U sumergido en N<sub>2</sub> líquido. El tubo de vidrio estaba rodeado por una resistencia de 1,6 Ω/ft conectada a un transformador de salida variable. Transcurridos 2 minutos, la resina se retiró del N<sub>2</sub> líquido y se calentó para conseguir la separación de las arsinas según su punto de ebullición (-55 °C para la arsina; 2 °C para la metilarsina; 35.6 °C para la dimetilarsina). Las arsinas fueron transportadas hasta la celda de cuarzo del AAS procediéndose a la cuantificación de las especies arsenicales según las condiciones instrumentales que se muestran en la tabla 18. Un esquema del proceso se presenta en la figura 21. La integración de las señales se realizó en área de pico y la cuantificación se realizó frente a las curvas de calibrado de patrones.



**Figura 21.** Representación esquemática del sistema CT-HG-AAS.

pH 1 las formas trivalentes y pentavalentes generan arsinas, especiándose arsénico inorgánico [As(III)+As(V)], MMA [MMA(III)+MMA(V)] y DMA [DMA(III)+DMA(V)], mientras que a pH 6, solamente las formas trivalentes son capaces de generar arsinas (Devesa *et al.*, 2004). Sin embargo, existen algunos estudios que han comprobado la generación de arsinas por parte de formas pentavalentes tioladas (DMAS, MMAS) a pH 7 (Regmi *et al.*, 2007), a pesar que estudios más recientes han empleado este sistema de cuantificación para discriminar entre formas arsenicales trivalentes y pentavalentes en matrices biológicas complejas (Currier *et al.*, 2011). Debido a estas discrepancias se considera que a pH 1 se detectan contenidos totales de arsénico inorgánico, MMA y DMA, mientras que a pH 6 se cuantifica el As(III) y formas metiladas trivalentes y/o formas metiladas pentavalentes tioladas.

El control del adecuado funcionamiento de la cuantificación a pH 1 se realizó a través del análisis de las muestras de agua *EnviroMAT drinking water* (EP-H-2) y RTC QCI-049-1, certificadas para su contenido en As(V).

**Tabla 18.** Condiciones instrumentales empleadas en la cuantificación de especies arsenicales mediante trampa criogénica-HG-AAS.

<b>Generación de hidruros</b>	
Muestra	Variable en función de la muestra
Diluyente	pH = 1 $\Rightarrow$ 1 mL HCl 6 mol/L pH = 6 $\Rightarrow$ 1 mL Tris-HCl 2.5 mol/L
Antiespumante	1 mL antiespumante B 1% (m/v)
Reductor	1 mL de NaBH <sub>4</sub> 4% (m/v) en NaOH 0.02 mol/L
Gas transportador	He. Flujo 200 mL/min
<b>Espectroscopía de absorción atómica</b>	
Aire	140 mL/min
Hidrógeno	600 mL/min
Longitud de onda	193.7 nm
Rendija	0.7 nm
Lámpara de As	Lámpara de descarga sin electrodos; 400 mA

### **15. Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA), utilizando comparaciones mediante el test de Tukey HSD o t de Student. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15.0. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **CAPÍTULO 1**

---

### **Transformaciones de especies arsenicales durante la digestión gastrointestinal**



El agua de bebida y los alimentos contaminados con arsénico son la principal fuente de exposición al tóxico para los humanos. Tras la ingesta de una especie arsenical a través de estas fuentes podrían producirse modificaciones de la especie química durante el tránsito gastrointestinal. Ello conllevaría cambios en la absorción y toxicidad de este metaloide a nivel intestinal y sistémico. En este capítulo se han evaluado los cambios en el estado de óxido/reducción de las formas arsenicales pentavalentes [As(V), MMA(V), DMA(V)] como consecuencia de su contacto con una matriz alimentaria y del proceso de digestión gastrointestinal.

## **Resultados**

---

### **1.1. Especiación de arsénico en los alimentos crudos**

Los productos vegetales crudos utilizados en esta investigación (ajo, brócoli, espárragos y espinacas) han sido caracterizados en cuanto a su contenido en arsénico total y especies arsenicales. Presentan concentraciones bajas y muy similares de arsénico total (4-14 ng/g peso fresco). Este arsénico es aportado en su totalidad por especies inorgánicas [As(III) + As(V)], con concentraciones no detectables para las muestras del brócoli crudo y una concentración máxima de 14 ng/g peso fresco en una muestra de ajo crudo.

### **1.2. Efecto de la digestión gastrointestinal sobre patrones de especies arsenicales**

El método de digestión gastrointestinal utilizado podría modificar las especies de arsénico inorgánico, monometiladas y dimetiladas. Con objeto de evaluar este efecto, se ha aplicado la digestión gastrointestinal a patrones de 1 mg/L de las especies pentavalentes [As(V), MMA(V) y DMA(V)] y sus análogos trivalentes [As(III), MMA(III) y DMA(III)].

La recuperación de cada especie tras el proceso gastrointestinal es cuantitativa, con valores que oscilan entre 93-109% para todas las especies. As(V), As(III), MMA(V) y DMA(V) no modifican su estado de oxidación tras la digestión aplicada. Las especies metiladas trivalentes, por el contrario experimentan un cambio en el estado de oxidación, apareciendo en forma pentavalente un  $83 \pm 7\%$  del MMA(III) y un  $71 \pm 3\%$  del DMA(III). No se ponen de manifiesto otros cambios cualitativos como metilaciones, desmetilaciones o tiolaciones.

### **1.3. Efecto de la digestión gastrointestinal de alimentos sobre el estado de oxidación de As(V)**

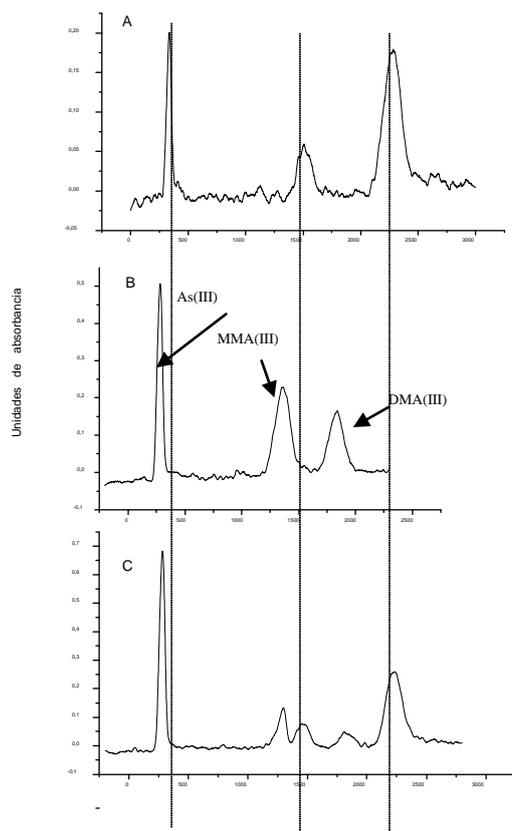
En alimentos puestos en contacto con As(V) es de interés conocer si la especie solubilizada tras la digestión gastrointestinal es únicamente As(V) o podría existir una reducción a As(III). Para estudiar este efecto se han tratado con As(V) los alimentos crudos descritos al inicio de este capítulo, tanto a través de un remojo a temperatura ambiente con As(V) durante 24 horas, como de una cocción en agua con As(V). En la tabla 1 se presentan los valores de arsénico inorgánico existentes en los alimentos tras los procesos de remojo y cocción, así como los contenidos de arsénico inorgánico y As(III) en la fracción bioaccesible obtenida tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de los mismos.

**Tabla 1.** Contenidos de arsénico inorgánico en alimentos tratados con As(V) 1 mg/L (remojo o cocción) y los contenidos de arsénico inorgánico y As(III) en la fracción bioaccesible de los mismos. Los resultados, expresados en peso húmedo (ph), presentan un valor medio  $\pm$  desviación estándar de tres muestras distintas de cada vegetal.

		Alimento	Fracción bioaccesible	
		As inorgánico (ng/g) ph	As inorgánico (ng/g) ph	As(III) (ng/g) ph
Ajo	Remojo	1237 $\pm$ 80	1011 $\pm$ 138	1 $\pm$ 0,1
	Cocinado	1143 $\pm$ 324	573 $\pm$ 253	81 $\pm$ 6
Brocoli	Remojo	937 $\pm$ 86	993 $\pm$ 114	189 $\pm$ 22
	Cocinado	1059 $\pm$ 174	1037 $\pm$ 126	17 $\pm$ 10
Espárrago	Remojo	1035 $\pm$ 214	1097 $\pm$ 192	44 $\pm$ 8
	Cocinado	1526 $\pm$ 164	1589 $\pm$ 127	266 $\pm$ 65
Espinaca	Remojo	840 $\pm$ 134	890 $\pm$ 131	62 $\pm$ 9
	Cocinado	1634 $\pm$ 401	1219 $\pm$ 376	51 $\pm$ 38

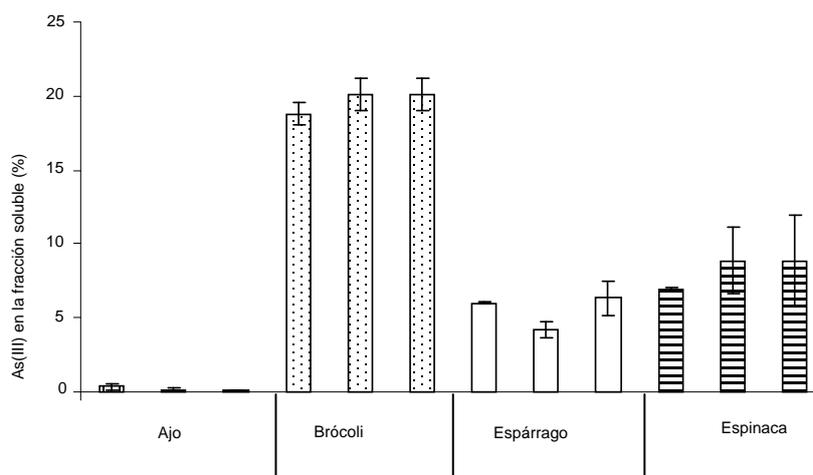
### 1.3.1. Alimentos en remojo

Tras la digestión gastrointestinal se pone de manifiesto que la bioaccesibilidad del arsénico es completa (91-116%). El arsénico presente en la fracción soluble de espárrago, espinaca y brócoli es aportado en su totalidad por arsénico inorgánico. Para la muestra de ajo, también se pone de manifiesto la existencia de arsénico inorgánico en la fracción bioaccesible, si bien no supone la totalidad del arsénico cuantificado, hecho que indica la existencia de otras especies arsenicales. Estas especies, que generan señal en la cuantificación mediante CT-HG-AAS (figura 1), y cuyo tiempo de retención no coincide con el de los patrones de especies arsenicales disponibles en el laboratorio, no han podido ser identificadas.



**Figura 1.** Cromatogramas obtenidos en la cuantificación mediante CT-HG-AAS (pH 6) de: A) fracción soluble del ajo en remojo con As(V); B) patrón de As(III), MMA(III) y DMA(III), 30 ng de cada especie arsenical; C) fracción soluble de ajo en remojo con As(V) adicionada con As(III), MMA(III) y DMA(III).

En la fracción bioaccesible de todas las muestras se detecta As(III). Los porcentajes de As(III) respecto al arsénico inorgánico solubilizado son variables en función de la matriz (figura 2). Los valores más elevados se encuentran en el brócoli (19-20%), seguido de espinaca (7-11%), espárrago (4-7%) y ajo (0.1-0.2%).



**Figura 2.** Porcentaje de As(III) en la fracción soluble obtenidas tras la digestión gastrointestinal de alimentos en remojo con As(V). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Cada barra corresponde a un lote de muestra.

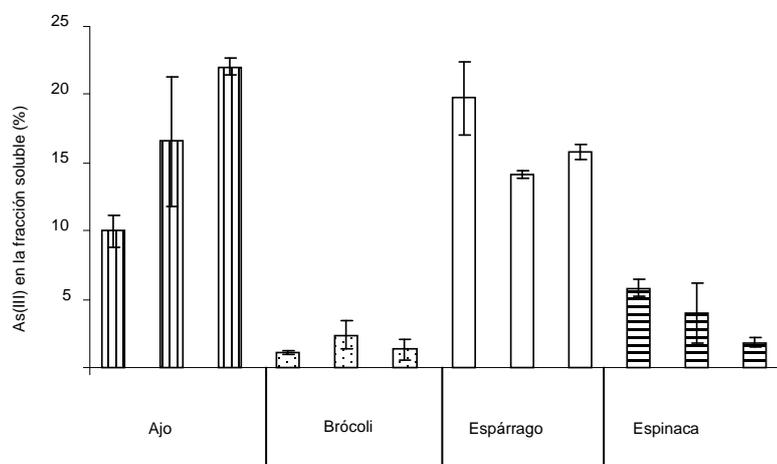
### 1.3.2. Alimentos cocinados

El proceso de cocción de las muestras con agua conteniendo 1 mg/L de As(V), produce un incremento importante en el contenido de arsénico total (736-2251 ng/g peso fresco), que aparece en su totalidad como arsénico inorgánico (758-2100 ng/g peso fresco) (tabla 1). La digestión gastrointestinal de estos alimentos conlleva una solubilización elevada del arsénico para las muestras de brócoli, espárrago y espinacas (84-106%). En las muestras de ajo, la bioaccesibilidad es inferior (56-60%).

Se detecta As(III) en las fracciones solubles de todos los alimentos cocinados (figura 3). Los porcentajes respecto al arsénico inorgánico solubilizado oscilan entre 2 y 22% [ajo (9-22%)  $\approx$  espárrago (14-22%) > espinaca (2-6%) > brócoli (1-2%)]. El porcentaje de As(III) es similar al hallado en las muestras mantenidas en remojo con As(V) (figura 2), si bien se modifica el orden de la gradación de porcentajes entre muestras.

En la fracción bioaccesible del ajo cocinado con As(V) aparecen señales que no corresponden a los patrones disponibles en el laboratorio. Los tiempos de retención de

estas especies no identificadas coinciden con los que se muestran en la figura 1 para la fracción bioaccesible del ajo en remojo.



**Figura 3.** Porcentaje de As(III) en la fracción soluble obtenidas tras la digestión gastrointestinal de alimentos cocinados en presencia de As(V) 1 mg/L. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Cada barra corresponde a un lote de muestra.

#### 1.4. Efecto de la digestión gastrointestinal de alimentos sobre el estado de oxidación de MMA(V) y DMA(V)

Los alimentos crudos descritos al inicio del este capítulo se han puesto en contacto de forma independiente con MMA(V) o DMA(V), tanto a través de un remojo como de una cocción en agua con la especie arsenical. Los contenidos de arsénico en el alimento tras los procesos de remojo y cocinado oscilan entre 1146-2760 ng/g peso húmedo (tabla 2).

Tras estos tratamientos, los alimentos se han sometido a un proceso de digestión gastrointestinal, analizándose el contenido de arsénico bioaccesible. La bioaccesibilidad del arsénico de muestras en remojo con MMA(V) y DMA(V) es elevada (69-102%), siendo el ajo la muestra con menor bioaccesibilidad (tabla 2). En las muestras cocinadas los porcentajes de solubilización son muy inferiores a los encontrados tras el proceso de

remojo (8-20%). Dado que el balance de masas del proceso de digestión gastrointestinal es adecuado para todas las combinaciones alimento/especie (80-112%), indicativo de que no hay pérdidas durante el proceso experimental ni durante la cuantificación, las diferencias de bioaccesibilidad sólo pueden ser atribuidas a los efectos de la matriz alimentaria.

El análisis de la fracción bioaccesible pone de manifiesto que se produce una transformación de MMA(V) y DMA(V) en porcentajes variables dependiendo del alimento (tabla 2). Debido a que mediante la técnica de cuantificación (HG-CT-AAS) a pH 6 se detectan formas metiladas trivalentes y/o pentavalentes tioladas (metodología, apartado 14.4), no es posible identificar la especie arsenical resultante de esta transformación.

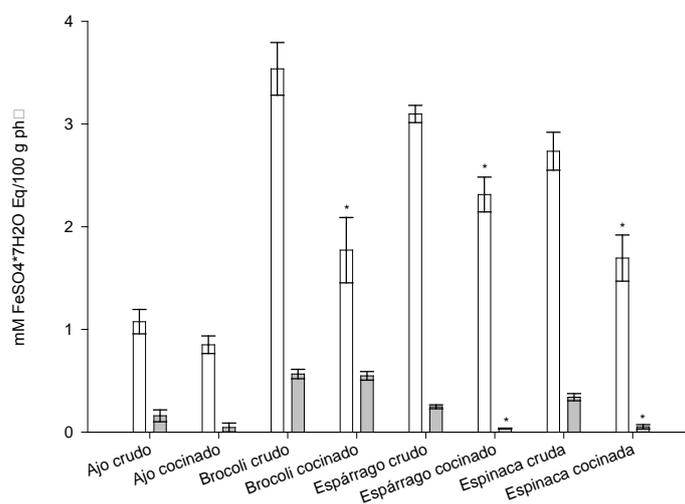
Como se ha comentado con anterioridad, el proceso de digestión aplicado por sí solo no produce cambios en la forma química de las especies metiladas pentavalentes, por lo que los cambios observados sólo pueden deberse a la presencia de la matriz en la digestión gastrointestinal. Cuantitativamente es destacable que hasta un 35% del arsénico bioaccesible aparece en una forma distinta a la adicionada. Los alimentos ensayados tienen distinta capacidad de transformación (espárrago>brócoli>ajo), sin observarse una tendencia clara en función de la especie (mono o dimetilada) o del efecto del tratamiento (remojo/cocción).

**Tabla 2.** Arsénico total en el alimentos tratados con MMA(V) y DMA(V) (remojo y cocción), y en la fracción soluble obtenida tras una digestión gastrointestinal. Se indican también la bioaccesibilidad de arsénico, los contenidos de MMA(III)/MMAS y DMA(III)/DMAS existente en la fracción soluble, y el porcentaje de modificación de la especie metilada. Los datos están expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Alimento y tratamiento			Fracción bioaccesible					
			As Total (ng/g ph)	As Total (ng/g ph)	Bioaccesibilidad (%)	MMA(III)/MMAS (ng/g ph)	DMA(III)/DMAS (ng/g ph)	% Modificación
Ajo	remojo	MMA(V)	1801 $\pm$ 112	1240 $\pm$ 31	69 $\pm$ 2	96 $\pm$ 5		8 $\pm$ 1
		DMA(V)	1405 $\pm$ 149	1064 $\pm$ 59	76 $\pm$ 4		182 $\pm$ 2	17 $\pm$ 3
	cocinado	MMA(V)	1791 $\pm$ 91	226 $\pm$ 32	13 $\pm$ 2	181 $\pm$ 2		4 $\pm$ 0.5
		DMA(V)	2760 $\pm$ 141	245 $\pm$ 17	9 $\pm$ 1		128 $\pm$ 8	5 $\pm$ 0.3
Brócoli	remojo	MMA(V)	1146 $\pm$ 23	1173 $\pm$ 25	102 $\pm$ 2	152 $\pm$ 3		13 $\pm$ 2
		DMA(V)	1359 $\pm$ 111	1060 $\pm$ 101	78 $\pm$ 7		200 $\pm$ 12	19 $\pm$ 3
	cocinado	MMA(V)	1302 $\pm$ 45	257 $\pm$ 22	20 $\pm$ 2	57 $\pm$ 6		22 $\pm$ 3
		DMA(V)	1489 $\pm$ 79	204 $\pm$ 7	14 $\pm$ 1		44 $\pm$ 5	20 $\pm$ 1
Espárrago	remojo	MMA(V)	1308 $\pm$ 131	1108 $\pm$ 66	85 $\pm$ 5	419 $\pm$ 35		35 $\pm$ 3
		DMA(V)	1139 $\pm$ 69	1091 $\pm$ 57	96 $\pm$ 5		288 $\pm$ 12	26 $\pm$ 1
	cocinado	MMA(V)	1217 $\pm$ 47	139 $\pm$ 12	11 $\pm$ 2	48 $\pm$ 4		35 $\pm$ 3
		DMA(V)	1319 $\pm$ 99	104 $\pm$ 9	8 $\pm$ 1		25 $\pm$ 4	24 $\pm$ 4

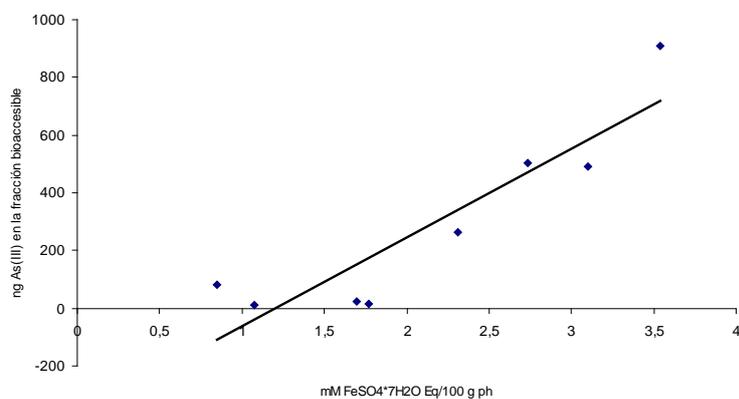
### 1.5. Capacidad antioxidante de la fracción soluble tras la digestión gastrointestinal de alimentos

Se ha analizado la capacidad antioxidante existente en la fracción soluble obtenida tras la digestión gastrointestinal de las muestras, tanto en remojo como cocinadas. Los resultados obtenidos, expresados como equivalentes de  $\text{FeSO}_4$  mM/100 g producto fresco a los 4 minutos y 30 minutos de iniciada la reacción, se muestran en la figura 4. La capacidad antioxidante en las muestras en remojo presenta la gradación brócoli > espárrago > espinaca > ajo, no existiendo diferencias de gradación entre los dos tiempos de análisis. Tras el cocinado se reduce significativamente el valor de equivalentes de  $\text{FeSO}_4$  en todas las muestras a excepción del ajo, indicando que las temperaturas aplicadas durante la cocción afectan a los compuestos con capacidad reductora.



**Figura 4.** Capacidad antioxidante de la fracción soluble de muestras en remojo y cocinadas, evaluada como concentración equivalente de  $\text{FeSO}_4$  (mM/100 g) a los 4 (barra blanca) y 30 minutos (barra gris) (media  $\pm$  desviación estándar; n = 3). Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre muestras crudas y cocinadas se marcan con un asterisco.

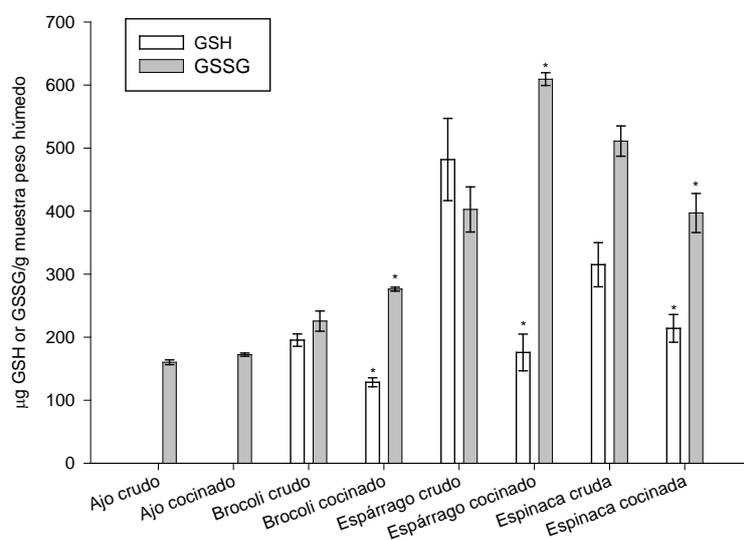
Los contenidos de As(III) encontrados en la fracción solubilizada tras la digestión gastrointestinal de alimentos cocinados presentan una correlación lineal con los valores de FRAP ( $R^2 = 0.82$ ) (figura 5). No se ha encontrado correlación con el resto de especies arsenicales. Tampoco se ha observado correlación entre FRAP y especies arsenicales en la fracción solubilizada de las muestras en remojo.



**Figura 5.** Correlación entre el contenido de As(III) (ng) y el contenido de FRAP en la fracción bioaccesible de los alimentos cocinados.

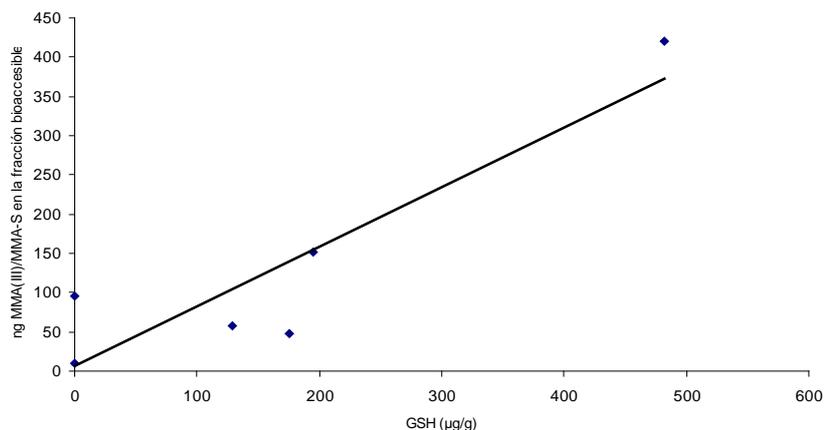
### 1.6. Glutatión oxidado y reducido en la fracción soluble

La figura 6 muestra los contenidos de GSH y GSSG en la fracción soluble obtenida tras la digestión gastrointestinal de las muestras en remojo y cocinadas. Los mayores niveles de GSH se detectan en la muestra de espárrago, seguida de espinaca y brócoli. En el ajo no se detecta glutatión en forma reducida. Tras el cocinado de las muestras se observa una reducción significativa en los niveles de GSH.



**Figura 6.** Contenidos de GSH (barra blanca) y GSSG (barra gris) en la fracción soluble de muestras en remojo y cocinadas (media  $\pm$  desviación estandar; n = 3). Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los niveles de GSH y GSSG de muestras crudas y cocinadas se marcan con un asterisco.

En la fracción soluble de los alimentos cocinados, se pone de manifiesto una correlación lineal entre los contenidos de MMA(III)/MMAS y los contenidos de GSH ( $R^2 = 0.8132$ ) (figura 7). Para el resto de especies arsenicales no se pone de manifiesto esta correlación. No existen correlaciones para la fracción soluble de alimentos en remojo.



**Figura 7.** Correlación entre el contenido de MMA(III)/MMAS (ng) y el contenido de GSH en la fracción bioaccesible de los alimentos cocinados.

### 1.7. Efecto de la matriz alimentaria sobre la reducción de As(V)

Las sustancias con capacidad reductora podría modificar el estado de oxidación del As(V) incorporado al alimento durante el proceso de remojo o cocinado, lo que supondría una modificación en el estado de oxidoreducción del arsénico inorgánico previa a la observada durante la digestión gastrointestinal. Con el objeto de evaluar este efecto, se lleva a cabo al análisis de As(III) y As(V) en los alimentos procesados, utilizándose para ello una extracción con ácido fosfórico y posterior cuantificación del extracto mediante CT-HG-AAS (pH 1 y 6) (metodología, apartado 14.4). Previamente al análisis de los alimentos, se evaluó la adecuación de la metodología analítica de extracción con ortofosfórico mediante su aplicación a un patrón de As(V) (1 mg/L). El análisis de extracto no revela la existencia de As(III), siendo la recuperación del As(V) del 100%.

### 1.7.1. Muestras en remojo con As(V)

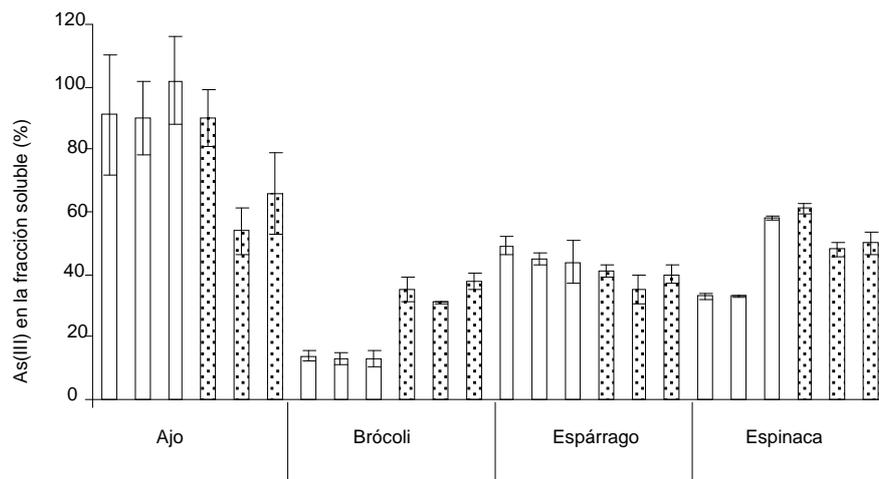
Las muestras en remojo con un patrón de As(V) 1 mg/L durante 24 horas, presentan un contenido de arsénico inorgánico que oscila entre 745 y 1294 ng/g (tabla 1). Tras la extracción con fosfórico se observa que parte del arsénico extraído desde la matriz se encuentra como As(III) (figura 8). El porcentaje de As(III) respecto al arsénico inorgánico extraído supone porcentajes muy elevados en el ajo 90-102%. Porcentajes inferiores aparecen en espinaca (33-58%), espárrago (44-49%) y brócoli (10-20%).

El análisis de la disolución acuosa de As(V) tras haber estado en contacto con las distintas muestras, evidencia que también contiene As(III). Los porcentajes de As(III) suponen entre 7-11% para espinacas, 13-14% para brócoli, 5-6% para espárrago y 0.3-0.5% para ajo.

### 1.7.2. Muestras cocinadas con As(V)

Los contenidos de arsénico inorgánico oscilan entre 758-2100 ng/g peso fresco (tabla 1). Tras la extracción con fosfórico de estas muestras cocinadas (figura 8) se observa la presencia de As(III) en porcentajes similares en brócoli (31-38%) y espárrago (35-41%) y ligeramente superiores en espinaca (48 y 61%) y ajo (54-60%).

En el agua resultante de la cocción de los alimentos también se detecta As(III). Los porcentajes de As(III) del ajo (5-7%), espinaca (17-20%) y espárrago (12-23%) se incrementan respecto a los hallados en el agua de remojo, mientras que para el brócoli se mantienen aproximadamente los mismos niveles (10-13%).



**Figura 8.** Porcentaje de As(III) en alimentos en remojo con un patrón de 1 mg/L de As(V) (barra blanca) y en alimentos cocinado con As(V) 1 mg/L (barra punteada). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Cada barra corresponde a un lote de muestra.

## Discusión

---

A través del consumo de agua de bebida y de alimentos se produce el mayor aporte de arsénico al organismo. El contenido en los alimentos crudos suele utilizarse para la evaluación del riesgo asociado a la ingesta de arsénico inorgánico, pero debería considerarse que el procesado de los alimentos hasta su consumo y las transformaciones durante el tránsito gastrointestinal podrían introducir cambios en las especies arsenicales que llegan al epitelio intestinal y a la circulación sanguínea, introduciéndose nuevas variables a tener en cuenta en la estimación del riesgo asociado al consumo de este metaloide. De todas las especies arsenicales aportadas por los alimentos, son objeto de interés toxicológico las especies inorgánicas y las especies de bajo grado de metilación (mono y dimetiladas). En este capítulo se han evaluado las transformaciones del arsénico adicionado al alimento que se producen durante el proceso de digestión gastrointestinal.

Los productos vegetales utilizados para el estudio, presentan contenidos de arsénico inferiores a 14 ng/g peso húmedo, valores habituales en este tipo de alimentos, encontrándose la totalidad en forma de arsénico inorgánico. En áreas que presentan contaminación ambiental por arsénico, el contenido de este elemento en los alimentos ingeridos por la población suele ser muy superior como consecuencia del uso de agua contaminada con As(V) para cocinar los alimentos (Smith *et al.*, 2006). Emulando la situación de estas zonas, en la presente tesis se ha realizado la cocción o remojo de los vegetales en presencia de As(V), muestras que han sido posteriormente utilizadas para evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal sobre el estado de oxidación de esta especie pentavalente. El mismo tipo estudio se ha llevado a cabo para las especies metiladas MMA(V) y DMA(V). Estas especies son minoritarias en el agua de bebida y con su utilización para el remojo y cocción de los alimentos no se ha tratado de emular una situación real, sino de evaluar si estas especies arsenicales, que pueden llegar a alcanzar altas concentraciones en alimentos crudos como algas, arroz y vegetales (Almela *et al.*, 2005; Yathavakilla *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2011), pueden aparecer en

el lumen intestinal como formas arsenicales distintas a las ingeridas con los alimentos. Las muestras resultantes de los procesos de remojo y cocción de alimentos en presencia de 1 mg/L de cada una de las especies arsenicales presenta, en todos los casos, elevadas concentraciones de arsénico y constituyen muestras idóneas para el estudio del efecto de la digestión gastrointestinal.

La bioaccesibilidad de arsénico inorgánico varía entre 56-116%, tanto en alimentos en remojo como cocinados. En las formas arsenicales metiladas, existen sin embargo grandes diferencias entre la bioaccesibilidad de muestras en remojo (69-96%) y cocinadas (2-13%). Este hecho puede deberse a la formación de complejos estables durante el cocinado que mantienen el arsénico adsorbido en la matriz y no permiten su solubilización. Estos complejos podrían formarse con fitoquelatinas y metalotioneínas, proteínas ricas en residuos de cisteína con elevada capacidad de unión de arsénico u otros metales (Raab *et al.*, 2004, 2007). De hecho, estas proteínas se han relacionado con la baja bioaccesibilidad de plomo, cadmio y mercurio en alimentos (Torres-Escribano *et al.*, 2011). Por otra parte, podría ocurrir que el cocinado solubilice sustancias que actúen precipitando las especies metiladas arsenicales. En este sentido Shim *et al.* (2009) han indicado que la adición de sustancias quelantes y antioxidantes durante la digestión gastrointestinal de muestras conteniendo mercurio, reduce de forma significativa bioaccesibilidad por precipitación del tóxico. No obstante, sería conveniente realizar más estudios para corroborar si las diferente bioaccesibilidad de MMA(V) y DMA(V) tras el cocinado del alimentos es un efecto que se manifiesta en otros vegetales u otro tipo de alimentos. Debe tenerse en cuenta que no existen estudios previos sobre bioaccesibilidad de especies metiladas desde productos cocinados.

El estado de oxidación de las especies arsenicales en la fracción bioaccesible se analizó mediante CT-HG-AAS, metodología basada en la generación selectiva de arsinas a partir de arsénico inorgánico, MMA y DMA. La especificidad en la generación de arsinas en función del pH de trabajo permite discriminar los estados de oxidación (Devesa *et al.*, 2004). Así, a pH 1 tanto las formas trivalentes como pentavalentes generan arsinas, determinándose los contenidos totales de arsénico inorgánico [As(III)+As(V)], MMA [MMA(III)+MMA(V)] y DMA [DMA(III)+DMA(V)]. A pH 6

solamente las formas trivalentes son capaces de generar arsinas. Esta técnica ha sido utilizada para el análisis cualitativo o cuantitativo de arsénico inorgánico, MMA y DMA, sin diferenciar estados de oxidación, en muestras de orina (Ng *et al.*, 1998; Feldmann *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2008), cultivos celulares y tejidos (Hernandez-Zavala *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2010) y en menor medida muestras de vegetales (Zhao *et al.*, 2006). Otros trabajos la han aplicado para diferenciar entre los estados de oxidación de formas pentavalentes y trivalentes en orina, tejidos y cultivos celulares (Del Razo *et al.*, 2001a; Drobna *et al.*, 2005; Currier *et al.*, 2011).

El campo de la especiación del arsénico es, no obstante, complejo y está en continuo cambio debido a la identificación de nuevas especies. Estas especies en muchas ocasiones presentan comportamientos cromatográficos similares a los de especies tradicionales por lo que pueden generar errores en la cuantificación. Esto también puede ocurrir en el análisis por CT-HG-AAS. Así, Regmi *et al.* (2007) pusieron de manifiesto que las formas pentavalentes tioladas arsenicales DMAS y MMAS también son capaces de generar hidruros a pH 7. Estas especies tioladas podrían estar presentes en las fracciones bioaccesibles analizadas, como consecuencia de la reacción entre los patrones adicionados para la cocción o remojo y los grupos tiol propios de la matriz. Se ha descrito la formación de dimetiltioarsinoilil glutatión (DMAS-GS) en plantas ricas en compuestos sulfurados, tales como *Brassica oleracea* (Raab *et al.*, 2007). Los vegetales empleados en este estudio son ricos en tioles, tales como GSH, N-acetilcisteína, sulfóxidos de alquil cisteína, metil sulfonilmetano, glucosinolatos (Vasanthi *et al.*, 2009; Ramoutar y Brumaghim., 2010), por lo que la existencia de complejos sulfurados de arsénico en la fracción bioaccesible no es descartable.

No se comercializan patrones de especies arsenicales metiladas pentavalentes tioladas por lo que no ha podido estudiarse si generan hidruros en las condiciones de trabajo utilizadas, y si se solapan con las señales de DMA(III) y MMA(III). Por todo lo expuesto, se considera que para los ensayos con las formas metiladas, las señales detectadas a pH 6 podrían corresponder a especies trivalentes [MMA(III) y DMA(III)] o a especies pentavalentes tioladas [MMAS y DMAS].

Los resultados del análisis de la fracción bioaccesible ponen de manifiesto que tras la digestión gastrointestinal de alimentos adicionados de As(V), MMA(V) y DMA(V) se detecta en la fracción soluble especies arsenicales distintas a las adicionadas: As(III) y especies metiladas trivalentes o tioladas. Los porcentajes de modificación son variables según el alimento y la especie arsenical considerada; en los casos más extremos la fracción bioaccesible presenta un 22% del arsénico inorgánico, un 35% del MMA y un 26% del DMA como una especie química distinta a la adicionada al alimento. Los procesos de reducción del arsénico inorgánico tras la digestión gastrointestinal únicamente han sido descritos por Laparra *et al.* (2005b) en muestras de arroces cocinados en presencia de As(V). No existen sin embargo antecedentes sobre cambios en las especies metiladas pentavalentes tras su solubilización gastrointestinal. Las especies trivalentes o tioladas pentavalentes presentan mayor citotoxicidad que las formas pentavalentes (Raml *et al.*, 2007; Naramandura *et al.*, 2011a, 2011b), por lo que la presencia de estas especies en la fracción soluble resultante de la digestión gastrointestinal podría tener consecuencias toxicológicas.

Los patrones de formas metiladas trivalentes son altamente inestables y tras el proceso de digestión gastrointestinal están casi completamente oxidados. Sin embargo, se han detectado formas metiladas trivalentes o tioladas tras la digestión gastrointestinal de alimentos conteniendo MMA(V) y DMA(V), pudiendo existir un efecto protector por parte de la matriz con la formación en la fracción soluble de complejos con las especies metiladas trivalentes en que eviten su oxidación. Está descrito que estas formas arsenicales son altamente reactivas y se unen a proteínas y aminoácidos sulfurados (Naramandura *et al.*, 2006), formándose uniones covalentes entre el arsénico y el azufre, estables tanto a pH ácido como neutro (Schmidt *et al.*, 2007). Tal y como se ha descrito anteriormente, los vegetales empleados en este estudio son ricos en compuestos sulfurados, potenciales puntos de unión de las distintas formas arsenicales.

Dado el papel que pueden desempeñar las sustancias reductoras en los cambios de las especies arsenicales observados, se ha evaluado la capacidad reductora de dicha fracción. Solamente se han observado correlaciones positivas FRAP/ng As(III) y GSH/ng MMA(III) o MMAS. Para el resto de combinaciones especie arsenical/tipo de

procesado/nivel de GSH/capacidad reductora no se observa correlación lineal, hecho que evidencia la complejidad de los procesos implicados en las transformaciones observadas durante el proceso de digestión gastrointestinal.

Adicionalmente al proceso de digestión gastrointestinal, se ha evaluado la posibilidad de que las modificaciones en la forma química del arsénico evidenciadas en la fracción soluble no sean sólo consecuencia del proceso de digestión gastrointestinal, sino que se produzcan previamente durante el remojo o cocinado del alimento. El estudio se ha centrado en las matrices tratadas únicamente con As(V). La determinación del estado de oxidación del arsénico inorgánico no es una labor frecuente dadas las dificultades analíticas; muchos de los métodos de extracción aplicados para disolución de las especies, pueden conllevar un cambio en el estado de oxidación y en consecuencia, no reflejar la verdadera naturaleza del arsénico inorgánico existente en la matriz (Heitkemper *et al.*, 2001). Por ello, los datos existentes en la bibliografía sobre concentraciones de As(V) y As(III) en alimentos son muy escasos, frente a la mayor información disponible para los contenidos de arsénico inorgánico [As(V) + As(III)].

En el presente estudio los alimentos sometidos a remojo y cocción con As(V) se han extraído con ácido ortofosfórico y posteriormente el extracto ha sido analizado mediante CT-HG-AAS. El ácido ortofosfórico se ha empleado previamente como extractante en alimentos de origen vegetal (Matos-Reyes *et al.*, 2004), al presentar mayor capacidad extractiva que el agua, metanol/agua o ácido trifluoroacético, debido posiblemente a la capacidad de este ácido para romper las uniones S-As. De hecho, se ha demostrado efectivo para la extracción de especies arsenicales desde tejidos (Hughes *et al.*, 2008). El proceso de extracción con ácido ortofosfórico no produce cambios en el estado de oxidación de patrones de As(V), por lo que se consideró adecuado para su aplicación a las matrices vegetales. En estas muestras la extracción con ácido ortofosfórico pone de manifiesto la presencia de As(III) en porcentajes que suponen entre el 10 y el 102% del arsénico inorgánico extraído en los alimentos en remojo con As(V), y entre el 31-61% en los alimentos cocinados. Adicionalmente, el patrón acuoso de As(V) utilizado para el remojo y cocción de las muestras también presenta As(III) tras el contacto con el alimento.

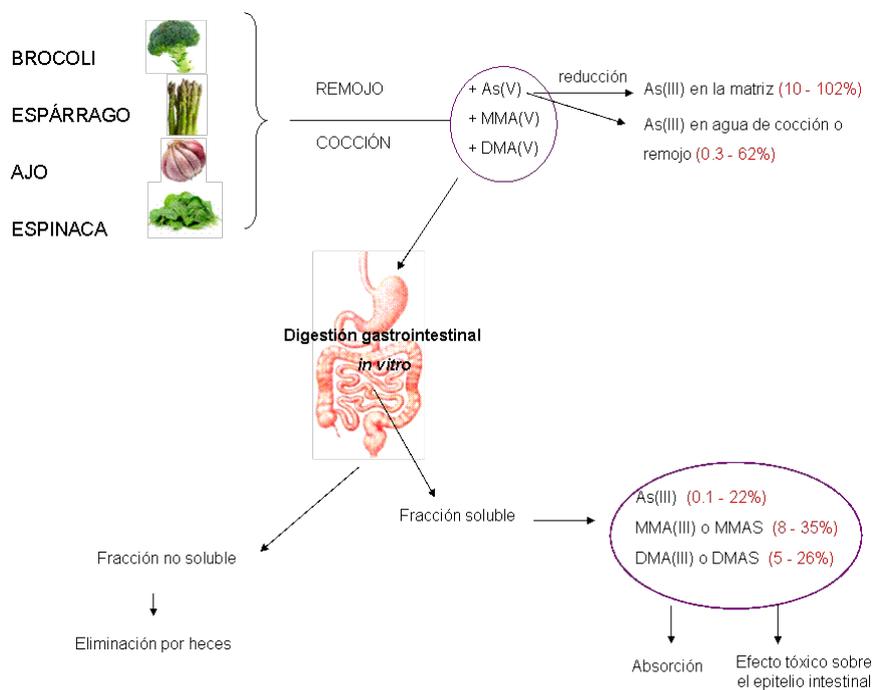
Estos resultados indican que las sustancias con capacidad reductora existentes en el alimento son capaces de modificar el estado de oxidoreducción del arsénico, incluso tras la aplicación de elevadas temperaturas. Estos compuestos podrían solubilizarse al agua de remojo o cocción produciendo la reducción del As(V) a As(III). Compuestos hidrosolubles con capacidad antioxidantes, como vitamina C, glutatión, ácido úrico o compuestos fenólicos (Köse y Dogan, 1995; Szeto *et al.*, 2002; Pellegrini *et al.*, 2003; Podsedek, 2007; Sumazian *et al.*, 2010) podrían ejercer esta acción. Los porcentajes de reducción en las muestras en remojo y cocinadas sólo son similares para las muestras de espárragos. El brócoli y la espinaca presentan mayores porcentaje de As(III) tras la cocción, hecho que podría ser consecuencia una mayor eficacia de extracción de sustancias con capacidad reductora tras la aplicación de temperaturas elevadas, como ya han observado otros autores (Annamalai *et al.*, 2011). Es importante señalar que en todos los vegetales analizados el porcentaje de As(III) hallado en la fracción soluble tras la digestión gastrointestinal es inferior al cuantificado en la muestra tras la extracción con ácido ortofosfórico. Este hecho puede tener dos causas. En primer lugar, las condiciones de tiempo, temperatura y pH durante el proceso de extracción ácido ortofosfórico son más agresivas que las aplicadas durante la digestión gastrointestinal. Ello puede liberar más sustancias reductoras capaces de modificar el estado de oxidación. Por otra parte, el As(III) presente en la matriz podría oxidarse durante el proceso de digestión gastrointestinal, a pesar que este efecto no se ha observado en patrones.

Los resultados hasta ahora comentados evidencian la capacidad de la matriz alimentaria para modificar la especie arsenical ingerida, tanto previamente como durante el proceso de digestión gastrointestinal, hecho que conlleva un cambio en la estimación de la toxicidad. No obstante, se ha descrito el efecto beneficioso del consumo de vegetales en relación a la toxicidad del arsénico. Islam *et al.* (2009) observaron que en ratas coadministradas con arsénico y un extracto de espinacas se reducían los niveles del tóxico en distintos órganos, respecto a los animales administrados solamente con el metaloide. Zablotska *et al.* (2008) también han observado que el consumo de alimentos ricos en vitaminas y ácido fólico reduce el

riesgo de padecer lesiones dérmicas asociadas a la exposición a arsénico a través del agua de bebida. Estos resultados pueden deberse a que las distintas formas arsenicales solubles durante la digestión con alimentos no sean absorbidas. A este respecto Yang *et al.* (2012) han observado una reducción en la absorción de arsénico y otros metales en presencia de espinaca, posiblemente por procesos de quelación.

Los cambios observados tras la digestión gastrointestinal mediante un método estático podrían incrementarse si aumentase la complejidad del sistema modelo, introduciendo otros factores existentes *in vivo*. En este sentido, Van de Wiele *et al.* (2010) y Alava *et al.* (2012) han realizado estudios con microbiota colónica humana, empleando un simulador del ecosistema microbiano intestinal humano (SHIME). Estos autores han comprobado la formación de As(III), MMA(V), MMA(III) y MMMTA(V) a partir del As(V) presente en disoluciones acuosas, suelos y arroz. Todo ello refuerza la necesidad de continuar las investigaciones sobre las transformaciones de las especies arsenicales ingeridas con el alimento en el tracto gastrointestinal.

La figura 9 presenta a modo de resumen gráfico los resultados presentados en el presente capítulo.



**Figura 9.** Transformaciones de las especies arsenicales durante la digestión gastrointestinal de alimentos.

## **CAPÍTULO 2**

---

### **Metabolismo de las formas inorgánicas de arsénico por el epitelio intestinal**



En la actualidad existen distintas propuestas sobre la ruta metabólica del arsénico inorgánico, si bien todas ellas incluyen una serie de etapas de metilación que dan lugar a metabolitos con distinto carácter tóxico. El metabolismo hepático del arsénico se ha evaluado en profundidad durante los últimos años, sin embargo, no existen datos previos sobre el metabolismo intestinal de este metaloide. En el presente capítulo se ha evaluado la capacidad de metabolismo del arsénico inorgánico por el epitelio intestinal en función de distintos factores (tipo celular, tiempo de exposición, estado de diferenciación celular, soporte de cultivo, presencia de GSH y vitamina B12).

## Resultados

---

### 2.1. Expresión relativa de ARNm de los marcadores de diferenciación en Caco-2 y HT29-MTX mediante RT-qPCR

Diversos estudios muestran que las células Caco-2 y HT29-MTX se diferencian progresivamente tras alcanzar la confluencia hasta adquirir características típicas de células diferenciadas enterocíticas o secretoras de mucus, respectivamente (Mahler *et al.*, 2009; Lesuffleur *et al.*, 1993). En el presente estudio se ha evaluado la expresión a nivel de ARNm de marcadores de diferenciación comúnmente empleados para Caco-2 (ALPI, SI y DPP4) y para HT29-MTX (MUC5AC) con el fin de evaluar el proceso de diferenciación de ambas líneas celulares. Los resultados muestran que los niveles de expresión de estos genes aumentan con el tiempo de siembra (tabla 1). Se observa que tras 15-21 días postsiembra, los niveles de *ALPI*, *SI* y *DPP4* en células Caco-2 son mayores que a los 5 días postsiembra [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre 2.6 y 8.6]. En HT29-MTX, los niveles de *MUC5AC* son superiores en células con 15-21 días postsiembra que en células 5 días postsiembra [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre 3.2 y 6.6].

**Tabla 1.** Expresión relativa de ARNm de marcadores de diferenciación celular en células Caco-2 y HT29-MTX tras 15 y 21 días postsiembra. Los valores obtenidos a los 15 y 21 días se han comparado con los de 5 días postsiembra. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n = 3-6). Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

	Gen	Eficacia	Días postsiembra	Ratio de expresión ( $\log_2$ )
Caco-2	<i>ALPI</i>	$1.88 \pm 0.21$	15	$8.6 \pm 3.5^*$
			21	$5.2 \pm 2.4^*$
	<i>DPP4</i>	$2.01 \pm 0.32$	15	$5.5 \pm 2.3^*$
			21	$2.6 \pm 1.1^*$
	<i>SI</i>	$2.12 \pm 0.17$	15	$5.0 \pm 2.0^*$
			21	$5.9 \pm 2.6^*$
HT29-MTX	<i>MUC5AC</i>	$1.84 \pm 0.25$	15	$3.2 \pm 0.3^*$
			21	$6.6 \pm 1.6^*$

## 2.2. Metabolismo de As(III) y As(V) en células diferenciadas (15 días postsiembra)

### 2.2.1. Influencia del tiempo de exposición

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el metabolismo de las formas inorgánicas sólo es detectable a partir de 24 horas de exposición. A tiempos inferiores (4 y 6 horas) no se observa metabolismo de As(III) o As(V). En la tabla 2 se muestran las cantidades de especies arsenicales (ng de arsénico/mg proteína) en el medio y en las células tras exposición a As(III) y As(V), así como el porcentaje de metabolismo (MMA+DMA) y los ratios de metilación a los 15 días postsiembra. El porcentaje de metabolismo de As(III) no se modifica significativamente con el tiempo (24 horas:  $29 \pm 6\%$ ; 48 horas:  $36 \pm 4\%$ ; 72 horas:  $27 \pm 4\%$ ). En todos los casos, el metabolito mayoritario es la forma monometilada (MMA) detectada tanto en el medio como en las células. La forma dimetilada (DMA) también se detecta a todos los tiempos, sin embargo, sólo aparece en el medio tras 72 horas de exposición.

Para  $1 \mu\text{M}$  de As(III) el primer ratio de metilación (MMA/As inorgánico) presenta valores similares a 24 y 72 horas (0.26 y 0.22 respectivamente), siendo

significativamente superior a las 48 horas (0.44). El segundo ratio de metilación (DMA/MMA) presenta un valor máximo a las 24 horas (0.72) y disminuye significativamente a los tiempos superiores de ensayo (48 horas, 0.32; 72 horas, 0.41). Por otro lado, no se detecta metabolismo en células tratadas con la concentración más alta de As(III) (10  $\mu$ M) a ninguno de los tiempos ensayados.

El contenido total de arsénico en el interior celular varía entre 32 y 38%. El análisis de las especies arsenicales existentes en el interior celular tras 48 horas de exposición se llevó a cabo tanto a pH 1 como a pH 6. A pH 1 se detecta arsénico inorgánico [As(III)+As(V)], MMA, [MMA(III)+MMA(V)] y DMA [DMA(III)+DMA(V)], mientras que a pH 6 se detectan formas trivalentes o tioladas (ver discusión capítulo 1). Se pone de manifiesto que todas las especies presentes en el interior celular están en forma trivalente o tiolada.

**Tabla 2.** Arsénico total y formas arsenicales en los lisados celulares y medios tras exposición de células Caco-2 (15 días postsiembra) a 1  $\mu\text{M}$  As(III) y 10  $\mu\text{M}$  As(V) durante 24, 48 y 72 h. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n = 4), n.d.: no detectado. El metabolismo total (%) es la suma de metabolitos (MMA y DMA) presentes en células y medio.

Tiempo (h)	Adición (ng As)	ng As/mg proteína								% Metabolismo (MMA+DMA)	Ratios de metilación	
		Total As		As inorgánico		MMA		DMA			MMA/iAs	DMA/MMA
		Células	Medio	Células	Medio	Células	Medio	Células	Medio			
<b>As(III)</b>												
24	173 $\pm$ 11	58 $\pm$ 5	115 $\pm$ 2	27 $\pm$ 5	86 $\pm$ 7	11 $\pm$ 1	18 $\pm$ 5	21 $\pm$ 4	n.d.	29 $\pm$ 6	0.26	0.72
48	159 $\pm$ 7	60 $\pm$ 9	87 $\pm$ 8	26 $\pm$ 4	75 $\pm$ 13	20 $\pm$ 4	24 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	n.d.	36 $\pm$ 4	0.44	0.32
72	180 $\pm$ 18	57 $\pm$ 5	134 $\pm$ 8	25 $\pm$ 6	128 $\pm$ 9	21 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1	11 $\pm$ 4	3 $\pm$ 1	27 $\pm$ 4	0.22	0.41
<b>As(V)</b>												
24	1127 $\pm$ 13	17 $\pm$ 2	1113 $\pm$ 17	14 $\pm$ 1	1113 $\pm$ 17	3 $\pm$ 1	n.d.	n.d.	n.d.	1.5 $\pm$ 0.1*	–	–
48	1096 $\pm$ 71	76 $\pm$ 21	1020 $\pm$ 71	32 $\pm$ 11	1020 $\pm$ 71	44 $\pm$ 7	n.d.	n.d.	n.d.	7 $\pm$ 1*	–	–
72	1101 $\pm$ 47	75 $\pm$ 11	1045 $\pm$ 47	24 $\pm$ 7	1045 $\pm$ 47	51 $\pm$ 4	n.d.	n.d.	n.d.	7 $\pm$ 0.4*	–	–

\* Para el As(V), el porcentaje de metabolismo corresponde a la suma de las especies As(III)+MMA+DMA

Los resultados para el As(V) ponen de manifiesto que el metabolismo en Caco-2 tras 15 días postsiembra es diferente del observado para su análogo trivalente. El As(V) requiere una etapa de reducción previa para dar lugar a As(III) y continuar la ruta metabólica, por tanto, los metabolitos de As(V) evaluados en el presente trabajo comprenden, además de las especies mono y dimetiladas, el As(III). En este caso no se observa metabolismo a la concentración más baja de As(V) (1  $\mu$ M). Para la concentración 10  $\mu$ M de As(V) el metabolismo es inferior al del As(III), con valores que oscilan entre 1.5-7%, no observándose DMA en ninguna de las condiciones. La cantidad de MMA en el interior celular a las 48 y 72 horas (44-51 ng/mg proteína) es más elevada que la hallada tras exposición a As(III). Al igual que para la especie trivalente, las especies encontradas en el interior celular a las 48 horas de exposición a As(V) están en forma trivalente o tiolada.

A diferencia de lo observado en la línea celular Caco-2, las células secretoras de mucus HT29-MTX no presentan metabolismo tras 13-14 días postsiembra en ninguna de las condiciones ensayadas [especie arsenical (pentavalente o trivalente), concentración (1 o 10  $\mu$ M) y tiempos de exposición (4, 6, 24, 48, 72 horas)].

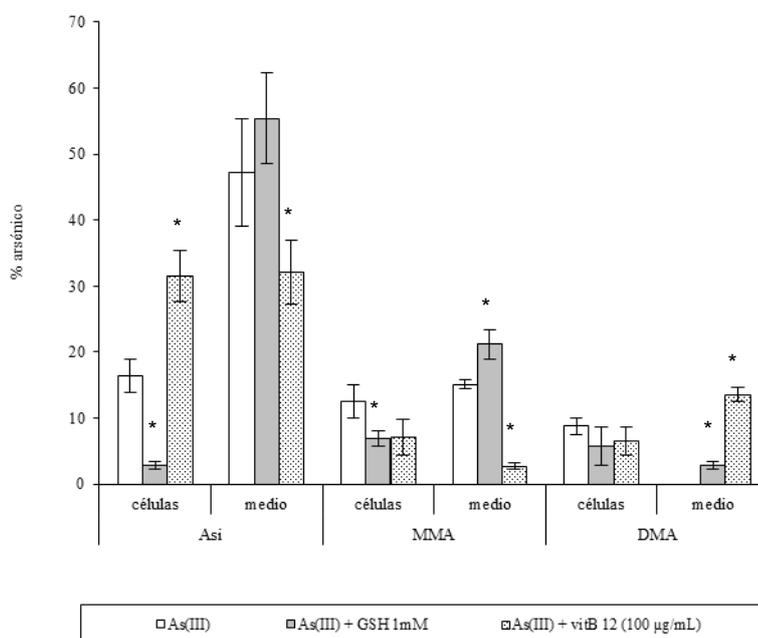
#### 2.2.2. Influencia de GSH y la vitamina B12 (cianocobalamina)

El GSH y la vitamina B12 son componentes dietarios que pueden afectar el metabolismo de las formas inorgánicas de arsénico (Buchet y Lawyers, 1985, Hall *et al.*, 2007). La exposición durante 48 horas de As(V) (10  $\mu$ M) junto a estos dos compuestos no modifica significativamente el perfil metabólico ni la distribución de las especies arsenicales en la línea Caco-2. Contrariamente, estos compuestos afectan el metabolismo de As(III) (1  $\mu$ M) a las 48 horas de exposición, tal y como se observa en la figura 1.

Los porcentajes de metabolismo total en presencia de GSH ( $37 \pm 7\%$ ) son similares a los hallados en células expuestas únicamente a As(III) ( $36 \pm 4\%$ ), mientras que las células co-expuestas con vitamina B12 presentan porcentajes ligeramente inferiores ( $28 \pm 7\%$ ). Aunque las diferencias en porcentajes de metabolismo no son acentuadas,

existen diferencias significativas en las especies arsenicales y su distribución (células o medio). En la exposición a As(III) o a As(III)/GSH el metabolito mayoritario es el MMA ( $28 \pm 4\%$  y  $26 \pm 3\%$ , respectivamente), siendo el DMA minoritario ( $9 \pm 1\%$  y  $9 \pm 4\%$  respectivamente). En ambos casos, tras 48 horas de exposición, el primer ratio de metabolismo es ligeramente superior al segundo ( $0.48 \pm 0.04$  y  $0.31 \pm 0.07$ , respectivamente). Sin embargo, tras el tratamiento As(III)/vitamina B12, el metabolito más abundante es el DMA ( $20 \pm 3\%$ ), aumento que va ligado a una reducción en el MMA ( $10 \pm 4\%$ ). Este cambio también se pone de manifiesto en los ratios de metilación, con una disminución del primer ratio ( $0.15 \pm 0.02$ ) y un aumento del segundo ratio ( $2 \pm 0.1$ ).

La retención celular de arsénico disminuye significativamente en presencia de GSH [As(III):  $60 \pm 9$  ng/mg proteína,  $38 \pm 6\%$ ; As(III)/ GSH:  $27 \pm 4$  ng/mg proteína,  $15 \pm 2\%$ ], debido a que existe una mayor salida de metabolitos al medio, mientras que en presencia de vitamina B12 los niveles de arsénico en el interior celular se incrementan [As(III)/ vit B12:  $75 \pm 8$  ng/mg proteína,  $45 \pm 4\%$ ] (figura 1).



**Figura 1.** Efecto de GSH y vitamina B12 sobre el metabolismo del As(III) en células Caco-2 (15 días postsiembra en placas 6 pocillos, 48 horas). Las barras representan los porcentajes de especies arsenicales en células y medio (media  $\pm$  desviación estándar, n = 4) para los distintos tratamientos: 1  $\mu$ M As(III) (barras blancas); 1  $\mu$ M As(III) y 1 mM GSH (barras grises); 1  $\mu$ M As(III) y 100  $\mu$ g/mL vitamina B12 (barras punteadas). Los porcentajes de arsénico se han calculado respecto a la cantidad de arsénico inicial adicionada al sistema. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para cada una de las especies, comparando los tratamientos con As(III)/GSH y As(III)/vit B12, respecto al tratamiento únicamente con arsénico.

### 2.2.3. Metabolismo de As(III) en función del sistema de cultivo empleado

La mayoría de estudios de metabolismo empleando modelos celulares se llevan a cabo en placas multipocillo. En el presente trabajo, y debido a que Caco-2 son células polarizadas cuando se diferencian, también se ha evaluado el metabolismo empleando un sistema bicameral (Transwell®). Este sistema permite el contacto del compuesto con el dominio luminal (apical) de la monocapa y la eliminación del mismo tanto al lado

apical como al basal. Este estudio se llevó a cabo sólo en Caco-2 diferenciadas (15 días postsiembra) expuestas 48 horas a As(III) (1  $\mu$ M).

La tabla 3 muestra el porcentaje y distribución de las especies arsenicales en los tres compartimentos (medio apical, monocapa celular y medio basal). Los resultados muestran, a diferencia de lo que ocurría en las placas multipocillo, que la transformación de As(III) únicamente genera MMA. En el interior celular sólo se detecta arsénico inorgánico, mientras que el MMA se encuentra en porcentajes similares en el lado apical ( $5.4 \pm 1.2\%$ ) y basal ( $5.3 \pm 1.4\%$ ) basal. El porcentaje de metabolismo es significativamente inferior al observado en placas multipocillo ( $11 \pm 3\%$  vs.  $36 \pm 4\%$ ), así como la retención celular ( $3.5 \pm 0.4\%$  frente a  $38 \pm 5\%$ ).

**Tabla 3.** Metabolismo en células Caco-2 (15 días postsiembra) sembradas sobre Transwell®, tras exposición a 1  $\mu$ M As(III) durante 48 horas. Los datos muestran los ng As/mg proteína (media  $\pm$  desviación estándar, n = 4), con los porcentajes entre paréntesis. Los porcentajes de arsénico en células y medio están calculados respecto a la concentración inicial de arsénico adicionada al cultivo. n.d.: no detectado.

	ng/mg proteína (%)		
	iAs	MMA	DMA
<b>Compartimento basal</b>	23.1 $\pm$ 4.4 (18.2 $\pm$ 3.5)	6.8 $\pm$ 1.8 (5.3 $\pm$ 1.4)	n.d.
<b>Células</b>	4.5 $\pm$ 1.2 (3.5 $\pm$ 0.4)	n.d.	n.d.
<b>Compartimento apical</b>	107.2 $\pm$ 5.6 (84.4 $\pm$ 4)	6.9 $\pm$ 1.5 (5.4 $\pm$ 1.2)	n.d.

### 2.3. Metabolismo de As(III) y As(V) en función del estado de diferenciación

Se ha puesto de manifiesto que la actividad metabólica así como los mecanismos de transporte de las líneas epiteliales del intestino varían como consecuencia del grado de diferenciación celular. Por este motivo, se ha evaluado el metabolismo de As(III) (1  $\mu$ M) y As(V) (10  $\mu$ M) en Caco-2 y HT29-MTX a distintos tiempos postsiembra. Así,

además de células diferenciadas con 15 días postsiembra (tabla 2), se ha evaluado el metabolismo en células no diferenciadas (5 días postsiembra) y células diferenciadas tras 21 días postsiembra.

Los resultados obtenidos indican que no se detectan metabolitos de arsénico inorgánico en las células HT29-MTX en ninguno de los estadios de diferenciación. En Caco-2, los resultados son distintos, tal y como se observa en la tabla 4, donde se presentan los contenidos totales de arsénico y de las especies arsenicales en el medio e interior celular tras 5 y 21 días postsiembra y exposición a As(III) durante 24, 48 y 72 horas, junto con los ratios de metilación.

Para el As(III), las células Caco-2 tras 5 días postsiembra son capaces de metabolizar el As(III) a MMA y DMA tras 48 horas en contacto con el tóxico, mientras que en los ensayos a 15 y 21 días se observa metabolismo a las 24 horas de exposición. El metabolismo en las células sin diferenciar es menor (8-11%) que en células diferenciadas (25-36%) ( $p < 0.05$ ), sin embargo, en todos los estadios de diferenciación el MMA es el metabolito mayoritario. Por otro lado, la retención celular varía significativamente entre los 5 días post siembra (7-16%) y los 15 (31-38%) o 21 días post siembra (17-29%).

En cuanto a los ratios de metilación, a los 5 días postsiembra el primer ratio de metilación (MMA/As inorgánico) es muy bajo (0.1) y se mantiene a 48 y 72 horas, mientras que el segundo ratio de metilación (DMA/MMA) alcanza un máximo a las 48 horas (0.6) y se reduce a las 72 horas (0.25) (tabla 2). A los 21 días postsiembra, de forma similar a lo que ocurría a los 15 días, el primer ratio de metilación alcanza un máximo a las 48 horas, que disminuye a las 72 horas. El segundo ratio de metilación, sin embargo, presenta un incremento continuo con el tiempo de exposición.

En cuanto al As(V), sólo se detectan metabolitos en células diferenciadas tras 48 horas de exposición, siendo similar a los 15 y 21 días postsiembra ( $\leq 7\%$ ).

**Tabla 4.** Arsénico total y formas arsenicales en los lisados celulares y medios tras exposición de células Caco-2 (5 y 21 días postsiembra) a 1  $\mu$ M As(III) durante 24, 48 y 72 h. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n = 4), n.d.: no detectado. El metabolismo total (%) es la suma de metabolitos (MMA y DMA) presentes en células y medio.

Tiempo (h)	Adición (ng As)	ng As/mg proteína								Metabolismo (%)	Ratios de metilación	
		Total As		As inorgánico		MMA		DMA			MMA/iAs	DMA/MMA
		Células	Medio	Células	Medio	Células	Medio	Células	Medio			
<b>5 días postsiembra</b>												
24	138 $\pm$ 3	11 $\pm$ 4	129 $\pm$ 15	11 $\pm$ 4	129 $\pm$ 15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0
48	143 $\pm$ 12	15 $\pm$ 2	144 $\pm$ 25	5 $\pm$ 1	138 $\pm$ 21	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 0.3	6 $\pm$ 1	n.d.	11 $\pm$ 2	0.07	0.6
72	129 $\pm$ 7	13 $\pm$ 2	97 $\pm$ 11	8 $\pm$ 2	117 $\pm$ 12	3 $\pm$ 0.5	5 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0.1	n.d.	8 $\pm$ 1	0.06	0.25
<b>21 días postsiembra</b>												
24	138 $\pm$ 9	22 $\pm$ 7	116 $\pm$ 7	15 $\pm$ 3	105 $\pm$ 6	5 $\pm$ 1	11 $\pm$ 3	2 $\pm$ 0.4	n.d.	13 $\pm$ 3	0.13	0.13
48	165 $\pm$ 15	43 $\pm$ 5	130 $\pm$ 12	21 $\pm$ 4	108 $\pm$ 7	15 $\pm$ 4	19 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2	n.d.	25 $\pm$ 5	0.26	0.21
72	191 $\pm$ 12	46 $\pm$ 8	143 $\pm$ 19	22 $\pm$ 3	135 $\pm$ 20	15 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2	9 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	25 $\pm$ 2	0.17	0.48

#### 2.4. Expresión relativa de ARNm de la As(+3) metiltransferasa (*AS3MT*)

La *AS3MT* se considera en la actualidad el principal enzima responsable del metabolismo del arsénico inorgánico. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el estado de diferenciación de la línea celular Caco-2 afecta la expresión de genes relacionados con el metabolismo y el transporte (Hashimoto y Shimizu, 1993; Wang y Evers, 1999). Esto podría ocurrir con el gen que codifica la *AS3MT* y para corroborarlo se evaluó la expresión de este enzima en células en distintos estadios de diferenciación (5, 15 y 21 días postsiembra). Los resultados obtenidos muestran que en los tres estados de diferenciación tanto las células Caco-2 como HT29-MTX expresan este enzima. Los niveles de *AS3MT* en las células 15 y 21 días postsiembra no presentan diferencias significativas respecto a los niveles a los 5 días postsiembra en ambas líneas celulares [ratio de expresión ( $\log_2$ ): Caco-2, 15 días:  $-0.82 \pm 0.04$  y 21 días:  $-0.12 \pm 0.02$ ; HT29-MTX, 15 días:  $1.4 \pm 0.4$  y 21 días:  $1.1 \pm 0.3$ ].

Adicionalmente se ha evaluado el efecto de la exposición a arsénico inorgánico sobre la expresión de *AS3MT* en células Caco-2. La expresión diferencial evaluada a 5, 15 y 21 días postsiembra tras la exposición a As(III) ( $1 \mu\text{M}$ ) o As(V) ( $10 \mu\text{M}$ ) durante 24, 48 y 72 horas se muestra en la tabla 5. La exposición a As(V) no conlleva ningún cambio significativo en la expresión del gen que codifica la *AS3MT*. Por el contrario, los resultados con As(III) muestran un incremento significativo en la expresión de *AS3MT* [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $3 \pm 0.5$ ] tras 48 horas de exposición en células diferenciadas (15 días postsiembra).

**Tabla 5.** Expresión de ARNm de *AS3MT* tras tratamiento de las células Caco-2 (5, 15 y 21 días postsiembra) con 1  $\mu\text{M}$  As(III) o 10  $\mu\text{M}$  As(V) a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Los datos representan el ratio de expresión ( $\log_2$ ) de *AS3MT* (media  $\pm$  desviación estándar,  $n = 8$ ). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a controles no tratados con arsénico a los distintos tiempos de tratamiento se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

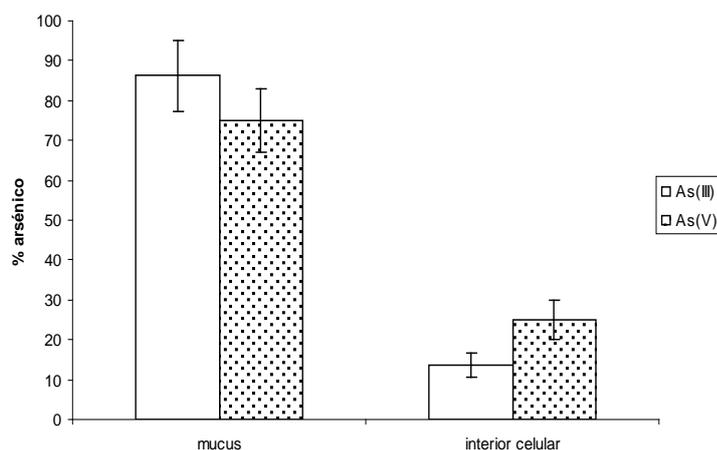
Especie arsenical	Tiempo (h)	Expresión relativa ( $\log_2$ )		
		5 días postsiembra	15 días postsiembra	21 días postsiembra
As(III)	24	$-0.02 \pm 0.01$	$-0.1 \pm 0.02$	$0.1 \pm 0.04$
	48	$-0.3 \pm 0.04$	$3 \pm 0.5^*$	$-0.1 \pm 0.02$
	72	$0.8 \pm 0.2$	$-0.7 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.5$
As(V)	24	$0.5 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.04$	$0.4 \pm 0.1$
	48	$0.7 \pm 0.2$	$0.8 \pm 0.1$	$1 \pm 0.2$
	72	$0.2 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.4$	$0.9 \pm 0.4$

### 2.5. Influencia del mucus en la acumulación intracelular del arsénico inorgánico en la línea celular HT29-MTX

El mucus secretado por HT29-MTX constituye una barrera a la difusión de nutrientes, drogas, iones, toxinas, metales pesados y macromoléculas (Forstner *et al.*, 1994). Por este motivo, y teniendo en cuenta que este tipo celular no presenta metabolismo de las formas inorgánicas en ninguna de las condiciones ensayadas, se ha evaluado la influencia de esta capa glicoproteica en la acumulación intracelular del tóxico. Para tal fin, células HT29-MTX diferenciadas se han expuesto a As(III) (1  $\mu\text{M}$ ) o As(V) (10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas.

Los resultados obtenidos para ambas especies muestran que del arsénico total adicionado al cultivo, la retención celular (mucus + interior celular) es mayor para la forma trivalente ( $8 \pm 1\%$ ) que para la pentavalente ( $1 \pm 0.2\%$ ). La figura 2 presenta los

porcentajes de arsénico total en mucus e interior celular respecto a la cantidad de arsénico presente en células HT29-MTX, mostrando que la mayoría del arsénico presente en este tipo celular queda retenido por el mucus.



**Figura 2.** Distribución de arsénico en células HT29-MTX tras 24 horas de exposición a As(III) (1  $\mu\text{M}$ ) (barras blancas) y As(V) (10  $\mu\text{M}$ ) (barras punteadas). Las barras representan el porcentaje de arsénico en mucus e interior celular respecto a los contenidos de arsénico en las células (mucus+interior celular). Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n= 3-6).



---

## Discusión

---

El epitelio intestinal supone la primera barrera con la que se encuentran los tóxicos que entran al organismo por vía oral. La principal función de este órgano es la absorción de nutrientes y agua, pero también presenta la capacidad de metabolizar fármacos u otros compuestos a través de diversos sistemas enzimáticos que permiten especialmente las reacciones de fase 1 y 2 (Lin *et al.*, 1999). Combinadas con las transformaciones hepáticas, el metabolismo de primer paso puede modificar los niveles y forma química en la que los compuestos alcanzan la circulación sistémica. Estudios *in vitro* han demostrado que hepatocitos primarios de distintas especies (humanos, perros, ratones, conejos, macacos y ratas) y líneas celulares hepáticas presentan una importante capacidad para metilar el arsénico inorgánico (Del Razo *et al.*, 2001; Drobná *et al.*, 2010b; Watanabe *et al.*, 2011). Sin embargo, no existen datos sobre la capacidad metabólica de células del tracto gastrointestinal. En el presente capítulo de tesis se ha llevado a cabo un estudio de la capacidad de metabolismo de células epiteliales del intestino tras exposición a unas concentraciones de arsénico inorgánico habituales en agua de bebida y alimentos (EFSA, 2009), empleando los dos tipos celulares más abundantes en este órgano, enterocitos, representados por las células Caco-2 y células caliciformes, representadas por las células HT29-MTX.

Los resultados obtenidos indican que las células Caco-2 diferenciadas ( $\geq 15$  días postsiembra), pueden metabolizar entre un 7% y un 36% del arsénico inorgánico adicionado, según se encuentre en forma pentavalente o trivalente respectivamente. Del Razo *et al.* (2001) en un estudio llevado a cabo con HepG2, línea celular obtenida de un carcinoma hepatocelular, ponen de manifiesto porcentajes de metabolismo del 28% tras 24 horas de exposición a concentraciones de  $1 \mu\text{M}$  de As(III), iguales a los obtenidos en este trabajo para Caco-2 15 días postsiembra ( $28 \pm 6\%$ , figura 1) en igualdad de tiempos y concentraciones. Asimismo, el ratio DMA/MMA observado para hepatocitos primarios humanos expuestos a concentraciones de As(III) entre  $0.1$  y  $4 \mu\text{M}$  oscila entre  $0.7-0.1$  (Styblo *et al.*, 2000). En el presente estudio se ha determinado un ratio

DMA/MMA de 0.7 tras exposición de células Caco-2 a 1 $\mu$ M As(III) 24 horas (15 días postsiembra), dato que indica la elevada capacidad de metilación de este tipo celular. Estos datos indican que las células epiteliales del intestino tienen una capacidad de metilación del As(III) comparable a la de los hepatocitos humanos.

Con respecto al As(V), Styblo *et al.* (1999b) observaron en hepatocitos humanos, un porcentaje de metilación a DMA y MMA menor o igual al 3% tras 48 horas de exposición a 0.1  $\mu$ M de As(V), porcentaje similar al obtenido en el presente trabajo. El bajo metabolismo observado para el As(V) en Caco-2 comparado con el hallado para As(III), se debe posiblemente a una mínima entrada de la forma pentavalente al interior celular, hecho que ya ha sido puesto de manifiesto en otros tipos celulares (Dopp *et al.*, 2010). Se ha sugerido que la baja entrada del As(V) a las células se debe a mecanismos de competición con transportadores de fosfato (Hirano *et al.*, 2003). En el presente estudio, las concentraciones de fosfato en el medio de ensayo (1 mM), similares a los contenidos fisiológicos *in vivo* (plasma 0.97-1.45 mmol/L; intersticio: 1 mmol/L, Dopp *et al.*, 2010), son dos órdenes de magnitud superiores a las concentraciones de As(V) empleadas, por lo que el fosfato podría disminuir su captación celular y el subsiguiente metabolismo.

Los resultados obtenidos evidencian que los enterocitos pueden producir cambios significativos en la forma química del arsénico inorgánico ingerido. El metabolito mayoritario encontrado en células Caco-2 diferenciadas es el MMA. Drobná *et al.* (2004) ponen de manifiesto que el perfil metabólico del As(III) depende de la concentración. De hecho, su trabajo evidencia que el DMA es el metabolito predominante en cultivos primarios de hepatocitos humanos expuestos a concentraciones menores a 0.9 nmol As(III)/mg de proteína, mientras que a concentraciones superiores (30 nmol As(III)/mg de proteína), similares a las empleadas en este estudio, predomina la forma monometilada. Esta disminución del metabolismo total o del paso de MMA a DMA, puede ser consecuencia del efecto inhibitorio de la actividad de enzimas por parte del As(III) o de alguno de sus metabolitos. Se ha descrito que tanto el As(III) como el MMA(III) inhiben la actividad del AS3MT, enzima responsable de distintas etapas del proceso metabólico, con constantes de inhibición de

> 5  $\mu\text{M}$  para el As(III) y  $\geq 1 \mu\text{M}$  para el MMA(III) en el caso de la As3mt de rata (Styblo, comunicación personal). También se ha puesto de manifiesto que el MMA(III) y complejos de arsénico inorgánico-glutatión son inhibidores de enzimas que pueden intervenir indirectamente en el metabolismo de arsénico inorgánico tales como la glutatión reductasa (Styblo *et al.*, 1997) y la tiorredoxina reductasa (Lin *et al.*, 1999).

En este sentido, nuestro estudio pone de manifiesto que una mayor acumulación de formas trivalentes, supone una disminución del paso de MMA a DMA y por tanto de la tasa metabólica total de las células. Estas inhibiciones pueden ser la causa de la reducción en el ratio DMA/MMA a los tiempos superiores de ensayo para células Caco-2 (15 días postsiembra), donde se alcanzan las mayores concentraciones de MMA en el interior celular. Asimismo, el ratio DMA/MMA a las 48 horas de exposición es mayor para las células no diferenciadas (0.6) que para las células diferenciadas (0.3), coincidiendo con los menores contenidos en el interior celular tanto de As(III) como de MMA(III) (células no diferenciadas: As(III)  $5 \pm 1$  ng As/mg proteína, MMA(III)  $4 \pm 1$  ng As/mg proteína; células diferenciadas: As(III)  $26 \pm 4$  ng As/mg proteína, MMA(III)  $20 \pm 4$  ng As/mg proteína). Adicionalmente, concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  de As(III) provocan una inhibición completa del metabolismo del arsénico inorgánico, no encontrando metabolitos en el medio ni en las células a ninguno de los tiempos ensayados. Este hecho se ha observado previamente en hepatocitos humanos, donde el metabolismo de As(III) se bloquea completamente tras exposiciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$  de As(III) (Styblo *et al.*, 1999a).

Existen numerosos estudios que describen cambios en actividades enzimáticas, niveles de expresión de ARNm o proteína a lo largo del periodo de diferenciación de las células Caco-2 (Matsumoto *et al.*, 1990; Jumarie y Malo 1991; Sonoyama *et al.*, 2000; Fleet *et al.*, 2002, 2003; Bédrine-Ferran *et al.*, 2004; Siissalo, 2009). En el presente estudio se ha puesto de manifiesto que tanto las células Caco-2 diferenciadas como las no diferenciadas son capaces de metabolizar el arsénico inorgánico, si bien en estas últimas el porcentaje de metabolismo es inferior (11% vs 25-36% a las 48 horas). El menor metabolismo en células no diferenciadas puede deberse a un menor transporte de arsénico inorgánico al interior celular. De hecho, la cantidad de As total en el interior

celular tras 48 horas de exposición a As(III) es inferior en las células no diferenciadas ( $15 \pm 2$  ng As/mg proteína), que en las diferenciadas (15 días:  $60 \pm 9$  ng/mg proteína; 21 días:  $49 \pm 5$  ng/mg proteína) (tablas 2 y 4). En la presente tesis se han identificado transportadores involucrados en la captación celular del As(III) en células Caco-2 (capítulo 3), en concreto OATPB, GLUT5 y AQP10. La menor captación de As(III) a los 5 días postsiembra puede deberse a una menor expresión de estos transportadores. Diversos estudios han evaluado los niveles de expresión de estos transportadores en Caco-2 en función del estadio de diferenciación. Así, König *et al.* (2006) observaron que los niveles de OATPB aumentaban con el tiempo en cultivo de las células (1-5 semanas). Mahraoui *et al.* (1992) determinaron que el nivel de ARNm de *GLUT5* es dependiente del crecimiento celular y solo se detecta en células postconfluentes diferenciadas. Para AQP10, sin embargo, no existe bibliografía específica que correlacione los niveles proteicos o de ARNm con los distintos estadios de diferenciación, sin embargo, para otros miembros de esta familia de proteínas sí existen trabajos que indican aumentos en su expresión en células Caco-2 diferenciadas, frente a las no diferenciadas (Fleet *et al.*, 2003; Landowski *et al.*, 2004).

Por otra parte, los cambios de metabolismo en distintos estadios de diferenciación pueden deberse también a cambios en la actividad metabólica. La AS3MT ha sido descrita como la enzima responsable de la ruta metabólica del arsénico inorgánico desde As(III) a DMA u óxido de trimetilarsina (Waters *et al.*, 2004a, 2004b; Drobna *et al.*, 2006). En esta tesis se ha observado que Caco-2 y HT29-MTX expresan ARNm de *AS3MT* en todos los estadios de diferenciación, sin variaciones significativas entre ellos. Serían necesarios estudios que evalúen los niveles proteicos y la actividad enzimática de la *AS3MT* para definir la causa de las variaciones del metabolismo en los distintos tiempos postsiembra. Por otra parte, se han observado cambios en los niveles de la *AS3MT* tras exposición a As(III) (48 horas, 15 días postsiembra). Este hecho indica que la exposición al tóxico es capaz de alterar la expresión de genes relacionados con su metabolismo, siendo necesarios más estudios que evalúen las consecuencias de estos cambios.

Estudios previos han indicado que la polarización que acompaña a la diferenciación celular está influenciada por el soporte donde crecen las células. Así, Gaillard y Finlay (1996) observaron diferencias en la estructura de las uniones estrechas en Caco-2 crecidas sobre filtros porosos. Anderle *et al.* (2003) observan cambios en la expresión de P-gp entre Caco-2 cultivadas sobre filtros de policarbonato y frascos de poliestireno. Así mismo, células caninas renales Mandin-Darby presentan mayor polaridad cuando crecen en soportes permeables (Fuller y Simons, 1986). Teniendo en cuenta la influencia de la diferenciación celular de Caco-2 sobre el metabolismo del arsénico inorgánico y la importancia de la polarización en procesos de absorción, transporte y metabolismo intestinal, se he evaluado el metabolismo y distribución de metabolitos en Caco-2 diferenciadas (15 días postsiembra) sobre membranas semipermeables (Transwell®).

El porcentaje de metabolismo obtenido en estas condiciones es menor al observado en células crecidas sobre placas de polipropileno (11% frente a 36%). Este hecho puede ser debido a la menor retención celular de arsénico observada en células crecidas en Transwell® ( $5 \pm 1$  ng As/mg proteína en Transwell®;  $60 \pm 9$  ng As/mg proteína en placas) tras 48 horas de exposición a arsénico inorgánico. Estos resultados ponen de manifiesto el importante efecto del sistema de cultivo en la evaluación del metabolismo de estas células polarizadas. En células sembradas sobre soportes porosos hay un aumento de la superficie de membrana y pueden intervenir en el transporte proteínas presentes en la membrana basolateral, aumentando de esa forma los procesos de eliminación celular, y por tanto disminuyendo la retención del arsénico. Hay que destacar el hecho de que los metabolitos generados en este sistema bicameral son transportados tanto hacia el lado apical, que emularía el lumen intestinal y por tanto el sentido secretorio, como al lado basolateral, que reproduciría la cavidad serosa y por tanto el transporte en sentido absortivo. En consecuencia, tras la ingesta de arsénico inorgánico, podrían llegar a la vena porta metabolitos de arsénico generados en el epitelio intestinal.

La absorción de nutrientes, fármacos o tóxicos en el tracto gastrointestinal es un proceso complejo afectado por numerosos factores como las propiedades moleculares

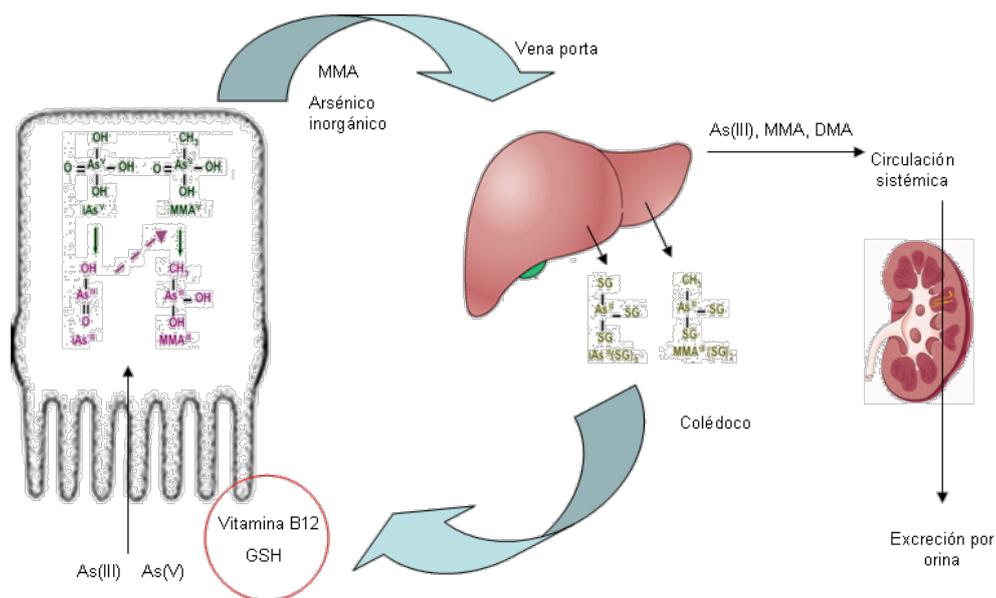
del compuesto (tamaño, grado de ionización, solubilidad, polaridad), factores fisiológicos (motilidad intestinal, permeabilidad de la mucosa, estado), propiedades cinéticas (afinidad por transportadores, capacidad de los transportadores, metabolismo) e interacciones con alimentos, fármacos u otras sustancias presentes en el lumen. Adicionalmente, diversos componentes de la dieta se han descrito como potentes moduladores de actividades enzimáticas (Ferriola *et al.*, 1989; Agullo *et al.*, 1997). En el presente estudio se pone de manifiesto que en células diferenciadas, el perfil metabólico y la retención celular del arsénico inorgánico varían en presencia de GSH o vitamina B12, dos componentes que están presentes de forma habitual en el quimo.

La presencia de vitamina B12 favorece el paso de MMA a DMA, siendo el DMA el metabolito mayoritario, a diferencia de lo observado para el resto de condiciones estudiadas. El ratio DMA/MMA se incrementa significativamente en presencia de vitamina B12 en comparación con células expuestas sólo a As(III) (2 vs 0.3) y el ratio MMA/As inorgánico disminuye. Buchet y Lauwerys (1985) observaron la misma tendencia trabajando con un preparado citosólico de hígado de rata, si bien este fenómeno sólo se manifestaba en presencia de S-adenosilmetionina (SAM), el dador de grupos metilo en la etapa de metilación. SAM requiere metionina para su síntesis y, por su parte, la vitamina B12 es esencial en la remetilación de la homocisteína a metionina, por tanto, indirectamente actúa como cofactor en las etapas de metilación del arsénico inorgánico (Vahter, 2007). Estos datos no coinciden con los obtenidos en estudios poblacionales (Heck *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2009a, 2009b) que muestran que la vitamina B12 se asocia inversamente con los porcentajes de arsénico inorgánico en orina, aumentando el ratio MMA/As inorgánico. En cuanto al GSH, aunque no hay variaciones significativas en el perfil metabólico, sí que hay una disminución del arsénico presente en el interior celular, posiblemente por favorecer la extrusión de las formas arsenicales al formar complejos As-GSH, tal y como documentan otros autores (Leslie *et al.*, 2004). Estos resultados indican que la composición de la matriz alimentaria es un factor muy importante que puede afectar el perfil de especies durante el tránsito y la absorción gastrointestinal, y puede influir en el metabolismo y la toxicidad del arsénico ingerido.

Por otra parte, el intestino no se compone únicamente por enterocitos. El segundo tipo celular mayoritario en el intestino son las células caliciformes. Las células HT29-MTX se han descrito previamente como una línea celular capaz de diferenciarse a células secretoras de mucus (Lesuffleur *et al.*, 1990) y secretar a una capa protectora de mucus sobre el cultivo. La barrera de mucus gastrointestinal se compone de una capa interna íntimamente adherida a la superficie celular y una capa externa de mucus no adherente. Esta última se elimina continuamente por los movimientos peristálticos que desplazan distalmente el contenido luminal. En el presente trabajo se ha observado que el arsénico inorgánico queda retenido en la capa de mucus, evitando en parte su entrada al interior celular y posiblemente facilitando su eliminación en heces. Esta retención es, posiblemente, la responsable de la ausencia de metabolismo del arsénico inorgánico por HT29-MTX. Es necesario llevar a cabo más estudios para esclarecer el papel de esta capa glicoproteica en la protección del epitelio intestinal frente a la exposición a arsénico inorgánico y evaluar su papel en el metabolismo y la entrada y retención celular. Asimismo, sería necesario evaluar el efecto del arsénico sobre la cantidad y composición de glicoproteínas presentes en el mucus, ya que existen estudios que demuestran la capacidad de disolver el mucus por compuestos que interaccionan con grupos -SH (Allen y Flemström, 2005).

Hasta el momento se ha considerado que el arsénico inorgánico ingerido con los alimentos o el agua de bebida, tras la absorción intestinal, es metabolizado por el hígado antes de llegar a la circulación sistémica. El presente trabajo muestra que las células intestinales también son capaces de transformar el arsénico inorgánico y por lo tanto modificar las especies arsenicales que llegan a la circulación portal. Se pone de manifiesto la necesidad de considerar al intestino en la evaluación del metabolismo presistémico del arsénico inorgánico, si bien deberían combinarse los estudios *in vitro* e *in vivo* para establecer la importancia real de estos procesos (Lin *et al.*, 1999). La presencia de formas metiladas trivalentes en el interior celular muestra la necesidad de llevar a cabo más estudios sobre el posible efecto de estas formas arsenicales a nivel intestinal.

La figura 3 presenta, a modo de resumen, los procesos del metabolismo intestinal del arsénico inorgánico observados en este capítulo, así como la información existente en bibliografía sobre el metabolismo hepático, recirculación enterohepática y eliminación.



**Figura 3.** Representación esquemática del metabolismo del arsénico inorgánico, su circulación enterohepática y eliminación.

## **CAPÍTULO 3**

---

**Caracterización *in vitro* de la permeabilidad,  
acumulación celular y mecanismos de transporte de  
las especies arsenicales en el epitelio intestinal**



El epitelio intestinal constituye la primera barrera para la absorción de las distintas especies arsenicales hacia el torrente sanguíneo, sin embargo, los estudios sobre su permeabilidad intestinal son muy escasos. En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en el estudio de retención celular, transporte y permeabilidad aparente de especies arsenicales inorgánicas, mono y dimetiladas [As(III), As(V), MMA(III), MMA(V), DMA(III), DMA(V)] utilizando la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal. Se ha evaluado el transporte de las especies arsenicales en distintas condiciones (apertura de uniones intercelulares, pH, temperatura, presencia de componentes dietéticos y/o fisiológicos del quimo) con el fin de profundizar en el modo de absorción intestinal del arsénico y en los factores que pueden afectar a la misma. Así mismo se han identificado proteínas transportadoras implicadas en el transporte de las formas inorgánicas.

## Resultados

---

### 3.1. Captación y transporte de especies arsenicales en células Caco-2

En todos los ensayos se llevaron a cabo pruebas para evaluar la integridad de la monocapa y la viabilidad celular, tal y como se describe en metodología (apartado 6.5). Los parámetros se mantuvieron dentro de los límites establecidos para considerar la monocapa íntegra, excepto que se indique lo contrario en el texto.

#### 3.1.1. Especies arsenicales pentavalentes

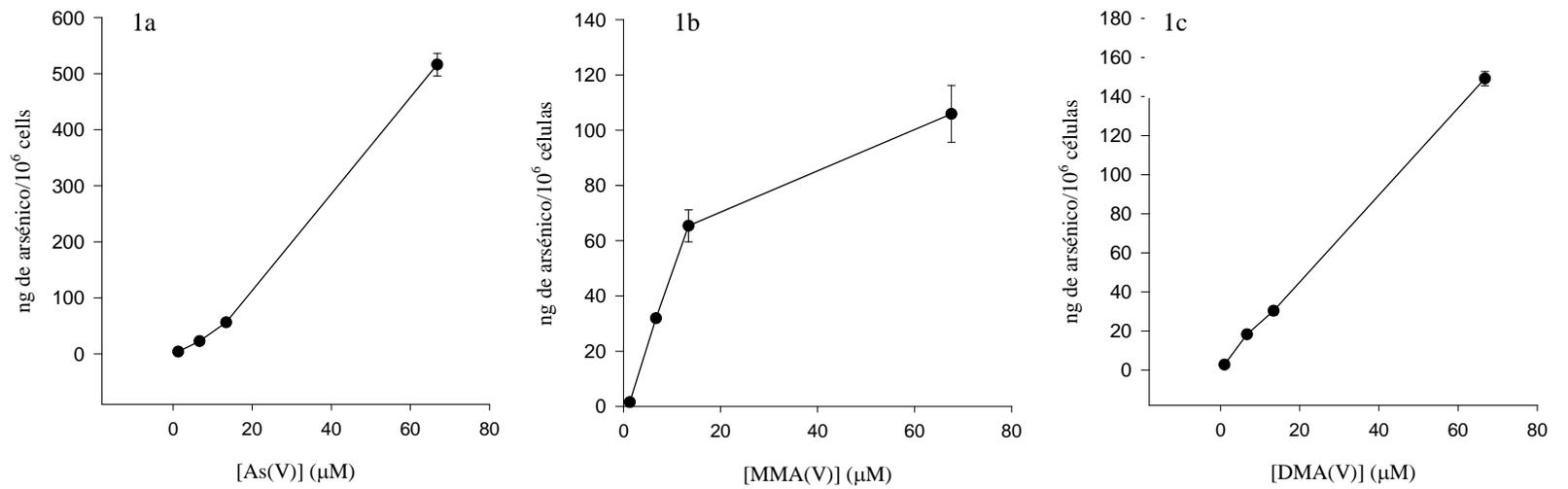
En los estudios de transporte y retención de las especies arsenicales pentavalentes en dirección apical-basolateral y basolateral-apical se han empleado dos medios de cultivo, DMEMc y HBSS. El empleo de estos dos medios aporta información sobre el efecto de su composición en el transporte de las especies arsenicales, tal y como se ha descrito para otros compuestos (Zucco *et al.*, 2005; Ingels y Augustijns, 2003).

#### 3.1.1.1. Transporte y captación en dirección apical-basolateral

Las concentraciones de las especies arsenicales evaluadas [As(V), MMA(V) y DMA(V)] para los estudios de transporte en DMEMc fueron 1, 7, 13 y 67  $\mu\text{M}$ .

La figura 1 muestra el arsénico transportado frente a la concentración tras 24 horas de exposición. Para el As(V) (figura 1a) y DMA(V) (figura 1c), la cantidad de arsénico transportada al lado basolateral se incrementa linealmente con la concentración. En el caso del MMA(V) (figura 1b), esta linealidad se mantiene sólo hasta la concentración de 13  $\mu\text{M}$ , sugiriendo la participación de un componente saturable en el transporte. Los valores de los parámetros cinéticos tras la aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten al MMA(V) son:  $K_m = 2.02 \mu\text{M}$ ;  $V_{\max} = 4.6 \times 10^{-5} \text{ pmol}/10^6 \text{ células}/\text{min}$ .

Los porcentajes de transporte al lado basolateral tras 24 horas [As(V): 3-10%; MMA(V): 3-11%; DMA(V): 4-6%], indican un bajo transporte de estos compuestos a través de la monocapa Caco-2. La retención celular de todas las especies también es muy baja (<0.1-0.5%; 12-20  $\text{ng}/10^6 \text{ células}$ ), sin diferencias significativas entre concentraciones y especies.



**Figura 1.** Transporte apical-basolateral en DMEMc (ng As/10<sup>6</sup> células) de As(V) (1a), MMA(V) (1b) y DMA(V) (1c) en función de la concentración. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

En los ensayos de captación y transporte llevados a cabo en medio HBSS, se utilizó una única concentración para cada especie arsenical (67  $\mu\text{M}$ ) a un tiempo de 24 horas. Los resultados de transporte obtenidos en medio HBSS se muestran en la tabla 1 junto a los comentados anteriormente para el medio DMEMc.

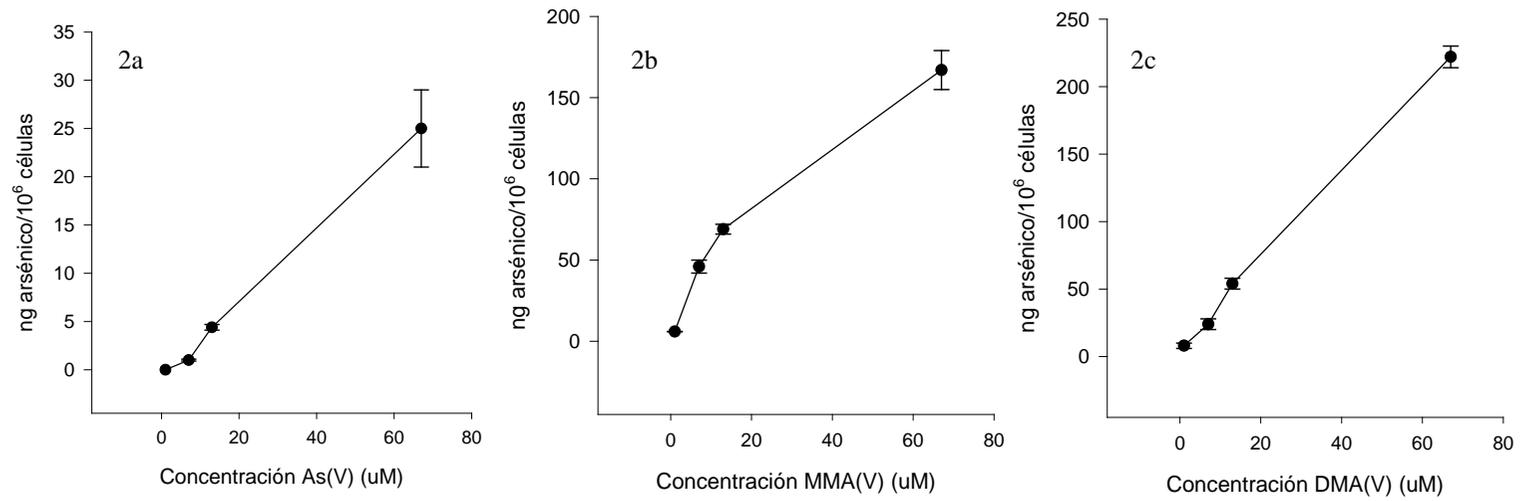
**Tabla 1.** Efecto del medio de cultivo en el transporte apical-basal de especies pentavalentes (67  $\mu\text{M}$ ) por células Caco-2. Contenido de arsénico (ng As/ $10^6$  células) en el compartimento basal tras 24 horas de exposición. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

	<b>DMEMc</b> (ng As/ $10^6$ células)	<b>HBSS</b> (ng As/ $10^6$ células)
<b>As(V)</b>	516 $\pm$ 20	637 $\pm$ 12
<b>MMA(V)</b>	106 $\pm$ 10	157 $\pm$ 15
<b>DMA(V)</b>	149 $\pm$ 4	129 $\pm$ 19

El transporte de As(V) y MMA(V) es significativamente superior en HBSS, mientras que para DMA(V) las diferencias no son significativas. Por lo que respecta a los contenidos intracelulares, los valores son muy bajos (< 1%), similares a los hallados en DMEMc.

### 3.1.1.2. Transporte y captación en dirección basolateral-apical

Las concentraciones de las formas arsenicales pentavalentes empleadas en dirección basolateral-apical en medio DMEMc fueron las mismas que en dirección apical-basolateral (1, 7, 13 y 67  $\mu\text{M}$ ). Para el As(V) el porcentaje de transporte basolateral-apical en DMEMc tras 24 horas de exposición se reduce significativamente respecto al observado en dirección apical-basolateral (<0.2% vs 3-10%). Sin embargo, el transporte de MMA(V) (5-8%) y DMA(V) (5-6%) es comparable al observado en el sentido apical-basal. Por lo que respecta a la retención celular, es muy baja (0.1-1%), al igual que ocurría en el transporte apical-basolateral. En la figura 2 se representan los ng de arsénico en el lado apical frente a la concentración de cada una de las especies arsenicales.



**Figura 2.** Transporte apical-basolateral (ng As/10<sup>6</sup> células) de As(V) (2a), MMA(V) (2b) y DMA(V) (2c) en función de la concentración. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Los ensayos de captación y transporte en medio HBSS se llevaron a cabo sólo a una concentración de cada especie arsenical (67  $\mu\text{M}$ ). Los resultados en medio HBSS y DMEMc se muestran conjuntamente en la tabla 2.

**Tabla 2.** Efecto del medio de cultivo en el transporte basal-apical de especies pentavalentes (67  $\mu\text{M}$ ) por células Caco-2. Contenido de arsénico (ng As/ $10^6$  células) en el compartimento receptor tras 24 horas de exposición. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

	<b>DMEMc</b> (ng As/ $10^6$ células)	<b>HBSS</b> (ng As/ $10^6$ células)
<b>As(V)</b>	12 $\pm$ 3	237 $\pm$ 3
<b>MMA(V)</b>	167 $\pm$ 12	55 $\pm$ 4
<b>DMA(V)</b>	222 $\pm$ 8	46 $\pm$ 7

En el caso del As(V) observamos un incremento significativo en el transporte en HBSS (5  $\pm$  0.7%) frente al obtenido en DMEMc (0.16  $\pm$  0.05%). Las formas metiladas pentavalentes presentan un comportamiento distinto, con una reducción significativa en el transporte en HBSS (0.9-1%) frente a DMEMc (5-6%).

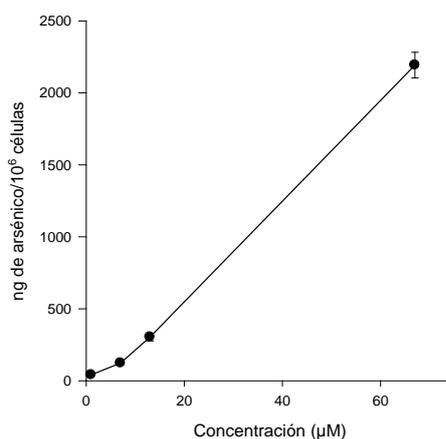
### 3.1.2. Especies arsenicales trivalentes

El estudio del transporte de las formas trivalentes se realizó únicamente en medio HBSS. Las concentraciones evaluadas en dirección apical-basolateral y basolateral-apical fueron 1, 7, 13 y 67  $\mu\text{M}$  para As(III) y 1  $\mu\text{M}$  para MMA(III) y DMA(III).

Los ensayos de transporte se extendieron hasta las 24 horas para el As(III) y hasta las 4 horas para el MMA(III) y DMA(III). Las diferencias en los tiempos y concentraciones de ensayo entre el As(III) y las formas metiladas trivalentes se deben a la mayor toxicidad del MMA(III) y DMA(III).

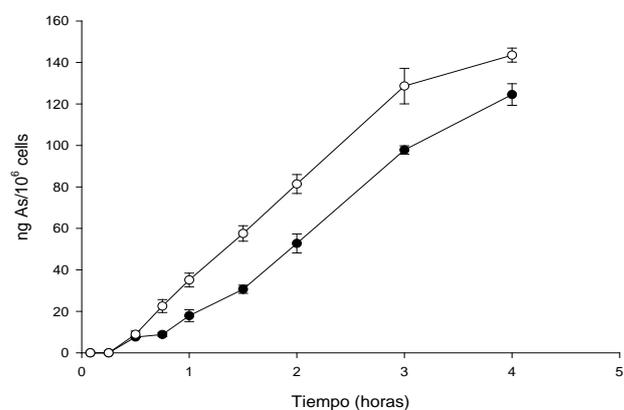
#### *3.1.2.1. Transporte y captación en dirección apical-basolateral*

La figura 3 muestra el transporte de As(III) en función de la concentración adicionada, tras 24 horas de exposición. Se observa un incremento lineal de los ng en el lado basolateral con el aumento de la concentración, indicando que en las condiciones estudiadas no existe un componente saturable en el transporte de esta especie. Los porcentajes de transporte de esta forma arsenical varían entre 45 y 64%, valores muy superiores a los obtenidos para la forma pentavalente.



**Figura 3.** Transporte apical-basolateral en HBSS de As(III) (ng As/10<sup>6</sup> células) en función de la concentración. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

La figura 4 representa los ng de arsénico en el lado basolateral en función del tiempo tras exposiciones a MMA(III) y DMA(III). Los porcentajes de transporte al lado basolateral de ambas especies son similares a los 240 minutos [MMA(III):  $50 \pm 4\%$  y DMA(III):  $58 \pm 3\%$ ]. Se observa una ligera reducción en la velocidad de transporte entre las 3 y 4 horas, hecho que puede deberse a una reducción en la concentración de estas formas arsenicales en el compartimento apical o a una oxidación de las mismas, ya que son compuestos inestables que se oxidan con rapidez.



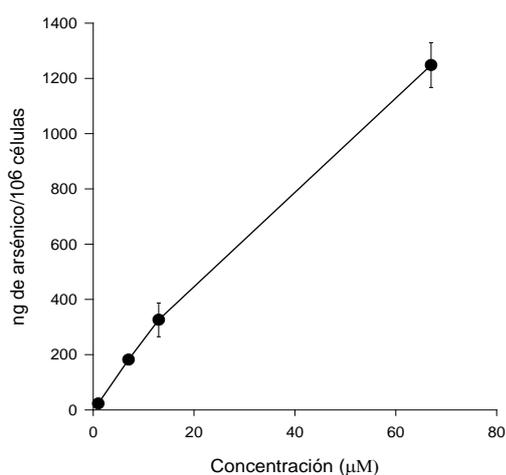
**Figura 4.** Transporte apical-basolateral (ng As/10<sup>6</sup> células) de MMA(III) (○) y DMA(III) (●), ambos a la concentración de 1 μM, en función del tiempo. Valores expresados como media ± desviación estándar.

Los contenidos intracelulares en dirección apical-basal son superiores a los observados para las formas pentavalentes en medio HBSS. El contenido intracelular de As(III) a tiempo final de ensayo (24 horas) varía entre 0.9-2.4% y aumenta con el incremento de la concentración (1, 7, 13 y 67 μM:  $2.4 \pm 0.2$ ,  $8 \pm 1$ ,  $21 \pm 3$  y  $43 \pm 5$  ng/10<sup>6</sup> células, respectivamente). El incremento, sin embargo no es lineal si consideramos la concentración más elevada de As(III), indicando que en estos niveles de exposición existe una saturación en la entrada de esta forma arsenical al interior celular.

El MMA(III) y el DMA(III) tienen una retención celular muy superior al As(III),  $30 \pm 4\%$  ( $76 \pm 11$  ng/10<sup>6</sup> células) y  $35 \pm 5\%$  ( $88 \pm 13$  ng/10<sup>6</sup> células) respectivamente. La suma del transporte al lado basolateral y el contenido intracelular de estas formas arsenicales supone el 100% del arsénico adicionado.

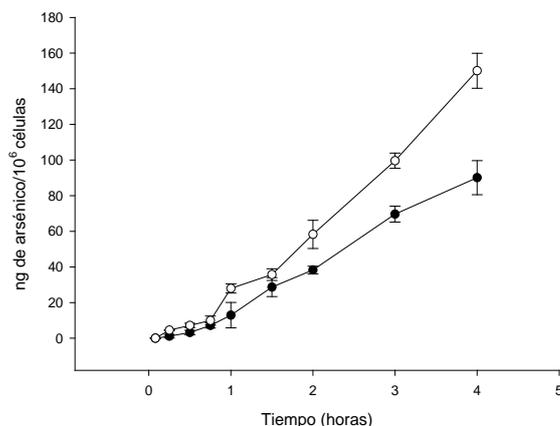
### 3.1.2.2. Transporte y captación en dirección basolateral-apical

La figura 5 muestra el transporte de As(III) al lado apical en función de la concentración, tras 24 horas de exposición. Al igual que para la dirección apical-basolateral, se observa un incremento lineal en el transporte con el aumento de la concentración, por lo que no existe saturación en las condiciones de ensayo. Los porcentajes de transporte de esta forma arsenical varían entre 26-36%.



**Figura 5.** Transporte basolateral-apical (ng As/ $10^6$  células) de As(III) en función de la concentración. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

El transporte en dirección basolateral-apical de MMA(III) y DMA(III) frente al tiempo se representa en la gráfica 6. Estas dos formas arsenicales presentan tasas de transporte similares a las observadas en dirección opuesta, con una tendencia lineal en el transporte. No se observa, sin embargo, la reducción en la velocidad de paso a lado basolateral que se detectaba entre las 3 y 4 horas, especialmente para el DMA(III).



**Figura 6.** Transporte basolateral-apical (ng As/10<sup>6</sup> células) de MMA(III) (○) y DMA(III) (●), ambos a la concentración de 1 μM, en función del tiempo. Valores expresados como media ± desviación estándar (n = 3).

Los contenidos intracelulares de arsénico tras 24 horas de exposición a As(III) en el compartimento basolateral son similares a los observados en la dirección opuesta, con porcentajes que varían entre 1-3% y que se incrementan con el aumento de la concentración (1, 7, 13 y 67 μM: 3.1 ± 0.9, 15 ± 2, 31 ± 4 y 55 ± 7 ng/10<sup>6</sup> células, respectivamente). La concentración más elevada modifica la tendencia lineal, indicando una saturación a estos niveles de exposición.

Los niveles de arsénico en el interior celular tras exposiciones a MMA(III) y DMA(III) en el compartimento basal (4 horas) son ligeramente superiores a los observados en dirección apical-basolateral, 37 ± 3% (92 ± 7 ng/10<sup>6</sup> células) y 42 ± 5% (105 ± 12 ng/10<sup>6</sup> células) respectivamente, y superiores a los encontrados para As(III). Al igual que en dirección opuesta, la totalidad del arsénico adicionado se encuentra en las células y compartimento basolateral.

### 3.2. Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente. Determinación del ratio de eliminación

El coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) calculado *in vitro*, evalúa la velocidad de paso de un compuesto a través de una monocapa celular y constituye un parámetro muy útil para establecer comparaciones, ya que corrige los valores obtenidos por la superficie del inserto, el tiempo y la concentración del compuesto adicionada.

La  $P_{app}$  en condiciones estándar de cultivo (37 °C y pH 7.2) y dirección apical-basal y basal-apical, se evaluó para 67  $\mu\text{M}$  de As(V), MMA(V), DMA(V) y As(III), y para 1  $\mu\text{M}$  de MMA(III) y DMA(III).

En las especies pentavalentes, la retirada de alícuotas se ha efectuado cada 15 minutos hasta el tiempo final de exposición, 120 minutos. En las especies trivalentes, las alícuotas se retiraron a 5, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. Los valores de  $P_{app}$  obtenidos para las distintas especies arsenicales y el valor del ratio de eliminación (Er) se presentan en la tabla adjunta.

**Tabla 3.** Coeficientes de permeabilidad aparente ( $\times 10^{-6}$  cm/s) de las especies arsenicales en dirección apical-basal, basal-apical y el ratio de eliminación en medio HBSS. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

	$P_{app}$ Apical-basal	$P_{app}$ Basal-apical	Ratio de eliminación (Er) $(P_{app} \text{ B-A}) / (P_{app} \text{ A-B})$
As(V) 67 $\mu\text{M}$	1.04 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.08
MMA(V) 67 $\mu\text{M}$	0.26 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.03
DMA(V) 67 $\mu\text{M}$	0.30 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.03
As(III) 67 $\mu\text{M}$	4.61 $\pm$ 0.32	4.72 $\pm$ 0.51	1.02 $\pm$ 0.12
MMA(III) 1 $\mu\text{M}$	7.15 $\pm$ 0.91	8.43 $\pm$ 0.5	1.18 $\pm$ 0.21
DMA(III) 1 $\mu\text{M}$	11.05 $\pm$ 1.42	13.15 $\pm$ 1.6	1.18 $\pm$ 0.07

Adicionalmente, para el As(III), se calcularon los valores de  $P_{app}$  para concentraciones inferiores (1, 7 y 13  $\mu\text{M}$ ), con valores similares al encontrado para la concentración superior (67  $\mu\text{M}$ ) ( $3.75 - 4.46 \times 10^{-6}$  cm/s).

Los valores de  $P_{app}$  en dirección apical-basolateral y basolateral-apical presentan la siguiente gradación según la especie arsenical:  $\text{DMA(III)} > \text{MMA(III)} > \text{As(III)} > \text{As(V)} > \text{DMA(V)} \approx \text{MMA(V)}$ . En el caso de las formas pentavalentes, el Er es menor que 1, indicando que el transporte en dirección apical-basolateral es superior al observado en dirección opuesta. Los valores de Er para las formas trivalentes están próximos a 1, mostrando un transporte similar en ambas direcciones.

### **3.3. Mecanismos de absorción de formas arsenicales en el modelo celular *in vitro* Caco 2**

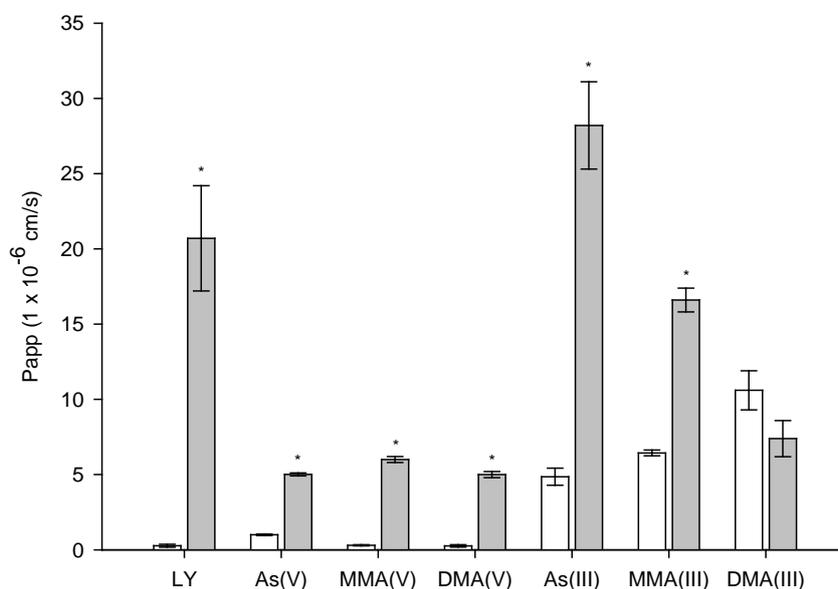
Con el fin de identificar los mecanismos de transporte implicados en la absorción de las formas arsenicales, se evaluó la  $P_{app}$  tras una serie de modificaciones de las condiciones de transporte consideradas estándar (37 °C y pH 7.2). Para las especies pentavalentes [As(V), MMA(V), DMA(V)] los ensayos se llevaron a cabo a una concentración de 67  $\mu\text{M}$  y la exposición se prolongó hasta los 120 minutos, con retirada de alícuotas a los 15, 30, 60 y 120 minutos. Para las especies trivalentes, la concentración estudiada fue 67  $\mu\text{M}$  para As(III) y 1  $\mu\text{M}$  para MMA(III) y DMA(III), con un tiempo de exposición de 120 minutos y retirada de alícuotas a 5, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. Si existen cambios en estas condiciones se detallan en el apartado de resultados correspondiente.

#### *3.3.1. Participación de la ruta paracelular*

Para evaluar la participación de la vía paracelular en la absorción de especies arsenicales, se llevó a cabo la apertura de las uniones estrechas intercelulares mediante la depleción de calcio en el medio de cultivo tras incubación con un agente quelante (EDTA 5 mM). La eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular causa la retracción de las proteínas

que forman las uniones estrechas y en consecuencia una apertura de los espacios intercelulares (Ma *et al.*, 2000).

Tras el tratamiento con EDTA se constató que existe una apertura importante de las uniones intercelulares en base a dos hechos: a) el incremento detectado en el transporte del marcador paracelular LY (100 mM) y b) el descenso en el valor de RET. La figura 7 muestra los valores de  $P_{app}$  de las especies arsenicales y del LY en las monocapas tratadas y no tratadas con EDTA. La apertura de las uniones intercelulares conlleva un aumento significativo del valor de la  $P_{app}$  de todas las especies ensayadas, con excepción del DMA(III) cuya  $P_{app}$  disminuye. El incremento de la  $P_{app}$  presenta la siguiente gradación: DMA(V) > MMA(V) > As(V) > As(III) > MMA(III).

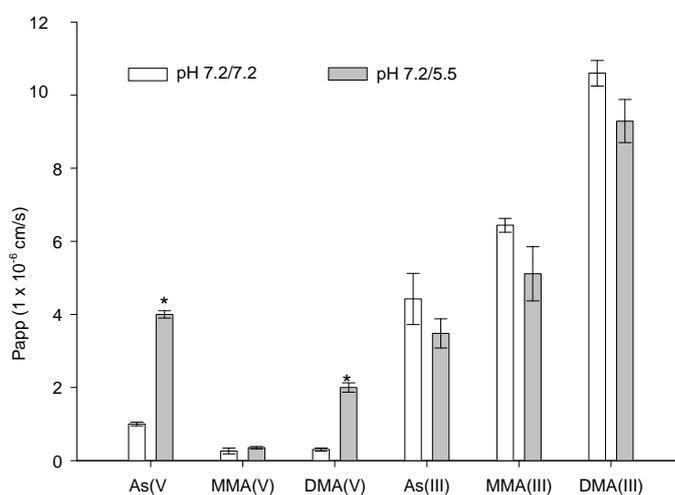


**Figura 7.** Valores de permeabilidad aparente a los 120 min para el marcador paracelular LY, As(V), MMA(V), DMA(V), As(III), MMA(III) y DMA(III) con las uniones estrechas íntegras (ausencia de EDTA) (barras blancas) y en tras la apertura de las uniones estrechas con 5mM de EDTA (barras grises). Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres réplicas. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos se marcan con un asterisco.

3.3.2. Efecto del pH sobre el transporte

Los resultados en las condiciones de pH evaluadas (apical 5.5/basal 7.2) se comparan con los hallados anteriormente en condiciones estándar de pH 7.2/7.2. La figura 8 muestra los valores de  $P_{app}$  para las distintas formas arsenicales, obtenidos en ambas condiciones de pH.

El descenso del pH en el medio apical sólo afecta el transporte de As(V) y DMA(V), que ven incrementada significativamente su  $P_{app}$  en dirección apical-basal. Para el As(V), la  $P_{app}$  pasa de  $1 \times 10^{-6}$  cm/s en condiciones estándar a  $4 \times 10^{-6}$  cm/s cuando el pH es ácido en el compartimento apical. El incremento es mayor para el DMA(V), que pasa de  $0.26 \times 10^{-6}$  cm/s a  $2 \times 10^{-6}$  cm/s. Por el contrario, las especies trivalentes y el MMA(V), no modifican significativamente su  $P_{app}$  con el cambio de pH en el lado apical.



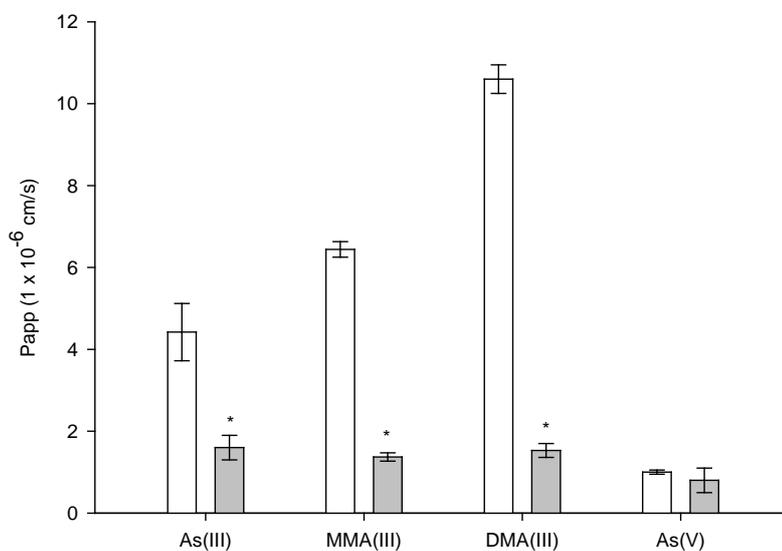
**Figura 8.** Valores de permeabilidad aparente a los 120 min de exposición a As(V), MMA(V), DMA(V), As(III), MMA(III) y DMA(III) a pH 7.2/7.2 (barras blancas) y pH 5.5/7.2 (barras grises). Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres réplicas. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos se marcan con un asterisco.

Por lo que respecta a la retención celular, la acidificación del medio en el compartimento apical no afecta al contenido intracelular de MMA(V) ni de las especies trivalentes. Únicamente existen diferencias significativas para el As(V) y DMA(V), con un incremento en la retención de arsénico a pH 5.5/7.2 [As(V):  $30 \pm 2$  ng/10<sup>6</sup> células; DMA(V):  $37 \pm 4$  ng/10<sup>6</sup> células] respecto a los valores hallados a pH 7.2/7.2 [As(V):  $12 \pm 1$  ng/10<sup>6</sup> células; DMA(V):  $17 \pm 3$  ng/10<sup>6</sup> células].

### 3.3.3. Efecto de la temperatura sobre la permeabilidad aparente del As(V), As(III), MMA(III) y DMA(III)

Debido a los bajos porcentajes de transporte y retención celular y a los bajos valores de  $P_{app}$  descritos con anterioridad para MMA(V) y DMA(V), el efecto de la temperatura se evaluó para As(V), As(III), MMA(III) y DMA(III). El estudio se llevó a cabo inicialmente a 4 °C, y a diferencia del resto de ensayos, solamente se extienden hasta los 60 minutos de exposición, con retirada de alícuotas a 5, 15, 30, 45 y 60 minutos.

La figura 9 compara los valores de  $P_{app}$  obtenidos a 4 °C y 37 °C. En todas las especies trivalentes se pone de manifiesto un descenso significativo de los valores de  $P_{app}$  a 4 °C, siendo mayor la reducción para el DMA(III) (85% de reducción), que para el MMA(III) (79% de reducción) y As(III) (63% de reducción). Por otra parte, mientras que a 37 °C sí existen diferencias evidentes entre los valores de  $P_{app}$  de las especies trivalentes, estas desaparecen a 4 °C [As(III):  $(1.6 \pm 0.3) \times 10^{-6}$  cm/s; MMA(III):  $(1.4 \pm 0.7) \times 10^{-6}$  cm/s; DMA(III):  $(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-6}$  cm/s]. Por lo que respecta al As(V), el descenso en el transporte a 4 °C respecto a 37 °C no es significativo.



**Figura 9.** Valores de permeabilidad aparente a los 120 min de exposición a As(III), MMA(III) y DMA(III) y As(V) a 37 °C (barras blancas) y 4 °C (barras grises). Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres réplicas. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos se marcan con un asterisco.

Las energías de activación ( $E_a$ ), calculadas mediante la ecuación de Arrhenius a partir de los datos de  $P_{app}$  obtenidos a 4, 15 y 37 °C, son las siguientes: As(V) = 4 kJ/mol (1 kcal/mol); As(III) = 25 kJ/mol (6 kcal/mol); MMA(III) = 35 kJ/mol (8 kcal/mol); DMA(III) = 41 kJ/mol (10 kcal/mol).

La temperatura no afecta a la captación celular del As(V), mientras que la retención de las especies trivalentes sí se ve afectada por el descenso de temperatura, tal y como se observa en la tabla 4. El contenido intracelular de As(III) y MMA(III) a 4 °C disminuye respecto al hallado a 37 °C entre 1.5 y 2 veces. El DMA(III) presenta una reducción en la retención celular mucho más marcada con el descenso de la temperatura (7 veces).

**Tabla 4.** Contenidos de arsénico en el interior de Caco-2 tras 60 minutos de exposición a As(V), As(III), MMA(III) y DMA(III), utilizando distintas temperaturas de ensayo. Valores expresados en ng As/10<sup>6</sup> células y en porcentaje (media ± desviación estándar; n=3). Los cambios significativos (p<0.05) en la retención celular a ambas temperaturas se marcan con un asterisco.

		4 °C	37 °C
<b>As(V)</b> <b>67 μM</b>	ng As/10 <sup>6</sup> células porcentaje	8.7 ± 1.1 (0.17 ± 0.02)	10.2 ± 2.1 (0.2 ± 0.04)
<b>As(III)</b> <b>67 μM</b>	ng As/10 <sup>6</sup> células porcentaje	28.1 ± 3.2 (0.56 ± 0.1)	47.2 ± 7.4* (0.98 ± 0.2)
<b>MMA(III)</b> <b>1 μM</b>	ng As/10 <sup>6</sup> células porcentaje	54.2 ± 4.5 (21.6 ± 1.6)	79.4 ± 8.1* (31.6 ± 3.2)
<b>DMA(III)</b> <b>1 μM</b>	ng As/10 <sup>6</sup> células porcentaje	15.9 ± 3.8 (6.4 ± 1.2)	(108.1 ± 4.1)* (43.24 ± 2)

#### 3.4. Estudio de los transportadores implicados en la absorción intestinal de As(V) y As(III)

Teniendo en cuenta que las formas inorgánicas de arsénico [As(III) y As(V)] son las mayoritarias en agua de bebida, y considerando que según los resultados hasta ahora expuestos podrían tener un componente transcelular en su absorción, se procedió a identificar posibles transportadores implicados en su captación y transporte transcelular. Los transportadores seleccionados para el estudio fueron elegidos en base a datos bibliográficos que confirmaban o sugerían su participación en el transporte de las formas inorgánicas en otros tipos celulares o tejidos. Se exponen a continuación los resultados obtenidos en los ensayos de expresión diferencial, inhibición química y silenciamiento génico.

3.4.1. Efecto de la presencia de fosfato inorgánico sobre la  $P_{app}$  y retención celular del As(V)

Existen numerosos trabajos que apuntan a un posible transporte activo del As(V) mediado por transportadores de fosfato. En la presente tesis se estudia la participación de este tipo de transportadores valorando la influencia del fosfato en la absorción del As(V). Para ello se evaluó la  $P_{app}$  y la retención celular del As(V) (67  $\mu$ M) en un medio salino sin fosfato y en medios con distintos contenidos de fosfato inorgánico (1.1 y 10 mM). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. Los valores de  $P_{app}$  a los 240 minutos de exposición muestran una disminución del transporte a medida que aumenta la concentración de fosfato en el medio. A tiempo final de ensayo, los contenidos celulares de As(V) en presencia de fosfato son significativamente inferiores a los obtenidos en el medio sin fosfato.

**Tabla 5.** Valores del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app} \times 10^{-6}$  cm/s) y acumulación intracelular (ng As/ $10^6$  células) en células expuestas a As(V) (67  $\mu$ M) en medios con y sin fosfato durante 240 minutos. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los cambios significativos ( $p < 0.05$ ) entre la  $P_{app}$  y retención celular con y sin fosfato se marcan con un asterisco.

	Tratamiento	$P_{app}$ ( $10^{-6}$ cm/s)	Retención celular (ng As/ $10^6$ células)
As(V)	Sin fosfato	2.3 $\pm$ 0.2	32 $\pm$ 4
	1.1 mM fosfato	1.9 $\pm$ 0.1*	17 $\pm$ 2*
	10 mM fosfato	0.96 $\pm$ 0.10*	1.4 $\pm$ 0.1*

3.4.2. Efecto de inhibidores de transportadores sobre la  $P_{app}$  y la retención celular del As(III)

Con objeto de poner de manifiesto la participación en el transporte intestinal de As(III) de transportadores identificados en otros tipos celulares, se evaluaron la  $P_{app}$  y la

retención celular de 10  $\mu\text{M}$  As(III) en presencia de inhibidores de estos transportadores, todos ellos a 100  $\mu\text{M}$  (rifamicina SV, phloridzin, phloridzin y sulfato de cobre). La  $P_{\text{app}}$  se calculó a los 60 minutos de exposición debido a que a tiempos superiores, el tratamiento con  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  afectó a la integridad de la membrana (valores de RET > 20% del valor inicial y  $P_{\text{app}} \text{ LY} > 0.5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.

La rifamicina SV, inhibidor de OATPs, produce una reducción de la  $P_{\text{app}}$  que es dependiente del tiempo de preincubación (40% de reducción a los 15 minutos, 70% de reducción a 60 minutos). La retención celular también se ve significativamente reducida (64% de reducción).

La phloridzin, un inhibidor de SGLT y la phloridzin, inhibidor de GLUT y AQP, también reducen significativamente la captación y el transporte del As(III). La phloridzin necesita tiempos de preincubación de 60 minutos para producir descensos significativos en el valor de  $P_{\text{app}}$ , mientras que la phloretin produce un descenso en la  $P_{\text{app}}$  a tiempos de preincubación de 15 minutos. Ambos compuestos producen una reducción similar del  $P_{\text{app}}$  del As(III) (40% de reducción) y de la retención celular (reducción del 57% y 53% para la phloridzin y phloretin respectivamente).

El tratamiento  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ , inhibidor de AQP, reduce tanto la  $P_{\text{app}}$  (69% menor que el valor obtenido en ausencia de inhibidor) como la retención celular (55% de reducción) del As(III).

**Tabla 6.** Valores del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) y acumulación intracelular (ng As/ $10^6$  células) en células con y sin inhibición previa, expuestas a  $10 \mu\text{M}$  de As(III) durante 60 minutos. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Los cambios significativos ( $p<0.05$ ) entre la  $P_{app}$  y retención celular con y sin inhibidores se marcan con un asterisco.

	Tratamiento	Preincubación (minutos)	$P_{app}$ ( $10^{-6}$ cm/s)	Retención celular (ng As/ $10^6$ células)
As(III)	Sin inhibidor	—	$4.5 \pm 0.3$	$47 \pm 7$
	Rifamicina	15	$2.7 \pm 0.3^*$	n.a.
		60	$1.2 \pm 0.3^*$	$17 \pm 4^*$
	Phloridzin	15	$4.0 \pm 0.4$	n.a.
		60	$2.7 \pm 0.4^*$	$22 \pm 4^*$
	Phloretin	15	$2.7 \pm 0.3^*$	$20 \pm 3^*$
CuSO <sub>4</sub>	15	$1.4 \pm 0.3^*$	$21 \pm 6^*$	

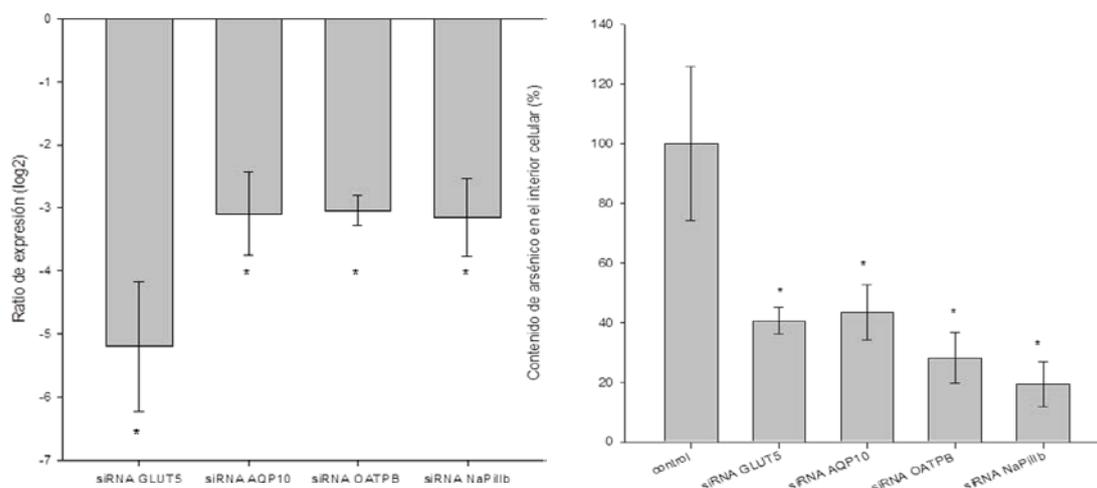
n.a. no analizado

### 3.4.3. Inhibición de transportadores mediante silenciamiento transitorio y su efecto sobre la captación celular de arsénico inorgánico

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición, se seleccionan cuatro transportadores para confirmar mediante silenciamiento génico su participación en la entrada en células del epitelio intestinal de As(III) (GLUT5, AQP10 y OATPB) y As(V) (NaPiIIb). Se escogen transportadores localizados en la membrana apical y por tanto en contacto con el lumen intestinal.

La figura 10 muestra el cambio de expresión de las muestras transfectadas respecto a los respectivos controles no transfectados. Para los cuatro transportadores estudiados existe un silenciamiento significativo, similar para *AQP10*, *OATPB* y *NaPiIIb*. Para el *GLUT5* el silenciamiento es mayor. La figura 11 representa el porcentaje de retención celular de arsénico para los cultivos transfectados respecto a la retención observada en los controles. Para el As(III), el silenciamiento de *GLUT5*, *AQP10* y *OATPB* producen reducciones significativas en la acumulación celular ( $59 \pm 5\%$ ,  $57 \pm 9\%$  y  $72 \pm 9\%$ ,

respectivamente). Para el As(V), el silenciamiento de NaPiIIIb también produce una importante reducción de la acumulación celular ( $81 \pm 7\%$ ).



**Figura 10.** Expresión relativa de transportadores en células Caco-2 transfectadas con siRNA, en relación a células no transfectadas [ratio de expresión ( $\log_2$ )] (media  $\pm$  desviación estándar, n=6). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a controles de células no transfectadas se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

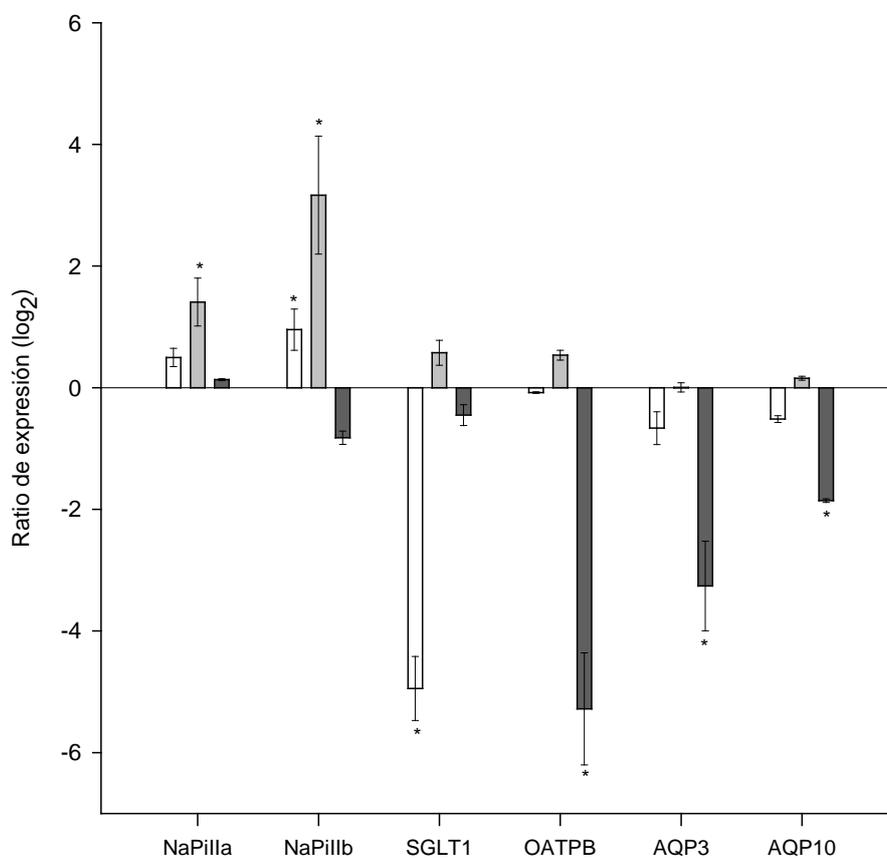
**Figura 11.** Porcentaje de arsénico en el interior celular en células Caco-2 transfectadas con siRNA respecto a células control (media  $\pm$  desviación estándar, n=6). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a controles de células no transfectadas se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

#### 3.4.4. Expresión diferencial de transportadores tras la exposición a As(V)

Tras el tratamiento de células Caco-2 con As(V) (100  $\mu$ M) durante 24, 48 y 72 horas, se evaluaron los cambios en la expresión de ARNm los transportadores de fosfato tipo II (NaPiIIa y NaPiIIIb) y tipo III (PiT1 y PiT2), así como de *SGLT1*, *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT5*, *OATPB*, *OATPE*, *AQP1*, *AQP3*, *AQP4* y *AQP10*. También se evaluaron los transportadores de salida (*P-gp*, *MRP2*, *MRP3* y *BCRP*). Todos los transportadores analizados se expresan en el clon de Caco-2 empleado; sin embargo los niveles de expresión de ARNm de *AQP1*, *GLUT1* y *OATPE* son muy bajos, tanto en los

controles como en las células tratadas, por lo que no se consideran en los estudios de expresión diferencial.

La exposición a 100  $\mu\text{M}$  de As(V) no afecta significativamente a la expresión de *GLUT2*, *GLUT5*, *AQP4*, *Pi1* y *Pi2*, ni a la de los transportadores de salida (*P-gp*, *MRP2*, *MRP3* y *BCRP*). A pesar de ello se observa una tendencia al descenso en su expresión, con valores entre -1.7 y -0.4 [ratio de expresión ( $\log_2$ )]. La figura 12 muestra los cambios en la expresión del ARNm de aquellos transportadores que sí presentan cambios significativos tras los tratamientos con As(V). Existe un incremento en la expresión de ARNm de los transportadores NaPiII, que se manifiesta a las 48 horas para el NaPiIIa, y a las 24 y 48 horas para el NaPiIIb. En cuanto al resto de transportadores, el *SGLT1* experimenta un descenso en su expresión a las 24 horas, mientras que para el *OATPB*, *AQP3* y *AQP10* este descenso se observa a las 72 horas de tratamiento.

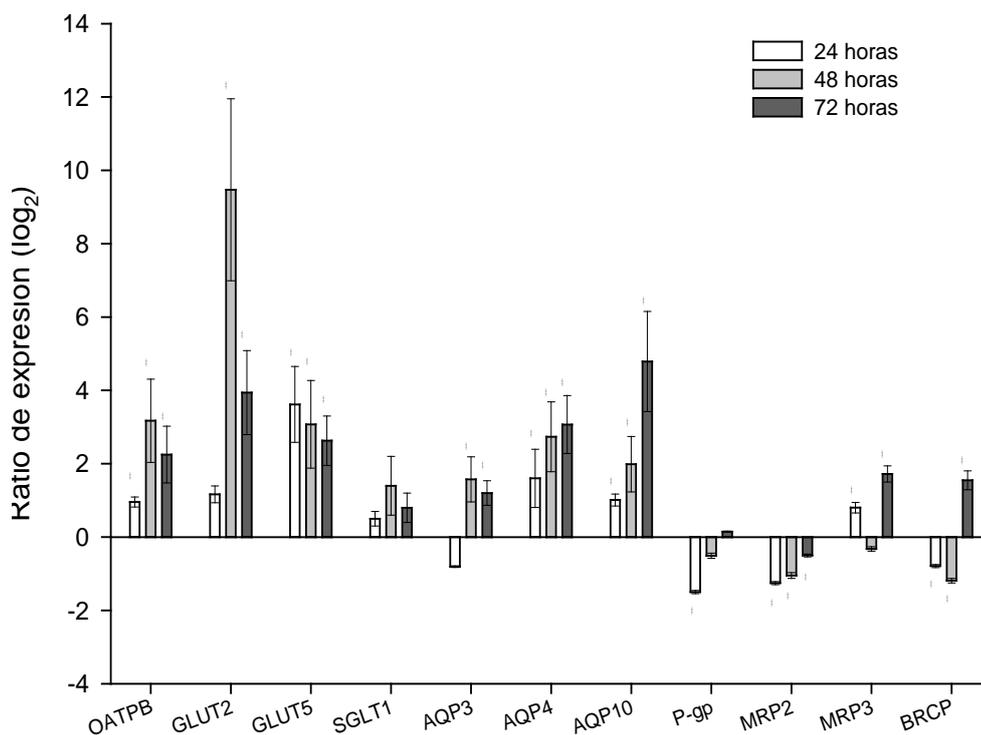


**Figura 12.** Expresión relativa de transportadores [ratio de expresión ( $\log_2$ )] de células Caco-2 tratadas con As(V) ( $100 \mu\text{M}$ ) (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=8$ ). Las barras representan diferentes tiempos de tratamiento: 24 horas (barras blancas); 48 horas (barras gris claro); 72 horas (barras gris oscuro). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a controles no tratados con arsénico mantenidos el mismo tiempo en cultivo se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ )

#### 3.4.5. Expresión diferencial de ARNm de transportadores tras la exposición a As(III)

Se analizaron los cambios en la expresión de *SGLT1*, *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT5*, *OATPB*, *OATPE*, *AQP1*, *AQP3*, *AQP4*, *AQP10*, *P-gp*, *MRP2*, *MRP3* y *BCRP* tras la exposición a 10  $\mu$ M de As(III) durante 24, 48 y 72 horas. Al igual que para el As(V), los transportadores *AQP1*, *GLUT1* y *OATPE* no se consideran en la evaluación de la expresión diferencial.

La figura 13 muestra los cambios observados en la expresión del ARNm. Los resultados ponen de manifiesto una sobreexpresión de *GLUT2* y *AQP3* a las 48 y 72 horas. *OATPB*, *GLUT5*, *AQP4* y *AQP10* presentan incrementos en su expresión a todos los tiempos de ensayo. El transportador *SGLT1* no presenta cambios significativos entre las muestras tratadas y las muestras control. Por lo que respecta a los transportadores de salida, se observa una regulación a la baja, excepto para el *MRP3*, que presenta una sobreexpresión a las 24 y 72 horas, y el *BCRP* que se sobreexpresa a las 72 horas.



**Figura 13.** Expresión relativa de transportadores [ratio de expresión ( $\log_2$ )] de células Caco-2 tratadas con As(III) ( $10 \mu\text{M}$ ) (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=8$ ). Las barras representan diferentes tiempos de tratamiento: 24 horas (barras blancas); 48 horas (barras gris claro); 72 horas (barras gris oscuro). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a controles no tratados con arsénico mantenidos el mismo tiempo en cultivo se marcan con un asterisco ( $p<0.05$ ).

### 3.5. Factores que afectan al transporte intestinal del arsénico inorgánico

Los estudios de absorción empleando patrones acuosos de especies arsenicales suponen una aproximación parcial a los complejos procesos que pueden experimentar las especies arsenicales ingeridas con los alimentos y el agua de bebida en su paso a través del tracto gastrointestinal. No obstante, aportan información valiosa ya que se

eliminan variables que pueden dificultar la interpretación de los datos. La presencia de matrices alimentarias y el efecto de ciertos componentes presentes en el quimo, deben sin embargo evaluarse para establecer posibles cambios en la absorción del arsénico. En la presente tesis doctoral, se ha estudiado el efecto sobre la permeabilidad intestinal del As(III) y As(V), ambos a una concentración de 67  $\mu$ M, del GSH y de las sales biliares, componentes habituales en el quimo, así como del extracto de té verde, un producto con propiedades antioxidantes, quelante de metales y con efectos sobre la estructura del citoesqueleto y de las uniones estrechas.

### 3.5.1. Efecto del glutatión reducido (GSH)

Los valores de la  $P_{app}$  de As(V) y As(III) en presencia de 5 mM de GSH, obtenidos tras 120 min de exposición tanto en dirección apical-basal como basal-apical, se presentan en la tabla 7. La  $P_{app}$  en dirección apical-basal de As(V) y As(III) experimenta cambios significativos respecto a los hallados previamente en ausencia del tripéptido; aumentan para As(V) y disminuye para As(III). En dirección basal-apical, el GSH también incrementa significativamente la  $P_{app}$  del As(V), pero no afecta al transporte de As(III).

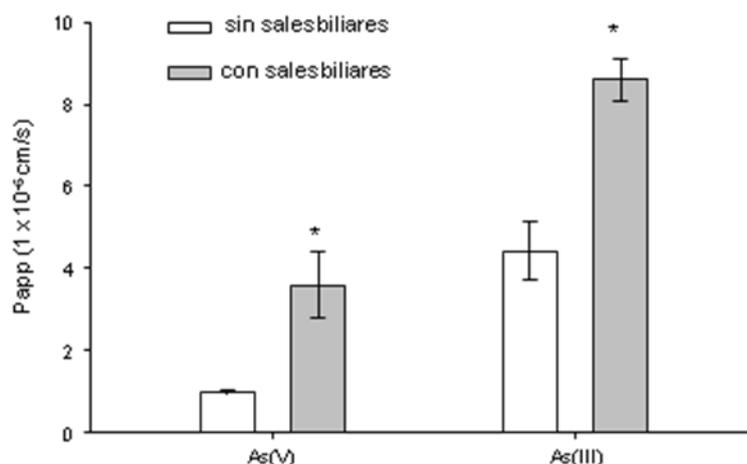
Por lo que respecta a los contenidos intracelulares, en dirección apical-basal la presencia de GSH incrementa significativamente el contenido celular de As(V) pero reduce el contenido de As(III). En sentido basal-apical, los contenidos celulares en presencia de GSH aumentan de forma significativa para ambas especies [13 veces para el As(V) y 1.3 veces para el As(III)].

**Tabla 7.** Valores del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) y acumulación intracelular (ng As/ $10^6$  células) en células expuestas a As(V) y As(III) ( $67 \mu\text{M}$ ) con y sin coexposición a GSH (5 mM) durante 120 minutos. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Los cambios significativos ( $p<0.05$ ) de la  $P_{app}$  y retención celular en presencia de GSH, respecto al tratamiento únicamente con arsénico, se marcan con un asterisco.

		$P_{app}$ ( $10^{-6}$ cm/s)	Retención celular (ng/mg proteína)
<b>Apical-basolateral</b>	As(V)	$1.0 \pm 0.1$	$12 \pm 2$
	As(V)+GSH	$2.3 \pm 0.2^*$	$22 \pm 3^*$
	As(III)	$4.6 \pm 0.6$	$49 \pm 5$
	As(III)+GSH	$2.1 \pm 0.3^*$	$20 \pm 4^*$
<b>Basolateral-apical</b>	As(V)	$0.5 \pm 0.1$	$4 \pm 0.3$
	As(V) + GSH	$2.8 \pm 0.4^*$	$53 \pm 2^*$
	As(III)	$4.7 \pm 0.5$	$55 \pm 7$
	As(III) + GSH	$3.3 \pm 0.7^*$	$70 \pm 5^*$

### 3.5.2. Efecto de las sales biliares

Los estudios de permeabilidad en dirección apical-basolateral en presencia de sales biliares (25 mg/mL) tras 120 minutos de exposición a As(III) y As(V) ponen de manifiesto un incremento en la  $P_{app}$  de ambas especies. El aumento es de 4 veces para el As(V) y de 2 veces para el As(III), respecto a los valores de  $P_{app}$  hallados en ausencia de sales biliares (figura 14). Los valores de retención celular también se incrementan significativamente respecto a lo observado en ausencia de sales biliares [As(V):  $27 \pm 6$  ng As/mg proteína frente a  $4 \pm 0.3$  ng/mg proteína; As(III):  $83 \pm 12$  ng As/mg proteína frente a  $55 \pm 7$  ng As/mg proteína].



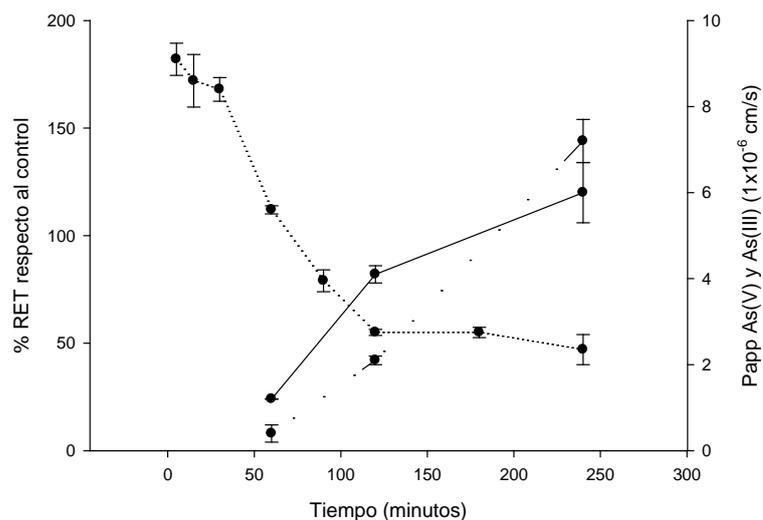
**Figura 14.** Valores del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) ( $\times 10^{-6}$  cm/s) (120 min) en medio HBSS sin sales biliares (barra blanca) y con sales biliares (barra gris). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Los cambios significativos ( $p<0.05$ ) se marcan con un asterisco.

### 3.5.3. Extracto de té verde (ETV)

En los ensayos de permeabilidad realizados en presencia de  $10 \mu\text{g/mL}$  de ETV (dirección apical-basal) la exposición se ha prolongado hasta los 240 minutos. En la figura 15 se muestran los valores de  $P_{app}$  de As(V) y As(III) tras la adición de ETV a la monocapa celular, y los porcentajes de variación de la RET respecto a la monocapa no tratada.

Inicialmente (60 minutos) existe un incremento muy marcado en los valores de RET junto con una disminución del  $P_{app}$  de LY ( $0.004 \times 10^{-6}$  cm/s) respecto al control ( $0.1 \times 10^{-6}$  cm/s). Este comportamiento revierte a partir de los 120 minutos, momento en que la RET de la monocapa expuesta a ETV disminuye respecto al control, siendo la disminución del 50% a los 240 minutos. Estos cambios en la monocapa celular se reflejan en los valores de  $P_{app}$  de As(III) y As(V). Así, en las monocapas celulares coexpuestas a estas especies arsenicales y a ETV, se produce una reducción inicial del

transporte del As(V) [60 min;  $P_{app}$  As(V) =  $1 \times 10^{-6}$  cm/s;  $P_{app}$  As(V) + ETV =  $0.4 \times 10^{-6}$  cm/s] y del As(III) [60 min;  $P_{app}$  As(III) =  $4 \times 10^{-6}$  cm/s;  $P_{app}$  As(III) + ETV =  $1.8 \times 10^{-6}$  cm/s]. Este efecto revierte a tiempos más largos de exposición, coincidiendo con la apertura de las uniones intercelulares, observándose incrementos de la  $P_{app}$  del As(III) y As(V) (5 y 18 veces respectivamente).



**Figura 15.** Valores de porcentaje de resistencia eléctrica transepitelial (RET) respecto al control y coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) ( $\times 10^{-6}$  cm/s) del As(III) y As(V) en presencia de ETV a distintos tiempos. La línea punteada (eje izquierdo), representa los valores de RET, la línea partida (eje derecho) representa los valores de  $P_{app}$  de As(V) y la línea continua (eje derecho) representa los valores de  $P_{app}$  de As(III). Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres réplicas.



---

## Discusión

---

El modelo celular Caco-2 ha sido ampliamente empleado para la evaluación de la absorción intestinal de fármacos y nutrientes. Su aplicación para determinar la absorción de tóxicos alimentarios está menos descrita. Los datos de permeabilidad aparente obtenidos *in vitro* empleando el modelo celular formado por Caco-2 se pueden correlacionar con la magnitud de la absorción intestinal en humanos, tal y como ponen de manifiesto diversos estudios sobre fármacos (Yee, 1997; Pade y Stavchansky, 1998; Artursson *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2010).

Para los estudios de transporte se describe en la bibliografía el uso de medios muy distintos. Estudios previos sobre transporte y permeabilidad de arsénico en Caco-2 refieren DMEMc o MEM (medio esencial mínimo con sales de Eagle) como medio de ensayo (Laparra *et al.*, 2005, 2006). Sin embargo, el medio HBSS es el más empleado en los ensayos de permeabilidad de fármacos en células Caco-2 (Hidalgo y Borchardt, 1990; Knipp *et al.*, 1997; Saitoh *et al.*, 2004; Hubatsch *et al.*, 2007; Catalioto *et al.*, 2008), debido a la ausencia de compuestos que pueden interferir en los procesos de absorción, tales como aminoácidos, vitaminas o elevados niveles de glucosa. No existen datos previos que empleen HBSS en el cálculo de la permeabilidad y transporte de arsénico a nivel intestinal *in vitro*.

En la presente tesis, el empleo de distintos medios de cultivo aporta información sobre el efecto de la composición del medio en el transporte de las especies arsenicales pentavalentes, tal y como se ha descrito para otros compuestos (Mathieu *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en el transporte de arsénico en DMEMc y HBSS. La composición de cada uno de ellos puede ser la causa; el DMEMc contiene suero fetal bovino y elevados niveles de glucosa (4.5 g/L), vitaminas y aminoácidos, mientras que el HBSS es un medio salino mucho más pobre en su composición y con niveles de glucosa inferiores (1 g/L). El menor transporte de As(V) y MMA(V) que existe en medio DMEMc podría ser consecuencia de la interacción de estas especies con ciertos componentes del medio, disminuyendo así la cantidad de

especie arsenical libre. En este sentido, existen trabajos previos que evidencian la interacción del arsénico con la glucosa (Mandal *et al.*, 2011) y con la albúmina presente en el suero fetal bovino (Jiang *et al.*, 2003). El transporte de As(III) también está afectado por el cambio de medio, ya que la  $P_{app}$  obtenida en medio DMEMc por Laparra *et al.* (2006) es inferior a la determinada en la presente tesis en medio HBSS ( $1 \times 10^{-6}$  cm/s vs  $4.4 \times 10^{-6}$  cm/s). Estos resultados indican que las condiciones de estudio, entre las que se incluye el medio de transporte, deben ser consideradas al comparar los resultados obtenidos en distintos trabajos, poniendo de manifiesto la importancia de estandarizar los protocolos para obtener datos comparables. Tras los resultados obtenidos, el medio HBSS ha sido el seleccionado para el resto de experiencias de permeabilidad, transporte y captación celular realizados.

Los resultados de transporte y permeabilidad obtenidos en dirección apical-basal muestran que el transporte intestinal del arsénico es dependiente de su forma química. En general, el transporte de las formas trivalentes es mayor que el de las formas pentavalentes. Para las especies trivalentes, la velocidad de entrada es directamente proporcional al grado de metilación [DMA(III)>MMA(III)>As(III)], al contrario de lo observado en las especies pentavalentes [As(V)>MMA(V)>DMA(V)].

La permeabilidad en sentido secretorio (basal-apical) es, para todas las formas arsenicales estudiadas, igual o inferior a la observada en sentido absorbivo, por lo que el ratio de eliminación, cociente entre permeabilidades en ambas direcciones ( $P_{app} B-A/P_{app} A-B$ ), no supera la unidad. Según, Hubatsch *et al.* (2007), los valores de este ratio aportan información sobre la posible existencia de mecanismos de eliminación activos. Valores superiores a 1.5 sugieren la participación de glicoproteína P u otros sistemas de eliminación, hecho que no se pone de manifiesto para ninguna de las especies arsenicales evaluadas.

En lo referente a la retención celular, es destacable la importante acumulación de las formas metiladas trivalentes, que al igual que ocurre en el transporte, aumenta al aumentar el grado de metilación [DMA(III)>MMA(III)>As(III)]. Este dato es de suma importancia cuando se considera la elevada toxicidad que se ha descrito para estas

formas arsenicales en otros sistemas celulares (Stybło *et al.*, 2000, 2001; Mass *et al.*, 2001; Nesnow *et al.*, 2002, Kliegerman *et al.*, 2003) y que, tal y como se comentará posteriormente en esta tesis, también producen importantes efectos tóxicos sobre las células epiteliales del intestino (capítulo 5 y 6). Por tanto, su acumulación en el epitelio intestinal podría afectar al normal funcionamiento de la mucosa intestinal.

La evaluación de los coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos en la presente tesis se ha realizado en base al criterio descrito por Yee (1997), según el cual permeabilidades  $<10^{-6}$  cm/s corresponden a sustancias de baja absorción (<30%), permeabilidades entre  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  cm/s a sustancias con moderada absorción (30-70%), y permeabilidades  $>10^{-5}$  cm/s a sustancias con una elevada absorción (>70%). Aplicando este criterio a los valores de  $P_{app}$  obtenidos en el monocultivo Caco-2 en condiciones de transporte apical-basal estándar (37 °C y pH 7.2), el DMA(III) se clasificaría como de alta absorción, As(V), As(III) y MMA(III) presentarían una absorción moderada, mientras que MMA(V) y DMA(V) se considerarían compuestos con una baja absorción.

Los estudios de absorción intestinal de patrones de especies arsenicales realizados *in vivo* difieren en cuanto a la magnitud de la absorción *in vitro* con el modelo celular Caco-2. Así, se ha descrito una absorción elevada de As(V) y As(III) en modelos animales como pollo (Fullmer y Wasserman, 1985), rata (Gonzalez *et al.*, 1995) y cerdo (Juhász *et al.*, 2006), llegándose en muchos casos a una absorción completa. Para las especies orgánicas pentavalentes se ha descrito menor absorción *in vivo* [33-50% DMA(V) y 17% MMA(V) (Hwang y Schanker, 1973; Juhász *et al.*, 2006)]. Las diferencias *in vivo-in vitro* son especialmente importantes para las formas inorgánicas y pueden deberse a distintos motivos. Uno de ellos podría ser la modificación de la especie química ingerida durante el tránsito gastrointestinal, cambio que no es contemplado en el sistema *in vitro*. Algunas de estas transformaciones ya se han puesto de manifiesto en el capítulo 1 y 2 de esta tesis, consecuencia de sustancias reductoras presentes en el quimo y del metabolismo intestinal. Otros autores han observado que la flora microbiana intestinal también produce cambios entre especies, con reducción del As(V) a As(III) y metilación del As(III) a MMA(III) (Ávila *et al.*, 2012; Van de Wiele

*et al.*, 2010, Hall *et al.*, 1997). Todas estas transformaciones podrían generar especies arsenicales de mayor absorción que la especie ingerida con el agua y los alimentos.

Otra posible causa de las diferencias *in vivo-in vitro* es la propia morfología del modelo celular Caco-2. Estas células forman densos complejos intercelulares, más semejantes a los presentes en el colon (RET 200  $\Omega$  cm<sup>2</sup>) que a los observados en el epitelio del intestino delgado humano (RET 60  $\Omega$  cm<sup>2</sup>) (Hilgendorf *et al.*, 2000). Por ello, algunas moléculas hidrofílicas que se transportan por vía paracelular presentan una permeabilidad en Caco-2 hasta 100 veces menor que en el intestino humano (Wikman-Larhed y Artursson, 1995). En el caso del arsénico, la existencia de un transporte paracelular podría causar una subestimación de su absorción cuando se utiliza el modelo Caco-2. Se ha evidenciado que las formas arsenicales estudiadas con excepción del DMA(III) presentan un transporte paracelular, siendo más importante para las formas pentavalentes [DMA(V) > MMA(V) > As(V)] que para las trivalentes [As(III) > MMA(III)]. Por otra parte, tras la apertura de las uniones intercelulares se observa un aumento de la  $P_{app}$  para el LY, compuesto que se transporta mayoritariamente por vía paracelular, muy superior al observado para las especies arsenicales. Este hecho apunta a la coexistencia de ambas vías de transporte (transcelular y paracelular), tal y como se ha descrito para otros compuestos hidrofílicos como la ranitidina o cimetidina (Bourdet *et al.*, 2004; Nagahara *et al.*, 2004) o para el fosfato (Eto *et al.*, 2006).

Otra posible causa de las diferencias *in vivo-in vitro* observadas en las especies arsenicales es el pH, el cual influye en la absorción de compuestos de carácter iónico. Este parámetro presenta un intervalo amplio de valores a lo largo del tracto gastrointestinal, desde el pH ácido del estómago hasta valores de pH 8 en el colon (Neuhoff *et al.*, 2005). El pH puede afectar de forma significativa a los procesos de permeabilidad pasiva, habiéndose descrito este fenómeno como la hipótesis de partición de pH por Shore *et al.* (1957). La absorción de fármacos o tóxicos en el tracto gastrointestinal por difusión pasiva depende de la fracción de compuesto que se encuentra en forma no disociada al pH de interés (Kristl, 2009). Por otra parte, existen transportadores que dependen de la concentración de protones, tal como el polipéptido

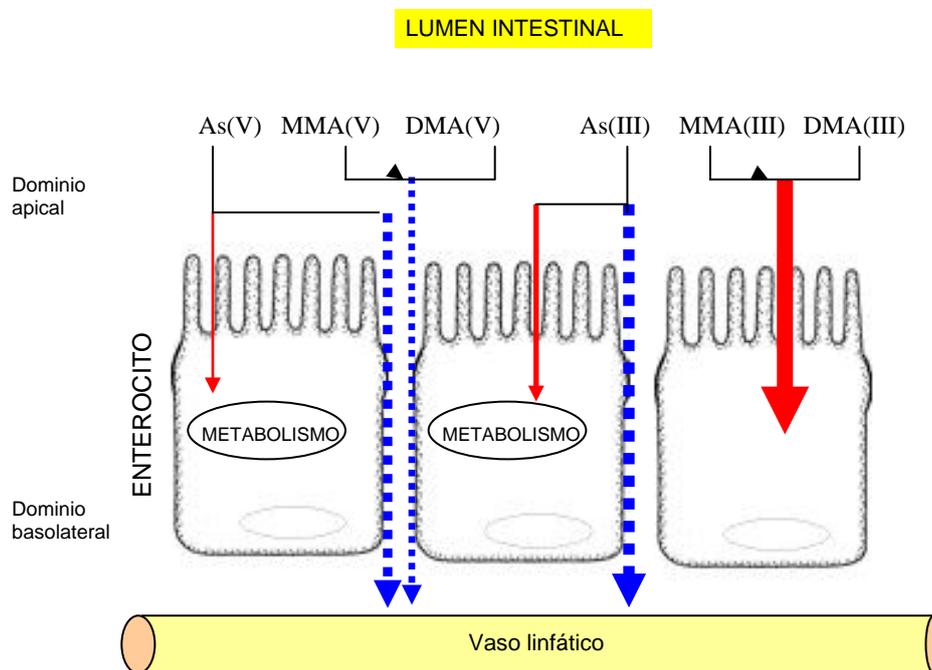
transportador de aniones orgánicos (OATP), que podría participar en la absorción intestinal del arsénico (Lu *et al.*, 2006).

Las modificaciones de pH realizados en este estudio sólo han afectado significativamente el transporte de As(V) y DMA(V), el cual se ha incrementado significativamente tras reducir el pH apical de 7.2 a 5.5. Ambas especies experimentan cambios en el estado de ionización en este intervalo de pH. A pH 5.5, el As(V) pasa de forma dianiónica a monoaniónica ( $pK_a$  2.3, 6.7, 11.6), mientras que el DMA(V) pasa de forma monoaniónica a neutra ( $pK_a$  6.3). La reducción en el número de cargas negativas hacen más permeable al As(V) en estas condiciones de pH, tal y como se ha descrito para el fosfato, molécula con la cual tiene una gran similitud (Virkki *et al.*, 2007). Así mismo, las formas neutras de ácidos y bases débiles, como es el caso del DMA(V), presentan mayor permeabilidad que las formas aniónicas, fenómeno demostrado para un gran número de compuestos (Knipp *et al.*, 1997). La permeabilidad aparente a pH ácido para As (V) ( $4 \times 10^{-6}$  cm/s) y DMA(V) ( $2 \times 10^{-6}$  cm/s) aumenta significativamente respecto a la obtenida a pH 7.2, y en el caso de la forma dimetilada es más comparable a los datos de absorción intestinal observados *in vivo*. El hecho de que el MMA(V) y las especies trivalentes no modifiquen su transporte con el cambio de pH puede deberse a que en el intervalo de pH evaluado no existe modificación en las cargas, como es el caso del MMA(V) ( $pK_a$  3.6, 8.2) o porque no estén implicados en su absorción transportadores dependientes de gradiente de protones. Para el MMA(III) y DMA(III) no existen datos de  $pK_a$ , por lo que no se conoce si existe variación de carga en estas especies. Consideramos pues, el transporte de estas especies arsenicales a través del epitelio intestinal independiente del gradiente de protones.

El incremento en la absorción del As(V) y DMA(V) con valores ácidos de pH en el lado apical podría posibilitar la absorción de estas especies no sólo en las regiones proximales del intestino, sino también en el estómago. A pesar de que el componente gástrico no se considera mayoritario en la absorción de fármacos o nutrientes, se ha demostrado su importancia en compuestos tales como el flúor (Liteplo *et al.*, 2002) o el ácido oxálico (Hatch y Freel, 2005). A  $pH < 2$  tanto el As(V) como el DMA(V) se encuentran en forma neutra, por lo que su absorción en el estómago no es descartable.

Las bajas temperaturas aplicadas sobre sistemas celulares se consideran inhibidores generales del metabolismo y del transporte activo (Hubatsch *et al.*, 2007). El estudio del transporte de las especies arsenicales a bajas temperaturas muestra diferencias respecto al transporte a 37 °C para algunas especies arsenicales. La reducción en los valores de  $P_{app}$  con la disminución de la temperatura para las formas trivalentes [7 veces menor para el DMA(III); 5 veces menor para MMA(III); 3 veces menor para As(III)], podrían indicar un transporte transcelular dependiente de temperatura para estas formas arsenicales. Por el contrario, para el As(V) las permeabilidades a 37 y 4 °C no difieren significativamente, por lo que se considera que la participación de un componente transcelular activo en su absorción intestinal es insignificante. Por otra parte, Hidalgo y Borchardt (1990) indican que valores de energías de activación ( $E_a$ ) entre 5-7 y 25 kcal/mol se asocian con transportes activos, mientras que  $E_a$  más bajas se relacionan con difusión pasiva o transporte facilitado a través de canales no dependientes de energía. Los valores de  $E_a$  obtenidos para el As(V) (1 kcal/mol) indican la existencia de procesos de difusión pasiva o transporte facilitado, mientras que para MMA(III) y DMA(III) (8 y 10 kcal/mol, respectivamente) indican que el transporte transcelular tiene un componente activo. Los valores obtenidos para el As(III) (6 kcal/mol) no permiten confirmar la participación de un transporte activo en su absorción. No obstante, cabe señalar que los procesos de difusión pasiva también pueden verse afectados por la temperatura (Sugano *et al.*, 2010).

La figura 16 presenta de forma esquemática las distintas vías de absorción de las formas arsenicales hasta ahora comentadas (transcelular, paracelular). Las flechas de color rojo indican la entrada al interior celular y el grosor de las mismas representa una mayor o menor captación celular. Las flechas azules punteadas indican la vía paracelular y el grosor de las mismas indica una mayor o menor absorción.



**Figura 16.** Representación de las vías de absorción intestinal de las distintas formas arsenicales.

En la presente tesis se ha querido profundizar en los procesos relacionados con la absorción intestinal de las formas arsenicales, centrándonos exclusivamente en las formas inorgánicas de arsénico. Como se ha comentado con anterioridad, los resultados obtenidos indican un importante componente paracelular en la absorción intestinal de las formas inorgánicas, sin embargo, parecen coexistir mecanismos transcelulares, especialmente para el As(III). Existen estudios sobre captación celular de arsénico inorgánico que identifican varios transportadores implicados en este proceso. Así, Liu (2010) y Liu *et al.* (2006) demostraron que AQP7, AQP9 y GLUT1 aumentaban la permeabilidad del  $As_2O_3$ , empleando como modelo oocitos de *Xenopus laevis*. Shinkai

*et al.* (2009) y Torres-Ávila *et al.* (2010) describen la participación de la AQP9 en la entrada de arsénico inorgánico a células de hígado de ratón. Lu *et al.* (2006) observaron que células embrionarias de riñón HEK-293 transfectadas con el transportador OATP-C tenían un mayor contenido intracelular de As(III) y As(V). Un estudio reciente de Villa-Bellosta y Sorribas (2010), en el que se utilizan oocitos de *Xenopus laevis*, pone de manifiesto que un transportador tipo II de fosfato inorgánico (NaPiIIb) presenta una alta afinidad por el As(V). Beene *et al.* (2011) demuestran que el transportador de fosfato tipo II en *Danio rerio*, NaPiIIb1, transporta As(V) *in vitro* cuando se expresa en *Xenopus laevis* y que además existe una correlación positiva entre los tejidos que expresan NaPiIIb1 y la acumulación de arsénico en los mismos.

Estos estudios se han llevado a cabo en distintos modelos celulares o tejidos, sin embargo, no existen datos sobre los transportadores implicados en la captación de arsénico a nivel intestinal. Para confirmar la participación de ciertos transportadores en la entrada de arsénico inorgánico en las células y en su absorción intestinal vía transcelular, se ha evaluado el efecto de distintos inhibidores sobre su permeabilidad y captación celular, así como el efecto del silenciamiento de transportadores específicos sobre la captación del As(III) y As(V). Asimismo, se ha determinado el efecto de estas formas arsenicales sobre la expresión de una selección de transportadores presentes en el intestino delgado.

En otros tipos celulares, tal y como se ha comentado anteriormente, el transportador de fosfato sodio dependiente parece participar en la captación celular de As(V) (Huang *et al.*, 1996; Villa-Bellosta y Sorribas, 2008, 2010). En esta tesis se evidencia una reducción en el transporte y permeabilidad del As(V) cuando las concentraciones de fosfato en el medio son elevadas (10 mM). Esta reducción podría deberse a un proceso competitivo, tal y como ha sugerido Villa-Bellosta y Sorribas (2008). Los estudios de interferencia génica realizados muestran una reducción superior al 80% en la retención celular de As(V) tras el silenciamiento génico parcial del NaPiIIb. Por otro lado, los resultados de expresión evidencian una sobreexpresión de los transportadores de fosfato sodio-dependientes tras la exposición 24 horas a As(V), siendo especialmente destacable la inducción de ARNm del NaPiIIb (incremento de 10 veces). Estos

resultados confirman que a nivel intestinal, el transportador de fosfato NaPiIIIb participa en la captación celular y absorción de As(V) y que esta forma arsenical actúa facilitando su propia permeabilidad intestinal, como se deduce de los incrementos en la expresión de ARNm de NaPiIIIb tras exposiciones al tóxico. Adicionalmente, estos cambios de expresión pueden afectar a la absorción del fosfato.

Existen estudios que indican diferentes procesos de regulación de la actividad del co-transportador Na-Pi a nivel intestinal. Estudios realizados en roedores muestran incrementos en la actividad de este transportador cuando los animales se alimentan con dietas bajas en fosfato (Hattenhauer *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2000). Beene *et al.* (2011) sugieren que los niveles de fosfato pueden influir en la toxicidad del As(V) ingerido, apuntando que niveles bajos de fosfato en la dieta pueden favorecer la captación celular de As(V) a través de transportadores de fosfato sodio dependientes. Así, en situaciones de elevada demanda de fosfato, como etapas de crecimiento, gestación y lactancia, podría producirse una mayor absorción de As(V), coincidiendo con períodos de elevada susceptibilidad al tóxico.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la vía de entrada mayoritaria del As(V) a nivel intestinal, según los datos obtenidos en la tesis, es la paracelular, por lo que el paso transcelular de esta forma arsenical puede considerarse mínimo. Asimismo, la reducción de la temperatura, tal y como se ha descrito anteriormente, no afecta a la permeabilidad de este compuesto, a pesar que se ha demostrado la participación del transportador de fosfato dependiente de energía, avalando la escasa participación de la vía transcelular en la absorción. Es importante, sin embargo, considerar la implicación del transportador de fosfato en la entrada a los enterocitos, ya que como se ha comentado en el capítulo 2, el As(V) que se capta por el epitelio intestinal se metaboliza a formas trivalentes y/o tioladas, formas químicas con niveles de toxicidad muy superiores a los observados para las formas pentavalentes, tal y como se pone de manifiesto posteriormente en el capítulo 5.

En el caso del As(III), la inhibición química ha puesto de manifiesto una reducción de la permeabilidad y de la retención celular al utilizar inhibidores de los transportadores SGLT, GLUT, AQP y OATP. Los estudios de interferencia génica se

han centrado en los transportadores que se localizan en el dominio apical de las células intestinales, GLUT5, AQP10 y OATPB (Davidson *et al.*, 1992; Mobasheri *et al.*, 2004; Sai *et al.*, 2006). Los resultados del silenciamiento de estos genes muestran una reducción significativa de la captación de As(III) por la monocapa Caco-2. Estos datos conjugados con los obtenidos en los ensayos de inhibición química sugieren que estos transportadores están implicados en el transporte transcelular de As(III). Teniendo en cuenta que estos transportadores funcionan como transportadores bidireccionales (Bell *et al.*, 1993; Verkman y Mitra, 2000; Mahagita *et al.*, 2007), podrían favorecer tanto la entrada de As(III) al organismo desde el lumen intestinal como los procesos de eliminación celular del tóxico desde el interior celular hacia el lumen. Adicionalmente, se ha constatado que la exposición de las células Caco-2 a As(III) causa una sobreexpresión de *GLUT5*, *AQP10* y *OATPB*, por lo que al igual que ocurre para el As(V), el As(III) facilitaría su propia entrada en el enterocito, afectando además la absorción de otros compuestos que empleen estos transportadores.

Cabe destacar los datos obtenidos en los estudios de expresión diferencial realizados en la presente tesis, que aportan información novedosa sobre el efecto del arsénico inorgánico en la expresión de isoformas de transportadores presentes en el intestino. Así, tras la exposición de las células Caco-2 a As(V) se observa una tendencia al descenso en la expresión de la mayoría de genes evaluados, siendo significativa para *SGLT1*, *OATPB*, *AQP3* y *AQP10*. Este efecto puede ser resultado de complejas respuestas celulares al tóxico. Debido a la gran cantidad de vías de señalización celular que pueden verse afectadas por el arsénico inorgánico (Flora, 2011), serían necesarios más estudios para esclarecer los mecanismos por los que se producen estos procesos de regulación de la transcripción, que finalmente conllevan cambios en la expresión génica de transportadores y posiblemente en los procesos de absorción de determinados compuestos.

Del mismo modo que para el As(V), el As(III) induce cambios en la expresión de las isoformas evaluadas, sin embargo, la tendencia observada es de incrementos en la expresión, al contrario que en la forma pentavalente. Así, la exposición a As(III) induce significativamente la expresión de *GLUT2*, *AQP3* y *AQP4*, transportadores que se

localizan en el lado basolateral del enterocito (Cheeseman, 1993; Koyama *et al.*, 1999) y que en el caso de participar en el transporte de As(III), favorecerían el paso de arsenito del interior del epitelio intestinal a sangre o viceversa, ya que también son transportadores bidireccionales. Sin embargo son necesarias más pruebas para confirmar este hecho.

En el caso de los transportadores que pueden participar en la eliminación de tóxicos del interior celular, el As(III) también afecta significativamente a su expresión. Existen trabajos previos que apuntan a la familia de proteínas transportadoras de membrana ABC (*ATP-binding cassette*) como responsables de la salida de As(III) de las células. En la presente tesis se ha evidenciado un descenso en la expresión de *P-gp* y *MRP2* a distintos tiempos de exposición a As(III), contrariamente a lo reportado para otros cultivos celulares. Así por ejemplo, Liu *et al.* (2001) ponen de manifiesto un incremento en la expresión de los genes codificadores de *MRP1*, *MRP2* y *P-gp* en cultivos celulares de hepatocitos de rata expuestos crónicamente a As(III). También Drobná *et al.* (2010b) sugieren un importante papel del *MRP2* en la salida de arsénico inorgánico en cultivos primarios de hepatocitos humanos, observando una correlación positiva entre los niveles de expresión proteica de este transportador y la salida del metaloide de la célula.

Por otra parte, el tratamiento de la línea celular Caco-2 con As(III) conlleva un incremento en la expresión de *MRP3* a las 24 y 72 horas, y de *BCRP* a las 72 horas. El transportador *MRP3* se ha descrito en otros trabajos como posible transportador de complejos de GSH con formas arsenicales trivalentes desde el hígado a la circulación (Drobná *et al.*, 2010b). En cuanto al *BCRP*, no se ha descrito su posible participación en procesos de eliminación celular de arsénico inorgánico, si bien se han observado cambios en su expresión en células madre expuestas a As(III) (Tokar *et al.*, 2010).

La localización en el intestino de los transportadores de eliminación celular ensayados está polarizada. La expresión de *P-gp*, *MRP2* y *BCRP* es mayor en el ribete en cepillo, donde se produce la absorción de distintos compuestos (Ito *et al.*, 2005). *MRP3*, sin embargo se encuentra localizado en la membrana basolateral (Yokooji *et al.*, 2007). El incremento en la expresión de *MRP3* a las 24 horas inducida por As(III)

facilitaría su entrada a la circulación sistémica, mientras que el descenso en la expresión de los transportadores de salida localizados en la membrana apical (24 horas) dificultaría su eliminación hacia el lumen intestinal, favoreciendo por tanto el proceso absorbivo. Teniendo en cuenta la importancia de los procesos de eliminación en la citotoxicidad de As(III) y la falta de datos bibliográficos, serían necesarios más estudios para confirmar la participación de estos transportadores, especialmente BCRP y la isoforma MRP3, en los procesos de captación o eliminación de As(III) en células intestinales.

Los estudios descritos hasta el momento empleando patrones arsenicales han permitido evaluar los distintos mecanismos implicados en la absorción intestinal, sin embargo, con este tipo de aproximación se obvian las interacciones en este proceso con los componentes exógenos o endógenos presentes en el quimo, como GSH o sales biliares. Estos compuestos pueden producir variaciones importantes tanto en la cantidad y forma del arsénico absorbido como en los procesos implicados en su absorción. Adicionalmente, los alimentos son matrices complejas que aportan compuestos que pueden interaccionar en los procesos de absorción del arsénico. A este respecto, Laparra *et al.* 2005a, 2005b, han observado una mayor captación (retención celular + transporte) del arsénico presente en el extracto obtenido tras la digestión gastrointestinal de muestras de arroz (4-20%), respecto a disoluciones estándar de la misma especie arsenical (<1.6%). En el presente trabajo, la evaluación de las permeabilidades de As(V) y As(III) en presencia de sales biliares, GSH y extracto de te verde (ETV) también pone de manifiesto la importancia de los compuestos luminales en la absorción intestinal de este metaloide.

El GSH es un compuesto que se encuentra en la mayoría de los tejidos animales y vegetales, y por tanto es ingerido con la dieta (Valencia *et al.*, 2001). El intestino delgado y el colón presentan concentraciones de GSH entre 1-10 mM (Martensson *et al.*, 1990), mantenidas por el GSH dietario y el procedente del hígado vía bilis o sangre. Suzuki *et al.* (2001) han demostrado que gran parte del As(III) captado por el hígado tras la administración intravenosa de arsenito se conjuga con GSH, formando As(III)(GS)<sub>3</sub>, forma necesaria para su eliminación por bilis. Otros autores, sin embargo,

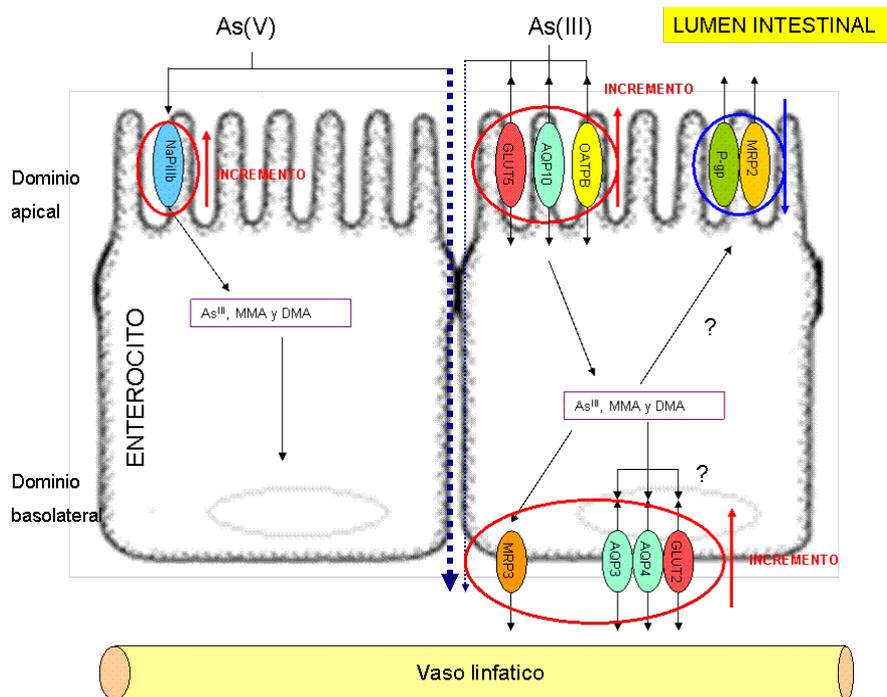
no reportan cambios en el transporte de arsenito en presencia de GSH. Así, Burton *et al.* (1995) muestra que el GSH extracelular no afecta la captación y acumulación de As(III) en células de la corteza renal de conejos.

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que la presencia de GSH extracelular reduce el transporte de As(III) y aumenta el transporte de As(V), igualándose los valores de  $P_{app}$  obtenidos para ambas especies. Esto puede deberse a que en presencia de GSH el As(V) se reduce y conjuga con el tripéptido (Delnomdedieu *et al.*, 1994), de forma que ambas especies inorgánicas se encuentren en la misma forma. En los estudios en dirección apical-basolateral se observa una reducción del contenido intracelular de As(III) en presencia de GSH, bien porque se favorece su salida del interior celular hacia el lumen intestinal o porque se reduce su entrada al interior celular. Sin embargo, para el As(V), el GSH causa un incremento en la retención celular. Es destacable el incremento en el transporte (6 veces) y retención celular (13 veces) del As(V) en presencia de GSH en la dirección basal-apical, indicando que este compuesto es importante para el proceso de salida al lumen intestinal de la forma inorgánica pentavalente, aunque durante este proceso el incremento de retención celular puede aumentar la toxicidad sobre el epitelio intestinal. Debe tenerse en cuenta también la posible participación de co-transportadores acoplados a GSH, tales como MRP u OATP, en el transporte de arsénico inorgánico por las células del epitelio intestinal.

Por lo que respecta a las sales biliares, provocan un incremento en la absorción del arsénico inorgánico. En estudios previos se ha indicado que las sales biliares son capaces de aumentar la permeabilidad intestinal de distintos fármacos debido a que reducen la fluidez y/o interactúan con dominios hidrofílicos de la membrana (Sharma *et al.*, 2005). Este puede ser el motivo por el cual el arsénico inorgánico ve incrementado su transporte, tanto al interior celular como al compartimento basal. La presencia de sales biliares y GSH en el tracto gastrointestinal podría favorecer la absorción del arsénico inorgánico, especialmente del As(V). La inclusión de estos factores en el modelo *in vitro* Caco-2, podría dar lugar a valores de absorción más semejantes a los observados en modelos *in vivo* por otros autores (Gonzalez *et al.*, 1995a, Juhasz *et al.*, 2006).

Adicionalmente a los compuestos que se encuentran habitualmente en el tracto gastrointestinal, distintos alimentos pueden influir en la absorción del arsénico. En el presente trabajo se ha observado que el extracto de té verde provoca un incremento de los valores de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) a tiempos cortos, y consecuentemente una reducción en los valores de  $P_{app}$  del As(V) y del As(III), debido a una disminución del transporte paracelular de esta especie. Sin embargo a tiempos superiores a 120 min el efecto es opuesto (reducción de RET, aumento  $P_{app}$  de arsénico inorgánico). Lu *et al.* (2005) describen el efecto del ETV en la remodelación de la actina en distintos tipos celulares, debido al incremento en la polarización de la actina filamentosa por aumentos en expresión de anexina I. Este efecto no está descrito en la línea celular Caco-2, si bien los resultados obtenidos indican que el té verde podría actuar sobre el citoesqueleto originando los cambios observados en los valores de RET y consecuentemente en la  $P_{app}$  del As(V) y del As(III). Por otro lado, se ha evidenciado la capacidad del ETV de quelar otros metales como el Fe(III) (Ryan y Hynes, 2007), capacidad quelante que también podría afectar al As(III).

El estudio realizado muestra que los mecanismos de absorción de los compuestos arsenicales, especialmente las formas inorgánicas, son complejos e implican posiblemente distintas vías de transporte, así como distintos transportadores, tal y como se refleja en la figura 17.



**Figura 17.** Hipótesis sobre el transporte del arsénico inorgánico a nivel intestinal.



## **CAPÍTULO 4**

---

**Transporte y permeabilidad de formas arsenicales  
pentavalentes y trivalentes empleando cocultivos  
Caco-2/HT29-MTX como modelo celular**



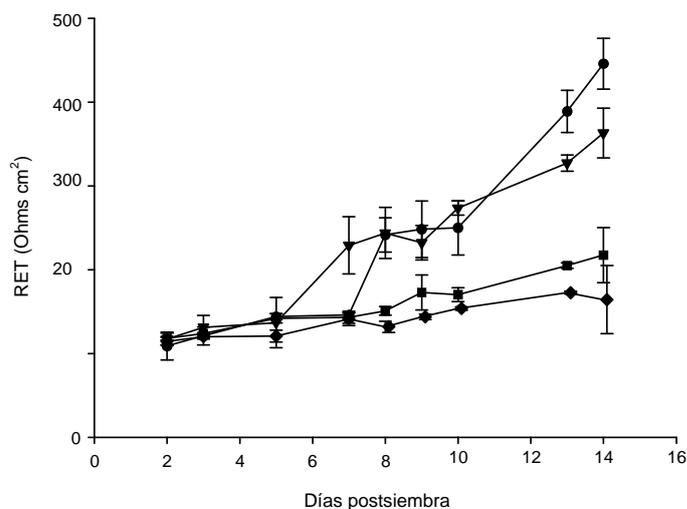
En el presente capítulo se han llevado a cabo estudios de transporte y permeabilidad de arsénico en el modelo Caco-2/HT29-MTX con el fin de evaluar la influencia del modelo celular en la absorción *in vitro* de distintas formas químicas de este metaloide. La incorporación de células HT29-MTX al cultivo de células Caco-2 da lugar a uniones estrechas más laxas, además de producir una capa de mucus que recubre la monocapa celular, factores que pueden influir en la absorción intestinal de las especies arsenicales.

## Resultados

---

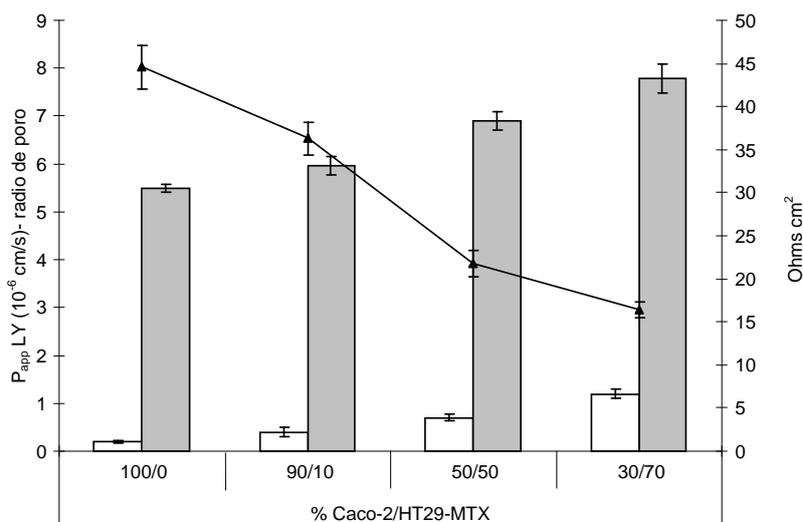
### 4.1. Caracterización del cocultivo Caco-2/HT29-MTX

El incremento en los valores de RET durante el proceso de diferenciación celular permite evaluar el desarrollo de uniones estrechas. La figura 1 muestra la evolución de los valores de RET durante el crecimiento de los distintos cultivos ensayados. En el monocultivo de Caco-2, la RET aumenta progresivamente durante los 14 días postsiembra, alcanzando un valor máximo de  $446 \pm 30$  Ohms  $\text{cm}^2$ . Por lo que respecta a los cocultivos Caco-2/HT29-MTX, el valor de RET se mantiene estable hasta el quinto día postsiembra ( $140 \pm 20$  Ohms  $\text{cm}^2$ ) y a partir de entonces sólo aumenta significativamente en el cocultivo 90/10. Los valores de TEER obtenidos en los cocultivos tras 14 días de siembra ( $164\text{--}363$  Ohms  $\text{cm}^2$ ) son inferiores al hallado en Caco-2, especialmente en las proporciones 50/50 y 30/70.



**Figura 1.** Valores de RET obtenidos durante el periodo de cultivo de las distintas proporciones Caco-2/HT29-MTX ensayadas: 100/0 (●); 90/10 (▼); 50/50 (■) y 30/70 (◆). Resultados expresados en Ohms cm<sup>2</sup> (media ± desviación estándar; n=10).

En las monocapas diferenciadas (14 días postsiembra), el coeficiente de permeabilidad aparente del LY aumenta significativamente con el incremento de la proporción de HT29-MTX en el cocultivo (figura 2). El radio de poro de la unión estrecha estimado oscila entre 5 y 8 Å, y se incrementa al aumentar la proporción de HT29-MTX en el cocultivo (figura 2). Los valores de radio de poro correlacionan negativamente con los valores de RET ( $R^2 = 0.96$ ).



**Figura 2.** Caracterización de los cocultivos Caco-2/HT29-MTX transcurridos 14 días postsiembra. Valores de RET [ $\text{Ohms cm}^2$  (línea negra; eje derecho)], permeabilidad aparente del LY [ $10^{-6} \text{ cm/s}$ ; 120 min; (barra blanca; eje izquierdo)] y radio de poro estimado [ $\text{\AA}$  (barra gris; eje izquierdo)]. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=10$ ).

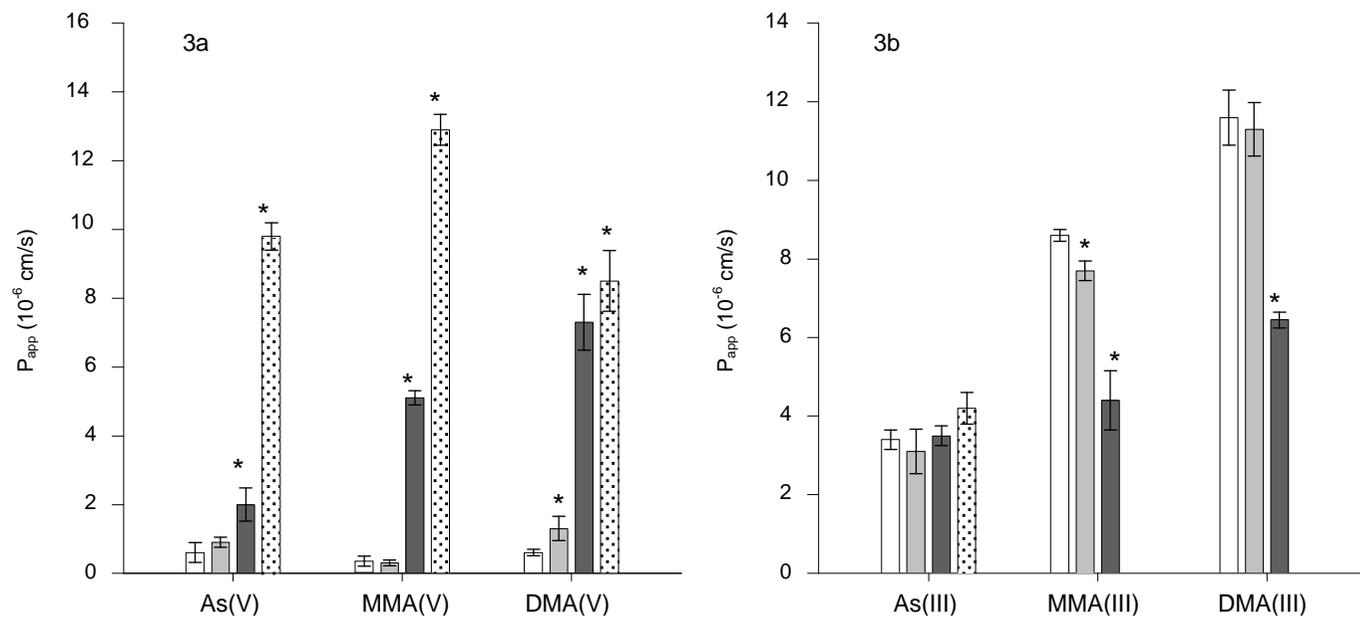
#### 4.2. Coeficiente de permeabilidad aparente de las especies arsenicales

Los distintos cultivos celulares se expusieron durante 120 minutos a especies pentavalentes [ $67 \mu\text{M}$  de  $\text{As(V)}$ ,  $\text{MMA(V)}$  y  $\text{DMA(V)}$ ] y trivalentes [ $67 \mu\text{M}$  de  $\text{As(III)}$ ;  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{MMA(III)}$  y  $\text{DMA(III)}$ ]. Todas las especies arsenicales se testaron en Caco-2 y en las proporciones 90/10, 50/50 y 30/70 de los cocultivos Caco-2/HT29-MTX. Sin embargo, los resultados de los estudios de permeabilidad de  $\text{MMA(III)}$  y  $\text{DMA(III)}$  en la proporción 30/70 no se han tenido en cuenta debido a que los cambios en los valores de RET y  $P_{app}$  del LY superaron los límites establecidos para considerar íntegra la membrana (metodología, apartados 6 y 9).

La figura 3a muestra los valores de  $P_{app}$  obtenidos para las especies pentavalentes, evidenciándose un aumento de la  $P_{app}$  al incrementarse la proporción de células HT29-MTX en el cocultivo. El incremento es significativo a partir de la proporción Caco-2/HT29-MTX 50/50 para  $\text{As(V)}$  y  $\text{MMA(V)}$  y de la proporción 90/10 para  $\text{DMA(V)}$ . El

mayor aumento del valor de  $P_{app}$  se produce para el MMA(V) (30/70 vs. 100/0: incremento de 36 veces). El As(V) y DMA(V) presentan incrementos similares de la  $P_{app}$  [30/70 vs. 100/0: As(V) 16 veces; DMA(V) 14 veces].

El comportamiento para las especies trivalentes (figura 3b) es distinto al de las especies pentavalentes. El As(III), no muestra diferencias significativas entre los valores de  $P_{app}$  obtenidos en las distintas proporciones Caco-2/HT29-MTX (media =  $3 \pm 0.2 \times 10^{-6}$  cm/s). Las especies metiladas trivalentes disminuyen su  $P_{app}$  al incrementarse la proporción de células HT29-MTX en el cocultivo. El  $P_{app}$  para el MMA(III) disminuye de  $8.6 \times 10^{-6}$  cm/s en Caco-2 a  $4.4 \times 10^{-6}$  cm/s en Caco-2/HT29-MTX 50/50, siendo la reducción del mismo orden para el DMA(III) (de  $11.6 \times 10^{-6}$  cm/s a  $6.5 \times 10^{-6}$  cm/s).



**Figura 3.** Coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) para As(V), MMA(V), DMA(V) (figura 3a) y As(III), MMA(III) y DMA(III) (figura 3b) en las diferentes proporciones Caco-2/HT29-MTX ensayadas: 100/0 (barras blancas); 90/10 (barras gris claro); 50/50 (barras gris oscuro) y 30/70 (barras punteadas). Valores expresados en  $10^{-6}$  cm/s (media  $\pm$  desviación estándar de al menos cuatro réplicas de cada especie arsenical). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas respecto al cultivo Caco-2 ( $p < 0.05$ )

### **4.3. Retención celular y transporte de especies arsenicales en el cocultivo Caco-2/HT29-MTX**

En el estudio de transporte y retención celular se utilizaron las concentraciones y tiempos descritos anteriormente para el estudio de la permeabilidad aparente. Los resultados de transporte muestran un comportamiento similar al obtenido para permeabilidad aparente, tal y como se muestra en las tablas 1 (especies pentavalentes) y 2 (especies trivalentes). En las especies pentavalentes, la incorporación de HT29-MTX al cultivo incrementa el transporte al lado basal, alcanzando los porcentajes de transporte más elevados en la proporción 30/70 [As(V) 54%; MMA(V) 47%; DMA(V) 25%]. Para las formas trivalentes, la introducción de HT29-MTX en el cultivo afecta de forma desigual a las especies; no modifica el transporte basal de As(III) y disminuye el transporte de MMA(III) y DMA(III), tal y como se había observado en el estudio de permeabilidad.

La retención celular para las especies pentavalentes es baja ( $\leq 0.5\%$ ), similar en todas ellas y no se modifica con el porcentaje de HT29-MTX en el cultivo. Un comportamiento similar se observa para el As(III), aunque la retención ( $\approx 1.4\%$ ) es ligeramente superior a la de su análogo pentavalente. Para MMA(III) y DMA(III), la retención celular es muy superior a la de especies pentavalentes (27-46% vs  $\leq 0.5\%$ ) y se incrementa al aumentar la proporción de células HT29-MTX en el cultivo.

**Tabla 1.** Retención celular y transporte de As(V), MMA(V) y DMA(V) en distintas proporciones del cultivo Caco-2/HT29-MTX (100/0; 90/10; 50/50 y 30/70). Se indica el contenido de arsénico adicionado a las células y el contenido presente en el medio basal e interior celular a los 120 min de exposición. Se indica también la captación (contenido celular + transporte basal). Valores expresados en ng As/10<sup>6</sup> células (media ± desviación estándar de al menos cuatro réplicas de cada especie arsenical) y en porcentaje (valor entre paréntesis).

Caco-2/HT29-MTX (%)		As(V)			
		100/0	90/10	50/50	30/70
Adición	ng	4250 ± 124	4439 ± 211	4067 ± 39	3971 ± 275
Basal	ng	126 ± 29	164 ± 15	530 ± 50	2140 ± 264
	(%)	(3.0 ± 0.4)	(4.0 ± 0.5)	(13 ± 2)	(54 ± 5)
Celular	ng	13 ± 2	14 ± 3	14 ± 2	15 ± 3
	(%)	(0.3 ± 0.1)	(0.3 ± 0.1)	(0.3 ± 0.1)	(0.4 ± 0.1)
Captación (basal+células)	ng	139 ± 27	171 ± 12	539 ± 12	2191 ± 217
	(%)	(3.0 ± 0.4)	(4 ± 1)	(13 ± 2)	(55 ± 5)

Caco-2/HT29-MTX (%)		MMA(V)			
		100/0	90/10	50/50	30/70
Adición	ng	4719 ± 141	4994 ± 205	4517 ± 27	4821 ± 84
Basal	ng	603 ± 43	750 ± 103	1330 ± 195	2240 ± 8
	(%)	(13 ± 2)	(15 ± 3)	(30 ± 4)	(47 ± 1)
Celular	ng	17±2	15 ± 3	13 ± 2	22 ± 7
	(%)	(0.4 ± 0.1)	(0.3 ± 0.1)	(0.30 ± 0.1)	(0.5 ± 0.1)
Captación (basal+células)	ng	624 ± 51	771 ± 105	1345 ± 15	2281 ± 26
	(%)	(13 ± 3)	(15 ± 3)	(30± 4)	(50 ± 1)

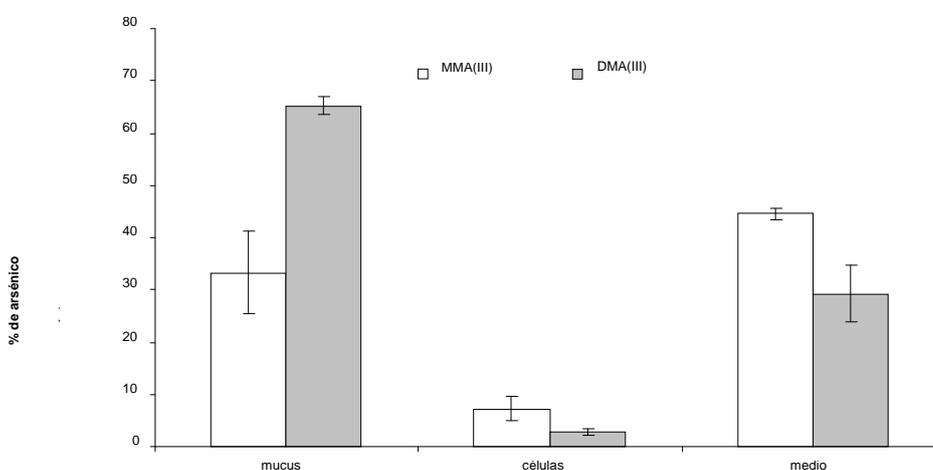
**Tabla 1.** Continuación.

<b>(%) Caco-2/HT29-MTX</b>		<b>DMA(V)</b>			
		<b>100/0</b>	<b>90/10</b>	<b>50/50</b>	<b>30/70</b>
Adición	ng	5015 ± 71	4841 ± 25	4530 ± 119	4212 ± 79
Basal	ng	312 ± 65	856 ± 120	1270 ± 49	1041 ± 107
	(%)	(6 ± 1)	(18 ± 4)	(28 ± 1)	(25 ± 3)
Celular	ng	11 ± 3	10 ± 3	12 ± 2	19 ± 4
	(%)	(0.2 ± 0.03)	(0.2 ± 0.1)	(0.3 ± 0.1)	(0.5 ± 0.1)
Captación (basal+células)	ng	334 ± 71	867 ± 125	1284 ± 51	1057 ± 110
	(%)	(6 ± 1)	(18 ± 4)	(28 ± 1)	(25 ± 4)

**Tabla 2.** Retención celular y transporte de As(III), MMA(III) y DMA(III) en distintas proporciones del cultivo Caco-2/HT29-MTX (100/0; 90/10; 50/50). Se indica el contenido de arsénico adicionado a las células y el contenido presente en el medio basal e interior celular a los 120 min de exposición. Se indica también la captación (contenido celular + transporte basal). Valores expresados en ng As/10<sup>6</sup> células (media ± desviación estándar de al menos cuatro réplicas de cada especie arsenical) y en porcentaje (valor entre paréntesis).

		As(III)			MMA(III)			DMA(III)		
Caco-2/HT29-MTX (%)		100/0	90/10	50/50	100/0	90/10	50/50	100/0	90/10	50/50
Adición	ng	3250 ± 105	3700 ± 91	3550 ± 201	190 ± 11	126 ± 14	141 ± 20	153 ± 17	124 ± 16	142 ± 25
Basal	ng	758 ± 94	701 ± 36	967 ± 56	55 ± 15	24 ± 3	28 ± 2	56 ± 10	38 ± 5	30 ± 6
	(%)	(23 ± 5)	(19 ± 3)	(26 ± 5)	(28 ± 7)	(22 ± 1)	(17 ± 2)	(47 ± 4)	(35 ± 4)	(26 ± 1)
Células	ng	46 ± 3	48 ± 5	46 ± 2	55 ± 1	65 ± 6	47 ± 2	32 ± 7	40 ± 6	50 ± 5
	(%)	(1.4 ± 0.2)	(1.5 ± 0.2)	(1.4 ± 0.1)	(28 ± 1)	(37 ± 1)	(46 ± 4)	(27 ± 5)	(37 ± 3)	(43 ± 4)
Captación (basal+células)	ng	804 ± 95	749 ± 27	1013 ± 60	110 ± 15	89 ± 9	75 ± 4	88 ± 12	78 ± 9	80 ± 10
	(%)	(24 ± 5)	(21 ± 4)	(28 ± 6)	(56 ± 8)	(59 ± 6)	(64 ± 3)	(74 ± 4)	(73 ± 4)	(70 ± 5)

La mayor retención de las especies metiladas trivalentes puede ser debida al mucus secretado por las células HT29-MTX, cuyo efecto en la retención de arsénico inorgánico ya ha sido evidenciado en el capítulo 2. Con objeto de evaluar la influencia de esta capa glicoprotéica en la acumulación intracelular de las especies metiladas trivalentes, se han expuesto células HT29-MTX a MMA(III) y DMA(III) ( $1 \mu\text{M}$ ) durante 2 horas. La figura 4 muestra los porcentajes de arsénico en el mucus, interior celular y medio. En ambas especies, el porcentaje de arsénico en el mucus [MMA(III):  $33 \pm 8\%$ ; DMA(III):  $65 \pm 2\%$ ] es superior al hallado en el interior celular [MMA(III):  $7 \pm 2\%$ ; DMA(III):  $2.9 \pm 0.6\%$ ].



**Figura 4.** Porcentaje de arsénico en mucus, células y medio tras la exposición de células HT29-MTX a  $1 \mu\text{M}$  de MMA(III) (barra blanca) y DMA(III) (barra gris) durante 2 horas. El porcentaje de arsénico se evalúa respecto a la cantidad adicionada a las células al inicio del tratamiento. Los valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3-6$ ).

#### 4.4. Retención y transporte de arsénico desde alimentos empleando como modelo el cocultivo Caco-2/HT29-MTX

Tras el estudio con patrones de especies arsenicales, se procedió a evaluar el efecto de la incorporación de HT29-MTX en el cultivo sobre el transporte y retención celular de la fracción bioaccesible obtenida tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de muestras de alimentos: arroz y alga crudos; ajo cocinado en un patrón acuoso de As(V) (1 mg/mL).

El análisis de arsénico total y especies arsenicales en la fracción bioaccesible, evidencia que en las muestras de arroz y de ajo la totalidad del arsénico solubilizado se encuentra como arsénico inorgánico. En el alga, sin embargo, no se detecta arsénico inorgánico ni MMA, y el DMA sólo representa un 1% del arsénico total (16 ng), por lo que el resto arsénico podrían atribuirse a especies que no generan hidruros en las condiciones de análisis utilizadas, muy probablemente arsenoazúcares (Francesconi y Kuehnelt, 2004).

Los resultados obtenidos para el transporte y retención de arsénico en el cocultivo desde las fracciones bioaccesibles de distintos alimentos se presentan en la tabla 3. En las dos muestras de arroz ensayadas la cantidad de arsénico adicionada al cultivo celular es muy similar ( $\approx 50$  ng). Al utilizar el cocultivo Caco-2/HT29-MTX en la proporción 50/50 se incrementa notablemente el transporte al lado basal ( $\approx 27\%$ ), respecto al hallado en la proporción 90/10 ( $\approx 12\%$ ) y en Caco-2 ( $\approx 13\%$ ). La retención celular es muy superior en los cocultivos, independientemente de la proporción de HT29-MTX que contengan (Caco-2  $\approx 13\%$ ; cocultivos 22-34%).

Para las muestras de alga y ajo, la cantidad de arsénico adicionada al cultivo es en torno a 20 veces superior a la adicionada al arroz (1187 ng y 890 ng respectivamente). En ambas muestras, la introducción de HT29-MTX en el cocultivo incrementa notablemente el transporte basal de arsénico, siendo especialmente elevado en el ajo para la proporción 50/50 ( $33 \pm 2\%$ ;  $293 \pm 17$  ng/mg proteína). La retención celular en ambas muestras ( $< 2\%$ ) es muy inferior a la hallada para el arroz, y no se ve afectada de forma destacable por la presencia de células HT29-MTX.

Considerando todas las muestras ensayadas, el porcentaje de transporte en Caco-2 y en cocultivo muestra la misma gradación: ajo  $\approx$  arroz  $>$  alga. La gradación en la retención celular (arroz  $\gg$  ajo  $\approx$  alga) tampoco varía entre los distintos cultivos celulares.

**Tabla 3.** Retención celular y transporte en distintas proporciones Caco-2/HT29-MTX (100/0; 90/10; 50/50) del arsénico existente en la fracción bioaccesible de alimentos. Se indica el contenido de arsénico adicionado a las células y el contenido presente en el medio basal e interior celular tras 120 minutos de exposición. Valores expresados en ng As/10<sup>6</sup> células (media ± desviación estándar de al menos cuatro réplicas de cada especie arsenical) y en porcentaje (valor entre paréntesis).

	(% Caco-2/HT29-MTX)		100/0		90/10		50/50	
	Adición (ng As)		Transporte basal	Retención celular	Transporte basal	Retención celular	Transporte basal	Retención celular
<i>Oriza sativa</i> (muestra 1)	53 ± 6	ng	7.0 ± 0.2	4.0 ± 0.3	8 ± 2	10 ± 1	15 ± 2	12 ± 2
		(%)	(14 ± 2)	(7 ± 0.5)	(15 ± 4)	(28 ± 2)	(27 ± 1)	(22 ± 1)
<i>Oriza sativa</i> (muestra 2)	49 ± 4	ng	6 ± 1	5 ± 0.4	6.0 ± 0.3	9.0 ± 0.4	14 ± 3	11 ± 3
		(%)	(13 ± 2)	(9 ± 1)	(12.0 ± 0.5)	(34 ± 2)	(29 ± 2)	(22 ± 4)
<i>Hizikia fusiforme</i>	1187 ± 71	ng	12 ± 2	7 ± 1	67 ± 4	14 ± 2	129 ± 13	21 ± 4
		(%)	(1.0 ± 0.1)	(0.6 ± 0.1)	(6.0 ± 0.3)	(1.0 ± 0.2)	(11 ± 1)	(2 ± 0.3)
<i>Allium sativa</i> cocinado con As(V)	890 ± 57	ng	97 ± 3	8 ± 1	217 ± 30	13 ± 1	293 ± 17	14 ± 1
		(%)	(11.0 ± 0.4)	(2.0 ± 0.1)	(24 ± 3)	(1.0 ± 0.1)	(33 ± 2)	(2 ± 0.2)



---

## Discusión

---

Los estudios sobre los mecanismos de transporte en células Caco-2 diferenciadas llevados a cabo en el capítulo 3 de esta tesis ponen de manifiesto el importante papel de la vía paracelular en el transporte de la mayoría de las especies arsenicales evaluadas. Por lo tanto, el empleo de células Caco-2 diferenciadas como modelo de epitelio intestinal puede no ser el más adecuado para evaluar su transporte intestinal, dado que este tipo celular forma uniones estrechas menos permeables que las presente en el intestino delgado humano. Esta limitación del modelo celular Caco-2 ha sido descrita previamente para sustancias con una importante participación de la vía paracelular en su transporte (Tavelin *et al.*, 2003, Hilgendorf *et al.*, 2000; Nagahara *et al.*, 2004). El empleo de modelos que combinan células Caco-2 y HT29-MTX incluyen los dos tipos celulares más abundante en el epitelio intestinal (células absortivas y células caliciformes) y emulan mejor las condiciones fisiológicas (Hilgendorf *et al.*, 2000) ya que la presencia HT29-MTX modula la geometría y tamaño de las uniones intercelulares, y crea una capa de mucus que cubre la superficie celular. Este modelo de epitelio intestinal ha sido ampliamente utilizado en la bibliografía para múltiples propósitos (Wikman-Lared y Artursson, 1995; Mahler *et al.*, 2009; Laparra y Sanz, 2009), si bien no existen antecedentes sobre el estudio de la absorción intestinal de las especies arsenicales en estos cocultivos. En el presente capítulo de tesis se evalúan las modificaciones de la permeabilidad aparente, transporte y retención celular de especies arsenicales pentavalentes y trivalentes como consecuencia de la introducción de células HT29-MTX en el cultivo.

La caracterización del cocultivo Caco-2/HT29-MTX ha puesto de manifiesto que la incorporación de HT29-MTX produce un descenso significativo en el valor de la RTE y un aumento en la  $P_{app}$  del LY respecto al monocultivo de Caco-2. La existencia de cambios en ambos parámetros ya ha sido puesta de manifiesto en trabajos previos que utilizan células secretoras de mucus junto a células Caco-2 (Karlsson *et al.*, 1993; Wikman-Larhed y Artursson, 1995; Hilgendorf *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2010). Estos

cambios pueden deberse a un aumento en el tamaño medio del radio de poro de las uniones estrechas por la presencia de HT29-MTX, tal y como ponen de manifiesto otros autores (Cohen *et al.*, 1985). El incremento del radio de poro también se ha evidenciado en esta tesis, siendo mayor en los cocultivos, 6-8 Å (figura 2), y más próximo a los valores fisiológicos del intestino delgado, 6.7-7.9 Å (Fordtran, 1965; Soergel, 1968) que los obtenidos con el monocultivo Caco-2 (5 Å).

Por otra parte, trabajos más recientes indican que en los cocultivos Caco-2/HT29-MTX la mayor permeabilidad de los compuestos que se transportan por vía paracelular puede deberse también a un mayor número de poros entre células por  $\text{cm}^2$  que los existentes en monocultivos de Caco-2 (Linnankoski *et al.*, 2010). Wikman-Lared y Artursson (1995) observaron que si bien se siembra una proporción concreta de cada uno de los dos tipos celulares Caco-2 y HT29-H, durante los primeros días de cultivo se produce un mayor crecimiento de las células HT29-H, por lo que al alcanzar el estadio de diferenciación celular existe una elevada proporción de células HT29-H en el cocultivo. Ello supondría un mayor número de poros por  $\text{cm}^2$  y un mayor transporte paracelular. Es posible que este fenómeno se haya producido en los cocultivos Caco-2/HT29-MTX utilizados en este trabajo y que el incremento en la  $P_{\text{app}}$  del LY se deba tanto a un mayor número de poros por  $\text{cm}^2$ , como a uniones estrechas más laxas entre los dos tipos celulares.

La apertura de las uniones estrechas y/o incremento en la porosidad observado en el cocultivo afecta al transporte y a la  $P_{\text{app}}$  de las especies arsenicales pentavalentes, que aumentan significativamente con la proporción de HT29-MTX en el cocultivo. Este hecho corrobora la importante participación de la vía paracelular en el transporte de estas formas arsenicales observada en el capítulo 3. El comportamiento de las especies trivalentes difiere del observado para los análogos pentavalentes. Así, la  $P_{\text{app}}$ , transporte y retención celular del As(III) no se modifica con la incorporación de HT29-MTX al cultivo, mientras que las especies metiladas trivalentes disminuyen su  $P_{\text{app}}$  y por tanto su paso al lado basolateral. Estos resultados apuntarían a una escasa participación de la vía paracelular en su transporte, si bien estudios previos realizados en el capítulo 3

evidencian incrementos significativos en la  $P_{app}$  de As(III) y MMA(III) tras la apertura de las uniones estrechas.

El mucus secretado por HT29-MTX constituye una barrera a la difusión de nutrientes, drogas, iones, toxinas, metales pesados y macromoléculas (Forstner *et al.*, 1994). Estructuralmente, las mucinas consisten en un núcleo proteico conjugado con múltiples cadenas de carbohidratos. MUC2 y MUC5AC, presentes en el tracto gastrointestinal contienen residuos de cisteína y participan en la formación de geles extracelulares (Gum *et al.*, 1992; Lau *et al.*, 2004). Los estudios realizados en células HT29-MTX para evaluar el efecto del mucus sobre la retención de especies trivalentes metiladas y As(III) indican que son altamente retenidas por el mucus [DMA(III)  $\gg$  MMA(III)  $\gg$  As(III)] y que esta retención es muy superior a su entrada al interior celular. Esta retención posiblemente se produce por interacción con residuos de cisteína libres existentes en la mucina, dado que se ha descrito una importante unión de las especies arsenicales trivalentes a los residuos tiolados de proteínas y péptidos (Styblo y Thomas, 1997).

Esta retención por el mucus podría ser la causa de la disminución del  $P_{app}$  del DMA(III) y MMA(III). Como se ha indicado en el capítulo 3, para el DMA(III) el transporte paracelular sería mínimo, mientras que para el As(III) y MMA(III) sí se ha puesto de manifiesto su significación. En cuanto a la forma monometilada, su transporte paracelular, que debería estar incrementado en los cocultivos Caco-2/HT29-MTX, se vería contrarrestado por la retención de esta especie en el mucus. Respecto al As(III), sería necesario realizar estudios adicionales con objeto de dilucidar las razones por las que su  $P_{app}$  no se modifica con la incorporación de HT29-MTX.

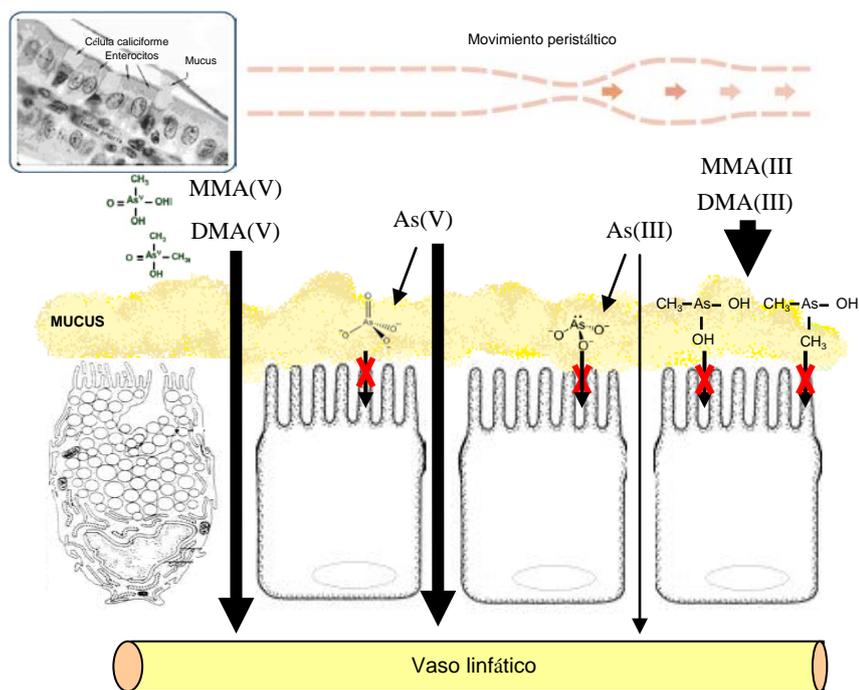
La retención por el mucus de las especies trivalentes podría ser considerada como beneficiosa al suponer un efecto barrera a la entrada a la circulación sanguínea de estas especies, altamente reactivas y tóxicas. No obstante debería evaluarse si estas especies podrían afectar a la producción de mucus, lo cual daría lugar a disfunciones en la barrera intestinal, o podrían producir otros efectos tóxicos sobre las propias células intestinales.

La significación de los cambios en la  $P_{app}$  que introduce el uso de cocultivo ha sido evaluada utilizando el criterio de Yee (1997), ya descrito para los ensayos con el monocultivo Caco-2 [ $P_{app} < 10^{-6}$  cm/s: baja absorción *in vivo* (<30%);  $P_{app}$  entre  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  cm/s: moderada absorción (30-70%);  $P_{app} > 10^{-5}$  cm/s: absorción completa (>70%)]. Las especies pentavalentes pasan de ser compuestos poco absorbibles a compuestos con una absorción moderada con la proporción Caco-2/HT29-MTX 50/50. De las especies trivalentes, solo el DMA(III) cambia su clasificación, pasando de ser altamente absorbible en el modelo Caco-2 y en el cocultivo 90/10, a ser moderadamente absorbible en el cocultivo 50/50. Los valores de  $P_{app}$  de las formas pentavalentes obtenidos con el modelo Caco-2/HT29-MTX suponen una mejor aproximación a los datos *in vivo* (Juhasz *et al.*, 2006, 2008) que los hallados en el monocultivo Caco-2. Las diferencias que persisten entre el modelo *in vitro* y la situación *in vivo* son posiblemente al efecto de factores que no se contemplan en este modelo de cocultivo (superficie de absorción, movimientos peristálticos, regulación neuroendocrina, presencia de componentes del quimo como sales biliares o GSH).

Los estudios en patrones acuosos comentados hasta ahora evidencian que el transporte varía con el modelo de cultivo empleado y que esta variación es distinta según la forma arsenical considerada. Estos cambios podrían ocurrir igualmente en la absorción de arsénico desde los alimentos. Para estudiar este aspecto se ha evaluado el transporte y retención celular del arsénico presente en la fracción solubilizada tras la digestión gastrointestinal de distintos alimentos: arroz, alga y ajo. Los datos obtenidos muestran un aumento del transporte de arsénico con la incorporación de HT29-MTX al cultivo Caco-2, para las tres fracciones bioaccesibles. La retención celular sólo se modifica en las muestras de arroz, que experimentan aumentos muy acentuados en presencia de HT29-MTX. La magnitud de la respuesta al cambio del modelo celular no es igual para todas las matrices, hecho que puede estar relacionado con las especies arsenicales existentes en cada una de las fracciones bioaccesibles (arsénico inorgánico para arroz y ajo; arsenoazúcares y DMA para el alga), la concentración de arsénico en la fracción bioaccesible ( $\approx 50$  ng para arroz;  $\approx 1000$  ng para alga y ajo) y con el efecto de otros constituyentes de la matriz. En este sentido, estudios *in vivo* realizados por Juhasz

*et al.* (2006) en cerdos alimentados con arroz evidenciaron que la biodisponibilidad es muy distinta si las muestras contienen mayoritariamente DMA o As(V) (33% vs 100%). Por lo que respecta al efecto de los concomitantes, los mismos autores postulan que la presencia de polisacáridos no digestibles puede reducir la absorción de arsénico inorgánico, haciendo que la biodisponibilidad de acelgas y lechuga ( $\approx 50\%$ ) sea inferior a la obtenida en arroz, rábano, soja y judías (77-100%) (Juhasz *et al.*, 2008). Se requiere el estudio de un mayor número de muestras para establecer los posibles efectos de la matriz alimentaria, así como evaluar transportes con los mismos contenidos de arsénico adicionados al cultivo. El presente estudio pone de manifiesto la importancia del modelo celular, de la matriz alimentaria y de la especiación en los estudios sobre la absorción de arsénico.

La investigación realizada evidencia que la presencia de mucus y la apertura de las uniones intercelulares aportada por las HT29-MTX al cocultivo con Caco-2 tiene un marcado efecto en la absorción intestinal *in vitro* de especies arsenicales. Teniendo en cuenta la elevada exposición a arsénico inorgánico a través del agua de bebida y de los alimentos que presentan muchas poblaciones rurales de Asia y Latinoamérica, la ampliación del conocimiento sobre su absorción intestinal y el establecimiento de modelos que permitan realizar estos estudios debería ser objeto de mayor investigación.



**Figura 5.** Representación esquemática del efecto del mucus y la apertura de uniones estrechas en el cocultivo de Caco-2 y HT29-MTX sobre la absorción intestinal de distintas especies arsenicales.

## **CAPÍTULO 5**

---

**Efectos tóxicos de especies arsenicales sobre un  
modelo de epitelio intestinal**



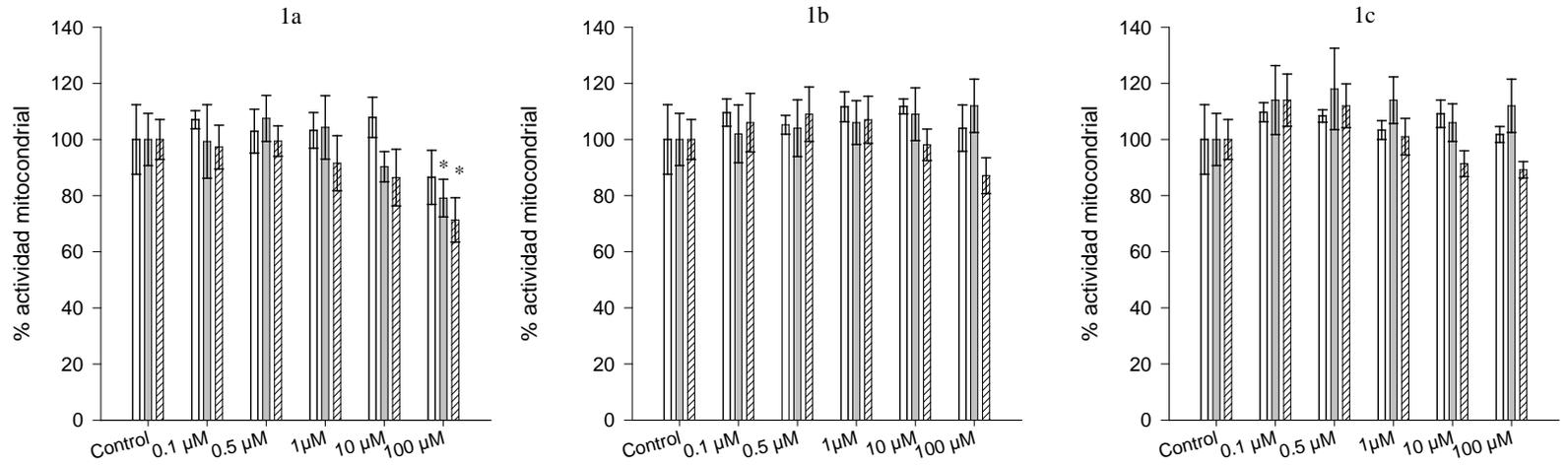
En el presente capítulo se ha evaluado la toxicidad de las formas arsenicales inorgánicas, mono y dimetiladas [As(V), As(III), MMA(V), MMA(III), DMA(V) y DMA(III)] sobre el modelo de epitelio intestinal formado células Caco-2 diferenciadas. Existen muchos estudios que evalúan la toxicidad del arsénico en otros tipos celulares, si bien los datos existentes a nivel intestinal son escasos y se centran únicamente en la toxicidad de As(III) (Davis *et al.*, 2000, Laparra *et al.*, 2006, 2008, Nakagawa *et al.*, 2002).

## Resultados

---

### 5.1. Actividad mitocondrial de células Caco-2 expuestas a especies arsenicales pentavalentes y trivalentes

Las células diferenciadas se expusieron durante 24, 48 y 72 horas a 0.1, 0.5, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  de cada una de las especies arsenicales pentavalentes. Los resultados obtenidos muestran que el MMA(V) y el DMA(V) no afectan a la actividad mitocondrial en ninguna de las concentraciones y tiempos ensayados (figura 1b y 1c). El As(V) produce sin embargo, una reducción de la actividad mitocondrial únicamente tras la exposición a la concentración más elevada (100  $\mu\text{M}$ ), que alcanza el  $71 \pm 6\%$  a las 72 horas de tratamiento (figura 1a).

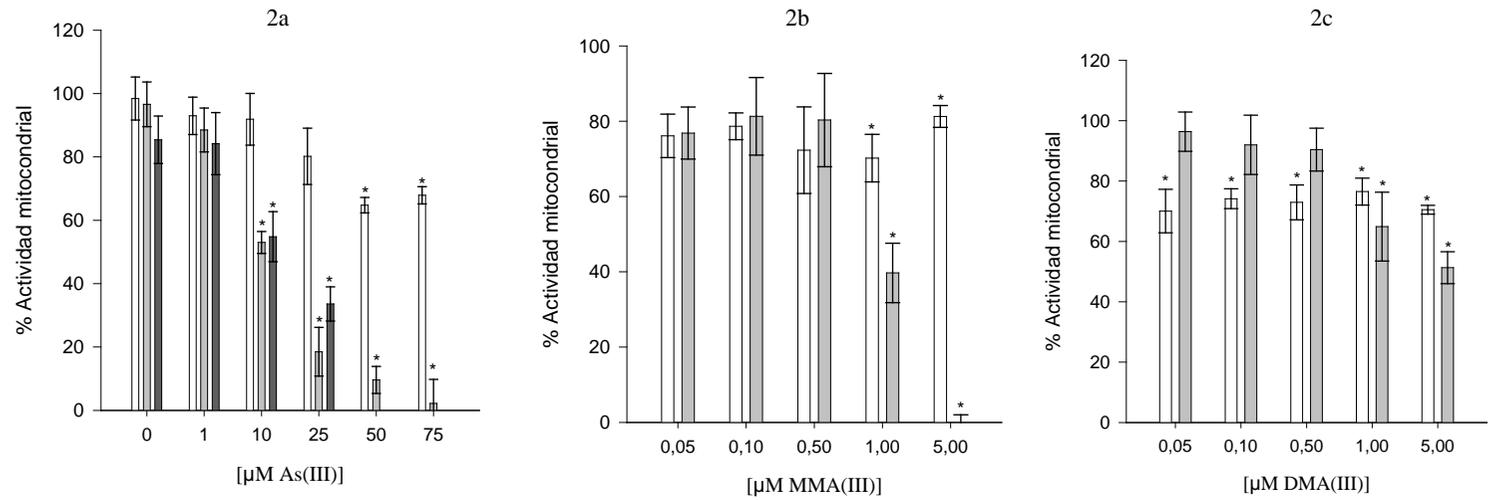


**Figura 1.** Porcentaje de actividad mitocondrial respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(V) (1a), MMA(V) (1b) y DMA(V) (1c) durante 24 (barra blanca), 48 (barra gris) y 72 horas (barra rayada). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n = 8-12). Las variaciones significativas respecto al control se marcan con un asterisco (p<0.05).

Las células también se expusieron a As(III) (1, 10, 25, 50 y 75  $\mu\text{M}$ ) durante 24, 48 y 72 horas y a MMA(III) y DMA(III) (0.05, 0.1, 0.5, 1 y 5  $\mu\text{M}$ ) durante 2 y 24 horas. Los resultados obtenidos (figura 2) indican que las formas trivalentes presentan mayor toxicidad, reduciendo la actividad mitocondrial a concentraciones de exposición inferiores a las de As(V). Así, la exposición a 10  $\mu\text{M}$  de As(III) (figura 2a) produce un descenso de la actividad mitocondrial del  $53 \pm 3\%$  y  $55 \pm 8\%$  a las 48 y 72 horas de tratamiento, respectivamente. A concentraciones más altas, 50 y 75  $\mu\text{M}$  de As(III), se producen reducciones moderadas de la actividad mitocondrial tras 24 horas de exposición ( $65 \pm 2\%$  y  $68 \pm 3\%$  respectivamente) y reducciones totales a 48 y 72 horas.

En cuanto al MMA(III) (Figura 2b), sólo la concentración de 1  $\mu\text{M}$  produce cambios significativos en la actividad mitocondrial tras 2 horas de exposición. Cuando el tratamiento con MMA(III) se prolonga hasta las 24 horas existen descensos significativos de la actividad para las concentraciones iguales o superiores a 1  $\mu\text{M}$  (reducción: 1  $\mu\text{M}$  =  $60 \pm 8\%$ , 5  $\mu\text{M}$  =  $100 \pm 3\%$ ).

El DMA(III) (figura 2c), a concentraciones iguales o inferiores a 0.5  $\mu\text{M}$  se produce mayor descenso de la actividad mitocondrial a 2 horas que a 24 horas de exposición, siendo estadísticamente significativos respecto al control los cambios a las 2 horas. A concentraciones superiores, 1 y 5  $\mu\text{M}$ , la mayor reducción de la actividad se pone de manifiesto a las 24 horas (reducción: 1  $\mu\text{M}$  =  $35 \pm 7\%$ , 5  $\mu\text{M}$  =  $49 \pm 5\%$ ).



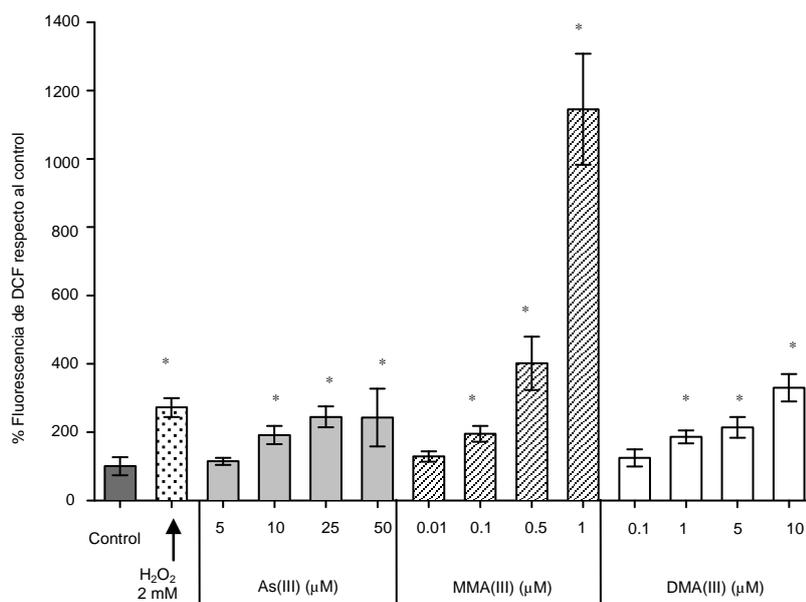
**Figura 2.** Porcentaje de actividad mitocondrial respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III) (figura 2a) durante 24 (barra blanca), 48 (barra gris) y 72 horas (barra rayas oblicuas); MMA(III) (figura 2b) y DMA(III) (figura 2c) durante 2 (barra punteada) y 24 horas (barra rayas horizontales). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n = 8-12). Las variaciones significativas respecto al control se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

## 5.2. Generación de especies reactivas de oxígeno de células Caco-2 expuestas a especies arsenicales pentavalentes y trivalentes

Para la cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se ha empleado 2',7'-dicloro fluoresceína diacetato (DCFDA). Esta molécula es deacetilada por esterasas a diclorofluoresceína (DCFH), compuesto no fluorescente que se transforma a DCF, altamente fluorescente, tras reaccionar con las ROS intracelulares.

La evaluación del efecto del arsénico sobre la generación de ROS en células Caco-2 se llevó a cabo tras exposición durante 24 horas a especies pentavalentes [0.1, 0.5, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  de As(V), MMA(V) y DMA(V)] y trivalentes [5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  de As(III); 0.01, 0.1, 0.5 y 1  $\mu\text{M}$  de MMA(III); 0.1, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de DMA(III)].

Los resultados obtenidos muestran que para las formas arsenicales pentavalentes, sólo la concentración más elevada de As(V) (100  $\mu\text{M}$ ) produce un aumento significativo de la fluorescencia de DCF ( $149 \pm 19\%$ ) respecto al control. Por el contrario, los resultados obtenidos tras los tratamientos con las formas trivalentes son diferentes (figura 3). Existe un incremento estadísticamente significativo en la fluorescencia de DCF a concentraciones  $\geq 10 \mu\text{M}$  de As(III),  $\geq 0.1 \mu\text{M}$  de MMA(III) y  $\geq 1 \mu\text{M}$  de DMA(III) y. Estos resultados indican que el MMA(III) es la especie arsenical que incrementa de forma más notoria la generación de ROS respecto al control. Cabe destacar que las concentraciones más elevadas de MMA(III) producen aumentos de la fluorescencia de DCF respecto al control (0.5  $\mu\text{M}$ :  $401 \pm 57\%$ ; 1  $\mu\text{M}$ :  $1145 \pm 162\%$ ) muy superiores a los observados para el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM ( $272 \pm 28\%$ ).

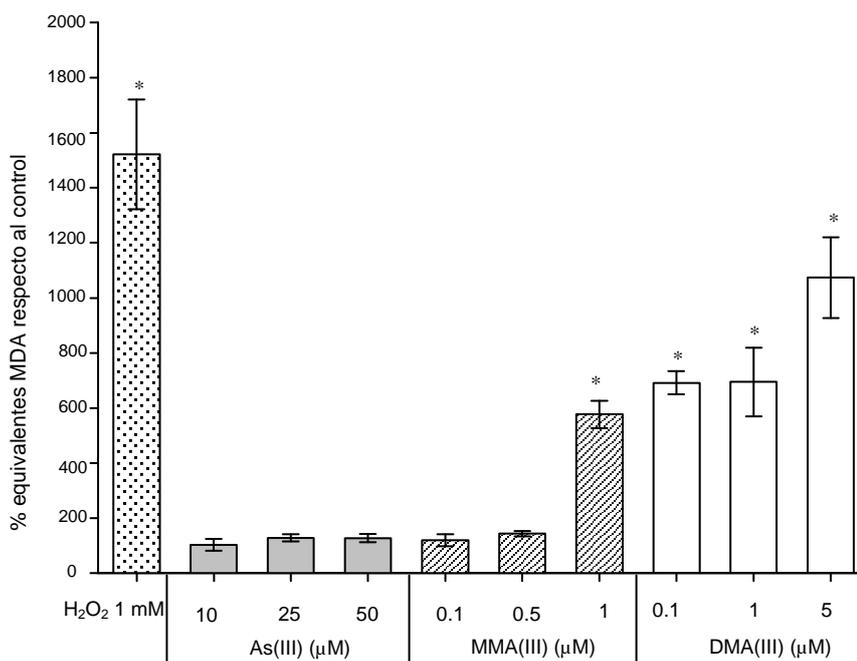


**Figura 3.** Porcentaje de fluorescencia de DCF respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n = 8-12). Las variaciones significativas respecto al control se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

### 5.3. Peroxidación lipídica de células Caco-2 expuestas a especies arsenicales trivalentes

El malondialdehído (MDA) es una de las muchas moléculas de bajo peso molecular formadas tras el proceso de peroxidación lipídica ocasionado por el estrés oxidativo. Los equivalentes de MDA se han evaluado tras su reacción de adición nucleofílica con el ácido 2-tiobarbitúrico en células Caco-2 tratadas durante 24 horas con distintas concentraciones de especies arsenicales trivalentes [10, 25 y 50  $\mu$ M de As(III); 0.1, 0.5 y 1  $\mu$ M de MMA(III); 0.1, 1 y 5  $\mu$ M de DMA(III)]. La figura 4 muestra el incremento en los equivalentes de MDA en células tratadas respecto al control, expresado en porcentaje. El valor de equivalentes de MDA en las células control es de  $134 \pm 12$  pmol/mg proteína.

El As(III) es la forma arsenical que menos efecto tiene sobre la peroxidación lipídica, con incrementos que no difieren significativamente respecto al control para ninguna de las concentraciones estudiadas. El DMA(III) produce el mayor porcentaje de equivalentes de MDA respecto al control en todas las concentraciones ensayadas (692-1074%). El MMA(III), también induce un incremento muy marcado a la concentración más elevada (1  $\mu$ M, 577  $\pm$  50%).



**Figura 4.** Porcentaje de equivalentes de MDA respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n = 6). Las variaciones significativas respecto al control se marcan con un asterisco (p<0.05).

#### **5.4. Determinación de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en células Caco-2 expuestas a especies arsenicales pentavalentes y trivalentes**

Los niveles de GSH y GSSG en células Caco-2 expuestas durante 24 horas a As(V) (0.1, 0.5, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ), presentan solamente una reducción significativa tras el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  [control:  $72 \pm 9$  nmol GSH/mg proteína y  $1 \pm 0.3$  nmol GSSG/mg proteína; As(V):  $41 \pm 6$  nmol GSH/mg proteína y  $0.3 \pm 0.1$  nmol GSSG/mg proteína]. A concentraciones inferiores sin embargo, los niveles de GSH y GSSG se ven significativamente aumentados respecto al control (GSH: 124-153%; GSSG: 135-169%). Ninguno de los tratamiento con As(V) modifica el ratio GSSG/GSH. El MMA(V) y DMA(V) aumentan los niveles de GSH (128-177%) y GSSG (134-215%) a todas las concentraciones estudiadas (0.1, 0.5, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, para estas especies el ratio GSSG/GSH se ve significativamente aumentado (0.03-0.05) respecto al control (0.015).

La tabla 1 muestra los contenidos intracelulares de GSH y GSSG (nmol/mg proteína) y el ratio GSSG/GSH en células Caco-2 tratadas durante 24 horas con especies trivalentes: As(III) [5, 10, 25 y 50 y 75  $\mu\text{M}$ ], MMA(III) y DMA(III) [0.1, 0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ]. Las muestras no tratadas presentan valores medios de  $72 \pm 9$  nmol GSH/mg proteína. Los tratamientos con las formas trivalentes conllevan, en general, una disminución significativa de los contenidos intracelulares de GSH. Esta disminución ya se pone de manifiesto desde la concentración más baja de As(III) (5  $\mu\text{M}$ ), y a partir de 0.5  $\mu\text{M}$  para MMA(III) y 1  $\mu\text{M}$  para DMA(III). El descenso de la concentración de GSH no va acompañada de un aumento de la forma oxidada (GSSG) para los tratamientos con MMA(III) y DMA(III); todo lo contrario, las disminuciones de GSSG son similares a las observadas para el GSH y por tanto no hay cambios en el ratio GSSG/GSH. Para el As(III) sin embargo, sí hay aumentos significativos del ratio GSSG/GSH (0.046-0.062) respecto al control no tratado (0.015), que son independientes de la concentración de As(III) utilizada.

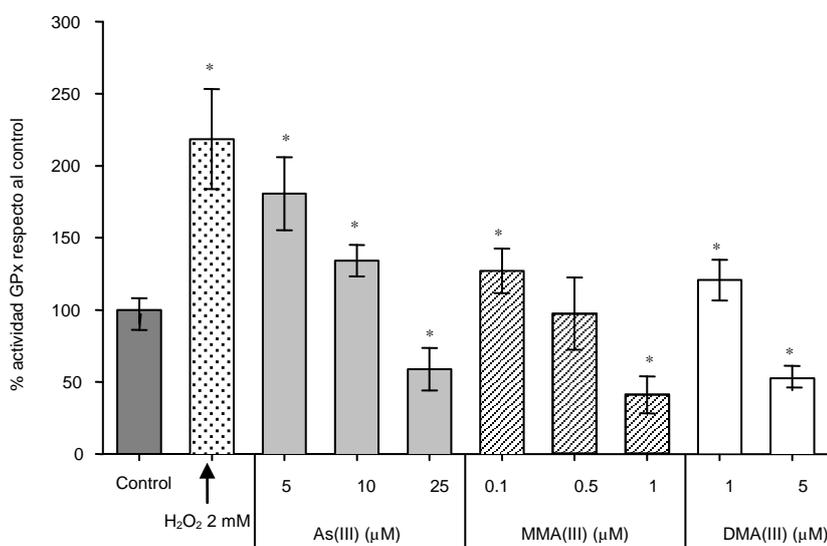
**Tabla 1.** Contenidos de GSH y GSSG (nmol/mg proteína) y ratio GSSG/GSH en células Caco-2 tratadas con As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n = 8). Las variaciones significativas respecto al control se marcan con un asterisco (p<0.05).

Tratamiento		GSH	GSSG	ratio GSSG/GSH
Control		70.3 $\pm$ 9.4	0.95 $\pm$ 0.26	0.014
As(III)	5 $\mu$ M	54.6 $\pm$ 7.7*	2.83 $\pm$ 0.28*	0.052*
	10 $\mu$ M	55.2 $\pm$ 2.7*	3.07 $\pm$ 0.52*	0.056*
	25 $\mu$ M	48.9 $\pm$ 2.7*	3.01 $\pm$ 0.21*	0.062*
	50 $\mu$ M	38.2 $\pm$ 1.3*	2.15 $\pm$ 0.14*	0.056*
	75 $\mu$ M	27.4 $\pm$ 1.6*	1.26 $\pm$ 0.12	0.046*
MMA(III)	0.1 $\mu$ M	80.2 $\pm$ 8.8	1.02 $\pm$ 0.13	0.013
	0.5 $\mu$ M	25.8 $\pm$ 3.2*	0.25 $\pm$ 0.02*	0.010
	1 $\mu$ M	24.8 $\pm$ 1.8*	0.24 $\pm$ 0.04*	0.010
	5 $\mu$ M	35.0 $\pm$ 5.4*	0.39 $\pm$ 0.09*	0.011
	10 $\mu$ M	35.6 $\pm$ 6.5*	0.38 $\pm$ 0.13*	0.011
DMA(III)	0.1 $\mu$ M	74.6 $\pm$ 4.2	0.79 $\pm$ 0.12	0.011
	0.5 $\mu$ M	80.9 $\pm$ 4.3	0.93 $\pm$ 0.15	0.011
	1 $\mu$ M	57.3 $\pm$ 8.9*	0.63 $\pm$ 0.03*	0.011
	5 $\mu$ M	31.2 $\pm$ 2.7*	0.35 $\pm$ 0.02*	0.011
	10 $\mu$ M	34.7 $\pm$ 4.4*	0.46 $\pm$ 0.03*	0.013

### 5.5. Actividad de enzimas antioxidantes de células Caco-2 expuestas a especies arsenicales trivalentes

Se evaluó la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) en Caco-2 expuestas 24 horas a las formas arsenicales trivalentes [5, 10 y 25  $\mu$ M de As(III); 0.1, 0.5 y 1  $\mu$ M de

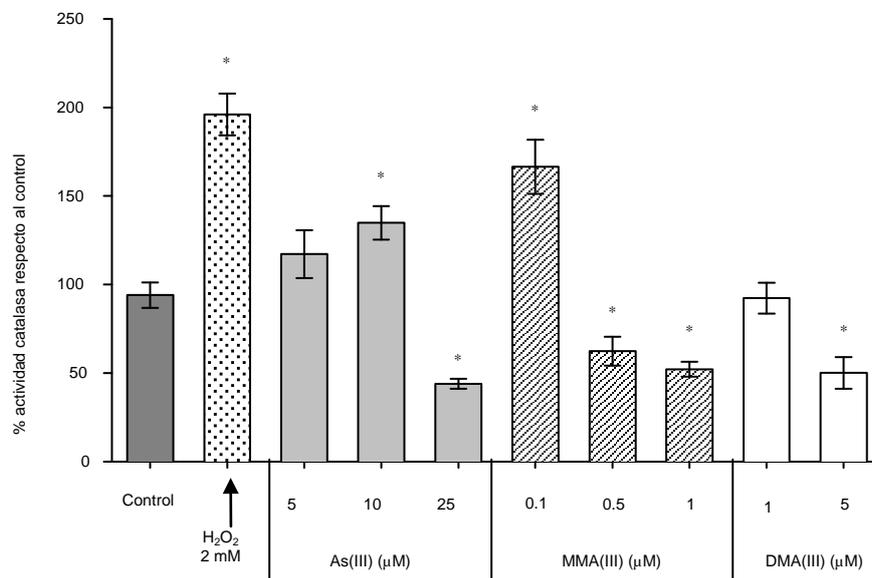
MMA(III); 1 y 5  $\mu\text{M}$  de DMA(III)]. La figura 5 muestra los valores obtenidos expresados como porcentaje respecto al control. La actividad GPx de las células tratadas con As(III) (1 y 5  $\mu\text{M}$ ) es significativamente superior al control ( $181 \pm 25\%$  y  $134 \pm 11\%$  respectivamente). También existen aumentos de la actividad para la concentración más baja de MMA(III) (0.1  $\mu\text{M}$ ,  $127 \pm 15\%$ ) y de DMA(III) (1  $\mu\text{M}$ ,  $121 \pm 14\%$ ). Las concentraciones más elevadas ensayadas de todas las especies, producen por el contrario descensos significativos de la actividad GPx: 25  $\mu\text{M}$  As(III) ( $59 \pm 15\%$ ); 1  $\mu\text{M}$  MMA(III) ( $41 \pm 12\%$ ); 5  $\mu\text{M}$  DMA(III) ( $53 \pm 8\%$ ).



**Figura 5.** Porcentaje de actividad de la GPx respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 6$ ). Las variaciones significativas respecto al control se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

La figura 6 muestra el porcentaje de actividad de la catalasa (CAT) respecto al control de células expuestas 24 horas a As(III) (5, 10 y 25  $\mu\text{M}$ ), MMA(III) (0.1, 0.5 y 1  $\mu\text{M}$ ) y DMA(III) (1 y 5  $\mu\text{M}$ ). La actividad se reduce respecto al control en las células expuestas a las concentraciones más altas de las tres formas arsenicales [As(III) 25  $\mu\text{M}$ ,

44 ± 3%; MMA(III) 1 μM, 52 ± 4%; DMA(III) 5 μM, 50 ± 9%]. Se observa, sin embargo, un aumento significativo en el tratamiento con As(III) 10 μM (135 ± 9%) y MMA(III) 0.1 μM (167 ± 15%).



**Figura 6.** Porcentaje de actividad de la catalasa respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas. Valores expresados como media ± desviación estándar (n = 6). Las variaciones significativas respecto al control se marcan con un asterisco (p<0.05).

### 5.6. Evaluación de la viabilidad celular y tipo de muerte celular mediante doble tinción anexina V/yoduro de propidio de células Caco-2 expuestas a especies arsenicales trivalentes

Durante la fase inicial de la apoptosis, la fosfatidilserina, molécula localizada en la porción citosólica de la bicapa lipídica queda expuesta en la superficie celular. La anexina V es un miembro de la familia de las proteínas de unión a calcio y fosfolípidos con una gran afinidad por la fosfatidilserina, que se ha empleado ampliamente como marcador de esta externalización. Por otro lado, el yoduro de propidio (IP) no puede atravesar la membrana plasmática intacta pero sí es capaz de entrar en células con la

membrana plasmática dañada o en células muertas, permitiendo distinguir entre células viables y no viables.

Las células se trataron con las siguientes concentraciones de especies trivalentes: 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  de As(III); 0.1, 0.5, 1 y 5  $\mu\text{M}$  de MMA(III); 0.1, 1, 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de DMA(III), durante 2 y 24 horas. Como control positivo de apoptosis se empleó estaurosporina 2  $\mu\text{M}$ , 24 horas. La figura 7 muestra los porcentajes respecto a la población celular total de las células viables, necróticas y apoptóticas tras 2 y 24 horas de exposición.

Los resultados obtenidos evidencian que el tratamiento con estaurosporina reduce significativamente la viabilidad celular respecto al control, tanto a las 2 horas ( $70 \pm 3\%$ ) como a las 24 horas ( $48 \pm 7\%$ ). Esta pérdida de viabilidad se debe tanto a procesos necróticos (2 horas,  $13 \pm 1\%$ ; 24 horas,  $19 \pm 3\%$ ) como apoptóticos (2 horas,  $16 \pm 2\%$ ; 24 horas,  $21 \pm 7\%$ ).

Las especies arsenicales afectan significativamente la viabilidad celular, si bien en distinto grado [As(III)>DMA(III)>MMA(III)]. El índice de citotoxicidad 50 ( $\text{IC}_{50}$ ), dosis que produce el 50% de muerte en la población celular, para Caco-2 diferenciadas tras 24 horas de exposición es de 2, 6 y 23  $\mu\text{M}$  para MMA(III), DMA(III) y As(III) respectivamente. El tipo de muerte celular que predomina en cada especie arsenical es distinto. En general, e independientemente del tiempo, el As(III) induce una muerte celular mayoritariamente por necrosis, si bien el número de células apoptóticas aumenta con respecto al control a medida que aumenta la concentración de As(III) utilizada, especialmente a las 2 horas de tratamiento (Figura 7a, control:  $1 \pm 0.5\%$ ; 5  $\mu\text{M}$ :  $1.5 \pm 0.8\%$ ; 50  $\mu\text{M}$ :  $8.1 \pm 2.1\%$ ). Para el MMA(III), tanto a las 2 como a las 24 horas (figuras 7c y 7d), la apoptosis es la única forma de muerte celular. Es destacable que a las 24 horas de exposición, las concentraciones más elevadas de MMA(III) presentan porcentajes de apoptosis (1  $\mu\text{M}$ :  $51 \pm 5\%$ ; 5  $\mu\text{M}$ :  $84 \pm 5\%$ ) muy superiores al de las células tratadas con estaurosporina, considerado un potente inductor de apoptosis. En cuanto al DMA(III), desde los tratamientos más bajos (0.1  $\mu\text{M}$ ), los porcentajes de apoptosis y necrosis son superiores a los de las células no tratadas, siendo los ratios de las dos formas de muerte celular muy similares en todas las concentraciones y en todos

los tiempos de tratamiento. Al igual que ocurría con el MMA(III), el tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de DMA(III) produce a las 24 horas más apoptosis ( $37 \pm 6\%$ ) que el marcador positivo (estaurosporina  $2 \mu\text{M}$ ).

**Figura 7.** Porcentaje de necrosis (barras blancas; eje izquierdo), apoptosis (barras grises; eje izquierdo) y viabilidad (línea continua; eje derecho) respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 2 (a, c y e) y 24 (b, d y f) horas. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 6$ ).

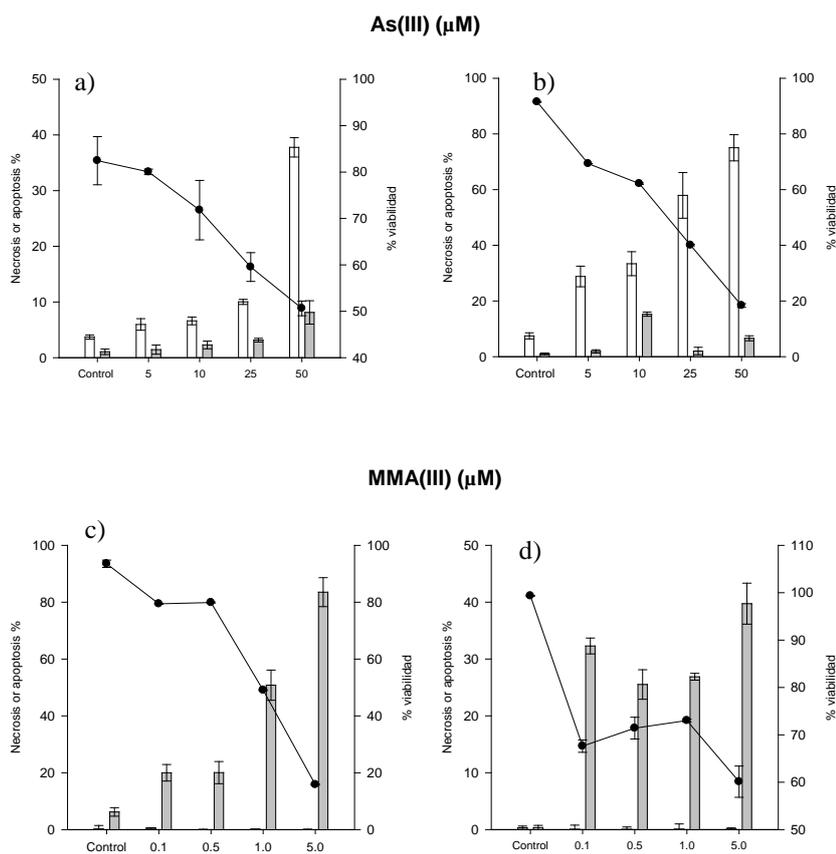
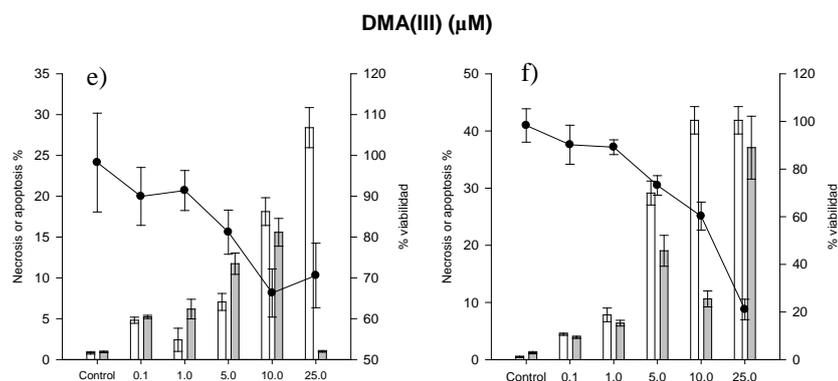
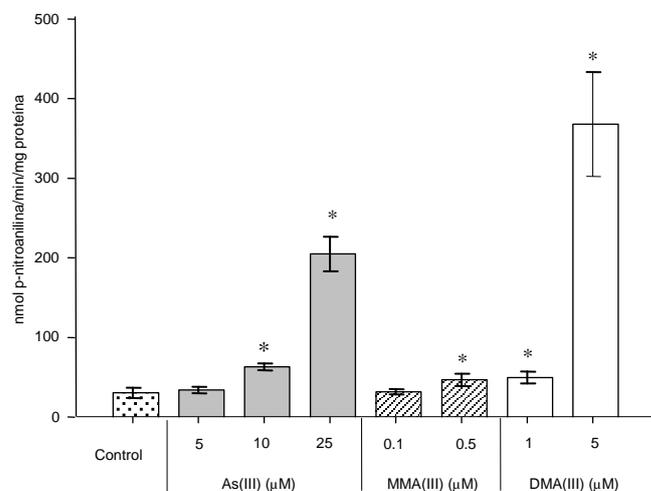


Figura 7. Continuación



### 5.7. Actividad de caspasa-3 de células Caco-2 expuestas a especies arsenicales trivalentes

Los valores de actividad caspasa-3 (nmol *p*-nitroanilina/min/mg proteína) en células Caco-2 expuestas durante 24 horas a As(III) (5, 10 y 25  $\mu\text{M}$ ), MMA(III) (0.1 y 0.5  $\mu\text{M}$ ) o DMA(III) (1 y 5  $\mu\text{M}$ ) se muestran en la figura 8. En todos los tratamientos hay un aumento significativo de la actividad caspasa-3 con respecto al control no tratado, a excepción de As(III) 5  $\mu\text{M}$  y MMA(III) 0.1  $\mu\text{M}$ . Al aumentar la concentración de arsénico aumenta la actividad caspasa-3, hecho especialmente acentuado en el caso del DMA(III) (1  $\mu\text{M}$ :  $50 \pm 8$  nmol *p*-nitroanilina/min/mg proteína; 5  $\mu\text{M}$ :  $368 \pm 65$  nmol *p*-nitroanilina/min/mg proteína). A diferencia de lo reportado en otros estudios realizados con células Caco-2 (Silano *et al.*, 2004; Circu *et al.*, 2009), las células tratadas con estaurosporina 2  $\mu\text{M}$ , empleada como control positivo, no presentan un aumento de la actividad caspasa-3 tras 24 horas de tratamiento.



**Figura 8.** Actividad caspasa-3 (nmol *p*-nitroanilina/min/mg proteína) en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de As(III), MMA(III) y DMA(III) durante 24 horas. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n = 3).

### 5.8. Expresión diferencial de proteínas de estrés térmico (*HSP*) y metalotioneínas (*MT*) en células Caco-2 expuestas a especies arsenicales trivalentes

Los datos obtenidos en los estudios de expresión ponen de manifiesto que todas las proteínas de choque térmico (*HSP27*, *HSP70* y *HSP90*) y metalotioneínas (*MT1A*, *MT1B* y *MT2A*) evaluadas se expresan en el clon de células Caco-2 empleado en el presente estudio.

Las células Caco-2 se expusieron a 1  $\mu$ M de As(III), 0.1  $\mu$ M de MMA(III) y 1  $\mu$ M de DMA(III) durante 2, 4, 6, 24 y 48 horas. Los tratamientos a las 2 y 48 horas no conllevan cambios significativos en la expresión de estas proteínas para ninguna de las formas arsenicales. Por el contrario, sí se observan cambios a las 4, 6 y 24 horas, tal y como se muestra en la tabla 2.

Los cambios en los niveles de ARNm de *HSP* y *MT* varían dependiendo de la forma arsenical ensayada. Para las *HSP*, los tratamientos con MMA(III) conllevan una mayor inducción de la expresión que la forma inorgánica y dimetilada. Las células tratadas con MMA(III) presentan aumentos significativos a las 4, 6 y 24 horas de tratamiento, siendo los de 4 horas muy acentuados [ratio de expresión ( $\log_2$ ); *HSP27* =  $12.6 \pm 7$ ; *HSP70* =  $14.0 \pm 7$ ; *HSP90* =  $14.3 \pm 7$ ]. El As(III) presenta aumentos menos notables, aunque significativos a 4 y 6 horas para la *HSP70* [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre 2.2 y 4.2] y *HSP90* [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $5.6 \pm 0.7$ ]. El DMA(III) produce una sobreexpresión de la *HSP70* y *HSP90* a las 6 horas de tratamiento [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre 2.6 y 3.0].

En cuanto a las *MTs*, la *MT2A* se induce tras 4 y 24 horas de exposición a MMA(III) (3.6-12.6) y 6 horas de tratamiento con As(III) ( $6.6 \pm 3.1$ ). La expresión de las dos isoformas de la *MTI* sólo se induce significativamente a las 4 y 24 horas de tratamiento con MMA(III). Cabe destacar que el tratamiento con DMA(III) provoca un descenso significativo a las 4 horas en la expresión de todas las *MTs* estudiadas, tendencia que también se observa, aunque en menor medida tras el tratamiento con As(III).

**Tabla 2.** Expresión relativa de ARNm de metalotioneínas y proteínas de estrés térmico [ratio de expresión ( $\log_2$ )] de células Caco-2 tratadas con 1  $\mu\text{M}$  de As(III), 0.1  $\mu\text{M}$  de MMA(III) y 1  $\mu\text{M}$  de DMA(III) durante 4, 6 y 24 horas (media  $\pm$  desviación estándar, n=8). Las diferencias significativas respecto al control se marcan con un asterisco (p<0.05). En rojo se indican los incrementos significativos en la expresión y en azul los descensos.

	As(III) 1 $\mu\text{M}$			MMA(III) 0.1 $\mu\text{M}$			DMA(III) 1 $\mu\text{M}$		
	4 h	6 h	24 h	4 h	6 h	24 h	4 h	6 h	24 h
<i>HSP27</i>	-1.3 $\pm$ 0.06	1.4 $\pm$ 0.2	-1.9 $\pm$ 0.01	12.6 $\pm$ 7.1*	1.6 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 2.5*	-0.7 $\pm$ 0.05	1.1 $\pm$ 0.1	0.18 $\pm$ 0.07
<i>HSP70</i>	2.2 $\pm$ 0.5*	4.2 $\pm$ 1.2*	-0.6 $\pm$ 0.07	14.0 $\pm$ 7.3*	3.2 $\pm$ 0.8*	1.5 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.6*	0.034 $\pm$ 0.008
<i>HSP90</i>	5.6 $\pm$ 0.7*	1.4 $\pm$ 0.2	-1.2 $\pm$ 0.1	14.3 $\pm$ 7.3*	1.2 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 1.9*	0.8 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.07*	-0.064 $\pm$ 0.02
<i>MT1A</i>	-1.0 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.1	-0.2 $\pm$ 0.03	13.0 $\pm$ 11.4*	1.0 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.6	-6 $\pm$ 0.08*	-0.65 $\pm$ 0.1	-0.34 $\pm$ 0.024
<i>MT1B</i>	-2.7 $\pm$ 0.09*	0.24 $\pm$ 0.08	-1.8 $\pm$ 0.03*	6.2 $\pm$ 3.1*	0.53 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 2.5*	-7.5 $\pm$ 0.003*	-0.041 $\pm$ 0.01	-0.20 $\pm$ 0.04
<i>MT2A</i>	-1.1 $\pm$ 0.04	6.6 $\pm$ 3.1*	-1.8 $\pm$ 0.05*	12.6 $\pm$ 6.5*	1.7 $\pm$ 0.7	3.6 $\pm$ 1.8*	-3.2 $\pm$ 0.01*	1.04 $\pm$ 0.2	-0.56 $\pm$ 0.15

### **5.9. Evaluación morfológica de las células expuestas a especies arsenicales trivalentes mediante microscopía de fluorescencia**

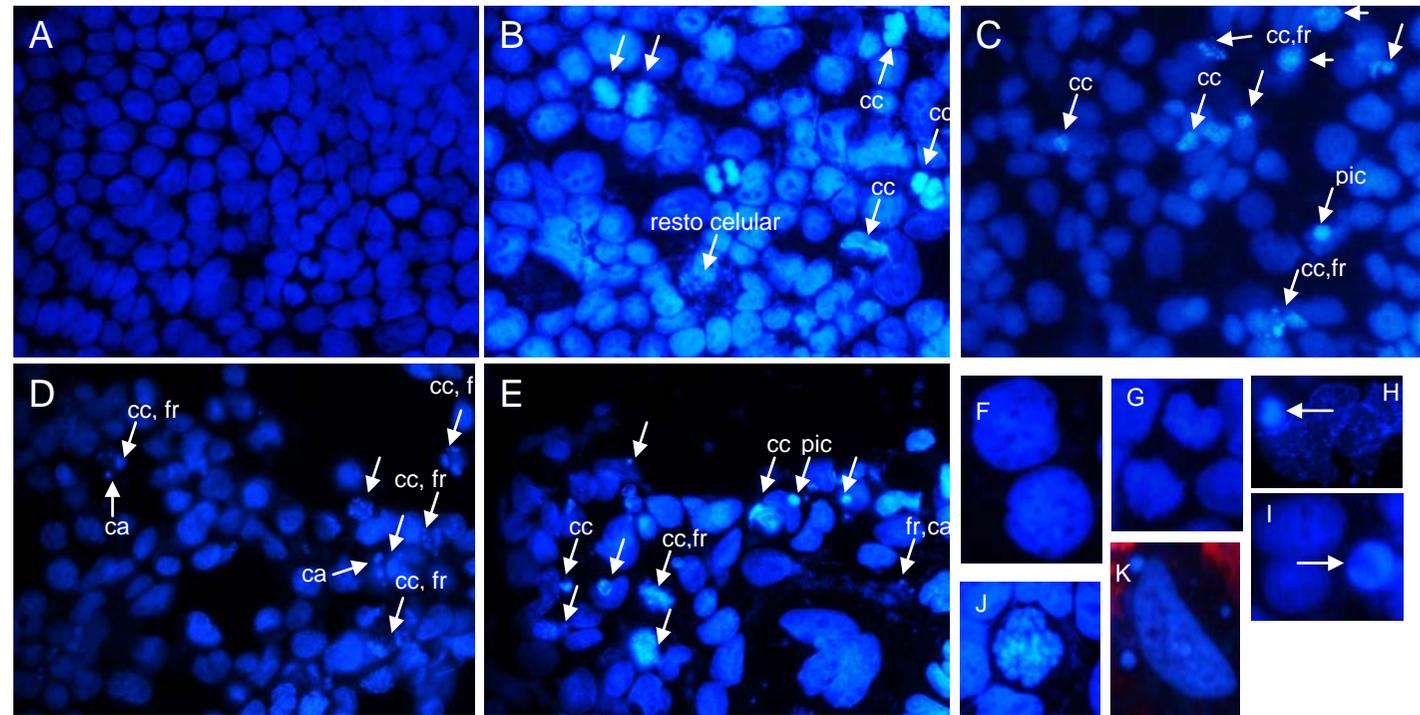
Las imágenes de la morfología nuclear (figura 9) de las células Caco-2 tras distintos tratamientos con arsénico durante 24 horas, corroboran los resultados obtenidos en el apartado 5.6. Indican cambios significativos en el cultivo celular, con condensación de la cromatina, fragmentación de núcleos y formación de cuerpos apoptóticos.

Las figuras 10 y 11 muestran la afectación en la organización del citoesqueleto de actina filamentosa en células Caco-2 tras distintos tratamientos con arsénico As(III) (10  $\mu$ M; 24, 48 y 72 horas). En las células control la actina se localiza principalmente en la periferia celular, dando una imagen característica en empedrado (A). El tratamiento con citocalasina B, inhibidor de la polimerización de las subunidades de actina presenta una imagen con pérdida de definición en la estructura celular (B) y aparición de agregados de actina en el citoplasma, que se observan como un punteado (C).

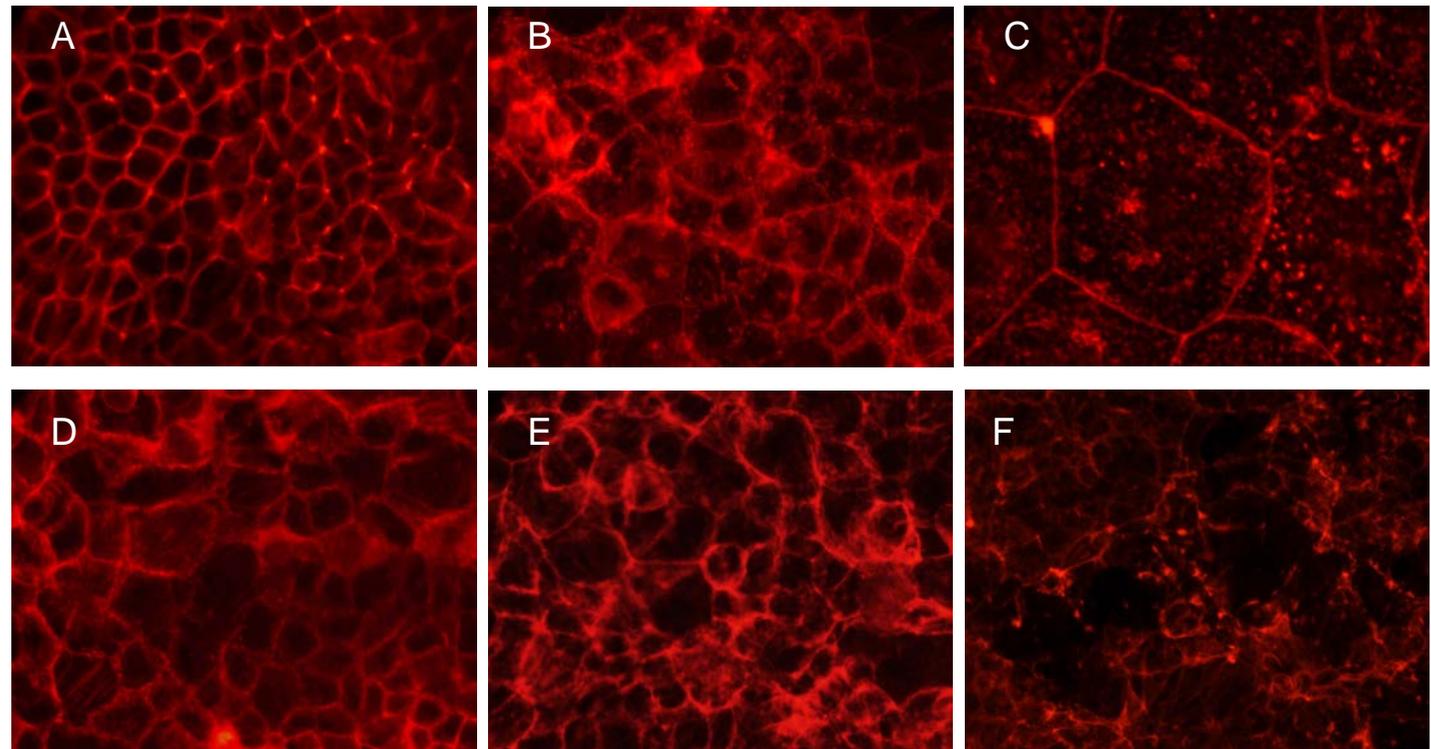
El As(III) 10  $\mu$ M 24 horas (D) produce una afectación de la estructura celular, con cambios en la morfología de las células, que se refleja en mayor presencia de actina en el citoplasma, sin embargo la desestructuración de la monocapa celular se hace más evidente a las 48 (E) y 72 horas de tratamiento (F).

En la figura 11 se observa también un cambio en la estructura del citoesqueleto celular, con pérdida de la morfología de empedrado y formación de estructuras redondeadas englobando los núcleos apoptóticos (figura 11, A). Se muestra con más detalle de una célula apoptótica (C) tras el tratamiento de As(III) 10  $\mu$ M.

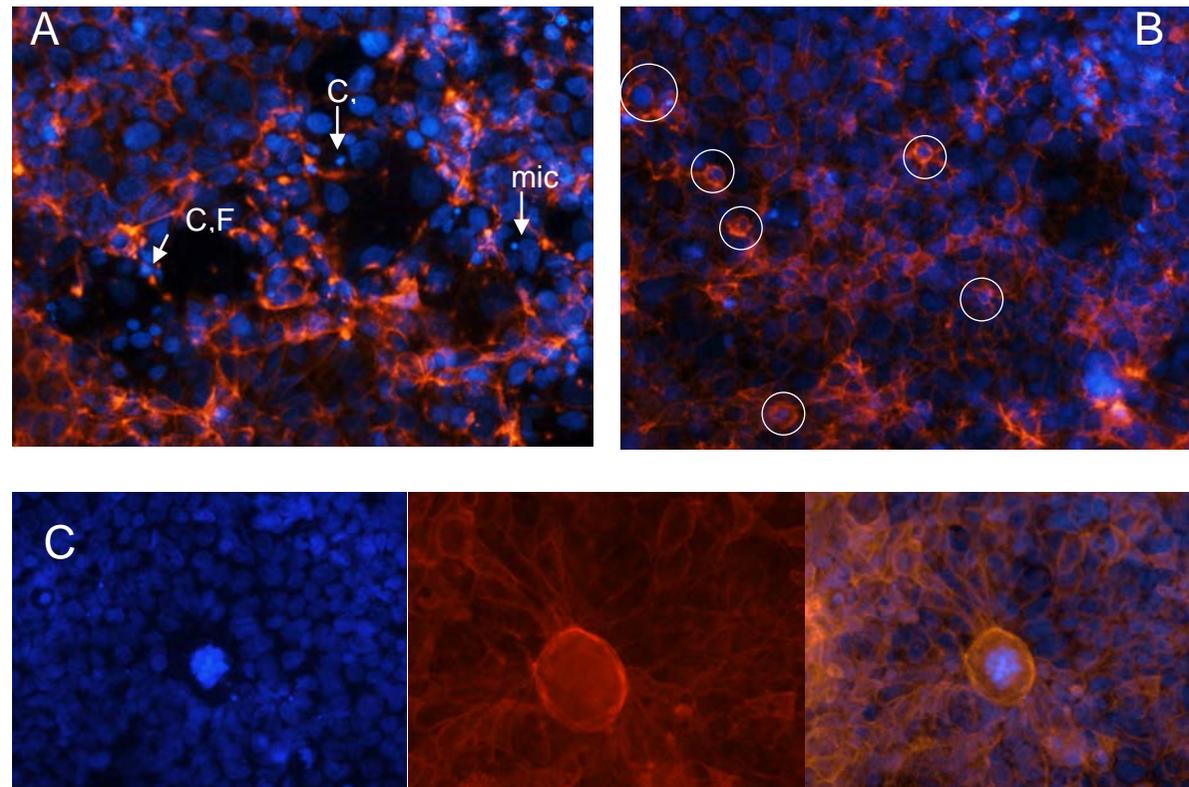
**Figura 9.** Microscopía de fluorescencia con tinción nuclear (DAPI) de células Caco-2 tras distintos tratamientos: A) Control; B) As(III) 10  $\mu\text{M}$  C) MMA(III) 1  $\mu\text{M}$ ; D) DMA(III) 5  $\mu\text{M}$ ; E) estaurosporina 2  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas. Se observan núcleos con condensación de la cromatina (cc), fragmentados (fr), cuerpos apoptóticos (ca) y núcleos picnóticos (pic). F) morfología celular normal; G) núcleo mitótico; H) e I) núcleos picnóticos; J) y K) condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. Imágenes tomadas con objetivo de 40X. Las imágenes F-K son ampliaciones de imágenes también tomadas a 40X.



**Figura 10.** Microscopía de fluorescencia del citoesqueleto de actina filamentosa en células Caco-2. A) Control; B y C) Citocalasina B, 2 horas; D, E y F) As(III) 10  $\mu$ M 24, 48 y 72 horas respectivamente. Imágenes tomadas con objetivo de 40X, excepto la figura C, que se tomó con objetivo 100X.



**Figura 11.** Microscopía de fluorescencia con doble tinción, núcleos (DAPI, azul) y actina filamentosa (rodamina-faloidina, rojo) de células Caco-2 tras tratamientos con As(III) 10  $\mu$ M, 72 horas (A, B). Se observa la desestructuración de la monocapa, con condensación y fragmentación de cromatina (C, F) y micronúcleos (mic) (flechas blancas). Imágenes tomadas con objetivo 20X (A y B) y 40X (C).





---

## Discusión

---

La toxicidad del arsénico sobre el epitelio intestinal humano ha sido escasamente evaluada. Los estudios existentes al respecto se limitan a la evaluación *in vitro* del As(III), empleando la línea Caco-2 como modelo de epitelio intestinal (Davis *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2002; Laparra *et al.*, 2006, 2008,). Estos estudios muestran que el As(III) induce estrés oxidativo en Caco-2, afectando el potencial de membrana mitocondrial (Laparra *et al.*, 2008) y produciendo finalmente muerte celular por apoptosis (Nakagawa *et al.*, 2002). Así mismo, se ha visto que el As(III) produce un arresto del ciclo celular (Laparra *et al.*, 2008) y un cambio en los patrones de metilación del DNA (Davis *et al.*, 2000). Por otro lado, no existen estudios a nivel intestinal que evalúen los efectos de las formas mono y dimetiladas [MMA(V), MMA(III), DMA(V) y DMA(III)] ni del arsénico inorgánico pentavalente [As(V)]. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, todas estas especies pueden entrar en contacto con el epitelio intestinal a través de los alimentos o como consecuencia de las transformaciones de las especies arsenicales previas a su absorción.

En este capítulo se ha evaluado la toxicidad de las formas inorgánicas [As(V), As(III)] y todos sus metabolitos [MMA(V), MMA(III), DMA(V) y DMA(III)]. Los resultados obtenidos muestran que las especies trivalentes son más tóxicas que las pentavalentes y que el grado de toxicidad depende de la especie considerada. Así, la reducción de la actividad mitocondrial a las 24 horas de exposición a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  presenta la gradación MMA(III) > DMA(III) > As(III). La mayor toxicidad de las formas metiladas trivalentes respecto a la inorgánica se ha puesto de manifiesto en otras líneas celulares (Stybło *et al.*, 2000; Charoensuk *et al.*, 2009; Naranmandura *et al.*, 2011a), atribuyéndose en parte a una mayor entrada y acumulación celular de las formas metiladas. Este hecho se ha evidenciado también para Caco-2 en los capítulos 2 y 3 de la presente tesis.

Los mecanismos de acción de estas formas arsenicales pueden ser muy variados (Lantz y Hays, 2006), sin embargo numerosos estudios en cultivos celulares, modelos

animales y estudios en humanos describen los efectos tóxicos causados por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) asociadas al estrés oxidativo. Los resultados obtenidos en la presente tesis muestran que la exposición a las formas trivalentes genera ROS, especialmente tras la exposición a MMA(III), debido posiblemente al importante efecto tóxico de esta especie arsenical sobre la mitocondria (Naramandura *et al.*, 2011b).

La peroxidación lipídica asociada al estrés oxidativo inducido por arsénico ha sido ampliamente estudiada, observándose una correlación positiva entre los niveles de peroxidación lipídica en plasma y los niveles de arsénico en orina o tejidos (Flora, 2011). Los resultados obtenidos evidencian que el incremento de los niveles de peroxidación lipídica es mayor en las células tratadas con DMA(III) que en células expuestas a MMA(III), mientras que el As(III) no provoca cambios significativos respecto al control. No se observa una relación directa entre el nivel de peroxidación y los niveles de ROS, ya que a niveles similares de ROS el As(III) no induce peroxidación mientras que el DMA(III) sí la produce. Se ha puesto de manifiesto que las formas dimetiladas arsenicales, especialmente el DMA(III), son capaces de liberar hierro de la ferritina (Ahmad *et al.*, 2000). Diversos estudios vinculan altas concentraciones de hierro con un aumento de la peroxidación lipídica (Kanner *et al.*, 1986; Courtois *et al.*, 2003). Esto podría explicar, al menos en parte, el hecho de que el DMA(III) produzca una mayor peroxidación lipídica en las células intestinales que las otras formas arsenicales. Adicionalmente, debido a su elevada reactividad y carácter hidrofóbico, las especies metiladas trivalentes podrían aumentar la peroxidación lipídica por interacción con fosfolípidos de membrana. Esta interacción se ha puesto de manifiesto para otras formas arsenicales (Marafante *et al.*, 1987; Suwalsky *et al.*, 2007; Jemiola-Rzeminska *et al.*, 2007).

Las células en condiciones fisiológicas poseen un sistema antioxidante para combatir la formación de especies reactivas. Este sistema incluye componentes no enzimáticos (vitaminas o compuestos tiolados de bajo peso molecular como el GSH) y sistemas enzimáticos [glutación peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)]. La determinación del ratio GSSG/GSH es uno de los principales

indicadores de estrés oxidativo en células y tejidos. Las células sometidas a estrés oxidativo experimentan aumentos en el ratio GSSG/GSH debido a que la forma reducida de glutatión es oxidada por los radicales libres de oxígeno. En este estudio, sólo las células Caco-2 expuestas a As(III) (5-50  $\mu$ M) aumentan el ratio GSSG/GSH. Parte de la oxidación del GSH observada en las células tratadas con As(III) puede no ser consecuencia de su papel como secuestrador de radicales libres, sino a la participación de GSH en el metabolismo de As(III) (Waters *et al.*, 2004a). Respecto a las formas metiladas trivalentes, no existe modificación en el ratio GSSG/GSH ya que existe una reducción proporcional de ambas formas en el interior celular.

Independientemente de los cambios en el ratio GSSG/GSH, la mayor parte de los tratamientos con formas trivalentes conllevan una disminución significativa de los contenidos de GSH respecto al control. Este hecho puede deberse a que las formas trivalentes arsenicales se transportan al exterior de las células en forma de complejos con GSH (Leslie *et al.*, 2004). Adicionalmente, la disponibilidad de cisteína en la célula se considera el factor limitante en la formación de GSH por la glutatión sintetasa (Sies, 1999; Estrela *et al.*, 2006). Un estudio reciente ha evidenciado la formación de complejos MMA(III)-cisteína y DMA(III)-cisteína en el interior celular (Murota *et al.*, 2006). Así, esta reducción en la disponibilidad de la cisteína puede reducir la síntesis de nuevas moléculas del tripéptido. Por otra parte, está descrito que la salida de GSH de las células está mediada por distintos transportadores, tales como proteínas de resistencia a múltiples drogas (MRP) o polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OAPT) (Lee *et al.*, 2001; Ballatori *et al.*, 2005). Como se ha puesto de manifiesto en el capítulo 3, el As(III) induce la expresión de estos transportadores, pudiendo afectar secundariamente a los procesos de transporte de GSH en las células.

Además de la depleción de GSH, la investigación realizada ha puesto de manifiesto que las formas arsenicales modifican la actividad de enzimas responsables de mantener el equilibrio redox en el organismo (GPx y CAT). A bajas concentraciones de arsénico, las actividades enzimáticas están aumentadas, en general, indicando una respuesta celular frente al estrés oxidativo. A mayores concentraciones, sin embargo, la actividad de ambas enzimas está disminuida. Esta inhibición enzimática puede ser resultado de la

unión de las formas trivalentes a grupos sulfhidrilo de proteínas intracelulares (Styblo *et al.*, 1997, Hirano *et al.*, 2003). A este respecto se ha observado que la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, SOD, GPX) en plasma, hígado y lisado de eritrocitos disminuye en humanos y ratas expuestos a arsénico (Saha *et al.*, 2011; Majumdar *et al.*, 2010). La reducción de la actividad enzimática también puede ser consecuencia de la generación de radicales libres (Arivazhagan *et al.*, 2002). La actividad enzimática de las células Caco-2 expuestas a las distintas formas arsenicales presenta una respuesta que se adapta al fenómeno de hormesis, caracterizado por una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas. La hormesis se ha descrito en células embrionarias humanas de pulmón (HELF) expuestas a As(III) para otra enzima relacionada con el sistema redox celular, la superóxido dismutasa (SOD), evidenciándose que la actividad de SOD se potencia con dosis bajas (0.5  $\mu$ M) y se inhibe a dosis altas (10  $\mu$ M).

Todos los procesos descritos hasta el momento, relacionados con el estrés oxidativo inducido por arsénico pueden provocar la muerte celular por varios mecanismos. Las especies reactivas de oxígeno, a través de diversas vías de señalización son capaces de inducir apoptosis y necrosis (Fiers *et al.*, 1999; Proskuryakov *et al.*, 2003). Se ha descrito en estudios previos que el arsénico altera los niveles de citocromo c en el citoplasma y afecta la expresión génica y proteica de un gran número de genes relacionados con los procesos de apoptosis y estrés oxidativo (Hamadeh *et al.*, 2002; Habib 2010; Mo *et al.*, 2011). Menos descritos están los procesos necróticos asociados con exposiciones a trióxido de arsénico, si bien también existen referencias al respecto (Lew *et al.*, 1999; Janku *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, tras el tratamiento con As(III), independientemente de la concentración y el tiempo de exposición utilizado, predomina la muerte por necrosis, aunque también hay una pequeña proporción de células apoptóticas. En las células expuestas a MMA(III) sólo se detectan células apoptóticas, mientras que en las células tratadas con DMA(III), los porcentajes de células apoptóticas y necróticas son similares en la mayoría de tratamientos. En las tres formas arsenicales se observa una activación de la caspasa-3 tras 24 horas de exposición. La caspasa-3 es una proteína perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, implicado en procesos apoptóticos tales como la

condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA (Porter y Janicke, 1999). Los aumentos de la actividad de esta proteasa son mayores para la forma dimetilada e inorgánica que para la monometilada. Este hecho no coincide con los porcentajes de apoptosis detectados en la células tras 24 horas de exposición [MMA(III)>>DMA(III)>As(III)]. Ello sugiere que la muerte por apoptosis de las células expuestas a MMA(III) se produce principalmente por una vía caspasa independiente y que en los tratamientos con DMA(III) la vía apoptótica predominante conlleva la activación de la caspasa efectora 3.

En relación al As(III), aunque la mayoría de las células tras 24 horas de exposición muestran una tinción necrosis positiva, la actividad caspasa-3 es elevada. Algunos estudios identifican una activación de esta caspasa en procesos de muerte celular por necrosis (Niquet *et al.*, 2003). Serían necesarios más estudios para evaluar la causa del elevado porcentaje de células necróticas tras tratamientos con As(III), ya que el proceso de muerte celular originado por esta forma arsenical depende en muchas ocasiones de los niveles de energía y oxígeno de la célula (Formigli *et al.*, 2000), así como de múltiples vías de señalización caspasa dependientes e independientes (McCafferty-Grad *et al.*, 2003, Michel *et al.*, 2003). En otros tipos celulares también se observó el mismo patrón de muerte celular, con predominancia del fenotipo necrótico (Scholz *et al.*, 2005).

La respuesta de las células intestinales al estrés generado por la exposición a las especies arsenicales trivalentes también se manifiesta en la inducción de proteínas de estrés. Las proteínas denominadas de estrés engloban una serie de familias entre las que cabe destacar las metalotioneínas (MT) y las proteínas de choque térmico (HSP), las cuales se ha demostrado en trabajos previos que se inducen por la exposición a especies arsenicales (Del Razo *et al.*, 2001b; Eblin *et al.*, 2006). En este sentido los trabajos son más abundantes para las formas inorgánicas y monometiladas trivalentes, no existiendo datos para el DMA(III). Las MT tienen una composición aminoacídica rica en cisteína (30%), residuos capaces de unir iones metálicos. Son moléculas implicadas en la homeostasis de iones metálicos esenciales para el correcto funcionamiento de la maquinaria celular (Maret, 2009; Festa y Thiele, 2011). Asimismo, la inducción de MT

protege a las células de la toxicidad de metales tóxicos y del estrés oxidativo generado por radicales libres (Viarengo *et al.*, 2000). Las proteínas de choque térmico son un grupo altamente conservado con funciones importantes en la homeostasis proteica, que se inducen ante estímulos de estrés. El incremento en la síntesis de hsp, especialmente hsp70, puede evitar fallos en el plegamiento de las proteínas así como su agregación (Kalmar y Greensmith, 2009). En este estudio, se observa que las tres especies arsenicales inducen la expresión de *HSP70* y *HSP90*, que la *MT2A* es inducida por la forma inorgánica y la metilada, y que sólo las células tratadas con MMA(III) presentan aumentos en la expresión de *HSP27* y de las dos isoformas de *MT1*. Podemos decir por tanto, que las formas arsenicales trivalentes regulan estas proteínas de estrés a nivel transcripcional, siendo mayor la inducción por la forma monometilada que por As(III) y DMA(III). Eblin *et al.* (2006) también muestran como en células de vejiga urinaria, el MMA(III) induce HSP70 y MT1 a tiempos más cortos y concentraciones menores que el As(III). Es destacable también la reducción de la expresión de las *MT* producida por las exposiciones a As(III) y DMA(III), que podrían afectar los procesos de detoxificación de este metaloide y de otros contaminantes ingeridos con los alimentos (Hg, Cd), así como a la homeostasis de metales como el Zn o el Cu, y a los procesos de protección frente al estrés oxidativo.

En cuanto a las formas arsenicales pentavalentes, el MMA(V) y DMA(V) no producen efectos tóxicos sobre la monocapa formada por Caco-2 diferenciadas a concentraciones iguales o inferiores a 100  $\mu$ M. El único efecto observado tras la exposición a estas especies es un aumento en el ratio GSSG/GSH, indicador temprano de estrés oxidativo, si bien es el único parámetro que se altera, ya que no se detectan aumentos en ROS ni peroxidación lipídica. El As(V) sin embargo, reduce la actividad mitocondrial y genera cierta respuesta celular con una disminución del GSH intracelular y un aumento de las sustancias reactivas de oxígeno a concentraciones de 100  $\mu$ M. Estas concentraciones no superan las halladas habitualmente en las principales vías de exposición a As(V) [agua (< 1 mg/L) y alimentos (<0.5 mg/L); JEFCA 2011], exceptuando algunos tipos de algas pardas (Almela *et al.*, 2002;). La susceptibilidad de las células Caco-2 diferenciadas a la forma inorgánica pentavalente es similar a la

observada para otros tipos celulares (Stybło *et al.*, 2000; Vega *et al.*, 2001; Hirano *et al.*, 2003). La reducida toxicidad de las especies pentavalentes en sistemas celulares puede deberse a la baja entrada al interior celular de estas formas arsenicales (Dopp *et al.*, 2010), hecho que también se ha puesto de manifiesto en la presente tesis (capítulo 2 y 3).

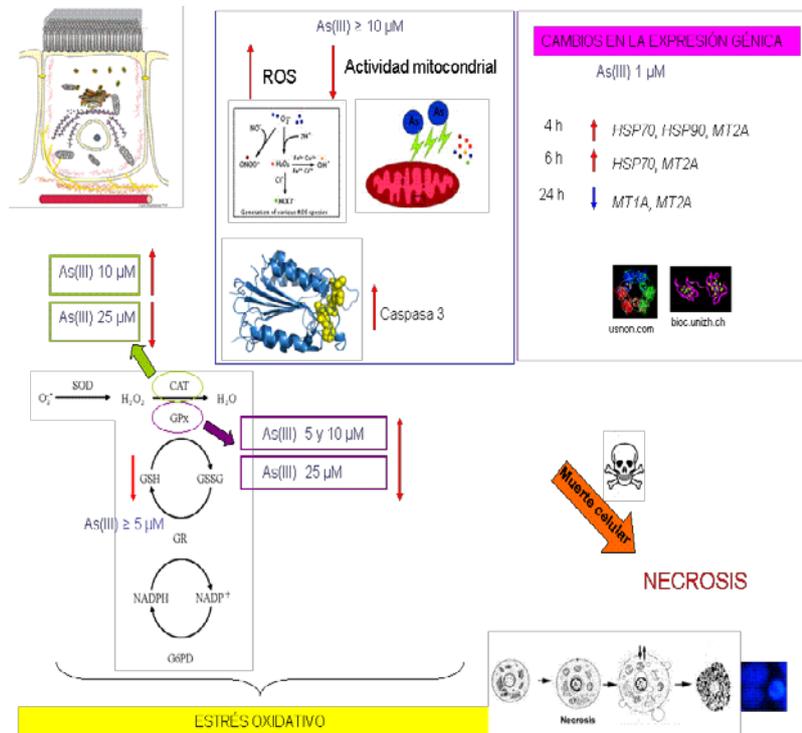
Por otra parte, una de las funciones principales del intestino es actuar como barrera de protección frente a los agentes externos presentes en el lumen, especialmente microorganismos. Una de las estructuras fundamentales en el mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal es el citoesqueleto celular, formado por tres sistemas de microfibras; microfilamentos (filamentos de actina), microtúbulos ( $\alpha$  y  $\beta$  tubulina) y filamentos intermedios (Izdebska *et al.*, 2009). La actina globular (actina-G) es capaz de agregarse y formar homopolímeros filamentosos (actina-F), proceso de una gran importancia en la citoquinesis, endocitosis, quimiotaxis, diferenciación y apoptosis (Izdebska *et al.*, 2009). Diversos estudios han asociado los procesos apoptóticos con modificaciones en la distribución celular de la actina, que parece estar implicada en la formación de vesículas en la membrana y cuerpos apoptóticos y marginación de la cromatina nuclear (Carlier *et al.*, 1999; Rando *et al.*, 2000; Grzanka *et al.*, 2005; Pederson, 2008).

El importante efecto del arsenito sobre la organización de la actina en diversos tipos celulares se ha puesto de manifiesto previamente (Li y Chou, 1992; Izdebska *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). En el presente trabajo se ha observado que en Caco-2 expuestas a As(III) existe un cambio en la morfología celular, con una desestructuración de la forma geométrica de las células y cambios importantes en la distribución de la actina filamentosos. Este efecto puede afectar a la pérdida de permeabilidad selectiva intestinal y favorecer el contacto de sustancias antigénicas con la lámina propia, así como afectar a múltiples procesos vitales en las células.

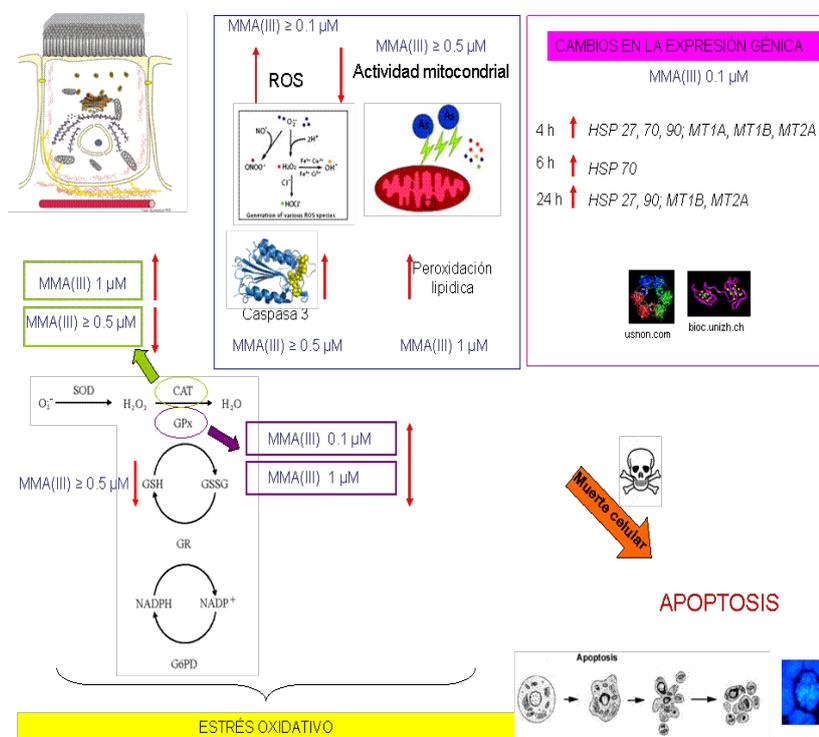
Podemos concluir, a la luz de los resultados obtenidos, que al igual que ocurre en otros sistemas celulares, las formas arsenicales trivalentes, pueden afectar la viabilidad celular de las células intestinales por distintos mecanismos relacionados con la inducción de estrés oxidativo. Esta inducción se produce a concentraciones similares a

las encontradas en alimentos y agua de bebida o a las observadas en la monocapa celular como consecuencia del metabolismo del arsénico inorgánico. Es conocido que el estrés oxidativo sobre tejido intestinal es un factor importante en la génesis de patologías inflamatorias crónicas o cáncer (Aw, 2003). Por tanto, es necesario realizar estudios más detallados que evalúen los posibles procesos fisiopatológicos que la exposición a arsénico, especialmente en situaciones crónicas, puede ocasionar en la mucosa intestinal y cómo estos procesos pueden afectar su estructura y funcionalidad (absorción, defensa frente a sustancias exógenas, procesos metabólicos).

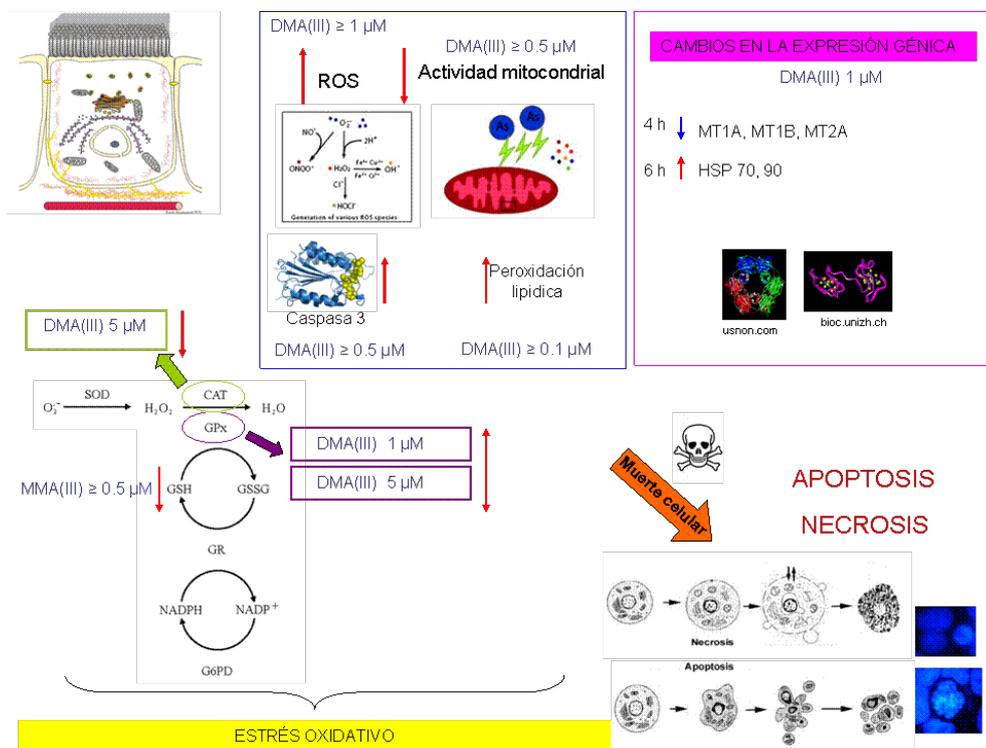
La figura 12 muestra gráficamente, un resumen de los resultados más significativos obtenidos en los estudios de toxicidad presentados en este capítulo.



**Figura 12a)** Representación esquemática de los distintos efectos observados en células Caco-2 tras la exposición a As(III)



**Figura 12b)** Representación esquemática de los distintos efectos observados en células Caco-2 tras la exposición a MMA(III).



**Figura 12c)** Representación esquemática de los distintos efectos observados en células Caco-2 tras la exposición a DMA(III).



## **CAPÍTULO 6**

---

### **Efectos inflamatorios de las especies arsenicales sobre el epitelio intestinal**



Existen pocos estudios que evalúen el efecto del arsénico en la liberación y expresión de citoquinas a nivel intestinal, si bien algunos estudios previos demuestran que este elemento tiene un importante efecto sobre el sistema inmunitario, tanto en sistemas *in vitro* como en estudios epidemiológicos sobre poblaciones expuestas a arsénico a través del agua de bebida.

En el presente capítulo se ha evaluado la respuesta inflamatoria del epitelio intestinal expuesto a las formas arsenicales inorgánicas, mono y dimetiladas trivalentes [As(III), MMA(III) y DMA(III)] o a la combinación de estas formas arsenicales con LPS. Tras los distintos tratamientos se han determinado los niveles de citoquinas y de ARNm tras exposición de células Caco-2 y del cocultivo Caco-2/PBMC. Adicionalmente se ha evaluado el efecto de los tratamientos sobre la permeabilidad de la monocapa formada por Caco-2 y sobre el transporte de las formas arsenicales trivalentes en el sistema de cocultivo Caco-2/PBMC.

## Resultados

---

### 6.1. Efectos inflamatorios del arsénico en el modelo *in vitro* Caco-2

Los ensayos realizados en el presente apartado se han llevado a cabo con dosis subletales de arsénico, LPS o combinación de ambos. En todos los casos se han expuesto los cultivos durante 2, 4, 6, 24 y 48 horas. Las concentraciones de arsénico empleadas han sido: 1  $\mu\text{M}$  de As(III), 0.1  $\mu\text{M}$  de MMA(III) y 1  $\mu\text{M}$  de DMA(III). El LPS se ha empleado a una concentración de 10 ng/mL y las combinaciones arsénico/LPS se han realizado a las concentraciones descritas anteriormente. Para las distintas citoquinas estudiadas, la cuantificación de proteína se ha llevado a cabo en el medio de cultivo (TNF $\alpha$ , IL8 e IL6), mientras que los niveles de ARNm (TNF $\alpha$ , IL8, IL6, IL1 $\alpha$  e IL1 $\beta$ ) se han evaluado en las células Caco-2.

### 6.1.1. Efecto del arsénico y del LPS sobre TNF $\alpha$

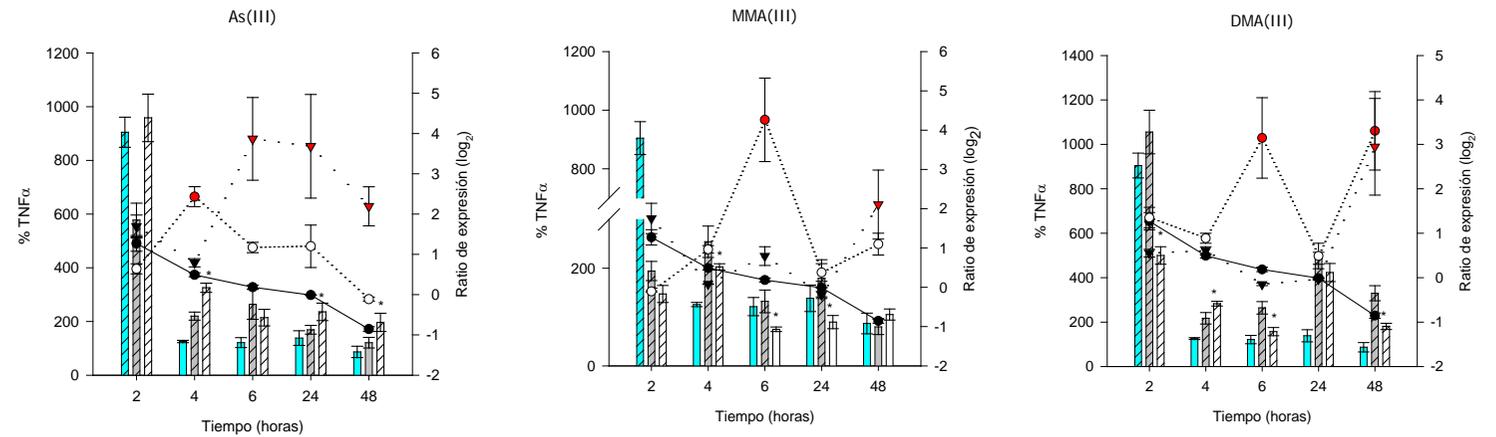
La tabla 1 presenta los valores, en pg/mg proteína, de TNF $\alpha$  en el medio de cultivo, tras los distintos tratamientos. La figura 1 muestra, en porcentaje, los cambios de los niveles de proteína TNF $\alpha$ , así como los cambios en la expresión de ARNm de células Caco-2 expuestas a especies trivalentes, a LPS o a combinaciones de ambos.

La secreción de TNF $\alpha$  al medio es superior al control a todos los tiempos de exposición a DMA(III) y hasta las 24 horas de exposición a As(III) y MMA(III). La mayor liberación de TNF $\alpha$  se observa a las 2 horas para As(III) y DMA(III), y a las 4 horas para MMA(III). En la exposición a LPS, tras un incremento de TNF $\alpha$  en el medio a las 2 horas, se produce un retorno al valor basal que se mantiene hasta las 48 horas de tratamiento. La combinación arsénico/LPS afecta a la secreción de TNF $\alpha$  de forma distinta para cada especie. El tratamiento As(III)/LPS supone un incremento de TNF $\alpha$  en el medio a la mayoría de los tiempos de tratamiento en relación a las células tratadas con As(III); el mayor nivel de TNF $\alpha$  se observa a las 2 horas y la respuesta es similar a la producida por el LPS. Por el contrario, para MMA/LPS y DMA/LPS la tendencia es a la reducción en la secreción de TNF $\alpha$  en relación al tratamiento únicamente con la especie arsenical.

La expresión génica de TNF $\alpha$  también se modifica tras los tratamientos con las formas arsenicales, y al igual que ocurre con la secreción, esta respuesta varía con la especie. En general, los aumentos más marcados tienen lugar tras la fase de máxima secreción de esta citoquina al medio. Así, el As(III) produce un incremento significativo en la expresión a las 4 horas de tratamiento [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $2.4 \pm 0.3$ ], el MMA(III) a las 6 horas [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $4.3 \pm 1.1$ ] y el DMA(III) a las 6 y 48 horas [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre 3.2 y 3.3]. La combinación arsénico/LPS afecta la expresión de esta citoquina principalmente en los tratamientos As(III)/LPS, donde se observa una mayor inducción con respecto a los tratamientos con As(III) en la mayoría de los tiempos ensayados. Para los tratamientos MMA(III)/LPS o DMA(III)/LPS, por el contrario, existe una tendencia a la reducción en la expresión respecto al tratamiento únicamente con arsénico, tendencia similar a la observada en los niveles proteicos.

**Tabla 1.** Niveles de TNF $\alpha$  (pg/mg proteína) tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones.

Tratamiento	TNF $\alpha$ (pg/mg proteína)				
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas	48 horas
<b>control</b>	27 $\pm$ 3	44 $\pm$ 12	35 $\pm$ 4	39 $\pm$ 8	57 $\pm$ 10
<b>LPS</b>	244 $\pm$ 15	55 $\pm$ 2	42 $\pm$ 7	54 $\pm$ 11	50 $\pm$ 12
<b>As(III)</b>	156 $\pm$ 17	96 $\pm$ 7	92 $\pm$ 20	66 $\pm$ 6	69 $\pm$ 11
<b>As(III)/LPS</b>	259 $\pm$ 24	143 $\pm$ 7	75 $\pm$ 11	92 $\pm$ 13	112 $\pm$ 19
<b>MMA(III)</b>	56 $\pm$ 5	111 $\pm$ 14	46 $\pm$ 8	70 $\pm$ 15	46 $\pm$ 9
<b>MMA(III)/LPS</b>	40 $\pm$ 5	89 $\pm$ 3	26 $\pm$ 2	35 $\pm$ 5	60 $\pm$ 6
<b>DMA(III)</b>	285 $\pm$ 27	95 $\pm$ 11	92 $\pm$ 10	190 $\pm$ 11	188 $\pm$ 19
<b>DMA(III)/LPS</b>	135 $\pm$ 11	124 $\pm$ 5	55 $\pm$ 7	165 $\pm$ 16	103 $\pm$ 8



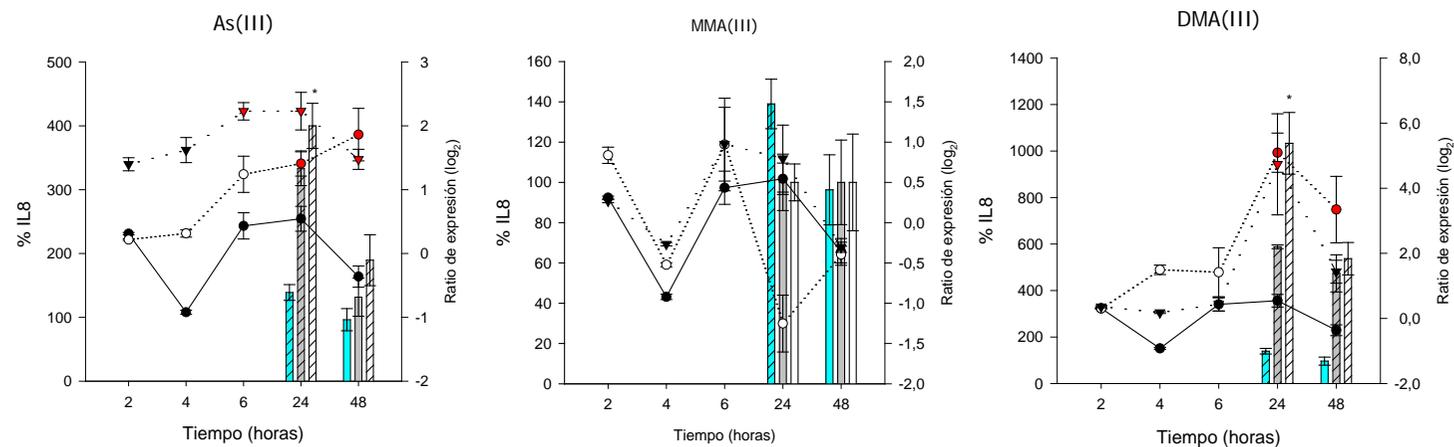
**Figura 1.** Niveles de TNF $\alpha$  en el medio de cultivo y cambios en la expresión tras tratamiento de As(III), MMA(III) y DMA(III). Las barras representan el porcentaje de TNF $\alpha$  en el medio de cultivo en relación a un control no tratado a distintos tiempos de tratamiento (eje izquierdo) [barras azules: LPS; barras grises: As(III), MMA(III) o DMA(III) y barras blancas: As(III)/LPS, MMA(III)/LPS o DMA(III)/LPS]. Las líneas representan cambios relativos en la expresión de *TNF $\alpha$*  [ratio de expresión ( $\log_2$ )] respecto a un control no tratado (eje derecho), tras tratamientos con LPS (línea continua, ●), As(III), MMA(III) o DMA(III) (línea punteada, ○) o As(III)/LPS, MMA(III)/LPS, DMA(III)/LPS (guión, ▼) (n=4-6). Los resultados significativos respecto al control sin tratamiento se indican con barras rayadas (niveles de citoquinas) y con las figuras de las líneas en color rojo (expresión génica) ( $p < 0.05$ ). Los resultados significativos en los porcentajes de secreción de TNF $\alpha$  de los tratamientos arsénico/LPS respecto a los tratamientos únicamente con arsénico se marcan con un asterisco sobre las barras ( $p < 0.05$ ).

### 6.1.2. Efecto del arsénico y del LPS sobre IL8

La tabla 2 presenta los valores, en pg/mg proteína, de IL8 en el medio de cultivo, tras los distintos tratamientos aplicados. La figura 2 muestra los cambios de los niveles de proteína IL8, así como los cambios en la expresión de ARNm de células Caco-2 expuestas a especies trivalentes, a LPS o a combinaciones de ambos. En general, la secreción de IL8 es más tardía que la de TNF $\alpha$ . Hasta las 24 horas de ensayo los niveles de esta citoquina están por debajo de los límites de cuantificación (LOQ) de la metodología (62.5 pg/mL). A partir de este tiempo, el tratamiento con As(III) y DMA(III) aumenta significativamente los niveles de esta citoquina en el medio de cultivo, siendo mayor la respuesta ocasionada por el DMA(III).

El LPS sólo afecta a los niveles de IL8 a las 24 horas, mientras que los tratamientos combinados As(III)/LPS y DMA(III)/LPS producen un incremento en los niveles de IL8 superiores al control a las 24 y 48 horas y superiores a los tratamientos únicamente con especie arsenical a las 24 horas. Tras el tratamiento con MMA(III) y su combinación con LPS, los valores de IL8 se encuentran por debajo del LOQ o igual al control.

Los cambios de expresión de ARNm de *IL8* coinciden con los cambios observados para el nivel proteico en el medio de cultivo. Así, se observan sobreexpresiones significativas de esta citoquina a partir de las 24 horas para As(III) y DMA(III). Las coexposiciones As(III)/LPS (24 horas) y DMA(III)/LPS (48 horas) producen un aumento de los niveles de ARNm de *IL8* respecto a las células tratadas únicamente con la especie arsenical.



**Figura 2.** Niveles de IL8 en el medio de cultivo y cambios en la expresión tras tratamiento de As(III), MMA(III) y DMA(III). Las barras representan el porcentaje de IL8 en el medio de cultivo en relación a un control no tratado a distintos tiempos de tratamiento (eje izquierdo) [barras rayadas: LPS; barras grises: As(III), MMA(III) o DMA(III) y barras blancas: As(III)/LPS, MMA(III)/LPS, DMA(III)/LPS]. Las líneas representan cambios relativos en la expresión de *IL8* [ratio de expresión (log<sub>2</sub>)] respecto a un control no tratado (eje derecho), tras tratamientos con LPS (línea continua, ●), As(III), MMA(III) o DMA(III) (línea punteada, ○) o As(III)/LPS, MMA(III)/LPS, DMA(III)/LPS (guión, ▼) (n=4-6). Los resultados significativos respecto al control sin tratamiento se indican con barras rayadas (niveles de citoquinas) y con las figuras de las líneas en color rojo (expresión génica) (p<0.05). Los resultados significativos en los porcentajes de secreción de TNFα de los tratamientos arsénico/LPS respecto a los tratamientos únicamente con arsénico se marcan con un asterisco sobre las barras (p<0.05).

**Tabla 2.** Niveles de IL8 (pg/mg proteína) tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones.

Tratamiento	IL8 (pg/mg proteína)				
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas	48 horas
control	< LOQ*			64 ± 15	95 ± 12
LPS				89 ± 8	92 ± 17
As(III)				212 ± 17	125 ± 20
As(III)/LPS				255 ± 23	180 ± 31
MMA(III)				< LOQ*	95 ± 15
MMA(III)/LPS				< LOQ*	< LOQ*
DMA(III)				375 ± 5	450 ± 76
DMA(III)/LPS				659 ± 85	510 ± 66

\*LOQ < 62.5 pg/ml

### 6.1.3. Efecto del arsénico y del LPS sobre IL6

La tabla 3 presenta los valores, en pg/mg proteína, de IL6 en el medio de cultivo, tras los distintos tratamientos aplicados. La figura 3 muestra los resultados de los niveles de IL6 en el medio de cultivo y cambios en la expresión génica para los distintos tratamientos realizados. Los cambios provocados por las formas arsenicales sobre la secreción de IL6 son menores que los observados para las otras citoquinas, no obstante, se observan incrementos significativos respecto a las células control para todas las especies. Los mayores incrementos ocurren a las 24 horas para el As(III) y a las 48 horas para el MMA(III) y DMA(III). Cabe destacar que tras 48 horas de tratamiento con As(III), los niveles de IL6 en el medio son significativamente inferiores a los del control.

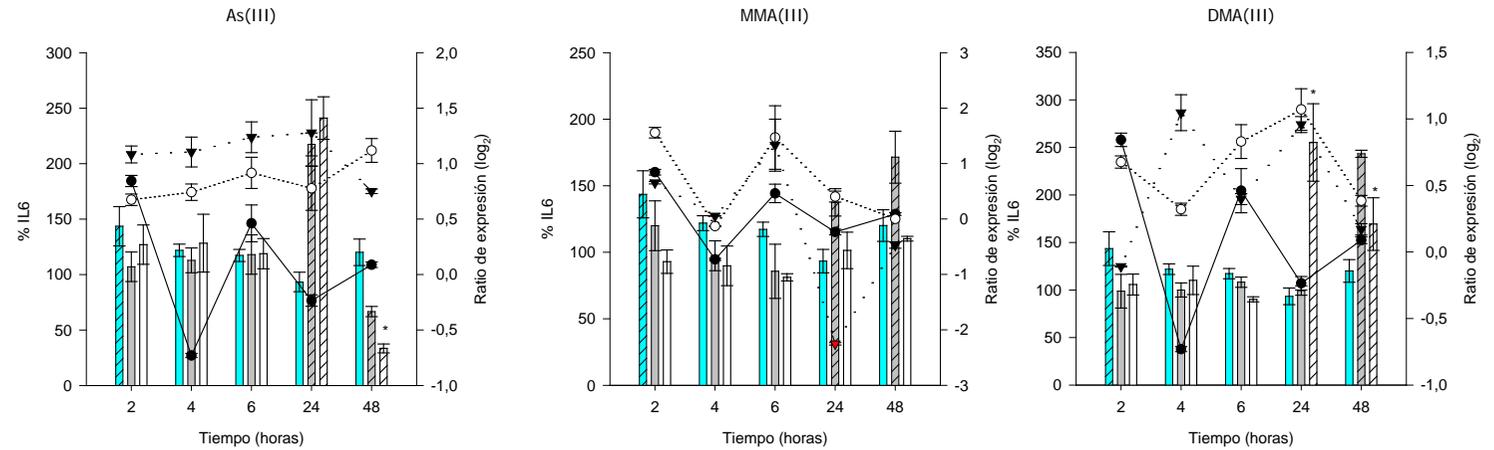
El LPS incrementa ligeramente la secreción de IL6 a las 2 horas, volviendo a las 4 horas a valores similares al control. En la mayoría de los tratamientos con arsénico/LPS no se modifica la respuesta respecto al tratamiento únicamente con arsénico, si bien existen cambios puntuales significativos. Cabe destacar la reducción significativa en los niveles de IL6 que se produce tras 48 horas de exposición al tratamiento combinado con

las tres especies arsenicales, y el aumento de IL6 tras 24 horas de exposición a DMA(III)/LPS.

Los tratamientos con las formas arsenicales, así como la combinación arsénico/LPS no modifican la expresión de *IL6*, a excepción de MMA(III)/LPS, que provoca un descenso a las 24 horas [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $-2.3 \pm 0.2$ ].

**Tabla 3.** Niveles de IL6 (pg/mg proteína) tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones.

Tratamiento	IL6 (pg/mg proteína)				
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas	48 horas
<b>control</b>	24 ± 3	27 ± 1	38 ± 3	101 ± 4	147 ± 14
<b>LPS</b>	35 ± 4	32 ± 1	44 ± 2	94 ± 9	177 ± 18
<b>As(III)</b>	26 ± 3	30 ± 3	45 ± 7	218 ± 10	98 ± 7
<b>As(III)/LPS</b>	31 ± 4	34 ± 7	45 ± 5	242 ± 19	49 ± 6
<b>MMA(III)</b>	29 ± 5	26 ± 3	32 ± 8	138 ± 10	253 ± 29
<b>MMA(III)/LPS</b>	22 ± 2	24 ± 4	31 ± 1	102 ± 14	162 ± 3
<b>DMA(III)</b>	24 ± 4	27 ± 2	41 ± 2	100 ± 5	359 ± 5
<b>DMA(III)/LPS</b>	25 ± 3	29 ± 4	34 ± 1	257 ± 41	250 ± 41

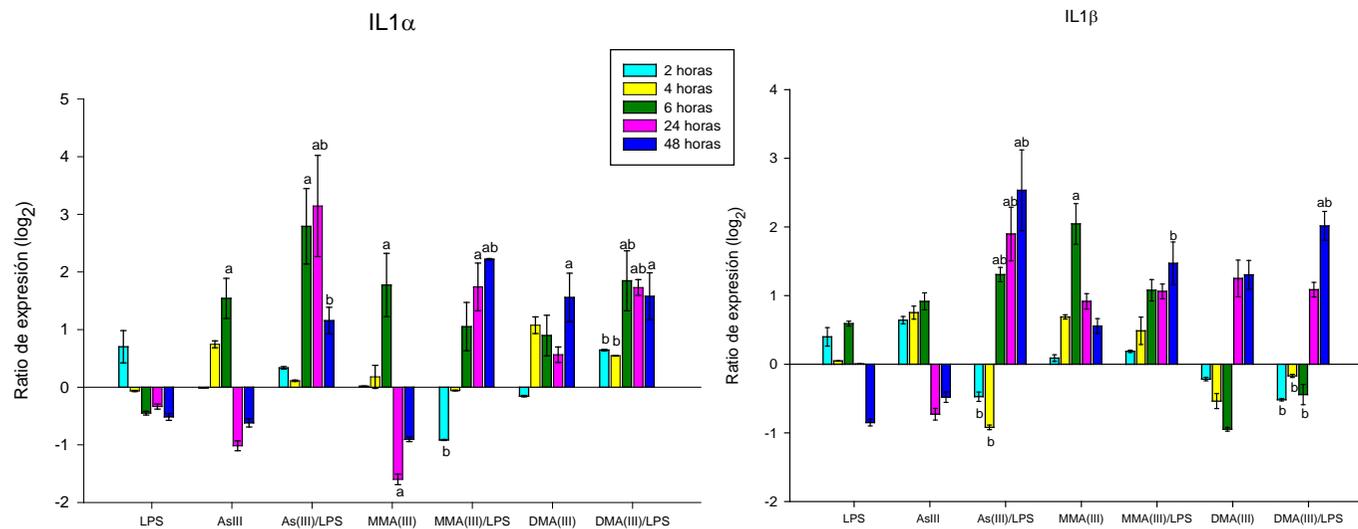


**Figura 3.** Niveles de IL6 en el medio de cultivo y cambios en la expresión tras tratamiento de As(III), MMA(III) y DMA(III). Las barras representan el porcentaje de IL6 en el medio de cultivo en relación a un control no tratado a distintos tiempos de tratamiento [barras rayadas: LPS; barras grises: As(III), MMA(III) o DMA(III) y barras blancas: As(III)/LPS, MMA(III)/LPS, DMA(III)/LPS]. Las líneas representan cambios relativos en la expresión de *IL6* [ratio de expresión ( $\log_2$ )] respecto a un control no tratado, tras tratamientos con LPS (línea continua, ●), As(III), MMA(III) o DMA(III) (línea punteada, ○) o As(III)/LPS, MMA(III)/LPS, DMA(III)/LPS (guión, ▼) (n=4-6). Los resultados significativos respecto al control sin tratamiento se indican con barras rayadas (niveles de citoquinas) y con las figuras de las líneas en color rojo (expresión génica) ( $p < 0.05$ ). Los resultados significativos en los porcentajes de secreción de TNF $\alpha$  de los tratamientos arsénico/LPS respecto a los tratamientos únicamente con arsénico se marcan con un asterisco sobre las barras ( $p < 0.05$ ).

#### 6.1.4. Efecto del As(III) sobre la expresión de *IL1 $\alpha$* e *IL1 $\beta$*

Las figura 4 muestra los cambios en expresión de *IL1 $\alpha$*  e *IL1 $\beta$*  de células Caco-2 expuestas a especies trivalentes, a LPS o a combinaciones de ambos. La expresión de *IL1 $\alpha$*  se induce significativamente con As(III) y MMA(III) tras 6 horas de tratamiento [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $1.5 \pm 0.6$  y  $1.8 \pm 0.7$ , respectivamente]. El DMA(III) causa también una sobreexpresión, si bien a las 48 horas [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $1.6 \pm 0.1$ ]. Respecto a *IL1 $\beta$* , el MMA(III) incrementa significativamente su expresión tras 6 horas de tratamiento [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $2 \pm 0.5$ ], no existiendo cambios significativos para As(III) y DMA(III).

El tratamiento con LPS no produce cambios significativos en los niveles de ARNm de ambas citoquinas, sin embargo, es capaz de modular la respuesta proinflamatoria de las células intestinales expuestas a las formas arsenicales. Así, todos los tratamientos combinados arsénico/LPS producen, respecto al tratamiento únicamente con arsénico, un incremento significativo en la expresión de *IL1 $\alpha$*  e *IL1 $\beta$*  a los tiempos superiores de ensayo (24 y/o 48 horas). La mayor respuesta se observa para el tratamiento con As(III)/LPS [ratio de expresión ( $\log_2$ ): *IL1 $\alpha$* , 24 horas:  $3.1 \pm 0.8$ ; *IL1 $\beta$* , 48 horas:  $2.5 \pm 0.6$ ].



**Figura 4.** Niveles de expresión relativa de *IL1 $\alpha$*  e *IL1 $\beta$*  en células Caco-2 expuestas a distintos tratamientos con arsénico, LPS o combinaciones de ambos. Las barras representan los cambios en expresión [ratio de expresión ( $\log_2$ )] a las 2, 4, 6, 24 y 48 horas, respecto a controles mantenidos el mismo tiempo pero no expuestos a ningún tratamiento (n=4-6). Los cambios significativos respecto al control se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b) ( $p < 0.05$ ).

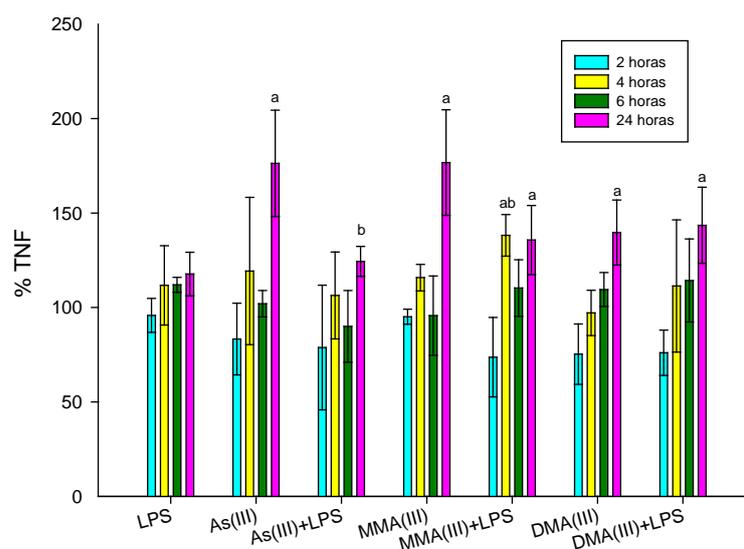
## 6.2. Efectos inflamatorios del arsénico sobre el modelo *in vitro* Caco-2/PBMC

Los ensayos realizados en el presente apartado se han llevado a cabo con dosis subletales de arsénico [1  $\mu$ M de As(III) y DMA(III); 0.1  $\mu$ M de MMA(III)], LPS (10 ng/mL) o combinaciones de ambos arsénico/LPS a las concentraciones descritas anteriormente. En todos los casos se han expuesto los cultivos durante 2, 4, 6 y 24 horas. Tras el tratamiento en sistemas Transwell<sup>®</sup> se han recuperado los medios apical y basal, y se ha cuantificado el nivel de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL8 y IL6. Adicionalmente se ha evaluado el nivel de expresión de ARNm de citoquinas en Caco-2 (TNF $\alpha$ , IL8 e IL6) y en PMBC (TNF $\alpha$ , IL8, IL6, IL10 e IL13).

### 6.2.1. Niveles proteicos de citoquinas proinflamatorias en el compartimento apical

Las figuras 5, 6 y 7 muestran los porcentajes de TNF $\alpha$ , IL8 e IL6, respectivamente, secretados al medio apical tras los tratamientos aplicados, respecto los niveles de estas citoquinas en cocultivos Caco-2/PBMC no tratados. Las tablas 4, 5 y 6 se presentan los contenidos de estas citoquinas en pg/mg de proteína.

Todas las especies arsenicales producen aumentos significativos de la citoquina TNF $\alpha$  en el compartimento apical a las 24 horas de tratamiento (figura 5, tabla 4). Estos incrementos son más acentuados en los tratamientos con As(III) y MMA(III) que con DMA(III). A tiempos inferiores, únicamente el MMA(III) tras 4 horas de exposición incrementa significativamente el contenido de TNF $\alpha$  en el medio. El tratamiento con LPS no provoca una respuesta significativa a los tiempos ensayados. Su combinación con las formas arsenicales sólo afecta a la respuesta MMA(III)/LPS, que respecto a MMA(III), incrementa los niveles de TNF $\alpha$  en el medio a las 4 horas de tratamiento, y a la respuesta As(III)/LPS, que disminuye respecto a As(III) los niveles de TNF $\alpha$  en el medio a las 24 horas de tratamiento.

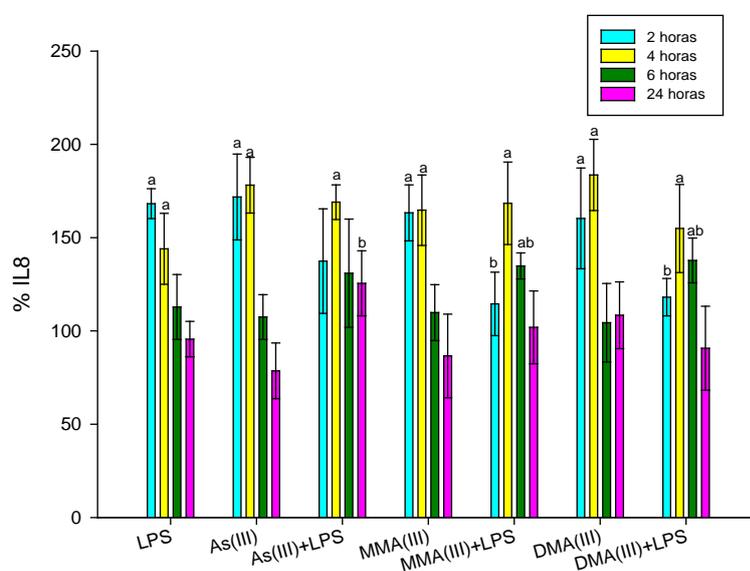


**Figura 5.** Porcentaje de liberación de TNF $\alpha$  en el medio apical, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico y combinaciones de ambos, calculado respecto a los niveles de TNF $\alpha$  en el medio apical de muestras control sin ningún tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=4-6). Los cambios significativos (p<0.05) respecto al control se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b).

**Tabla 4.** Niveles de TNF $\alpha$  (pg/mg proteína) en el medio apical del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones.

Tratamientos	TNF $\alpha$ (pg/mg proteína)			
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
Control	217 $\pm$ 25	149 $\pm$ 16	148 $\pm$ 31	87 $\pm$ 13
LPS	208 $\pm$ 19	167 $\pm$ 31	165 $\pm$ 6	102 $\pm$ 10
As(III)	180 $\pm$ 41	178 $\pm$ 58	151 $\pm$ 10	153 $\pm$ 24
As(III)/LPS	171 $\pm$ 71	159 $\pm$ 34	133 $\pm$ 28	108 $\pm$ 7
MMA(III)	206 $\pm$ 9	173 $\pm$ 10	141 $\pm$ 31	154 $\pm$ 24
MMA(III)/LPS	160 $\pm$ 45	206 $\pm$ 16	163 $\pm$ 22	118 $\pm$ 16
DMA(III)	163 $\pm$ 35	145 $\pm$ 18	162 $\pm$ 13	122 $\pm$ 15
DMA(III)/LPS	165 $\pm$ 26	166 $\pm$ 62	169 $\pm$ 32	125 $\pm$ 18

En cuanto a IL8, la mayoría de los tratamientos (arsénico, LPS, arsénico/LPS) incrementan su nivel, respecto al control, en el medio apical tras 2 y 4 horas (figura 6, tabla 5). A partir de este tiempo los valores de IL8 retornan a niveles similares a los hallados en el control. La coexposición a As(III)/LPS aumenta significativamente la liberación de IL8 al medio apical a las 24 horas, respecto al tratamiento con As(III). Este efecto se observa a las 6 horas con el tratamiento DMA(III)/LPS y MMA(III)/LPS. En algunos tratamientos combinados a ciertos tiempos, por el contrario, se observan contenidos de IL8 menores que los obtenidos para los tratamientos únicamente con las formas arsenicales. Esta reducción es significativa a las 2 horas de exposición a DMA(III)/LPS y MMA(III)/LPS.

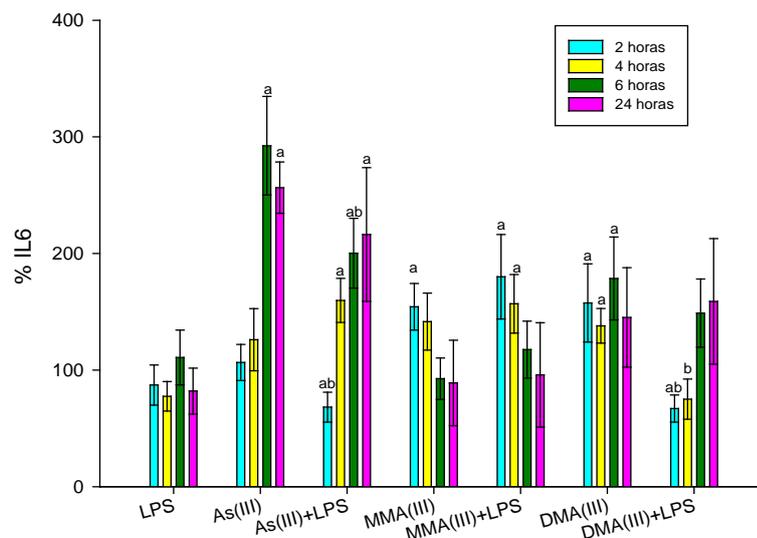


**Figura 6.** Porcentaje de liberación de IL8 en el medio apical, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico y combinaciones de ambos, calculado respecto a los niveles de IL8 en el medio apical de muestras control sin ningún tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=4-6). Los resultados significativos ( $p < 0.05$ ) se indican en el texto. Los cambios significativos respecto al control se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b).

**Tabla 5.** Niveles de IL8 (pg/mg proteína) en el medio apical del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones.

Tratamientos	IL8 (pg/mg proteína)			
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
<b>Control</b>	829 ± 212	819 ± 117	1019 ± 115	21597 ± 8906
<b>LPS</b>	1394 ± 66	1179 ± 156	1149 ± 177	20647 ± 846
<b>As(III)</b>	1424 ± 191	1459 ± 122	1094 ± 122	16975 ± 1327
<b>As(III)/LPS</b>	1139 ± 232	1384 ± 76	1334 ± 296	27104 ± 1550
<b>MMA(III)</b>	1354 ± 124	1349 ± 155	1119 ± 153	18703 ± 1995
<b>MMA(III)/LPS</b>	949 ± 141	1379 ± 181	1374 ± 71	22007 ± 1737
<b>DMA(III)</b>	1329 ± 224	1504 ± 156	1064 ± 214	23411 ± 1594
<b>DMA(III)/LPS</b>	979 ± 83	1269 ± 193	1404 ± 122	19588 ± 2004

En cuanto a los contenidos de IL6 liberados al medio apical (figura 7, tabla 6), no se modifican tras el tratamiento con LPS a ninguno de los tiempos estudiados. El mayor incremento se produce tras 6 horas de tratamiento con As(III), existiendo también un aumento significativo a las 24 horas de exposición. Las células tratadas con MMA(III) y DMA(III) producen un menor incremento en los niveles de IL6 que el As(III), con valores significativos respecto al control a las 2 horas para el MMA(III) y hasta las 6 horas para el DMA(III). La introducción de LPS en los tratamientos con arsénico no conlleva una mayor liberación de IL6 en relación a las células tratadas sólo con las formas arsenicales. Se observa, sin embargo, una reducción en el nivel de IL6 que resulta significativa para el As(III)/LPS a las 2 y 6 horas y para el DMA(III)/LPS a las 2 y 4 horas.



**Figura 7.** Porcentaje de liberación de IL6 en el medio apical, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico y combinaciones de ambos, calculado respecto a los niveles de IL6 en el medio apical de muestras control sin ningún tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=4-6). Los cambios significativos ( $p < 0.05$ ) respecto al control se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b).

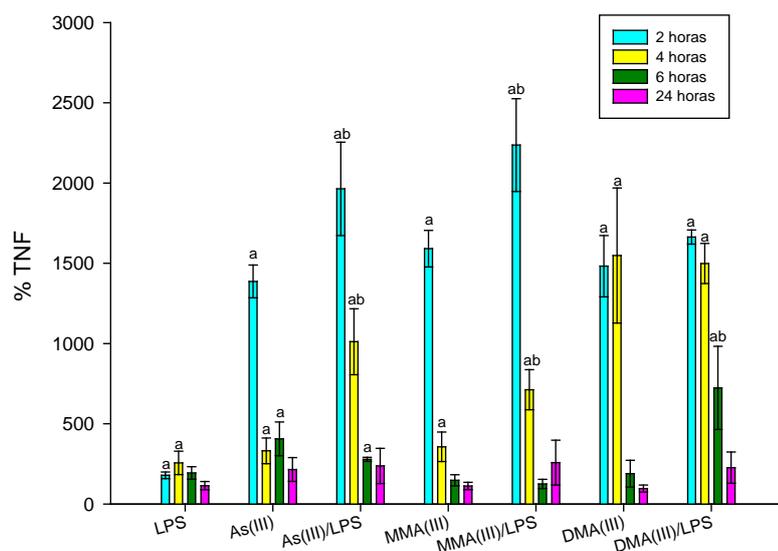
**Tabla 6.** Niveles de IL6 (pg/mg proteína) en el medio apical del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones.

Tratamientos	IL6 (pg/mg proteína)			
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
Control	356 $\pm$ 48	389 $\pm$ 86	360 $\pm$ 20	887 $\pm$ 177
LPS	310 $\pm$ 62	302 $\pm$ 49	399 $\pm$ 84	727 $\pm$ 175
As(III)	380 $\pm$ 55	491 $\pm$ 104	1053 $\pm$ 152	2275 $\pm$ 196
As(III)/LPS	243 $\pm$ 31	622 $\pm$ 73	721 $\pm$ 108	1918 $\pm$ 509
MMA(III)	550 $\pm$ 71	551 $\pm$ 95	333 $\pm$ 64	789 $\pm$ 325
MMA(III)/LPS	641 $\pm$ 129	611 $\pm$ 98	423 $\pm$ 88	850 $\pm$ 398
DMA(III)	561 $\pm$ 119	537 $\pm$ 58	643 $\pm$ 128	1287 $\pm$ 379
DMA(III)/LPS	239 $\pm$ 41	292 $\pm$ 67	536 $\pm$ 105	1409 $\pm$ 477

### 6.2.2. Niveles proteicos de citoquinas proinflamatorias en el compartimento basal

Las figuras 8, 9 y 10 muestran los porcentajes de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL8 e IL6) en el medio basolateral de los cocultivos Caco-2/PBMC en respuesta a los tratamientos con arsénico, LPS o combinaciones arsénico/LPS (porcentajes calculados respecto a las células control). En las tablas 7, 8 y 9 se presentan los contenidos de estas citoquinas en pg/mg de proteína. En general, la liberación de citoquinas a lado basolateral es muy superior a la observada en el lado apical.

TNF $\alpha$  es la citoquina con mayores cambios en respuesta a los tratamientos con las distintas formas arsenicales, especialmente a tiempos cortos (figura 8, tabla 9). Los incrementos tras 2 horas son similares para todas las especies (1387 - 1591%). El LPS produce incrementos en los valores de TNF $\alpha$  a 2, 4 y 6 horas, sin embargo, estos aumentos, especialmente a las 2 y 4 horas, son inferiores a los obtenidos para las células expuestas a las formas arsenicales. En los tratamientos combinados arsénico/LPS se observa un aumento en la respuesta respecto a los tratamientos con la forma arsenical para As(III)/LPS y MMA(III)/LPS a las 2 y 4 horas, y para DMA(III)/LPS a las 6 horas.

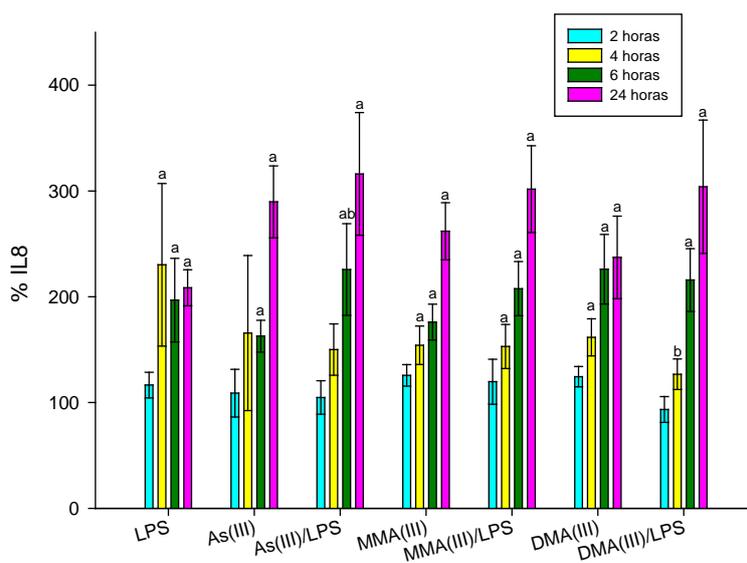


**Figura 8.** Porcentaje de liberación de TNF $\alpha$  en el medio basal, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico y combinaciones de ambos, calculado respecto a los niveles de TNF $\alpha$  en el medio basal de muestras control sin ningún tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=4-6). Los cambios significativos ( $p < 0.05$ ) respecto al control se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b).

**Tabla 7.** Niveles de TNF $\alpha$  (pg/mg proteína) en el medio basal del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones.

Tratamientos	TNF $\alpha$ (pg/mg proteína)			
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
Control	25 $\pm$ 12	37 $\pm$ 20	77 $\pm$ 24	3004 $\pm$ 1279
LPS	45 $\pm$ 5	96 $\pm$ 27	150 $\pm$ 53	3431 $\pm$ 781
As(III)	347 $\pm$ 26	124 $\pm$ 30	315 $\pm$ 81	6451 $\pm$ 2026
As(III)/LPS	491 $\pm$ 73	379 $\pm$ 77	215 $\pm$ 10	7131 $\pm$ 3092
MMA(III)	398 $\pm$ 29	133 $\pm$ 34	115 $\pm$ 27	3373 $\pm$ 691
MMA(III)/LPS	559 $\pm$ 72	267 $\pm$ 47	97 $\pm$ 22	7734 $\pm$ 4197
DMA(III)	371 $\pm$ 48	580 $\pm$ 158	146 $\pm$ 64	2880 $\pm$ 661
DMA(III)/LPS	416 $\pm$ 11	561 $\pm$ 47	561 $\pm$ 201	6805 $\pm$ 2919

Los niveles de IL8 en el lado basal también se incrementan con los tratamientos aplicados respecto a un control no tratado, incluido el LPS (figura 9, tabla 8). Los cambios no son tan marcados (< 300%) como para el TNF $\alpha$ , se manifiestan más tarde (entre 4 y 24 horas) y se incrementan con el tiempo. Los valores máximos se detectan a las 24 horas y son similares para las tres especies arsenicales. No se observan diferencias importantes entre los tratamientos individuales y las co-exposiciones con LPS.

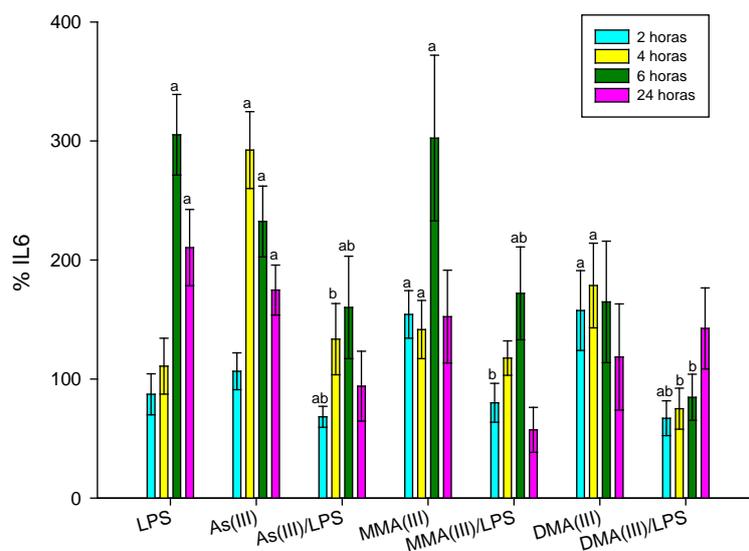


**Figura 9.** Porcentaje de liberación de IL8 en el medio basal, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico y combinaciones de ambos, calculado respecto a los niveles de IL8 en el medio basal de muestras control sin ningún tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=4-6). Los cambios significativos ( $p < 0.05$ ) respecto al control se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b).

**Tabla 8.** Niveles de IL8 (pg/mg proteína) en el medio basal del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones.

	<b>IL8</b> (pg/mg proteína)			
	<b>2 horas</b>	<b>4 horas</b>	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>Control</b>	2760 ± 329	3529 ± 805	2073 ± 793	15709 ± 3234
<b>LPS</b>	3215 ± 334	8124 ± 2713	4079 ± 818	327252 ± 2671
<b>As(III)</b>	3005 ± 622	5846 ± 2586	3373 ± 311	45512 ± 5341
<b>As(III)/LPS</b>	2892 ± 437	5295 ± 855	4679 ± 897	49655 ± 9111
<b>MMA(III)</b>	3469 ± 280	5439 ± 642	3648 ± 351	41150 ± 4241
<b>MMA(III)/LPS</b>	3303 ± 588	5399 ± 734	4304 ± 530	47392 ± 6441
<b>DMA(III)</b>	3435 ± 265	5702 ± 618	4685 ± 681	37262 ± 6127
<b>DMA(III)/LPS</b>	2579 ± 337	4472 ± 508	4472 ± 615	47751 ± 9897

Los niveles de citoquina IL6 en el compartimento basal presentan también cambios respecto al control tras la estimulación con LPS siendo la citoquina más inducida por este compuesto (figura 10, tabla 9). Por lo que respecta a los tratamientos con especies arsenicales, todas ellos producen un incremento en los niveles de citoquina, con valores máximos, en porcentaje respecto al control, a las 4 horas de exposición para As(III) y a las 6 horas para MMA(III). En los tratamientos conjuntos arsénico/LPS se observa un descenso en los niveles de IL6 respecto a los tratamientos únicamente con arsénico. Este efecto es significativo en la mayoría de los tiempos y tratamientos.



**Figura 10.** Porcentaje de liberación de IL6 en el medio basal, tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico y combinaciones de ambos, calculado respecto a los niveles de IL6 en el medio basal de muestras control sin ningún tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=4-6). Los cambios significativos respecto al control ( $p < 0.05$ ) se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b).

**Tabla 9.** Niveles de IL6 (pg/mg proteína) en el medio basal del cocultivo Caco-2/PBMC tras distintos tratamientos con LPS, especies arsenicales y combinaciones.

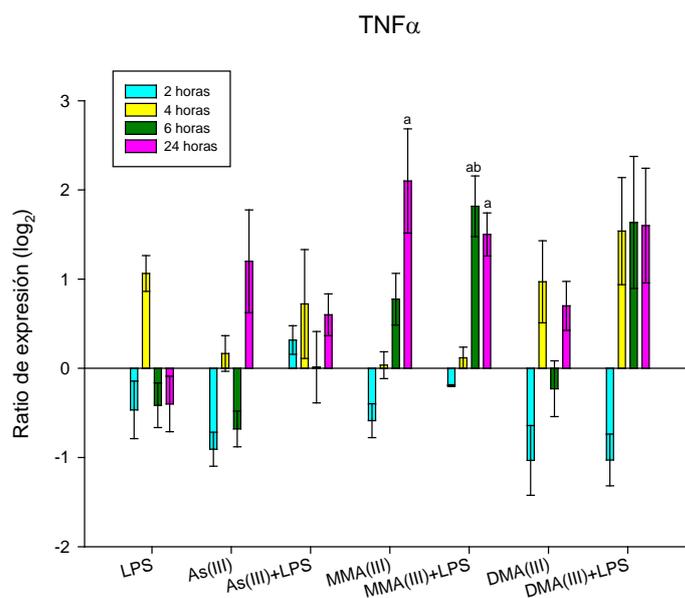
Tratamientos	IL6 (pg/mg proteína)			
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
<b>Control</b>	356 $\pm$ 48	398 $\pm$ 106	256 $\pm$ 65	1434 $\pm$ 238
<b>LPS</b>	310 $\pm$ 62	432 $\pm$ 91	782 $\pm$ 87	3019 $\pm$ 459
<b>As(III)</b>	380 $\pm$ 55	1139 $\pm$ 126	595 $\pm$ 76	2507 $\pm$ 301
<b>As(III)/LPS</b>	243 $\pm$ 31	520 $\pm$ 117	410 $\pm$ 110	1349 $\pm$ 421
<b>MMA(III)</b>	550 $\pm$ 71	551 $\pm$ 95	775 $\pm$ 178	2186 $\pm$ 560
<b>MMA(III)/LPS</b>	285 $\pm$ 58	458 $\pm$ 56	441 $\pm$ 100	822 $\pm$ 271
<b>DMA(III)</b>	561 $\pm$ 119	695 $\pm$ 138	422 $\pm$ 131	1701 $\pm$ 640
<b>DMA(III)/LPS</b>	239 $\pm$ 52	292 $\pm$ 67	217 $\pm$ 50	2045 $\pm$ 488

6.2.3. Cambios en la expresión de ARNm de *TNF $\alpha$* , *IL8* e *IL6* en células Caco-2 en cocultivo con PBMC

La figura 11 muestra los cambios en la expresión de *TNF $\alpha$* , *IL8* e *IL6* en células Caco-2 tras la exposición del cocultivo a LPS, especies arsenicales trivalentes o combinaciones. Los cambios significativos en la expresión de las distintas citoquinas entre tratamientos con arsénico y arsénico/LPS no se han considerado en el caso que ninguno de los dos presente diferencias significativas respecto al control.

Los cambios en respuesta a LPS son poco remarcables, con un ligero incremento en la expresión de *IL8* [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $1.5 \pm 0.3$ ] a las 6 horas de tratamiento.

En cuanto a las formas arsenicales, el As(III) produce incrementos en la expresión de *IL8* e *IL6* a las 4 y 6 horas de exposición, con aumentos especialmente importantes para *IL8* [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre 4.9 y 9.5]. El tratamiento combinado As(III)/LPS, en general disminuye la respuesta a estos tiempos, hasta valores semejantes al control. El tratamiento con MMA(III) produce un incremento significativo en la expresión de *TNF $\alpha$*  tras 24 horas y de *IL6* tras 2 horas, mientras que para *IL8* una regulación a la baja a las 6 horas de tratamiento. La combinación MMA(III)/LPS aumenta la expresión de *TNF $\alpha$*  respecto al control a las 6 y 24 horas. Respecto al tratamiento con MMA(III), la combinación MMA(III)/LPS incrementa la expresión de *TNF $\alpha$*  e *IL8* (6 horas) y reduce la expresión de *IL6* a las 2 horas. El DMA(III) no incrementa la expresión de ninguna citoquina, mientras que el tratamiento combinado DMA(III)/LPS aumenta únicamente la expresión de *IL8* a las 6 horas, tanto respecto al control como al tratamiento únicamente con DMA(III).



**Figura 11.** Ratio de expresión ( $\log_2$ ) de ARNm de *TNF $\alpha$* , *IL8* e *IL6* en células Caco-2 tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico y combinaciones de ambos. Los valores para cada tratamiento se comparan con los niveles de ARNm de muestras control sin ningún tratamiento pero mantenidas el mismo tiempo en cultivo. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=6-8). Los cambios significativos ( $p < 0.05$ ) respecto al control se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b).

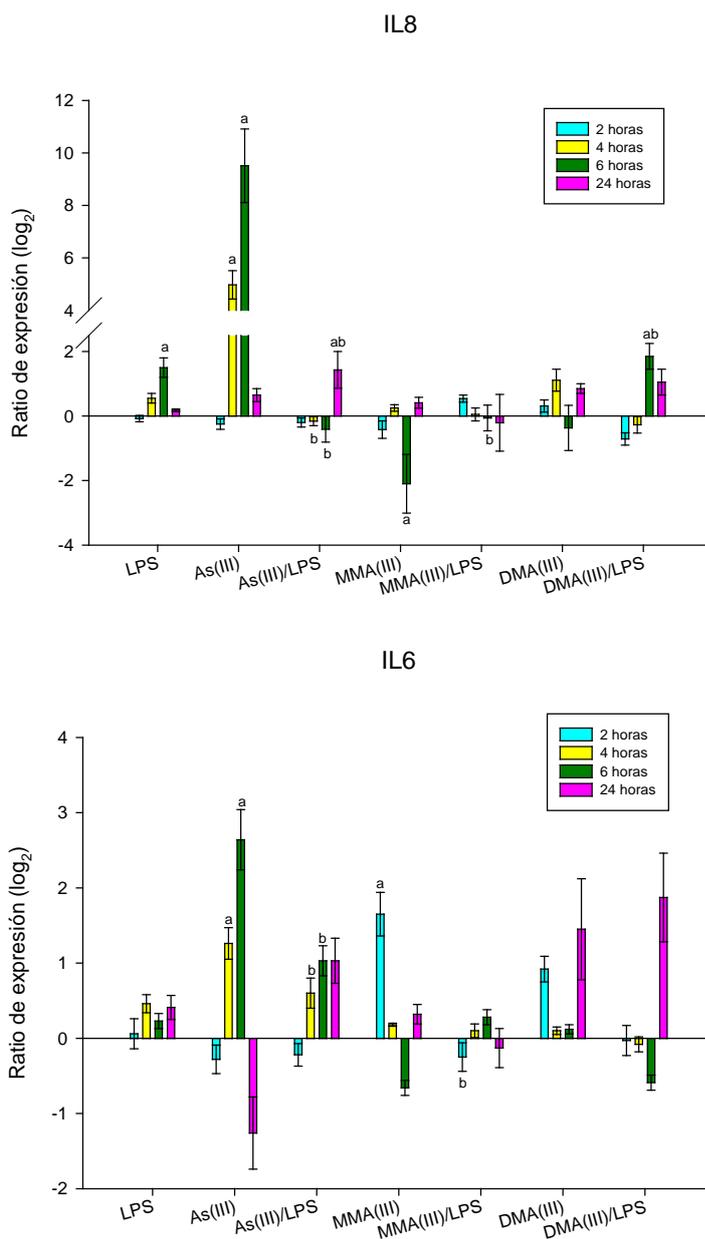
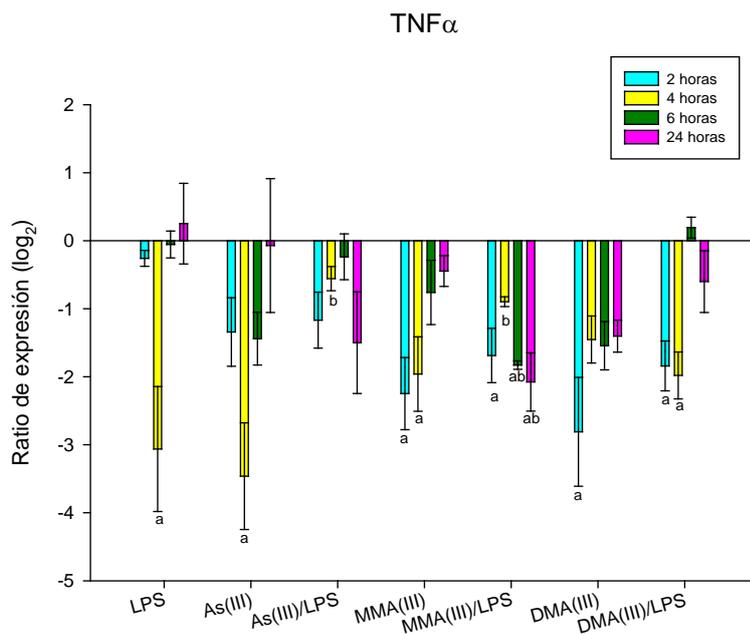


Figura 11. Continuación.

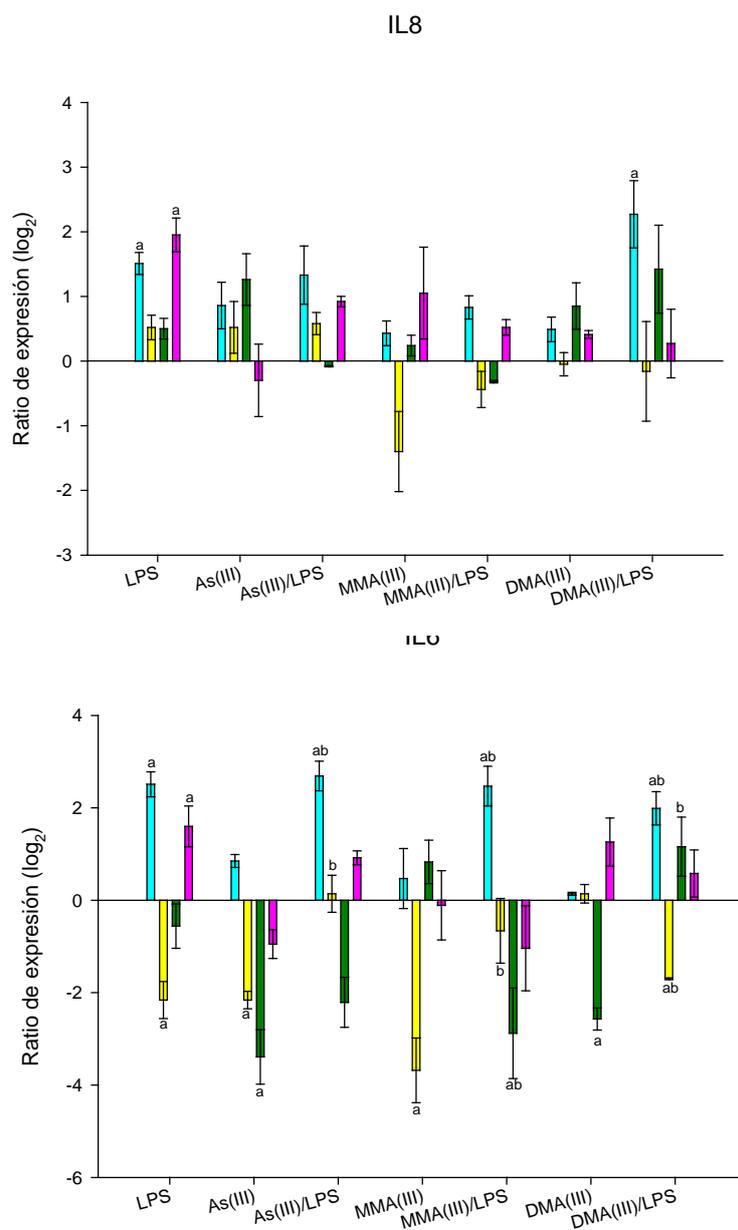
#### 6.2.4. Cambios en la expresión de ARNm de *TNF $\alpha$* , *IL8* e *IL6* en PBMC en cocultivo con Caco-2

La figura 12 muestra los cambios en la expresión de *TNF $\alpha$* , *IL8* e *IL6* en el medio apical del cocultivo Caco-2/PBMC tras la aplicación de LPS, especies arsenicales trivalentes o combinaciones arsénico/LPS.

Los cambios en la expresión de las citoquinas en los PBMC varían en función de la citoquina estudiada. De modo general, existe una reducción en la expresión de *TNF $\alpha$*  en todos los tratamientos aplicados, especialmente importante para LPS y As(III) [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre -3.1 y -3.4]. Los cambios en la expresión de *IL8* son solamente destacables para el tratamiento con LPS tras 2 y 24 horas de exposición [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre 1.5 y 1.9] y para el tratamiento combinado DMA(III)/LPS a las 2 horas [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $2.3 \pm 0.9$ ]. Para la *IL6* se observa, en general para los tratamientos con LPS y arsénico/LPS un incremento en la expresión a 2 horas, comparado con el control. A este tiempo también se observa una tendencia a incrementar la expresión respecto a los tratamientos únicamente con arsénico. A tiempos superiores, tanto los tratamientos con LPS, como con arsénico y las combinaciones tienden a reducir la expresión de *IL6* [4-6 horas, ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre -2.6 y -3.7].



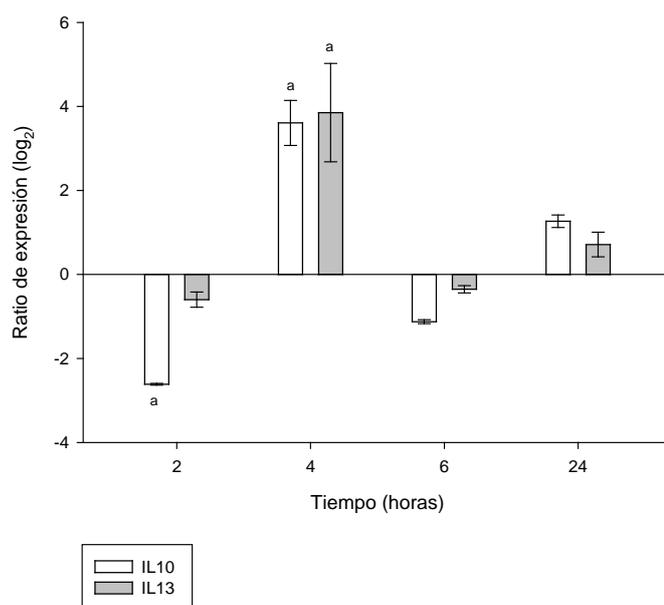
**Figura 12.** Ratio de expresión ( $\log_2$ ) de ARNm de *TNF $\alpha$* , *IL8* e *IL6* en PBMC tras exposiciones a distintos tiempos a LPS, arsénico y combinaciones de ambos. Los valores para cada tratamiento se comparan con los niveles de ARNm de muestras control sin ningún tratamiento pero mantenidas el mismo tiempo en cultivo. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=6-8). Los resultados significativos respecto al control ( $p < 0.05$ ) se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b).



**Figura 12.** Continuación.

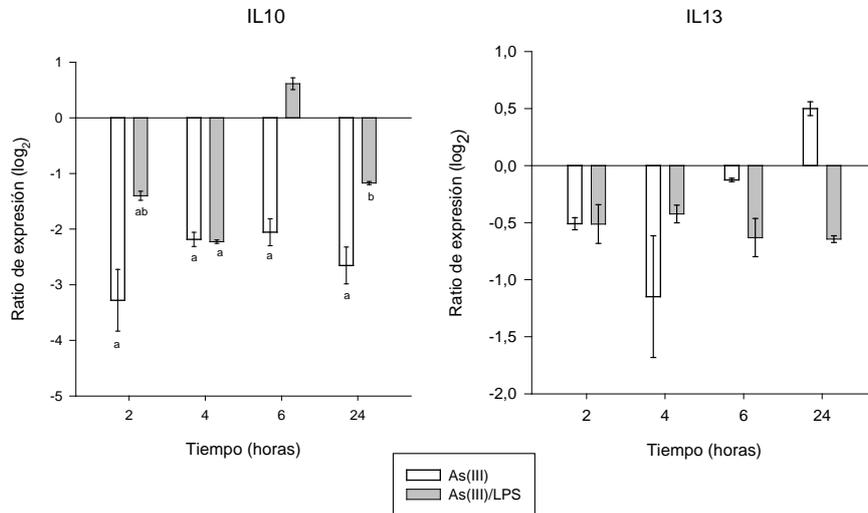
6.2.5. Cambios en la expresión de ARNm de *IL10* e *IL13* en PBMC

La figura 13 muestra los cambios en los niveles de ARNm para *IL10* e *IL13* en los PBMC del cocultivo, tras los distintos tratamientos. Los resultados obtenidos muestran que el LPS reduce la expresión de *IL10* a las 2 horas [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $2.6 \pm 0.02$ ] mientras que a las 4 horas es capaz de inducir la expresión de *IL10* e *IL13* [ratio de expresión ( $\log_2$ ) =  $3.6 \pm 0.5$  y  $3.8 \pm 1$ , respectivamente] (figura 13).



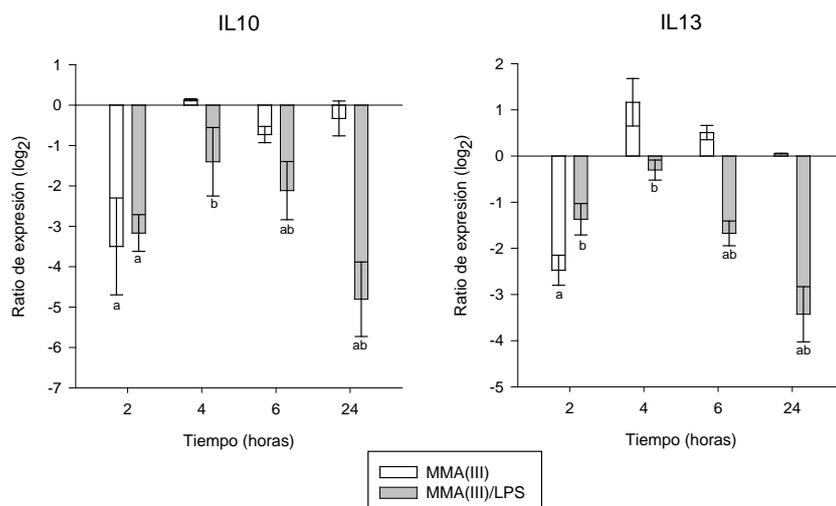
**Figura 13.** Ratio de expresión ( $\log_2$ ) de ARNm de *IL10* e *IL13* en PBMC tras exposición a LPS. Los valores para cada tratamiento se comparan con los niveles de ARNm de muestras control sin ningún tratamiento pero mantenidas el mismo tiempo en cultivo. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=6-8). Los resultados significativos ( $p < 0.05$ ) se marcan con una (a).

La figura 14 muestra los cambios de expresión de ARNm tras los tratamientos con As(III) o As(III)/LPS. Existe una tendencia a la reducción en la expresión de *IL10* e *IL13* con ambos tratamientos, si bien la respuesta sólo es significativa para *IL10*.



**Figura 14.** Ratio de expresión (log<sub>2</sub>) de ARNm de *IL10* e *IL13* en PBMC tras exposición a As(III) y As(III)/LPS. Las barras representan la media ± desviación estándar (n=6-8). Los resultados significativos respecto al control (p<0.05) se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b).

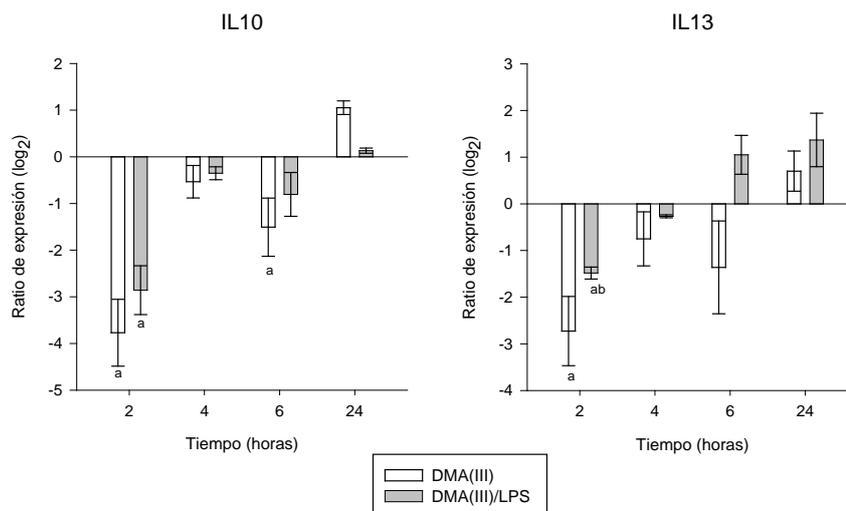
El MMA(III) produce en la mayoría de los casos una reducción significativa en los niveles de ambas citoquinas (figura 15). La mayor reducción se produce para la *IL10* a las 2 horas [ratio de expresión (log<sub>2</sub>) = -3.5 ± 0.03]. El tratamiento combinado MMA(III)/LPS produce un descenso más marcado en los niveles de ARNm de ambas citoquinas que el tratamiento con MMA(III), especialmente a las 24 horas. Nuevamente, la citoquina *IL10* es la que presenta el mayor descenso de expresión [24 horas; ratio de expresión (log<sub>2</sub>) = -4.8 ± 0.5].



\*

**Figura 15.** Ratio de expresión ( $\log_2$ ) de ARNm de *IL10* e *IL13* en PBMC tras exposición a MMA(III) y MMA(III)/LPS. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=6-8$ ). Los resultados significativos respecto al control ( $p<0.05$ ) se marcan con una (a) y respecto al tratamiento únicamente con especie arsenical con una (b).

Los cambios en las citoquinas ocasionados por los tratamientos con DMA(III) y DMA(III)/LPS se presentan en la figura 16. Tras el tratamiento con DMA(III) existe una reducción en la expresión de *IL10* e *IL13* [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre -2.7 y -3.8] a las 2 horas de exposición. El tratamiento DMA(III)/LPS reduce los niveles de ARNm hasta las 24 horas de exposición [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre -2.9 y -1.5], aunque este descenso es menor al observado para el DMA(III).



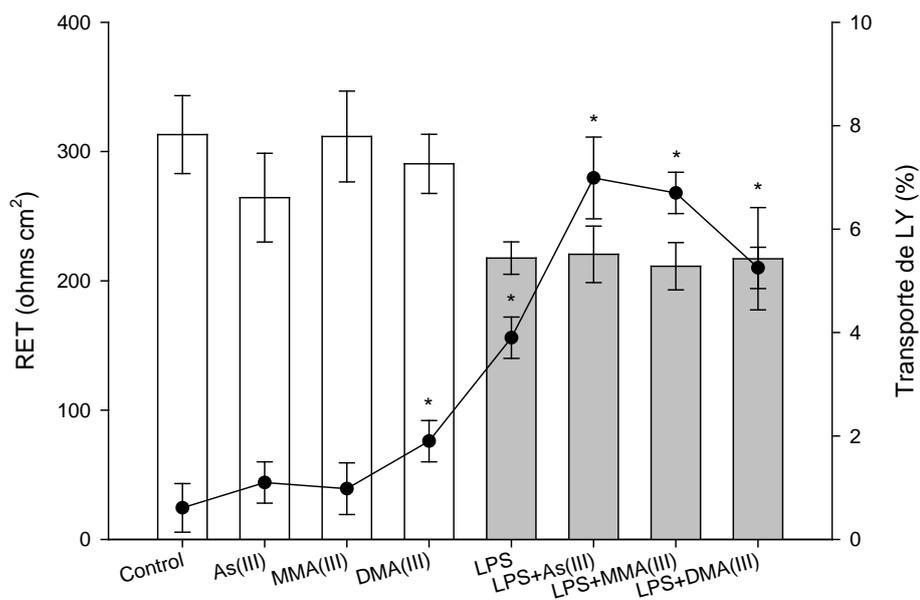
**Figura 16.** Ratio de expresión (log<sub>2</sub>) de ARNm de *IL10* e *IL13* en PBMC tras exposición a DMA(III) y DMA(III)/LPS. Las barras representan la media ± desviación estándar (n=6-8). Los resultados significativos (p<0.05) se marcan con un asterisco.

#### 6.2.6. Valores de RET y transporte de lucifer yellow en los cocultivos Caco-2/PBMC

La figura 17 muestra los valores de RET de la monocapa celular formada por Caco-2 y el transporte de LY al compartimento basolateral en el cocultivo Caco-2/PBMC para los distintos tratamientos ensayados. Los valores de estos parámetros en el control Caco-2 /PBMC (RET:  $263 \pm 30 \Omega \text{ cm}^2$ , transporte de LY:  $0.6 \pm 0.5\%$ ) son similares a los obtenidos en el capítulo 3 para los controles de monocultivos Caco-2 sembrados en Transwells® (RET:  $313 \pm 30 \Omega \text{ cm}^2$ ; transporte de LY:  $0.5 \pm 0.02 \%$ ).

Los tratamientos individuales con especies arsenicales no afectan la RET. Por el contrario el tratamiento con LPS o especie arsenical/LPS produce un descenso significativo de la RET ( $179\text{-}196 \Omega \text{ cm}^2$ ) respecto al control no tratado y a las exposiciones únicamente a especie arsenical, sin diferencias significativas entre tratamientos.

Respecto al transporte de LY, As(III) y MMA(III) no afectan a este parámetro, mientras que las células tratadas con DMA(III) muestran un aumento significativo en su transporte ( $1.9 \pm 0.4\%$ ) respecto al control no tratado ( $0.6 \pm 0.5\%$ ). El tratamiento con LPS, así como las combinaciones arsénico/LPS también aumentan el transporte de LY, siendo los tratamientos conjuntos los que producen un mayor incremento.

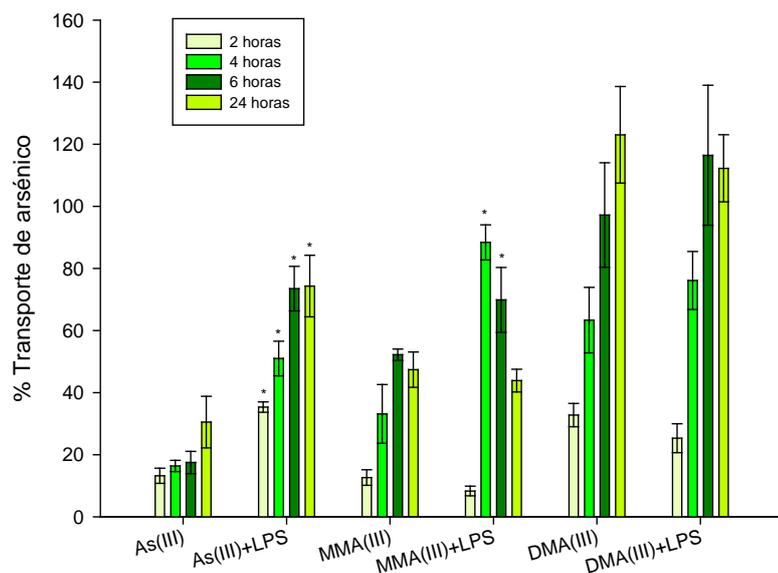


**Figura 17.** Valores de RET (barras; eje izquierdo) y porcentaje de transporte de lucifer yellow al compartimento basolateral (línea continua; eje derecho), tras tratamientos con LPS, especies arsenicales trivalentes y combinaciones durante 24 horas. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=4-6). Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control no tratado se marcan en gris (barras) o con un asterisco (línea)

### 6.2.7. Transporte apical-basolateral de especies arsenicales en cocultivos Caco-2/PBMC

La figura 18 muestra los contenidos de arsénico en el lado basolateral a distintos tiempos de exposición del cocultivo Caco-2/PBMC a As(III), MMA(III), DMA(III) y combinaciones de estas especies arsenicales con LPS.

Los porcentajes de transporte de las formas arsenicales muestran la gradación DMA(III)>MMA(III)>As(III). La presencia de LPS modifica el transporte de la forma inorgánica y monometilada. El tratamiento con As(III)/LPS presenta a todos los tiempos un transporte significativamente superior al observado en células tratadas sólo con As(III), con un máximo a las 6 horas [As(III):  $31 \pm 6$  ng/mg proteína; As(III)/LPS:  $113 \pm 11$  ng/mg proteína]. La coexposición MMA(III)/LPS aumenta el transporte de esta forma arsenical a las 4 horas [MMA(III):  $8 \pm 2$  ng/mg proteína; MMA(III)/LPS:  $21 \pm 1$  ng/mg proteína] y 6 horas [MMA(III):  $12 \pm 0.4$  ng/mg proteína; MMA(III)/LPS:  $17 \pm 2$  ng/mg proteína]. Por lo que respecta al DMA(III), la introducción de LPS no afecta significativamente su transporte al lado basolateral.



**Figura 18.** Porcentajes de transporte de arsénico al lado basolateral a distintos tiempos, tras el tratamiento con especies arsenicales trivalentes solas o en combinación con LPS. Los porcentajes están calculados en base a la adición (ng de arsénico total) aplicada al compartimento apical del cocultivo Caco-2/PBMC. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=4-6). Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a los tratamientos únicamente con la arsénico se marcan con un asterisco.

---

## Discusión

---

La mucosa intestinal participa de forma activa en la respuesta inflamatoria frente a distintos estímulos así como en el establecimiento de interacciones con células del sistema inmune (Eckmann, *et al.*, 1995). Las células epiteliales intestinales son capaces de sintetizar distintas citoquinas, tales como IL1, IL6, IL8, TGF $\beta$  y TNF $\alpha$  (Vitkus *et al.*, 1998; Woywodt *et al.*, 1994). El modelo celular Caco-2 se ha empleado previamente en la evaluación de procesos inflamatorios y se ha puesto de manifiesto que sintetizan y secretan citoquinas frente a diversos estímulos (Jung *et al.*, 1995; Amin *et al.*, 2008; Brozek *et al.*, 2008; Van de Walle *et al.*, 2010). Así mismo, las células Caco-2 son capaces de desarrollar tras su diferenciación características similares a los enterocitos y expresar múltiples proteínas de membrana, entre ellas receptores tipo toll directamente relacionados con la señalización en respuesta a estímulos inflamatorios a nivel intestinal (Cario *et al.*, 2000)

Los estudios que evalúan el efecto del arsénico en la respuesta inmune tanto en poblaciones como en modelos *in vivo* y en sistemas *in vitro*, presentan resultados contradictorios indicativos de la complejidad y la diversidad en la respuesta según el tipo celular o el modelo de estudio utilizado (Soto-Peña *et al.*, 2006; Fry *et al.*, 2007; Burchiel *et al.*, 2009; Acharya *et al.*, 2010). Las citoquinas proinflamatorias, moléculas peptídicas que actúan como mediadores en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, se inducen tras el tratamiento con arsénico de distintos tipos celulares (Germolec *et al.*, 1997; Yen *et al.*, 1996; Corsini *et al.*, 1999). Está aceptado que una de las causas que desencadena este proceso proinflamatorio es la generación de estrés oxidativo (Eblin *et al.*, 2008; Bourdonnay *et al.*, 2009b; Escudero-Lourdes *et al.*, 2010).

En la presente tesis se ha evaluado el efecto de los tratamientos con especies arsenicales trivalentes [As(III), MMA(III) y DMA(III)] sobre la expresión génica (*IL1 $\alpha$* , *IL1 $\beta$* , *TNF $\alpha$* , *IL8* e *IL6*) y niveles proteicos (TNF $\alpha$ , IL8 e IL6) de distintas citoquinas en el modelo *in vitro* Caco-2. La citoquina TNF $\alpha$  tiene múltiples efectos proinflamatorios,

tanto a nivel local como sistémico. Es fundamental en la respuesta de fase aguda así como en el reclutamiento y adhesión de leucocitos y la presentación de antígenos (Van de Walle *et al.*, 2010), siendo uno de los primeros factores solubles que se producen tras un estímulo antigénico, tal y como apuntan los tiempos cortos en los que se manifiesta la máxima respuesta tras exposición a arsénico. Es capaz de inducir la producción de otras citoquinas tales como IL1, IL6, IL8 e IL12 (Sands, 1997), ejerciendo con ello un efecto proinflamatorio. La quimiocina proinflamatoria IL8 se ha asociado con la quimiotaxis de neutrófilos y su degranulación (Baggiolini *et al.*, 1994, 1995). Aumentos en la expresión de IL8 se han puesto de manifiesto en células endoteliales, neutrófilos tisulares, macrófagos asociados a tumores y células cancerosas, indicando que tiene una importante participación en la regulación del microambiente tumoral, promoviendo la angiogénesis, la proliferación y la migración celular (Waugh y Wilson, 2008). IL6 es una citoquina inmunoreguladora que participa en los procesos de crecimiento, metástasis y angiogénesis en distintos tumores, incluido el cáncer colorrectal (Brozek *et al.*, 2005; Hsu y Chung, 2006).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las especies arsenicales trivalentes afectan la secreción y la expresión a nivel de ARNm de diversas citoquinas, induciendo una respuesta principalmente inflamatoria en células Caco-2. Así, se ha demostrado el incremento significativo en la liberación al medio de TNF $\alpha$ , IL8 e IL6 en respuesta a las formas arsenicales trivalentes, especialmente DMA(III) y As(III). Las citoquinas TNF $\alpha$  e IL8 son las que mayores cambios presentan. También se ha observado un incremento en los niveles de expresión de *IL1 $\alpha$*  tras exposición a las tres formas arsenicales, mientras que *IL1 $\beta$*  sólo presenta un incremento en su expresión con el MMA(III). Las células expuestas a arsénico aumentan la secreción del factor de necrosis tumoral desde las 2 horas. Este incremento de TNF $\alpha$  en el medio podría ser responsable del posterior aumento de la secreción de las citoquinas IL6 e IL8 que tiene lugar a tiempos superiores (24-48 horas). Numerosos estudios ponen de manifiesto la inducción de IL6 e IL8 por parte de TNF $\alpha$  en células epiteliales del intestino (Sonnier *et al.*, 2010; Van de Walle *et al.*, 2010).

El único antecedente sobre efectos del arsénico en el epitelio intestinal ha sido descrito para el As(III) (Hershko *et al.*, 2002). Este estudio muestra una inhibición en la producción de IL6 en células Caco-2 tratadas con As(III) tras su estímulo con IL1 $\beta$ . Las diferencias observadas respecto a los resultados obtenidos en la presente tesis pueden deberse a varios factores: empleo de células Caco-2 no diferenciadas; diferentes tiempos de estimulación y secuencia de aplicación del As(III); concentración de As(III) (500  $\mu$ M), muy superior a la aplicada en este trabajo. En la presente tesis, los estudios preliminares realizados para fijar las concentraciones de ensayo pusieron de manifiesto que el tratamiento de Caco-2 con 50  $\mu$ M de As(III) suponía una reducción en la expresión de ARNm de *IL1 $\alpha$* , *IL1 $\beta$* , *IL6*, *IL8* y *TNF $\alpha$*  [ratio de expresión ( $\log_2$ ) entre -4 y -2], dato que evidencia la importancia de la dosis de exposición en el tipo de respuesta celular. Existen otros trabajos que han descrito un efecto antiinflamatorio del arsénico sobre distintos tipos celulares (Zhou *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2011). En un estudio reciente, Singer *et al.* (2011), observaron la capacidad del As(III) (34-67  $\mu$ M; 2.5-5  $\mu$ g/mL) de prevenir o revertir el daño tisular, la inflamación y la muerte de los animales en un modelo murino de colitis inducida. La vía común que se establece para este efecto antiinflamatorio es a través de la inhibición del factor nuclear K $\beta$  (NFK $\beta$ ), uno de los reguladores más importantes de la expresión génica de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL8 (Tak y Firestein, 2001). No obstante, los estudios descritos emplean dosis más elevadas que las aplicadas en el presente estudio y se sabe que los efectos del arsénico sobre NFK $\beta$  dependen de la dosis y el tiempo de exposición, entre otros factores (Flora, 2011).

El MMA(III) es la forma arsenical que produce una menor respuesta inflamatoria de las especies trivalentes ensayadas. Como se ha puesto de manifiesto en el capítulo 4 de esta tesis, el MMA(III) es un compuesto que induce la muerte de las células intestinales por apoptosis, proceso durante el cual la liberación de sustancias celulares es menor que en los procesos necróticos, y que no lleva a la inducción de reacciones inflamatorias tan acentuadas (Haanen y Vermes, 1995). No existen estudios previos que indiquen que el MMA(III) no modifique o reduzca la producción de citoquinas proinflamatorias. Eblin *et al.* (2007) por el contrario, observan la activación de factores de transducción de moléculas inflamatorias tras exposiciones a MMA(III) (50 nM, 30 min) de células de

vejiga urinaria (UROtsa). Otros estudios llevados a cabo también en células UROtsa indican incrementos en la producción de citoquinas proinflamatorias (IL1, IL2, IL4, IL6, IL15 e IL17) tras exposiciones a MMA(III), si bien IL8 no ha sido evaluada (Escudero-Lourdes *et al.*, 2010). Las diferencias entre los resultados hallados en células Caco-2 y los descritos en células UROtsa, pueden deberse a diferencias en la retención celular y el metabolismo de arsénico por ambas líneas celulares. En el capítulo 2 de esta tesis se ha puesto de manifiesto que las células intestinales son capaces de metabolizar el arsénico, mientras que las células UROtsa no expresan la AS3MT y por tanto no metabolizan (Drobna *et al.*, 2005). Esto puede influir en la cantidad y formas acumuladas en el interior celular y por lo tanto en la respuesta inflamatoria generada.

Adicionalmente a los estudios realizados con arsénico, se han llevado a cabo tratamientos de los monocultivos Caco-2 con especies arsenicales trivalentes y lipopolisacárido de *Salmonella enterica*, con el objeto de evaluar el efecto conjunto de esta combinación en el tracto gastrointestinal. Teniendo en cuenta que las zonas con una mayor prevalencia de agua contaminada con arsénico son zonas rurales de países en desarrollo y que el acceso a fuentes de agua potable es limitado, la coexistencia de ambos factores (microorganismos patógenos y arsénico) no es descartable. Los resultados muestran que la presencia de LPS produce un aumento en la respuesta proinflamatoria del As(III) y el DMA(III). La respuesta conjunta MMA(III)/LPS es, en general, distinta a la observada para las otras dos especies, produciéndose en la mayoría de los casos un descenso en la producción de TNF $\alpha$  e IL6, respecto al tratamiento únicamente con arsénico o con LPS. Se desconoce sin embargo la causa de este tipo de regulación.

El modelo de epitelio intestinal formado por el cultivo Caco-2 permite realizar una primera aproximación a los procesos inflamatorios relacionados con el arsénico a nivel intestinal. Sin embargo, la introducción de células del sistema inmune en cocultivo se aproxima más a la situación *in vivo*, ya que el tracto gastrointestinal acoge el mayor número de células del sistema inmune del organismo. El modelo *in vitro* de cocultivo de células de epitelio intestinal con distintos tipos celulares del sistema inmune se ha descrito previamente para evaluar los factores que afectan a la inflamación intestinal

(Kerneis *et al.*, 1997; Kanzato *et al.*, 2001; Satsu y Shimizu 2006; Parlesak *et al.*, 2004; Kucharzik *et al.*, 2007; Ishimoto *et al.*, 2010; Emami *et al.*, 2011). La interacción entre células del epitelio intestinal y del sistema inmune a través de factores solubles también ha sido evidenciada (Shaykhiev y Bals, 2007; Pellegrina *et al.*, 2009). Esta interacción también se ha puesto de manifiesto en la presente tesis, ya que el cocultivo Caco-2/PBMC presenta mayores niveles de todas las citoquinas evaluadas, tanto en el medio tanto apical como basolateral, y tanto en los controles como en los tratamientos, en relación al monocultivo Caco-2.

Las diferencias observadas entre ambos modelos, Caco-2 y Caco-2/PBMC, pueden ser debidas a la modulación por parte de los PBMC sobre la respuesta de las células epiteliales. La presencia de PBMC en el lado basolateral incorpora la interacción a través de factores solubles entre distintos tipos celulares. A este respecto, Haller *et al.* (2000) han observado que tras neutralizar el TNF $\alpha$  del medio de cultivo, se inhibe la secreción de IL8 y TNF $\alpha$  en células Caco-2. Asimismo, observaron también una secreción polarizada de TNF $\alpha$  al compartimento basal tras estimular las células Caco-2 con bacterias patogénicas, siendo identificado como uno de los mediadores tempranos en la respuesta intestinal. Debido a sus efectos proinflamatorios, los incrementos en su síntesis se han asociado con daño tisular, inducción de apoptosis en enterocitos y patologías intestinales (Haller *et al.*, 2000).

Adicionalmente, la incorporación de PBMC al modelo *in vitro* de epitelio intestinal supone modificaciones significativas frente al empleo de células Caco-2 exclusivamente. En primer lugar, el soporte de cultivo empleado es distinto, ya que en el monocultivo Caco-2 las células se siembran sobre placas de plástico, mientras que en el cocultivo se encuentran sobre un soporte semipermeable que separa los compartimentos apical y basolateral. En células polarizadas es de especial importancia el soporte de crecimiento para el desarrollo adecuado de sus características morfológicas y funcionales (Gaillard y Finlay, 1996; Fuller y Simons, 1986). Otros autores han descrito la secreción bidireccional de citoquinas por parte de células intestinales, en función del origen del estímulo (Sonnier *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha puesto de manifiesto que en sistemas Transwell<sup>®</sup> la acumulación celular y

metabolismo de As(III) se modifica en relación a las placas multipocillo (capítulo 2). En cualquier caso, la exposición de la moncapa formada por Caco-2 a las formas arsenicales en un modelo Transwell<sup>®</sup>, más cercano a las condiciones reales de la mucosa intestinal, pone de manifiesto un incremento de citoquinas proinflamatorias en el compartimento apical (lumen intestinal) y especialmente en el compartimento basal (lámina propia).

Los resultados obtenidos combinando ambos tipos celulares (Caco-2/PBMC) indican que la exposición a las formas trivalentes arsenicales, al igual que ocurría con los monocultivos Caco-2, induce una respuesta proinflamatoria. Esta se manifiesta en un incremento de las citoquinas TNF $\alpha$ , IL8 e IL6 secretadas al compartimento basal. Por otra parte, los niveles de citoquinas en el lado apical, aunque menores a los observados en el lado basolateral, también son significativamente superiores a los obtenidos en las células control. En general, si bien los niveles de expresión de ARNm en Caco-2 para las citoquinas ensayadas no se modifican de forma apreciable tras el tratamiento con arsénico, se puede hablar sin embargo de una tendencia general de regulación a la baja de la expresión de estas citoquinas en PMBC.

En PBMC, además de las citoquinas proinflamatorias nombradas, se ha evaluado la expresión de *IL10* e *IL13*. IL10 inhibe la activación de células del sistema inmune, así como de células endoteliales y la producción de diversas citoquinas en macrófagos y células Th1 (Fiorentino *et al.*, 1991a, 1991b). IL13 inhibe la producción de citoquinas inflamatorias tras la inducción por LPS de PBMC (Kucharzik *et al.*, 1998).

Haller *et al.* (2000), empleando el mismo modelo *in vitro* que el utilizado en la presente tesis (cocultivo Caco-2/PBMC), ha evidenciado que tanto TNF $\alpha$  como IL1 $\alpha$  son moléculas que estimulan la secreción de IL10 a modo de retroalimentación negativa en el control de la inflamación intestinal. En esta tesis se ha observado un descenso en la expresión de las citoquinas antiinflamatorias *IL10* e *IL13* en PBMC, especialmente tras el tratamiento con As(III), indicando que el arsénico es capaz, no solo de producir una respuesta inflamatoria a través de la secreción de citoquinas, sino que también afecta a los procesos de regulación y mantenimiento de la misma, reduciendo la expresión de moléculas implicadas en el control de la inflamación. Sin embargo, no se

han cuantificado los niveles de IL10 e IL13 en el medio de cultivo, por lo que serían necesarios más estudios para corroborar la implicación de estos factores en la respuesta inflamatoria intestinal inducida por arsénico.

En general se observa un menor efecto del LPS en este sistema que en el monocultivo Caco-2. Estudios previos realizados por Haller *et al.* (2000) con un sistema compartimentalizado similar al sistema Transwell<sup>®</sup> empleado en el presente trabajo, ponen de manifiesto que el LPS de *Escherichia coli* no induce la secreción de TNF $\alpha$  en PBMC cocultivados con Caco-2, y concluyen que el LPS no migra a través de la barrera epitelial. Este podría ser el motivo por el cual la coexposición con LPS no produce un aumento generalizado de la respuesta proinflamatoria. Los tratamientos combinados arsénico/LPS en los cocultivos, afectan principalmente a la secreción de TNF $\alpha$  al lado basolateral. Los niveles de esta citoquina en las células coexpuestas se mantienen elevados durante todo el tratamiento, mientras que en las exposiciones individuales a arsénico los valores se van reduciendo con el tiempo.

Las células epiteliales que forman la mucosa intestinal son piezas clave en la función barrera de la mucosa. Las uniones intracelulares de las células epiteliales son las responsables mayoritarias de la permeabilidad del epitelio y de la selectividad de su transporte. Se ha puesto de manifiesto que diversas citoquinas proinflamatorias producen un aumento de la permeabilidad intestinal (Ma *et al.*, 2005; Al Sadi *et al.*, 2009; 2011), la cual se asocia a cambios conformacionales de proteínas de las uniones intercelulares que conllevan finalmente una desestructuración de las mismas. En el presente trabajo se han puesto de manifiesto cambios en el transporte de lucifer yellow a través del modelo Caco-2/PBMC tras determinados tratamientos. Así, el tratamiento individual con DMA(III) o con LPS afecta significativamente a este parámetro y también lo hacen los tratamientos conjuntos especie arsenical/LPS. En todos los casos se observa un mayor transporte de lucifer yellow a través de las uniones intracelulares y por tanto un aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal. Los tratamientos conjuntos arsénico/LPS aumentan esta permeabilidad en mayor medida que el tratamiento con LPS o con las especies arsenicales, indicando el efecto conjunto que tienen estos compuestos.

El aumento de la permeabilidad de membrana observado supone que puedan alcanzar la lámina propia compuestos que en condiciones normales no lo harían o lo harían en menor medida, algunos de los cuales pueden, a su vez, favorecer la respuesta proinflamatoria. De hecho, los resultados obtenidos en la presente tesis indican que la tasa de transporte de As(III) y MMA(III) en el cocultivo se ve afectada por los tratamientos con LPS. Así, estas dos formas arsenicales presentan un transporte significativamente superior cuando la monocapa celular se expone a LPS, de acuerdo con la existencia de un componente paracelular en su transporte a través del epitelio intestinal (capítulo 3). El DMA(III), sin embargo, se transporta en igual medida en presencia o ausencia de LPS. Este compuesto arsenical se absorbe principalmente vía transcelular (capítulo 3), por lo que el incremento en la permeabilidad paracelular no afecta a su transporte al lado basolateral. Adicionalmente, la absorción de otras formas arsenicales con un importante componente paracelular [As(V), MMA(V) y DMA(V); capítulo 3] estaría igualmente aumentada. Esto supondría que una mayor cantidad de arsénico sería absorbida tras la ingesta de agua o alimentos, y que por tanto una mayor cantidad de este metaloide alcanzaría la circulación sistémica y los distintos órganos, incluidos aquellos considerados diana.

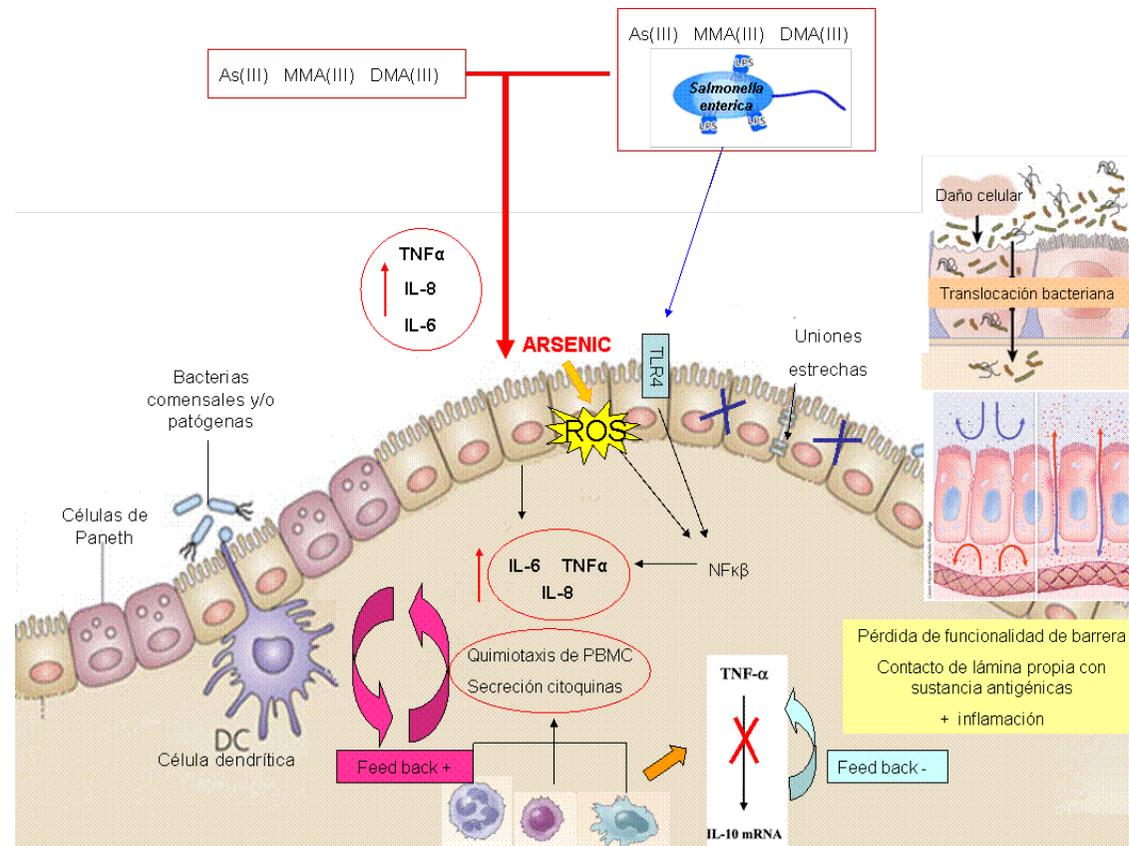
El estudio del efecto de las formas arsenicales trivalentes sobre el epitelio intestinal empleando un modelo formado por el cocultivo célula intestinal/célula del sistema inmune, indica efectos inflamatorios de estas formas arsenicales. De hecho se han reportado procesos inflamatorios a nivel gastrointestinal en exposiciones crónicas a este metaloide, especialmente a arsénico inorgánico. Así, en poblaciones expuestas a través del agua de bebida se han puesto de manifiesto síntomas de gastroenteritis (Borgoño *et al.*, 1997; Majumdar *et al.*, 2009) y en macacos Rhesus expuestos crónicamente a elevadas dosis de As(III) se han evidenciado signos de inflamación aguda y hemorragia del intestino delgado (Heywood y Sortwell, 1979).

A la vista de los resultados, se puede concluir que el arsénico inorgánico presente en los alimentos y las formas arsenicales mono y dimetiladas que pueden generarse por los procesos metabólicos o por las transformaciones en el tracto gastrointestinal, causan un importante efecto sobre la homeostasis intestinal, pudiendo favorecer el desarrollo de

enfermedades inflamatorias. Se ha descrito que en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) los niveles de TNF $\alpha$ , IL8 e IL6 en la mucosa intestinal están elevados, asociándose los niveles de estas citoquinas con la patogénesis y el nivel de daño tisular (Reimund *et al.*, 1996; Atreya *et al.*, 2000; Dube *et al.*, 2004).

Diversos estudios han puesto de manifiesto la conexión entre inflamación y cáncer (Baniyash, 2006; Hagemann *et al.*, 2007; Mantovani *et al.*, 2008) y en el caso del arsénico, cada vez surgen más evidencias de la importancia del proceso inflamatorio en la inducción de distintos tipos de cáncer ocasionados por este metaloide (Fry *et al.*, 2007; Achayara *et al.*, 2010; Escudero-Lourdes *et al.*, 2012). No existen, sin embargo, un número suficiente de estudios epidemiológicos concluyentes que evidencien una mayor prevalencia de cánceres del tracto gastrointestinal. Es por ello especialmente importante considerar la exposición a arsénico en zonas con contaminación en agua de bebida como posible causa de procesos inflamatorios intestinales y patologías derivadas.

**Figura 19.** Hipótesis sobre los procesos inflamatorios asociados a la exposición a arsénico del epitelio intestinal.



## **CONCLUSIONES**

---



Las conclusiones extraídas de la presente tesis doctoral son:

### **1. Transformaciones de las especies arsenicales.**

**Durante el procesado de los alimentos en presencia de arsénico [As(V), MMA(V) y DMA(V)] y tras la digestión gastrointestinal de los mismos se producen modificaciones significativas en sus formas químicas.**

Distintas matrices vegetales han demostrado la capacidad de modificar el arsénico inorgánico durante el contacto por remojo o cocinado con agua contaminada. Asimismo, tras la digestión gastrointestinal se detectan en la fracción soluble especies trivalentes y/o tioladas, no adicionadas al alimento para su preparación. Estas transformaciones pueden modificar la absorción intestinal y toxicidad del arsénico.

#### **El epitelio intestinal metaboliza el arsénico inorgánico.**

Tras exposición de células Caco-2 a arsénico inorgánico se produce metabolismo, especialmente del As(III), formándose como metabolito mayoritario el MMA. Diversos factores pueden influir en este proceso metabólico, tales como la concentración de arsénico, el grado de diferenciación celular, el soporte de cultivo donde crecen las células y la presencia de vitamina B12 y GSH. Los metabolitos formados a nivel intestinal alcanzan la circulación sanguínea o se eliminan hacia el lumen intestinal en la misma proporción.

El mucus secretado por las células HT29-MTX evita la entrada del metaloide al interior celular y por ello no se observa metabolismo del arsénico inorgánico en este tipo celular.

Las formas arsenicales que alcanzan la circulación portal tras su absorción intestinal pueden diferir de las especies presentes en agua o alimentos y de las especies solubilizadas durante la digestión gastrointestinal, hecho que debe considerarse en la evaluación del riesgo de este compuesto.

## **2. Absorción intestinal de arsénico.**

**La absorción intestinal de arsénico difiere en función de la forma química en la que se encuentre.**

El As(V), As(III) y MMA(III) presentan componentes mixtos, transcelular y paracelular, en su transporte, mientras que el DMA(III) se transporta mayoritariamente vía transcelular. El transporte transcelular puede implicar procesos dependientes de energía, especialmente para el As(III), MMA(III) y DMA(III). MMA(V) y DMA(V) presentan un importante transporte paracelular, si bien en el MMA(V) se evidencia un proceso de saturación que sería necesario estudiar con más detalle.

**El pH es un factor determinante en la absorción de algunas formas arsenicales.**

El As(V) y DMA(V) se absorben en mayor medida en condiciones de pH ácido en el lado apical, lo cual podría indicar una mayor absorción de estas especies en la zona proximal del tracto gastrointestinal. Este efecto puede ser debido a la participación de transportadores dependientes de protones y/o a cambios en el estado de ionización de estas formas arsenicales. Por el contrario, el MMA(V) y las especies trivalentes no modifican su transporte con los cambios del pH.

**La clasificación de la absorción de las distintas formas arsenicales en base a criterios de correlación de la permeabilidad aparente en el modelo Caco-2 con la absorción en humanos indica que,**

La absorción del As(V), As(III), MMA(III) y DMA(III) puede considerarse moderada-alta (> 70%), mientras que MMA(V) y DMA(V) se clasificarían como compuestos de baja absorción (< 30%).

**La captación celular del arsénico inorgánico a nivel intestinal se produce a través de distintos transportadores.**

El As(III) entra en las células Caco-2 por múltiples transportadores, entre ellos OATPB, GLUT5 y AQP10, mientras que el As(V) lo hace a través del transportador de fosfato sodio dependiente NaPiIIb.

**La exposición de células Caco-2 al arsénico inorgánico provoca cambios significativos en la expresión de múltiples transportadores.**

Las células Caco-2 modifican la expresión génica de múltiples transportadores implicados en su absorción o en la absorción de nutrientes esenciales (OATPB, AQP3, AQP4, AQP10, GLUT2, GLUT5) o en la eliminación de compuestos tóxicos del interior celular (P-gp, MRP2, MRP3 y BCRP), indicando los múltiples efectos que puede tener este metaloide sobre la homeostasis intestinal.

**Las sustancias luminales pueden afectar a la captación y transporte del arsénico a nivel intestinal.**

El GSH, sales biliares y extracto de té verde modifican la captación del arsénico inorgánico por diversos mecanismos relacionados con cambios en la captación celular del arsénico (GSH) y por modificaciones estructurales de la membrana (ETV y sales biliares), indicando el importante efecto de sustancias luminales sobre la absorción intestinal de arsénico.

**El modelo de cultivo empleado influye significativamente en la absorción y transporte de arsénico.**

Las formas pentavalentes incrementan significativamente su transporte en el modelo de cocultivo Caco-2/HT29-MTX, siendo atribuible este efecto al mayor tamaño de las uniones intercelulares existente respecto al monocultivo Caco-2. Las formas trivalentes, sin embargo, quedan retenidas en el mucus secretado por las células HT29-MTX,

manteniendo [As(III)] o reduciendo su absorción [MMA(III) y DMA(III)] en el modelo de cocultivo. Todo ello apunta a la importancia del modelo celular empleado en los estudios sobre la absorción *in vitro* de arsénico.

### **3. Efectos tóxicos de las especies arsenicales a nivel intestinal.**

**Las especies trivalentes arsenicales producen efectos tóxicos sobre el epitelio intestinal, especialmente relacionados con la inducción de especies reactivas de oxígeno.**

La exposición de células Caco-2 a formas arsenicales trivalentes reduce la actividad mitocondrial, disminuye los niveles de glutatión reducido, causa peroxidación lipídica, afecta a las actividades enzimáticas de catalasa y peroxidasa y altera la expresión génica de proteínas de estrés y metalotioneínas.

**La pérdida de viabilidad inducida por las distintas formas arsenicales se produce por distintos mecanismos.**

El As(III) induce muerte celular especialmente por necrosis, el MMA(III) por apoptosis y el DMA(III) causa porcentajes similares de necrosis y apoptosis.

**La estructura del epitelio intestinal se afecta por la exposición a As(III).**

El citoesqueleto de actina filamentosa de las células Caco-2 se altera tras exposiciones a As(III) a concentraciones que son habituales en el agua de bebida, siendo especialmente importante este proceso a tiempos de exposición superiores a 24 horas.

#### **4. Efectos inflamatorios del arsénico sobre el epitelio intestinal.**

**Las especies trivalentes generan una respuesta proinflamatoria en los modelos *in vitro* formados por células Caco-2 y cocultivo Caco-2/PBMC.**

El As(III), MMA(III) y DMA(III) en contacto con los modelos celulares, aumentan en general, la liberación de citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL8 e IL6 y provocan cambios en su expresión génica, lo que puede afectar a la homeostasis intestinal.

**La presencia de lipopolisacárido, un agente inmunógeno, aumenta en algunos casos la magnitud o tiempo durante el que se mantiene la respuesta inflamatoria producida por las especies arsenicales.**

La respuesta proinflamatoria del As(III) y DMA(III) se incrementa en presencia de LPS en el cultivo Caco-2. En el cocultivo Caco-2/PBMC todas las combinaciones de arsénico/LPS incrementan la respuesta, especialmente en el caso de la citoquina TNF $\alpha$ .

**Los tratamientos con LPS, DMA(III) y combinaciones de especies arsenicales/LPS afectan la permeabilidad de la monocapa formada por Caco-2.**

Estos tratamientos afectan la estructura de las uniones estrechas y por tanto aumentan el transporte paracelular. Este hecho puede promover la mayor absorción de formas arsenicales que se transportan vía paracelular y permitir el contacto de sustancias lumenales con la lámina propia promoviendo el daño intestinal.



## **DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

---



Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones en congresos.

### **Publicaciones**

- Calatayud, M.,** Gimeno, J., Vélez, D., Devesa, V., Montoro, R. Characterization of the intestinal absorption of arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid using the Caco-2 cell line. *Chemical Research in Toxicology*, 2010, 23, 547—556.
- Calatayud, M.,** Devesa, V., Montoro, R., Vélez, D. In vitro study of intestinal transport of arsenite, monomethylarsonous acid, and dimethylarsinous acid by Caco-2 cell line. *Toxicology Letters*. 2011, 204, 127–133.
- Calatayud, M.,** Barrios, J.A., Vélez, D., Devesa, V. In vitro study of transporters involved in intestinal absorption of inorganic arsenic. *Chemical and Research Toxicology*, 2012, 25, 446–453.
- Calatayud, M.,** Devesa, V., Vélez, D. Metabolism of inorganic arsenic in intestinal epithelial cell lines. Aceptado para su publicación en *Chemical and Research Toxicology*.
- Calatayud, M.,** Vázquez, M., Devesa, V., Vélez, D. In vitro study of intestinal transport of inorganic and methylated arsenic species by Caco-2/HT29-MTX co-cultures. *Chemical and Research Toxicology*. En fase de revisión.
- Calatayud, M.,** Devesa, V., Vélez, D. Differential toxicity and gene expression in Caco-2 cells exposed to arsenic species. *Toxicological Letters*. En fase de revisión.

## Contribuciones a congresos

**Calatayud M.,** Montoro R., Devesa V., Vélez D. Characterization of intestinal absorption of As(III) using Caco-2 cell line. Póster presentado en el congreso internacional IUTOX celebrado en Barcelona (España) en julio de 2010.

**Calatayud M.,** Vélez D., Devesa V. Metabolism and cellular retention of arsenic species in human intestine cells. Comunicación oral realizada en el congreso internacional Trace Elements in Food (TEF-4), celebrado en Aberdeen (Escocia) en junio de 2011.

**Calatayud M.,** Edit B.,Feldmann J., Vélez D., Devesa V. Effect of gastrointestinal digestion and dietary constituents and additives on inorganic forms of arsenic present in foodstuffs. Póster presentado en el congreso internacional Trace Elements in Food (TEF-4), celebrado en Aberdeen (Escocia) en junio de 2011.

**Calatayud M.,** Barrios J., Vélez D., Devesa V. The effect of inorganic arsenic exposure on the expression of intestinal transporters. Póster presentado en el congreso internacional FEBS, celebrado en Turín (Italia) en junio de 2011.

**Calatayud, M.,** Gimeno-Alcañiz, J.V., Vélez, D., Devesa, V. Effect of As(III) exposure on the cytokines expression in Caco-2 cell line, a model of intestinal epithelium. Póster presentado en el congreso internacional EUROTOX, celebrado en París (Francia) en agosto de 2011.

**Calatayud, M.,** Vázquez, M., Devesa, V., Vélez, D. Intestinal absorption of arsenic species using different in vitro models. Póster presentado en el congreso internacional EUROTOX, celebrado en París (Francia) en agosto de 2011

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, et al. Arsenic: Health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ Health Persp.* 1999;107(7):593-7.
- Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou YH, Hu B, et al. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277(23):20431-7.
- Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 2001;167(3):1609-16.
- Acharya S, Chaudhuri S, Chatterjee S, Kumar P, Begum Z, Dasgupta S, et al. Immunological Profile of Arsenic Toxicity: A Hint Towards Arsenic-induced Carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer P.* 2010;11(2):479-90.
- Ackerman AH, Creed PA, Parks AN, Fricke MW, Schwegel CA, Creed JT, et al. Comparison of a chemical and enzymatic extraction of arsenic from rice and an assessment of the arsenic absorption from contaminated water by cooked rice. *Environ Sci Technol.* 2005;39(14):5241-6.
- Agullo G, GametPayrastra L, Manenti S, Viala C, Remesy C, Chap H, et al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol.* 1997;53(11):1649-57.
- Agusa T, Kunito T, Minh TB, Trang PTK, Iwata H, Viet PH, et al. Relationship of urinary arsenic metabolites to intake estimates in residents of the Red River Delta, Vietnam. *Environ Pollut.* 2009;157(2):396-403.
- Ahmad S, Kitchin KT, Cullen WR. Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch Biochem Biophys.* 2000;382(2):195-202.
- Alava P, Tack F, Du Laing G, Van de Wiele T. HPLC-ICP-MS method development to monitor arsenic speciation changes by human gut microbiota. *Biomed Chromatogr.* 2012;26(4):524-33.
- Allen A, Flemstrom G. Gastrointestinal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol-Cell Ph.* 2005;288(1):C1-C19.
- Allen A, Hutton DA, Pearson JP. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell B.* 1998;30(7):797-801.
- Almela C, Algorta S, Benito V, Clemente MJ, Devesa V, Suner MA, et al. Heavy metal, total arsenic, and inorganic arsenic contents of algae food products. *J Agr Food Chem.* 2002;50(4):918-23.
- Almela C, Laparra JM, Velez D, Barbera R, Farre R, Montoro R. Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: Characterization and bioaccessibility. *J Agr Food Chem.* 2005;53(18):7344-51.
- Al-Sadi R, Ye DM, Said HM, Ma TY. Cellular and molecular mechanism of interleukin-1 beta modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *J Cell Mol Med.* 2011;15(4):970-82.
- Al-Sadi, R, Boivin M, ma, T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Frontiers in Bioscience* 2009, 14, 2765-2778.

- Amin PB, Diebel LN, Liberati DM. The synergistic effect of ethanol and shock insults on Caco(2) cytokine production and apoptosis. *Shock*. 2008;29(5):631-5.
- Annamalai A, Ponmari G, Sathishkumar R, Lakshmi PTV. Effect of drying treatment on the contents of antioxidants in *Cardiospermum halicacabum linn*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2011;2(1):B304-B313.
- Anderle P, Rakhmanova V, Woodford K, Zerangue N, Sadee W. Messenger RNA expression of transporter and ion channel genes in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells compared to human intestines. *Pharm Res-Dordr*. 2003;20(1):3-15.
- Andersen MH, Becker JC, Straten PT. Regulators of apoptosis: Suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(5):399-409.
- Aranyi C, Bradof JN, Oshea WJ, Graham JA, Miller FJ. Effects of Arsenic Trioxide Inhalation Exposure on Pulmonary Antibacterial Defenses in Mice. *J Toxicol Env Health*. 1985;15(1):163-72.
- Arivazhagan P, Thilakavathy T, Ramanathan K, Kumaran S, Panneerselvam C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and protein oxidation in various brain regions of aged rats. *J Nutr Biochem*. 2002;13(10):619-24.
- Arnold LL, Eldan M, Nyska A, van Gemert M, Cohen SM. Dimethylarsinic acid: Results of chronic toxicity/oncogenicity studies in F344 rats and in B6C3F1 mice. *Toxicology*. 2006;223(1-2):82-100.
- Artursson P. Epithelial Transport of Drugs in Cell-Culture .1. A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorptive (Caco-2) Cells. *J Pharm Sci-US*. 1990;79(6):476-82.
- Artursson P, Karlsson J. Correlation between Oral-Drug Absorption in Humans and Apparent Drug Permeability Coefficients in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *Biochem Bioph Res Co*. 1991;175(3):880-5.
- Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliver Rev*. 1996;22(1-2):67-84.
- Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliver Rev*. 2001;46(1-3):27-43.
- Aspenstrom-Fagerlund B, Sundstrom B, Tallkvist J, Ilback NG, Glynn AW. Fatty acids increase paracellular absorption of aluminium across Caco-2 cell monolayers. *Chem-Biol Interact*. 2009;181(2):272-8.
- Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*. 2000;6(5):583-8.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1991. Toxicological profile for arsenic. Atlanta: US Department of Health and Human Services.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2000. Toxicological profile for arsenic. Atlanta: US Department of Health and Human Services.
- Augeron C, Laboisie CL. Emergence of Permanently Differentiated Cell Clones in a Human Colonic-Cancer Cell-Line in Culture after Treatment with Sodium-Butyrate. *Cancer Res*. 1984;44(9):3961-9.

- Aviello G, Canadanovic-Brunet JM, Milic N, Capasso R, Fattorusso E, Taglialatela-Scafati O, et al. Potent Antioxidant and Genoprotective Effects of Boeravinone G, a Rotenoid Isolated from *Boerhaavia diffusa*. *Plos One*. 2011;6(5).
- Aw TY. Cellular redox: A modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol Sci*. 2003;18:201-4.
- Bae M, Watanabe C, Inaoka T, Sekiyama M, Sudo N, Bokul MH, et al. Arsenic in cooked rice in Bangladesh. *Lancet*. 2002;360(9348):1839-40.
- Bagchi S. Arsenic threat reaching global dimensions. *Can Med Assoc J*. 2007;177(11):1344-5.
- Baggiolini M. Il-8 and Other Chemotactic and Inflammatory Cytokines. *Chall Mod Med*. 1994;3:1-11.
- Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the Chemokine Family. *Int J Immunopharmacol*. 1995;17(2):103-8.
- Bailey CA, Bryla P, Malick AW. The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. *Adv Drug Deliver Rev*. 1996;22(1-2):85-103.
- Balimane PV, Chong SH. A combined cell based approach to identify P-glycoprotein substrates and inhibitors in a single assay. *Int J Pharmaceut*. 2005;301(1-2):80-8.
- Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharm*. 2005;204(3):238-55.
- Banerjee N, Banerjee S, Sen R, Bandyopadhyay A, Sarma N, Majumder P, et al. Chronic Arsenic Exposure Impairs Macrophage Functions in the Exposed Individuals. *J Clin Immunol*. 2009;29(5):582-94.
- Baniyash M. The inflammation-cancer linkage: A double-edged sword? *Semin Cancer Biol*. 2006;16(1):1-2.
- Barbera R, Farre R. Bioavailability of Trace-Elements - Review. *Rev Esp Cien Tec Ali*. 1992;32(4):381-99.
- Barchowsky A, Roussel RR, Klei LR, James PE, Ganju N, Smith KR, et al. Low levels of arsenic trioxide stimulate proliferative signals in primary vascular cells without activating stress effector pathways. *Toxicol Appl Pharm*. 1999;159(1):65-75.
- Batista BL, Souza JMO, De Souza SS, Barbosa F. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. *J Hazard Mater*. 2011;191(1-3):342-8.
- Bedrine-Ferran H, Le Meur N, Gicquel I, Le Cunff M, Soriano N, Guisle I, et al. Transcriptome variations in human CaCo-2 cells: a model for enterocyte differentiation and its link to iron absorption. *Genomics*. 2004;83(5):772-89.
- Beene LC, Halluer J, Yoshinaga M, Hamdi M, Liu ZJ. Pentavalent Arsenate Transport by Zebrafish Phosphate Transporter NaPi-IIb1. *Zebrafish*. 2011;8(3):125-31.
- Behrens I, Stenberg P, Artursson P, Kissel T. Transport of lipophilic drug molecules in a new mucus-secreting cell culture model based on HT29-MTX cells. *Pharm Res-Dordr*. 2001;18(8):1138-45.
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and Function of Mammalian Facilitative Sugar Transporters. *J Biol Chem*. 1993;268(26):19161-4.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6.

- Bergquist ER, Fischer RJ, Sugden KD, Martin BD. Inhibition by methylated organoarsenicals of the respiratory 2-oxo-acid dehydrogenases. *J Organomet Chem.* 2009;694(6):973-80.
- Bernstam L, Nriagu J. Molecular aspects of arsenic stress. *J Toxicol Env Heal B.* 2000;3(4):293-322.
- Bertolero F, Pozzi G, Sabbioni E, Saffiotti U. Cellular Uptake and Metabolic Reduction of Pentavalent to Trivalent Arsenic as Determinants of Cytotoxicity and Morphological Transformation. *Carcinogenesis.* 1987;8(6):803-8.
- Bettley FR, Oshea JA. Absorption of Arsenic and Its Relation to Carcinoma. *Brit J Dermatol.* 1975;92(5):563-8.
- Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukocyte Biol.* 2007;81(1):1-5.
- Biasi F, Mascia C, Astegiano M, Chiarpotto E, Nano M, Vizio B, et al. Pro-oxidant and proapoptotic effects of cholesterol oxidation products on human colonic epithelial cells: A potential mechanism of inflammatory bowel disease progression. *Free Radical Bio Med.* 2009;47(12):1731-41.
- Binet F, Cavalli H, Moisan E, Girard D. Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil proapoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis. *Brit J Haematol.* 2006;132(3):349-58.
- Borgono JM, Vicent P, Venturino H, Infante A. Arsenic in Drinking-Water of City of Antofagasta - Epidemiological and Clinical-Study before and after Installation of a Treatment-Plant. *Environ Health Persp.* 1977;19(Aug):103-5.
- Borrueal N, Casellas F, Antolin M, Llopis M, Carol M, Espiñ E, et al. Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(4):865-70.
- Bourdet DL, Lee K, Thakker DR. Photoaffinity labeling of the anionic sites in Caco-2 cells mediating saturable transport of hydrophilic cations ranitidine and famotidine. *J Med Chem.* 2004;47(11):2935-8.
- Bourdonnay E, Morzadec C, Fardel O, Vernhet L. Redox-Sensitive Regulation of Gene Expression in Human Primary Macrophages Exposed to Inorganic Arsenic. *J Cell Biochem.* 2009b;107(3):537-47.
- Bourdonnay E, Morzadec C, Sparfel L, Galibert MD, Jouneau S, Martin-Chouly C, et al. Global effects of inorganic arsenic on gene expression profile in human macrophages. *Mol Immunol.* 2009a;46(4):649-56.
- Braman RS, Foreback CC. Methylated Forms of Arsenic in Environment. *Science.* 1973;182(4118):1247-9.
- Brozek W, Bises G, Fabjani G, Cross HS, Peterlik M. Clone-specific expression, transcriptional regulation, and action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells. *Bmc Cancer.* 2008;8.
- Brozek W, Bises G, Girsch T, Cross HS, Kaiser HE, Peterlik M. Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: Relevance for tumour progression. *Eur J Cancer.* 2005;41(15):2347-54.
- Buchet JP, Lauwerys R. Study of Inorganic Arsenic Methylation by Rat-Liver In Vitro - Relevance for the Interpretation of Observations in Man. *Arch Toxicol.* 1985;57(2):125-9.

- Buchet JP, Lauwerys R, Roels H. Comparison of the Urinary-Excretion of Arsenic Metabolites after a Single Oral Dose of Sodium Arsenite, Monomethylarsonate, or Dimethylarsinate in Man. *Int Arch Occ Env Hea*. 1981;48(1):71-9.
- Buchet JP, Lison D. Clues and uncertainties in in the risk assessment of arsenic in drinking water. *Food Chem Toxicol*. 2000;38:S81-S5.
- Buckley ST, Fischer SM, Fricker G, Brandl M. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. *Eur J Pharm Sci*. 2012;45(3):235-50.
- Burchiel SW, Mitchell LA, Lauer FT, Sun X, McDonald JD, Hudson LG, et al. Immunotoxicity and biodistribution analysis of arsenic trioxide in C57Bl/6 mice following a 2-week inhalation exposure. *Toxicol Appl Pharm*. 2009;241(3):253-9.
- Burns LA, Sikorski EE, Saady JJ, Munson AE. Evidence for Arsenic as the Immunosuppressive Component of Gallium-Arsenide. *Toxicol Appl Pharm*. 1991;110(1):157-69.
- Burton CA, Hatlelid K, Divine K, Carter DE, Fernando Q, Brendel K, et al. Glutathione Effects on Toxicity and Uptake of Mercuric-Chloride and Sodium Arsenite in Rabbit Renal Cortical Slices. *Environ Health Persp*. 1995;103:81-4.
- Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metast Rev*. 2004;23(1-2):77-99.
- Cario E, Brown D, McKee M, Podolsky DK. Polarized intestinal epithelial cells express Toll-like receptors on the apical pole in vitro. *Gastroenterology*. 2000;118(4):A814-A.
- Carlier MF, Ressad F, Pantaloni D. Control of actin dynamics in cell motility - Role of ADF/cofilin. *J Biol Chem*. 1999;274(48):33827-30.
- Carriere V, Lesuffleur T, Barbat A, Rousset M, Dussaulx E, Costet P, et al. Expression of Cytochrome-P-450 3a in Ht29-Mtx Cells and Caco-2 Clone Tc7. *Febs Lett*. 1994;355(3):247-50.
- Carter DE, Aposhian HV, Gandolfi AJ. The metabolism of inorganic arsenic oxides, gallium arsenide, and arsine: a toxicochemical review. *Toxicol Appl Pharm*. 2003;193(3):309-34.
- Casteel S, Evans T, Turk J, Basta N, Weis C, Henningsen G, et al. Refining the risk assessment of metal-contaminated soils. *Int J Hyg Envir Heal*. 2001;203(5-6):473-4.
- Catalioto RM, Triolo A, Giuliani S, Altamura M, Evangelista S, Maggi CA. Increased paracellular absorption by bile salts and P-glycoprotein stimulated efflux of otilonium bromide in Caco-2 cells monolayers as a model of intestinal barrier. *J Pharm Sci-US*. 2008;97(9):4087-100.
- Caussy D. Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotox Environ Safe*. 2003;56(1):164-73.
- Cencic A, Langerholc T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology A review. *Int J Food Microbiol*. 2010;141:S4-S14.
- Charoensuk V, Gati WP, Weinfeld M, Le XC. Differential cytotoxic effects of arsenic compounds in human acute promyelocytic leukemia cells. *Toxicol Appl Pharm*. 2009;239(1):64-70.
- Cheeseman CI. Glut2 Is the Transporter for Fructose across the Rat Intestinal Basolateral Membrane. *Gastroenterology*. 1993;105(4):1050-6.
- Chen CJ, Chen CW, Wu MM, Kuo TL. Cancer Potential in Liver, Lung, Bladder and Kidney Due to Ingested Inorganic Arsenic in Drinking-Water. *Brit J Cancer*. 1992;66(5):888-92.

- Chen CJ, Chuang YC, Lin TM, Wu HY. Malignant Neoplasms among Residents of a Blackfoot Disease Endemic Area in Taiwan - High-Arsenic Artesian Well Water and Cancers. *Cancer Res.* 1985;45(11):5895-9.
- Chen CJ, Kuo TL, Wu MM. Arsenic and Cancers. *Lancet.* 1988;1(8582):414-5.
- Chen XM, Elisia I, Kitts DD. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. *J Pharmacol Tox Met.* 2010;61(3):334-42.
- Chowdhury R, Chatterjee R, Giri AK, Mandal C, Chaudhuri K. Arsenic-induced cell proliferation is associated with enhanced ROS generation, Erk signaling and CyclinA expression. *Toxicol Lett.* 2010;198(2):263-71.
- Chowdhury UK, Zakharyan RA, Hernandez A, Avram MD, Kopplin MJ, Aposhian HV. Glutathione-S-transferase-omega [MMA(V) reductase] knockout mice: Enzyme and arsenic species concentrations in tissues after arsenate administration. *Toxicol Appl Pharm.* 2006;216(3):446-57.
- Chu KH, Lee CC, Hsin SC, Cai BC, Wang JH, Chiang BL. Arsenic trioxide alleviates airway hyperresponsiveness and eosinophilia in a murine model of asthma. *Cell Mol Immunol.* 2010;7(5):375-80.
- Circu ML, Moyer MP, Harrison L, Aw TY. Contribution of glutathione status to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in colonic epithelial cells. *Free Radical Bio Med.* 2009;47(8):1190-8.
- Clewell HJ, Thomas RS, Gentry PR, Crump KS, Kenyon EM, El-Masri HA, et al. Research toward the development of a biologically based dose response assessment for inorganic arsenic carcinogenicity: A progress report. *Toxicol Appl Pharm.* 2007;222(3):388-98.
- Cohen E, Talmon A, Faff O, Bacher A, Benshaul Y. Formation of Tight Junctions in Epithelial-Cells .1. Induction by Proteases in a Human-Colon Carcinoma Cell-Line. *Exp Cell Res.* 1985;156(1):103-16.
- Cohen SM, Arnold LL, Eldan M, Lewis AS, Beck BD. Methylated arsenicals: The implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. *Crit Rev Toxicol.* 2006;36(2):99-133.
- Concha G, Vogler G, Lezcano D, Nermell B, Vahter M. Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicol Sci.* 1998;44(2):185-90.
- Corsini E, Asti L, Viviani B, Marinovich M, Galli CL. Sodium arsenate induces overproduction of interleukin-1 alpha in murine keratinocytes: Role of mitochondria. *J Invest Dermatol.* 1999;113(5):760-5.
- Courtois F, Seidman EG, Delvin E, Asselin C, Bernotti S, Ledoux M, et al. Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(3):744-50.
- Crecelius EA. Changes in Chemical Speciation of Arsenic Following Ingestion by Man. *Environ Health Persp.* 1977;19(Aug):147-50.
- Crews HM, Burrell JA, Mcweeny DJ. Preliminary Enzymolysis Studies on Trace-Element Extractability from Food. *J Sci Food Agr.* 1983;34(9):997-1004.
- Cui M, Klopot A, Jiang Y, Fleet JC. The Effect of Differentiation on 1,25 Dihydroxyvitamin D-Mediated Gene Expression in the Enterocyte-Like Cell Line, Caco-2. *J Cell Physiol.* 2009;218(1):113-21.
- Cullen WR, Reimer KJ. Arsenic Speciation in the Environment. *Chem Rev.* 1989;89(4):713-64.

- Currier JM, Svoboda M, Matousek T, Dedina J, Styblo M. Direct analysis and stability of methylated trivalent arsenic metabolites in cells and tissues. *Metallomics*. 2011;3(12):1347-54.
- Dabeka RW, McKenzie AD, Lacroix GMA, Cleroux C, Bowe S, Graham RA, et al. Survey of Arsenic in Total Diet Food Composites and Estimation of the Dietary-Intake of Arsenic by Canadian Adults and Children. *J Aoac Int*. 1993;76(1):14-25.
- Darmoul D, Baricault L, Sapin C, Chantret I, Trugnan G, Rousset M. Decrease of Messenger-Rna Levels and Biosynthesis of Sucrase-Isomaltase but Not Dipeptidylpeptidase-Iv in Forskolin or Monensin-Treated Caco-2 Cells. *Experientia*. 1991;47(11-12):1211-5.
- Darmoul D, Rouyerfessard C, Blais A, Voisin T, Sapin C, Baricault L, et al. Dipeptidyl Peptidase Iv Expression in Rat Jejunal Crypt-Villus Axis Is Controlled at Messenger-Rna Level. *Am J Physiol*. 1991;261(5):G763-G9.
- Davidson NO, Hausman AML, Ifkovits CA, Buse JB, Gould GW, Burant CF, et al. Human Intestinal Glucose Transporter Expression and Localization of Glut5. *Am J Physiol*. 1992;262(3):C795-C800.
- Davis CD, Uthus EO, Finley JW. Dietary selenium and arsenic affect DNA methylation in vitro in Caco-2 cells and in vivo in rat liver and colon. *J Nutr*. 2000;130(12):2903-9.
- Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Brambila-Colombres E, Calderon-Aranda ES, Manno M, Albores A. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharm*. 2001b;177(2):132-48.
- Del Razo LM, Styblo M, Cullen WR, Thomas DJ. Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices. *Toxicol Appl Pharm*. 2001a;174(3):282-93.
- Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug*. 1997;14(3):221-86.
- Delnomdedieu M, Basti MM, Styblo M, Otvos JD, Thomas DJ. Complexation of Arsenic Species in Rabbit Erythrocytes. *Chem Res Toxicol*. 1994;7(5):621-7.
- des Rieux A, Ragnarsson EGE, Gullberg E, Preat V, Schneider YJ, Artursson P. Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *Eur J Pharm Sci*. 2005;25(4-5):455-65.
- des Rieux A, Fievez V, Theate I, Mast J, Preat V, Schneider YJ. An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. *Eur J Pharm Sci*. 2007;30(5):380-91.
- Devesa V, Del Razo LM, Adair B, Drobná Z, Waters SB, Hughes MF, et al. Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry. *J Anal Atom Spectrom*. 2004;19(11):1460-7.
- Devesa V, Martínez A, Suner MA, Velez D, Almela C, Montoro R. Effect of cooking temperatures on chemical changes in species of organic arsenic in seafood. *J Agr Food Chem*. 2001a;49(5):2272-6.
- Devesa V, Martínez A, Suner MA, Velez D, Almela C, Montoro R. Effect of cooking temperatures on chemical changes in species of organic arsenic in seafood. *J Agr Food Chem*. 2001b;49(5):2272-6.
- Devesa V, Macho ML, Jalon M, Urieta I, Muñoz O, Suner MA, et al. Arsenic in cooked seafood products: Study on the effect of cooking on total and inorganic arsenic contents. *J Agr Food Chem*. 2001c;49(8):4132-40.

- Dinareello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503-8.
- Ding W, Hudson LG, Liu KJ. Inorganic arsenic compounds cause oxidative damage to DNA and protein by inducing ROS and RNS generation in human keratinocytes. *Mol Cell Biochem*. 2005;279(1-2):105-12.
- Dixon HBF. The biochemical action of arsonic acids especially as phosphate analogues. *Adv Inorg Chem*. 1997;44:191-227.
- Dopp E, von Recklinghausen U, Diaz-Bone RA, Hirner AV, Rettenmeier AW. Cellular uptake, subcellular distribution and toxicity of arsenic compounds in methylating and non-methylating cells. *Environ Res*. 2010;110(5):435-42.
- Drobna Z, Waters SB, Walton FS, LeCluyse EL, Thomas DJ, Styblo M. Interindividual variation in the metabolism of arsenic in cultured primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharm*. 2004;201(2):166-77.
- Drobna Z, Waters SB, Devesa V, Harmon AW, Thomas DJ, Styblo M. Metabolism and toxicity of arsenic in human urothelial cells expressing rat arsenic (+3 oxidation state)-methyltransferase. *Toxicol Appl Pharm*. 2005;207(2):147-59.
- Drobna Z, Xing WB, Thomas DJ, Styblo M. shRNA silencing of AS3MT expression minimizes arsenic methylation capacity of HepG2 cells. *Chem Res Toxicol*. 2006;19(7):894-8.
- Drobna Z, Naranmandura H, Kubachka KM, Edwards BC, Herbin-Davis K, Styblo M, et al. Disruption of the Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase Gene in the Mouse Alters the Phenotype for Methylation of Arsenic and Affects Distribution and Retention of Orally Administered Arsenate. *Chem Res Toxicol*. 2009;22(10):1713-20.
- Drobna Z, Walton FS, Harmon AW, Thomas DJ, Styblo M. Interspecies differences in metabolism of arsenic by cultured primary hepatocytes. *Toxicol Appl Pharm*. 2010a;245(1):47-56.
- Drobna Z, Walton FS, Paul DS, Xing WB, Thomas DJ, Styblo M. Metabolism of arsenic in human liver: the role of membrane transporters. *Arch Toxicol*. 2010b;84(1):3-16.
- Dube PH, Handley SA, Lewis J, Miller VL. Protective role of interleukin-6 during *Yersinia enterocolitica* infection is mediated through the modulation of inflammatory cytokines. *Infect Immun*. 2004;72(6):3561-70.
- Dufailly V, Guerin T, Noel L, Fremy JM, Beauchemin D. A simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal Atom Spectrom*. 2008;23(9):1263-8.
- Duker AA, Carranza EJM, Hale M. Arsenic geochemistry and health. *Environ Int*. 2005;31(5):631-41.
- Eblin KE, Bowen ME, Cromey DW, Bredfeldt TG, Mash EA, Lau SS, et al. Arsenite and monomethylarsonous acid generate oxidative stress response in human bladder cell culture. *Toxicol Appl Pharm*. 2006;217(1):7-14.
- Eblin KE, Bredfeldt TG, Buffington S, Gandolfi AJ. Mitogenic signal transduction caused by monomethylarsonous acid in human bladder cells: Role in arsenic-induced carcinogenesis. *Toxicol Sci*. 2007;95(2):321-30.
- Eblin KE, Hau AM, Jensen TJ, Futscher BW, Gandolfi AJ. The role of reactive oxygen species in arsenite and monomethylarsonous acid-induced signal transduction in human bladder cells: Acute studies. *Toxicology*. 2008;250(1):47-54.

- Eckmann L, Jung H, Yang SK, Fierer J, Morzyckawroblewska E, Kagnoff MF. A Distinct Array of Proinflammatory Cytokines Is Expressed in Human Colon Epithelial-Cells in Response to Bacterial Invasion. *J Cell Biochem.* 1995;245-.
- EFSA, 2009. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal* 7(10), 1351. doi:10.2903/j.efsa.2009.1351.
- Emami CN, Mittal R, Wang L, Ford HR, Prasadarao NV. Recruitment of Dendritic Cells Is Responsible for Intestinal Epithelial Damage in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis by *Cronobacter sakazakii*. *J Immunol.* 2011;186(12):7067-79.
- Englund G, Rorsman F, Ronnblom A, Karlbom U, Lazorova L, Grasjo J, et al. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci.* 2006;29(3-4):269-77.
- EPA. U.S. Environmental Protection Agency. 2011. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. EPA 820-R-11-002
- EPA 2009
- Escudero-Lourdes C, Medeiros MK, Cardenas-Gonzalez MC, Wnek SM, Gandolfi JA. Low level exposure to monomethyl arsonous acid-induced the over-production of inflammation-related cytokines and the activation of cell signals associated with tumor progression in a urothelial cell model. *Toxicol Appl Pharm.* 2010;244(2):162-73.
- Escudero-Lourdes C, Wu T, Camarillo JM, Gandolfi AJ. Interleukin-8 (IL-8) over-production and autocrine cell activation are key factors in monomethylarsonous acid [MMA(III)]-induced malignant transformation of urothelial cells. *Toxicol Appl Pharm.* 2012;258(1):10-8.
- Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Cl Lab Sci.* 2006;43(2):143-81.
- Esworthy RS, Chu F, Doroshov JH. Analysis of Glutathione Related Enzymes. *Curr Protoc Toxicol* (unit 7.1). 2001. DOI: 10.1002/0471140856.tx0701s00.
- Eto N, Tomita M, Hayashi M. NaPi-mediated transcellular permeation is the dominant route in intestinal inorganic phosphate absorption in rats. *Drug Metab Pharmacok.* 2006;21(3):217-21.
- Feldmann J, Lai VWM, Cullen WR, Ma MS, Lu XF, Le XC. Sample preparation and storage can change arsenic speciation in human urine. *Clin Chem.* 1999;45(11):1988-97.
- Ferrario D, Croera C, Brustio R, Collotta A, Bowe G, Vahter M, et al. Toxicity of inorganic arsenic and its metabolites on haematopoietic progenitors "in vitro": Comparison between species and sexes. *Toxicology.* 2008;249(2-3):102-8.
- Ferriola PC, Cody V, Middleton E. Protein-Kinase C Inhibition by Plant Flavonoids - Kinetic Mechanisms and Structure-Activity-Relationships. *Biochem Pharmacol.* 1989;38(10):1617-24.
- Festa RA, Thiele DJ. Copper: An essential metal in biology. *Curr Biol.* 2011;21(21):R877-R883.
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 1999;18(54):7719-30.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, Ogarra A. IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages. *J Immunol.* 1991a;147(11):3815-22.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, et al. IL-10 Acts on the Antigen-Presenting Cell to Inhibit Cytokine Production by Th1 Cells. *J Immunol.* 1991b;146(10):3444-51.

- Fleet JC, Eksir F, Hance KW, Wood RJ. Vitamin D-inducible calcium transport and gene expression in three Caco-2 cell lines. *Am J Physiol-Gastr L.* 2002;283(3):G618-G25.
- Fleet JC, Wang LY, Vitek O, Craig BA, Edenberg HJ. Gene expression profiling of Caco-2 BBe cells suggests a role for specific signaling pathways during intestinal differentiation. *Physiol Genomics.* 2003;13(1):57-68.
- Flora SJS. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Bio Med.* 2011;51(2):257-81.
- Fogh J, Fogh JM, Fogh H, Loveless J, Milder D, Wright W. Fully Characterized Cultured Cell Lines from Human Tumors. In *Vitro-Journal of the Tissue Culture Association.* 1977;13(3):175-.
- Fordtran JS, Rector FC, Ewton MF, Soter N, Kinney J. Permeability Characteristics of Human Small Intestine. *J Clin Invest.* 1965;44(12):1935-&.
- Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, et al. Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol.* 2000;182(1):41-9.
- Forstner, G. *Gastrointestinal mucus. Physiology of the gastrointestinal tract.* 1994. Third edition. Ed. Raven Press, New York, pp 1255–1283.
- Francesconi KA, Kuehnelt D. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst.* 2004;129(5):373-95.
- Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Menage a Trois. *Mutat Res-Gen Tox En.* 2009;674(1-2):3-22.
- Freeman GB, Johnson JD, Killinger JM, Liao SC, Davis AO, Ruby MV, et al. Bioavailability of Arsenic in Soil Impacted by Smelter Activities Following Oral-Administration in Rabbits. *Fund Appl Toxicol.* 1993;21(1):83-8.
- Freeman GB, Schoof RA, Ruby MV, Davis AO, Dill JA, Liao SC, et al. Bioavailability of arsenic in soil and house dust impacted by smelter activities following oral administration in cynomolgus monkeys. *Fund Appl Toxicol.* 1995;28(2):215-22.
- Fry RC, Navasumrit P, Valiathan C, Svensson JP, Hogan BJ, Luo M, et al. Activation of inflammation/NF-kappa B signaling in infants born to arsenic-exposed mothers. *Plos Genet.* 2007;3(11):2180-9.
- Fuller SD, Simons K. Transferrin Receptor Polarity and Recycling Accuracy in Tight and Leaky Strains of Madin-Darby Canine Kidney-Cells. *J Cell Biol.* 1986;103(5):1767-79.
- Fullmer CS, Wasserman RH. Intestinal-Absorption of Arsenate in the Chick. *Environ Res.* 1985;36(1):206-17.
- Gaillard JL, Finlay BB. Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. *Infect Immun.* 1996;64(4):1299-308.
- Gamble M, Liu X, Ahsan H, Pilsner J, Ilievsky V, Slavkovich V, et al. Folate and arsenic metabolism: A double-blind placebo controlled folate supplementation trial in Bangladesh. *Epidemiology.* 2006;17(6):S528-S.
- Gebel T. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology.* 2000;144(1-3):155-62.
- Germolec D, Spalding J, Yu H, Simeonova P, Luster M. Arsenic enhancement of skin neoplasia by chronic stimulation of growth-promoting cytokines. *J Leukocyte Biol.* 1997:44-.

- Germolec DR, Yoshida T, Gaido K, Wilmer JL, Simeonova PP, Kayama F, et al. Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes. *Toxicol Appl Pharm.* 1996;141(1):308-18.
- Gibaud S, Jaouen G. Arsenic-Based Drugs: From Fowler's Solution to Modern Anticancer Chemotherapy. *Top Organometal Chem.* 2010;32:1-20.
- Gonsebatt ME, Vega L, Montero R, Garcavargas G, Delraza LM, Albores A, et al. Lymphocyte Replicating Ability in Individuals Exposed to Arsenic Via Drinking-Water. *Mutat Res-Envir Muta.* 1994;313(2-3):293-9.
- Gonzalez MJ, Aguilar MV, Martinez MC. Inorganic Pentavalent Arsenic Methylation by Rats - Effect of Concentration and Dichromate. *Vet Hum Toxicol.* 1995;37(5):409-13.
- Gonzalez MJ, Aguilar MV, Para MCM. Gastrointestinal Absorption of Inorganic Arsenic(V) - the Effect of Concentration and Interactions with Phosphate and Dichromate. *Vet Hum Toxicol.* 1995;37(2):131-6.
- Gorby, M.S. Arsenic in human medicine. En *Arsenic in the environment. Part II: Human health and ecosystem effects.* 1994. Wiley Series in Advances in Environmental Science and Technology. Volumen 27. Nriagy J.O., Series Ed.; Jhon Wiley & Sons, Inc. New York.
- Graeme KA, Pollack CV, Jr. Heavy metal toxicity, Part I: arsenic and mercury. *The Journal of emergency medicine.* 1998;16(1):45-56. Epub 1998/02/24.
- Gregus Z, Nemeti B. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase works as an arsenate reductase in human red blood cells and rat liver cytosol. *Toxicol Sci.* 2005;85(2):859-69.
- Groen K, Vaessen HAMG, Kliet JJG, Deboer JLM, Vanooik T, Timmerman A, et al. Bioavailability of Inorganic Arsenic from Bog Ore-Containing Soil in the Dog. *Environ Health Persp.* 1994;102(2):182-4.
- Grzanka D, Domaniewski J, Grzanka A. Effect of doxorubicin on actin reorganization in Chinese hamster ovary cells. *Neoplasma.* 2005;52(1):46-51.
- Gullberg E, Leonard M, Karlsson J, Hopkins AM, Brayden D, Baird AW, et al. Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem Bioph Res Co.* 2000;279(3):808-13.
- Gum JR, Hicks JW, Toribara NW, Rothe EM, Lagace RE, Kim YS. The Human Muc2 Intestinal Mucin Has Cysteine-Rich Subdomains Located Both Upstream and Downstream of Its Central Repetitive Region. *J Biol Chem.* 1992;267(30):21375-83.
- Haanen C, Vermes I. Apoptosis and Inflammation. *Mediat Inflamm.* 1995;4(1):5-15.
- Habib GM. Arsenite Causes Down-Regulation of Akt and c-Fos, Cell Cycle Dysfunction and Apoptosis in Glutathione-Deficient Cells. *J Cell Biochem.* 2010;110(2):363-71.
- Hagemann T, Balkwill F, Lawrence T. Inflammation and cancer: A double-edged sword. *Cancer Cell.* 2007;12(4):300-1.
- Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of Cell Number in the Mammalian Gastrointestinal-Tract - the Importance of Apoptosis. *J Cell Sci.* 1994;107:3569-77.
- Hall LL, George SE, Kohan MJ, Styblo M, Thomas DJ. In vitro methylation of inorganic arsenic in mouse intestinal cecum. *Toxicol Appl Pharm.* 1997;147(1):101-9.
- Hall M, Gamble M, Slavkovich V, Liu XH, Levy D, Cheng ZQ, et al. Determinants of arsenic metabolism: Blood arsenic metabolites, plasma folate, cobalamin, and homocysteine concentrations in maternal-newborn pairs. *Environ Health Persp.* 2007;115(10):1503-9.

- Hall MN, Liu XH, Slavkovich V, Ilievski V, Mi ZY, Alam S, et al. Influence of Cobalamin on Arsenic Metabolism in Bangladesh. *Environ Health Persp.* 2009a;117(11):1724-9.
- Hall MN, Liu XH, Slavkovich V, Ilievski V, Pilsner JR, Alam S, et al. Folate, Cobalamin, Cysteine, Homocysteine, and Arsenic Metabolism among Children in Bangladesh. *Environ Health Persp.* 2009b;117(5):825-31.
- Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of Cell Number in the Mammalian Gastrointestinal-Tract - the Importance of Apoptosis. *J Cell Sci.* 1994;107:3569-77.
- Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AMA, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut.* 2000;47(1):79-87.
- Haller D, Holt L, Parlesak A, Zanga J, Bauerlein A, Sartor RB, et al. Differential effect of immune cells on non-pathogenic Gram-negative bacteria-induced nuclear factor-kappa B activation and pro-inflammatory gene expression in intestinal epithelial cells. *Immunology.* 2004;112(2):310-20.
- Hamadeh HK, Trouba KJ, Afshari CA, Germolec D. Coordination of altered DNA repair and damage pathways in arsenite-exposed keratinocytes. *Toxicol Sci.* 2002;69(2):306-16.
- Hanaoka K, Yosida K, Tamano M, Kuroiwa T, Kaise T, Maeda S. Arsenic in the prepared edible brown alga hijiki, *Hizikia fusiforme*. *Appl Organomet Chem.* 2001;15(6):561-5.
- Haanen C, Vermes I. Apoptosis and Inflammation. *Mediat Inflamm.* 1995;4(1):5-15.
- Hansen HR, Raab A, Price AH, Duan GL, Zhu YG, Norton GJ, et al. Identification of tetramethylarsonium in rice grains with elevated arsenic content. *J Environ Monitor.* 2011;13(1):32-4.
- Harvey CF, Swartz CH, Badruzzaman ABM, Keon-Blute N, Yu W, Ali MA, et al. Arsenic mobility and groundwater extraction in Bangladesh. *Science.* 2002;298(5598):1602-6.
- Hasegawa H, Sohrin Y, Matsui M, Hojo M, Kawashima M. Speciation of Arsenic in Natural-Waters by Solvent-Extraction and Hydride Generation Atomic-Absorption Spectrometry. *Anal Chem.* 1994;66(19):3247-52.
- Hashimoto K, Shimizu M. Epithelial Properties of Human Intestinal Caco-2 Cells Cultured in a Serum-Free Medium. *Cytotechnology.* 1993;13(3):175-84.
- Hatch M, Freel RW. Intestinal transport of an obdurate anion: oxalate. *Urol Res.* 2005;33(1):1-16.
- Hattenhauer O, Traebert M, Murer H, Biber J. Regulation of small intestinal Na-P-i type IIb cotransporter by dietary phosphate intake. *Am J Physiol-Gastr L.* 1999;277(4):G756-G62.
- Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, Hirano S. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol.* 2005;79(4):183-91.
- He Y, Zheng Y. Assessment of in vivo bioaccessibility of arsenic in dietary rice by a mass balance approach. *Sci Total Environ.* 2010;408(6):1430-6.
- Heck JE, Gamble MV, Chen Y, Graziano JH, Slavkovich V, Parvez F, et al. Consumption of folate-related nutrients and metabolism of arsenic in Bangladesh. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(5):1367-74.
- Hedegaard RV, Sloth JJ. Speciation of arsenic and mercury in feed: why and how? *Biotechnol Agron Soc.* 2011;15:45-51.

- Heitkemper DT, Vela NP, Stewart KR, Westphal CS. Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal Atom Spectrom.* 2001;16(4):299-306.
- Herbel MJ, Blum JS, Hoefft SE, Cohen SM, Arnold LL, Lisak J, et al. Dissimilatory arsenate reductase activity and arsenate-respiring bacteria in bovine rumen fluid, hamster feces, and the termite hindgut. *Fems Microbiol Ecol.* 2002;41(1):59-67.
- Hermiston ML, Gordon JI. Organization of the Crypt-Villus Axis and Evolution of Its Stem-Cell Hierarchy during Intestinal Development. *Am J Physiol-Gastr L.* 1995;268(5):G813-G22.
- Hernandez-Zavala A, Matousek T, Drobna Z, Paul DS, Walton F, Adair BM, et al. Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *J Anal Atom Spectrom.* 2008;23(3):342-51.
- Hershko DD, Robb BW, Hungness ES, Luo GJ, Guo XL, Hasselgren PO. Arsenite inhibits interleukin-6 production in human intestinal epithelial cells by down-regulating nuclear factor-kappa B activity. *Clin Sci.* 2002;103(4):381-90.
- Heywood R, Sortwell RJ. Arsenic Intoxication in the Rhesus-Monkey. *Toxicol Lett.* 1979;3(3):137-44.
- Hidalgo JJ, Borchardt RT. Transport of a Large Neutral Amino-Acid (Phenylalanine) in a Human Intestinal Epithelial-Cell Line - Caco-2. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1028(1):25-30.
- Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(8):1333-40.
- Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regardh CG, Lipka E, Amidon GL, Langguth P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharm Sci-US.* 2000;89(1):63-75.
- Hirano S, Cui X, Li S, Kanno S, Kobayashi Y, Hayakawa T, et al. Difference in uptake and toxicity of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in rat heart microvessel endothelial cells. *Arch Toxicol.* 2003;77(6):305-12.
- Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and Clinical Aspects of Interleukin-6. *Immunol Today.* 1990;11(12):443-9.
- Hissin PJ, Hilf R. Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Anal Biochem.* 1976;74(1):214-26.
- Hollins JG, Charbonneau SM, Bryce F, Ridgeway JM, Tam GKH, Willes RF. Whole-Body Retention and Excretion of [<sup>74</sup>As] Arsenic Acid in the Adult Beagle Dog. *Toxicol Lett.* 1979;4(1):7-13.
- Hsu CP, Chung YC. Influence of interleukin-6 on the invasiveness of human colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2006;26(6B):4607-14.
- Huang RN, Lee TC. Cellular uptake of trivalent arsenite and pentavalent arsenate in KB cells cultured in phosphate-free medium. *Toxicol Appl Pharm.* 1996;136(2):243-9.
- Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc.* 2007;2(9):2111-9.
- Hughes MF, Devesa V, Adair BM, Conklin SD, Creed JT, Styblo M, et al. Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent dimethylated arsenic in mice after oral administration. *Toxicol Appl Pharm.* 2008;227(1):26-35.

- Hume DA, Allan W, Hogan PG, Doe WF. Immunohistochemical Characterization of Macrophages in Human-Liver and Gastrointestinal-Tract - Expression of Cd4, Hla-Dr, Okm1, and the Mature Macrophage Marker 25f9 in Normal and Diseased Tissue. *J Leukocyte Biol.* 1987;42(5):474-84.
- Hwang SW, Schanker LS. Absorption of Organic Arsenical Compounds from Rat Small-Intestine. *Xenobiotica.* 1973;3(6):351-5.
- IARC, 2004. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs; International Agency for Cancer Research, Vol. 84, p. 39.
- Ikebe K. Daily Intake of Metals by Females in Osaka, Japan. *B Environ Contam Tox.* 1992;49(4):509-13.
- Ingels FM, Augustijns PF. Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2. *J Pharm Sci-US.* 2003;92(8):1545-58.
- Ishimoto Y, Nakai Y, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M. Transient Up-Regulation of Immunity- and Apoptosis-Related Genes in Caco-2 Cells Cocultured with THP-1 Cells Evaluated by DNA Microarray Analysis. *Biosci Biotech Bioch.* 2010;74(2):437-9.
- Islam MZ, Awal MA, Mostofa M, Ghosh A, Khair A. Effect of spinach against arsenic toxicity in rats. *Bangl. J. Vet. Med.* 2009. 7(2) : 358 – 363
- Ito K, Suzuki H, Horie T, Sugiyama Y. Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm Res-Dordr.* 2005;22(10):1559-77.
- Izdebska M, Grzanka A, Ostrowski M, Zuryn A, Grzanka D. Effect of arsenic trioxide (Trisenox) on actin organization in K-562 erythroleukemia cells. *Folia Histochem Cyto.* 2009;47(3):453-9.
- Jalal F, Corbeil D, Bawab W, Berteloot A, Crine P. Expression and Targeting of Neutral Endopeptidase (Ec3.4.24.11) in Polarized Human Colon Adenocarcinoma Cell-Line (Caco-2). *Faseb J.* 1992;6(1):A223-A.
- Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(9):528-39.
- Jemiola-Rzeminska M, Rivera C, Suwalsky M, Strzalka K. Interaction of arsenic compounds with model phospholipid membranes. *Thermochim Acta.* 2007;458(1-2):132-7.
- JEFCA, 2010. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Summary report of the seventy-second meeting of JECFA. JECFA/72/SC, Rome. [http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72\\_rev.pdf](http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf)
- Jiang GF, Lu XF, Gong Z, Cullen WR, Le XC. Trivalent arsenic species: analysis, stability, and interaction with a protein. *Arsenic Exposure and Health Effects V.* 2003:51-68.
- Johnson LR, Farmer JG. Use of Human Metabolic Studies and Urinary Arsenic Speciation in Assessing Arsenic Exposure. *B Environ Contam Tox.* 1991;46(1):53-61.
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011;283(2-3):65-87.
- Juhasz AL, Smith E, Weber J, Rees M, Rofe A, Kuchel T, et al. In vivo assessment of arsenic bioavailability in rice and its significance for human health risk assessment. *Environ Health Persp.* 2006;114(12):1826-31.

- Juhasz AL, Smith E, Weber J, Rees M, Rofe A, Kuchel T, et al. Application of an in vivo swine model for the determination of arsenic bioavailability in contaminated vegetables. *Chemosphere*. 2008;71(10):1963-9.
- Jumarie C, Malo C. Caco-2 Cells Cultured in Serum-Free Medium as a Model for the Study of Enterocytic Differentiation In vitro. *J Cell Physiol*. 1991;149(1):24-33.
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzyckawroblewska E, et al. A Distinct Array of Proinflammatory Cytokines Is Expressed in Human Colon Epithelial-Cells in Response to Bacterial Invasion. *J Clin Invest*. 1995;95(1):55-65.
- Kadiiska M, Nesnow S, Liu J, Waalkes M, Mason R. Arsenic methylation and oxidant injury by ESR in vivo and in vitro. *Free Radical Bio Med*. 2004;37:S21-S.
- Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliver Rev*. 2009;61(4):310-8.
- Kaltreider RC, Davis AM, Lariviere JP, Hamilton JW. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environ Health Persp*. 2001;109(3):245-51.
- Kanner J, Harel S, Hazan B. Muscle Membranal Lipid-Peroxidation by an Iron Redox Cycle System - Initiation by Oxy Radicals and Site-Specific Mechanism. *J Agr Food Chem*. 1986;34(3):506-10.
- Kanzato H, Manabe M, Shimizu M. An in vitro approach to the evaluation of the cross talk between intestinal epithelium and macrophages. *Biosci Biotech Bioch*. 2001;65(2):449-51.
- Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res*. 2003;63(9):2103-8.
- Kanzawa T, Zhang L, Xiao LC, Germano IM, Kondo Y, Kondo S. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene*. 2005;24(6):980-91.
- Kapaj S, Peterson H, Liber K, Bhattacharya P. Human health effects from chronic arsenic poisoning- A review. *J Environ Sci Heal A*. 2006;41(10):2399-428.
- Karagas MR, Stukel TA, Morris JS, Tosteson TD, Weiss JE, Spencer SK, et al. Skin cancer risk in relation to toenail arsenic concentrations in a US population-based case-control study. *Am J Epidemiol*. 2001;153(6):559-65.
- Karagas MR, Tosteson TD, Blum JD, Klaue B, Weiss JE, V S, et al. Measurement of low levels of arsenic exposure: A comparison of water and toenail concentrations. *Am J Epidemiol*. 2000;152(1):84-90.
- Karlsson J, Wikman A, Artursson P. The Mucus Layer as a Barrier to Drug Absorption in Monolayers of Human Intestinal Epithelial Ht29-H Goblet Cells. *Int J Pharmaceut*. 1993;99(2-3):209-18.
- Kato T, Owen RL. Absence of EGF receptors and of egf uptake in Peyer's patch dome epithelium. *In Vivo Immunology*. 1994;355:295-301.
- Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol*. 2001;11(12):526-34.
- Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science*. 1997;277(5328):949-52.
- Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Harrington-Brock K, Allen JW, Winkfield E, et al. Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: Induction

- of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ Mol Mutagen*. 2003;42(3):192-205.
- Knipp GT, Ho NFH, Barsuhn CL, Borchardt RT. Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: Effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. *J Pharm Sci-US*. 1997;86(10):1105-10.
- Koch I, Steven S, Lai VWM, Owen A, Reimer KJ, Cullen WR. Bioaccessibility and excretion of arsenic in Niu Huang Jie Du Pian pills. *Toxicol Appl Pharm*. 2007;222(3):357-64.
- Kojima C, Ramirez DC, Tokar EJ, Himeno S, Drobna Z, Styblo M, et al. Requirement of Arsenic Biomethylation for Oxidative DNA Damage. *J Natl Cancer I*. 2009;101(24):1670-81.
- König J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *N-S Arch Pharmacol*. 2006;372(6):432-43.
- Köse K, Doğan P. Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membranes. 2. Comparison of the antioxidant effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) with those of water-soluble and lipid-soluble antioxidants. *The Journal of international medical research*. 1995;23(1):9-18.
- Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, et al. Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol-Cell Ph*. 1999;276(3):C621-C7.
- Kozul CD, Hampton TH, Davey JC, Gosse JA, Nomikos AP, Eisenhauer PL, et al. Chronic Exposure to Arsenic in the Drinking Water Alters the Expression of Immune Response Genes in Mouse Lung. *Environ Health Persp*. 2009;117(7):1108-15.
- Kristl A. Membrane Permeability in the Gastrointestinal Tract: The Interplay between Microclimate pH and Transporters. *Chem Biodivers*. 2009;6(11):1923-32.
- Kucharzik T, Lugerling N, Weigelt H, Adolf M, Domschke W, Stoll R. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; Comparison with IL-4 and IL-10. *Clin Exp Immunol*. 1996;104(3):483-90.
- Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*. 2002;82(1):245-89.
- Lage CR, Nayak A, Kim CH. Arsenic ecotoxicology and innate immunity. *Integr Comp Biol*. 2006;46(6):1040-54.
- Landowski CP, Anderle P, Sun DX, Sadee W, Amidon GL. Transporter and ion channel gene expression after Caco-2 cell differentiation using 2 different microarray technologies. *Aaps J*. 2004;6(3).
- Langerholc T, Maragkoudakis PA, Wollgast J, Gradisnik L, Cencic A. Novel and established intestinal cell line models - An indispensable tool in food science and nutrition. *Trends Food Sci Tech*. 2011;22:S11-S20.
- Lantz RC, Hays AM. Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity. *Drug Metab Rev*. 2006;38(4):791-804.
- Lantz RC, Parlman G, Chen GJ, Hays AM, Witten ML, Carter DE. Effect of Arsenic Exposure on Alveolar Macrophage Function. *Ilsi Monogr*. 1994:529-31.
- Laparra JM, Velez D, Montoro R, Barbera R, Farre R. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *J Agr Food Chem*. 2003;51(20):6080-5.
- Laparra JM, Velez D, Montoro R, Barbera R, Farre R. Bioaccessibility of inorganic arsenic species in raw and cooked *Hizikia fusiforme* seaweed. *Appl Organomet Chem*. 2004;18(12):662-9.

- Laparra JM, Velez D, Barbera R, Montoro R, Farre R. An approach to As(III) and As(V) bioavailability studies with Caco-2 cells. *Toxicol in Vitro*. 2005a;19(8):1071-8.
- Laparra JM, Velez D, Barbera R, Farre R, Montoro R. Bioavailability of inorganic arsenic in cooked rice: Practical aspects for human health risk assessments. *J Agr Food Chem*. 2005b;53(22):8829-33.
- Laparra JM, Velez D, Barbera R, Granero L, Polache A, Montoro R, et al. Cytotoxic effect of As(III) in Caco-2 cells and evaluation of its human intestinal permeability. *Toxicol in Vitro*. 2006;20(5):658-63.
- Laparra JM, Velez D, Barbera R, Montoro R, Farre R. Bioaccessibility and transport by Caco-2 cells of organoarsenical species present in seafood. *J Agr Food Chem*. 2007;55(14):5892-7.
- Laparra JM, Velez D, Barbera R, Farre R, Montoro R. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-induced oxidative stress and cycle progression in a human intestinal epithelial cell line (Caco-2). *Toxicol in Vitro*. 2008;22(2):444-9.
- Laparra JM, Sanz Y. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49(6):695-701.
- Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(1):61-9.
- Le Ferrec E, Chesne C, Artursson P, Brayden D, Fabre G, Gires P, Guilou F, Rousset M, Rubas W, Scarino ML. In Vitro Models of the Intestinal Barrier. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 46. 2001. *ATLA* 29, 649-668,
- Lee K, Park SK, Kwon BM, Kim K, Yu HE, Ryu J, et al. Transport and metabolism of the antitumour drug candidate 2'-benzoyloxycinnamaldehyde in Caco-2 cells. *Xenobiotica*. 2009;39(12):881-8.
- Lee TK, Hammond CL, Ballatori N. Intracellular glutathione regulates taurocholate transport in HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharm*. 2001;174(3):207-15.
- Lennernas H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int J Pharmaceut*. 1996;127(1):103-7.
- Leslie EM, Haimour A, Waalkes MP. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) - Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J Biol Chem*. 2004;279(31):32700-8.
- Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth Adaptation to Methotrexate of Ht-29 Human Colon-Carcinoma Cells Is Associated with Their Ability to Differentiate into Columnar Absorptive and Mucus-Secreting Cells. *Cancer Res*. 1990;50(19):6334-43.
- Lesuffleur T, Kornowski A, Luccioni C, Muleris M, Barbat A, Beaumatin J, et al. Adaptation to 5-Fluorouracil of the Heterogeneous Human Colon-Tumor Cell-Line Ht-29 Results in the Selection of Cells Committed to Differentiation. *Int J Cancer*. 1991;49(5):721-30.
- Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, et al. Differential Expression of the Human Mucin Genes Muc1 to Muc5 in Relation to Growth and Differentiation of Different Mucus-Secreting Ht-29 Cell Subpopulations. *J Cell Sci*. 1993;106:771-83.
- Lesuffleur T, Roche F, Hill AS, Lacasa M, Fox M, Swallow DM, et al. Characterization of a Mucin Cdna Clone Isolated from Ht-29 Mucus-Secreting Cells - the 3' End of Muc5ac. *J Biol Chem*. 1995;270(23):13665-73.

- Lesuffleur T, Violette S, Vasile-Pandrea I, Dussault E, Barbat A, Muleris M, et al. Resistance to high concentrations of methotrexate and 5-fluorouracil of differentiated HT-29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype. *Int J Cancer*. 1998;76(3):383-92.
- Leteurtre E, Gouyer V, Rousseau K, Moreau O, Barbat A, Swallow D, et al. Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biol Cell*. 2004;96(2):145-51.
- Lew YS, Brown SL, Griffin RJ, Song CW, Kim JH. Arsenic trioxide causes selective necrosis in solid murine tumors by vascular shutdown. *Cancer Res*. 1999;59(24):6033-7.
- Li MY, Cai JF, Chiu JF. Arsenic induces oxidative stress and activates stress gene expressions in cultured lung epithelial cells. *J Cell Biochem*. 2002;87(1):29-38.
- Li Y and Schellhorn HE. Rapid Kinetic Microassay for Catalase Activity. *J Biomol Tech*. 2007;18(4): 185–187.
- Li W, Wanibuchi H, Salim EI, Yamamoto S, Yoshida K, Endo G, et al. Promotion of NCI-Black-Reiter male rat bladder carcinogenesis by dimethylarsinic acid an organic arsenic compound. *Cancer Lett*. 1998;134(1):29-36.
- Li WD, Chou IN. Effects of Sodium Arsenite on the Cytoskeleton and Cellular Glutathione Levels in Cultured-Cells. *Toxicol Appl Pharm*. 1992;114(1):132-9.
- Li YM, Broome JD. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Res*. 1999;59(4):776-80.
- Lin JH, Chiba M, Baillie TA. Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol Rev*. 1999;51(2):135-57.
- Lin S, Cullen WR, Thomas DJ. Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase. *Chem Res Toxicol*. 1999;12(10):924-30.
- Lin S, Shi Q, Nix FB, Styblo M, Beck MA, Herbin-Davis KM, et al. A novel S-adenosyl-L-methionine : arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem*. 2002;277(13):10795-803.
- Lindgren A, Vahter M, Dencker L. Autoradiographic Studies on the Distribution of Arsenic in Mice and Hamsters Administered as-74-Arsenite or as-74-Arsenate. *Acta Pharmacol Tox*. 1982;51(3):253-65.
- Linnankoski J, Makela J, Palmgren J, Mauriala T, Vedin C, Ungell AL, et al. Paracellular Porosity and Pore Size of the Human Intestinal Epithelium in Tissue and Cell Culture Models. *J Pharm Sci-US*. 2010;99(4):2166-75.
- List A, Beran M, DiPersio J, Slack J, Vey N, Rosenfeld CS, et al. Opportunities for Trisenox (R) (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2003;17(8):1499-507.
- Liteplo R, Howe P, Malcolm H, Aggett P, Belmar R, Buche J, Camarg J, Cauley J, Ekstrand J, Howe P, Karthikeyan G, Kierdorf U, Kurttio P, Liteplo R, Nishikawa A, Stevens D, Vineis P, Yinlong J. Environmental health criteria: Fluorides. *Environ. Health Crit*. 2002, 227, i–xx, and 1-268.
- Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR, et al. Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Mol Pharmacol*. 2001;60(2):302-9.
- Liu ZJ. Roles of Vertebrate Aquaglyceroporins in Arsenic Transport and Detoxification. Mips and Their Role in the Exchange of Metalloids. 2010;679:71-82.

- Liu ZJ, Sanchez MA, Jiang X, Boles E, Landfear SM, Rosen BP. Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(2):424-30.
- Louvard D, Arpin M, Coudrier E, Huet C, Pringault E, Robine S, et al. Experimental Manipulation of Intestinal-Cell Differentiation Using a Human Adenocarcinoma Cell-Line (Ht29). *J Cell Biol*. 1984;99(4):A6-A.
- Lu QY, Jin YS, Pantuck A, Zhang ZF, Heber D, Belldegrün A, et al. Green tea extract modulates actin remodeling via Rho activity in an in vitro multistep carcinogenic model. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1675-83.
- Lu WJ, Tamai I, Nezu J, Lai ML, Huang JD. Organic anion transporting polypeptide-C mediates arsenic uptake in HEK-293 cells. *J Biomed Sci*. 2006;13(4):525-33.
- Lu XF, Arnold LL, Cohen SM, Cullen WR, Le XC. Speciation of dimethylarsinous acid and trimethylarsine oxide in urine from rats fed with dimethylarsinic acid and dimercaptopropyl sulfonate. *Anal Chem*. 2003;75(23):6463-8.
- Ma TY, Boivin MA, Ye DM, Pedram A, Said HM. Mechanism of TNF-alpha modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol-Gastr L*. 2005;288(3):G422-G30.
- Ma TY, Hoa NT, Tran D, Merryfield M, Nguyen D, Tarnawski A. Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction barrier: Role of cytoskeletal involvement. *Gastroenterology*. 2000;118(4):A1268-A.
- MacDonald T. Intestinal immune responses and the maintenance of an anti-inflammatory environment - Introduction. *Semin Immunol*. 2001;13(3):159-61.
- Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(6):478-85.
- Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P, Ballatori N. Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol-Gastr L*. 2007;293(1):G271-G8.
- Maher S, Feighery L, Brayden DJ, McClean S. Melittin as a permeability enhancer II: In vitro investigations in human mucus secreting intestinal monolayers and rat colonic mucosae. *Pharm Res-Dordr*. 2007;24(7):1346-56.
- Mahler GJ, Shuler ML, Glahn RP. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *J Nutr Biochem*. 2009;20(7):494-502.
- Mahraoui L, Rousset M, Dussaulx E, Darmoul D, Zweibaum A, Brotlaroche E. Expression and Localization of Glut-5 in Caco-2 Cells, Human Small-Intestine, and Colon. *Am J Physiol*. 1992;263(3):G312-G8.
- Majumdar KK, Mazumder DNG, Ghose N, Ghose A, Lahiri S. Systemic manifestations in chronic arsenic toxicity in absence of skin lesions in West Bengal. *Indian J Med Res*. 2009;129(1):75-82.
- Majumdar S, Chanda S, Ganguli B, Mazumder DNG, Lahiri S, Dasgupta UB. Arsenic Exposure Induces Genomic Hypermethylation. *Environ Toxicol*. 2010;25(3):315-8.
- Makala LHC, Nishikawa Y, Suzuki N, Nagasawa H. Immunology - Antigen-presenting cells in the gut. *J Biomed Sci*. 2004;11(2):130-41.
- Mandal BK, Suzuki KT. Arsenic round the world: a review. *Talanta*. 2002;58(1):201-35.

- Mandal SM. A direct determination of a glucose-arsenic complex by electrospray ionization time of flight mass spectrometry. *Metallomics*. 2011;3(10):1074-8.
- Mandal SM, Mondal KC, Dey S, Pati BR. Arsenic biosorption by mucilaginous seeds of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *J Sci Ind Res India*. 2007;66(7):577-81.
- Mantovani A, Pierotti MA. Cancer and inflammation: A complex relationship. *Cancer Lett*. 2008;267(2):180-1.
- Mappes R. Experiments on Excretion of Arsenic in Urine. *Int Arch Occ Env Hea*. 1977;40(4):267-72.
- Marafante E, Lundborg M, Vahter M, Camner P. Dissolution of 2 Arsenic Compounds by Rabbit Alveolar Macrophages *In vitro*. *Fund Appl Toxicol*. 1987;8(3):382-8.
- Maret W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. *Biometals*. 2009;22(1):149-57.
- Martensson J, Jain A, Meister A. Glutathione Is Required for Intestinal Function. *P Natl Acad Sci USA*. 1990;87(5):1715-9.
- Mass MJ, Tennant A, Roop BC, Cullen WR, Styblo M, Thomas DJ, et al. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem Res Toxicol*. 2001;14(4):355-61.
- Mathews V, George B, Chendamarai E, Lakshmi KM, Desire S, Balasubramanian P, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term follow-up data. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3866-71. Epub 2010/07/21.
- Mathieu F, Galmier MJ, Pognat JF, Petit J, Lartigue C. Transepithelial transport of bepridil in the human intestinal cell line, Caco-2, using two media, DMEMc and HBSS. *Int J Pharmaceut*. 1999;181(2):203-17.
- Matos Reyes MN, Cervera ML, Campos RC, de la Guardia M. Determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid in cereals by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2007;62(9):1078-82.
- Matschullat J. Arsenic in the geosphere - a review. *Sci Total Environ*. 2000;249(1-3):297-312.
- Matsumoto H, Erickson RH, Gum JR, Yoshioka M, Gum E, Kim YS. Biosynthesis of Alkaline-Phosphatase during Differentiation of the Human Colon Cancer Cell-Line Caco-2. *Gastroenterology*. 1990;98(5):1199-207.
- McCafferty-Grad J, Bahlis NJ, Krett N, Aguilar TM, Reis I, Lee KP, et al. Arsenic trioxide uses caspase-dependent and caspase-independent death pathways in myeloma cells. *Mol Cancer Ther*. 2003;2(11):1155-64.
- Mckay DM, Perdue MH. Intestinal Epithelial Function - the Case for Immunophysiological Regulation Cells and Mediators .1. *Digest Dis Sci*. 1993;38(8):1377-87.
- Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002;296(5566):298-300.
- Michel L, Dupuy A, Jean-Louis F, Sors A, Poupon J, Viguier M, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis of cutaneous T cell lymphoma cells: Evidence for a partially caspase-independent pathway and potentiation by ascorbic acid (vitamin C). *J Invest Dermatol*. 2003;121(4):881-93.
- Mihucz VG, Tatar E, Virag I, Zang C, Jao Y, Zaray G. Arsenic removal from rice by washing and cooking with water. *Food Chem*. 2007;105(4):1718-25.

- Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* 2002;62(14):3893-903.
- Mishra D, Flora SJS. Quercetin administration during chelation therapy protects arsenic-induced oxidative stress in mice. *Biol Trace Elem Res.* 2008;122(2):137-47.
- Mo JY, Xia YJ, Wade TJ, DeMarini DM, Davidson M, Mumford J. Altered Gene Expression by Low-Dose Arsenic Exposure in Humans and Cultured Cardiomyocytes: Assessment by Real-Time PCR Arrays. *Int J Env Res Pub He.* 2011;8(6):2090-108.
- Mobasheri A, Shakibaei M, Marples D. Immunohistochemical localization of aquaporin 10 in the apical membranes of the human ileum: a potential pathway for luminal water and small solute absorption. *Histochem Cell Biol.* 2004;121(6):463-71.
- Moreda-Pineiro J, Moreda-Pineiro A, Romaris-Hortas V, Moscoso-Perez C, Lopez-Mahia P, Muniategui-Lorenzo S, et al. In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *Trac-Trend Anal Chem.* 2011;30(2):324-45.
- Morzadec C, Bouezzedine F, Macoch M, Fardel O, Vernhet L. Inorganic arsenic impairs proliferation and cytokine expression in human primary T lymphocytes. *Toxicology.* 2012a;300(1-2):46-56.
- Morzadec C, Macoch M, Robineau M, Sparfel L, Fardel O, Vernhet L. Inorganic arsenic represses interleukin-17A expression in human activated Th17 lymphocytes. *Toxicol Appl Pharm.* 2012b;262(3):217-22.
- Muñoz O, Devesa V, Suner MA, Velez D, Montoro R, Urieta I, et al. Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products. *J Agr Food Chem.* 2000;48(9):4369-76.
- Murota S, Himeno S, Sakurai T. Chemical and biological properties of trivalent methylarsenic compounds, monomethylarsonous cysteine and dimethylarsinous cysteine. *Trance Nutrients Research* 2006, 23:47-55.
- Myerscough N, Sylvester PA, Warren BF, Biddolph S, Durdey P, Thomas MG, et al. Abnormal subcellular distribution of mature MUC2 and de novo MUC5AC mucins in adenomas of the rectum: Immunohistochemical detection using non-VNTR antibodies to MUC2 and MUC5AC peptide. *Glycoconjugate J.* 2001;18(11-12):907-14.
- Nagahara N, Tavelin S, Artursson P. Contribution of the paracellular route to the pH-dependent epithelial permeability to cationic drugs. *J Pharm Sci-U.S.* 2004;93(12):2972-84.
- Nagler-Anderson C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(1):59-67.
- Nakagawa Y, Akao Y, Morikawa H, Hirata I, Katsu K, Naoe T, et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. *Life Sci.* 2002;70(19):2253-69.
- Nakahara H, Ishikawa T, Sarai Y, Kondo I, Kozukue H. Survey of Resistance to Metals and Antibiotics in Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae* in Japan. *Zbl Bakt-Int J Med M.* 1978;240(1):22-9.
- Nakahara T, Tanaka T, Musha S. Nondispersive and Dispersive Atomic Fluorescence Spectrometry of Arsenic by Utilizing Arsine-Generation Technique. *B Chem Soc Jpn.* 1978;51(7):2046-51.
- Naranmandura H, Suzuki N, Suzuki KT. Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(8):1010-8.

- Naranmandura H, Carew MW, Xu S, Lee J, Leslie EM, Weinfeld M, et al. Comparative Toxicity of Arsenic Metabolites in Human Bladder Cancer EJ-1 Cells. *Chem Res Toxicol*. 2011a;24(9):1586-96.
- Naranmandura H, Xu S, Sawata T, Hao WH, Liu H, Bu N, et al. Mitochondria Are the Main Target Organelle for Trivalent Monomethylarsonous Add (MMA(III))-Induced Cytotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2011b;24(7):1094-103.
- Narasingarao BS, Prabhavathi T. Invitro Method for Predicting Bioavailability of Iron from Foods. *Am J Clin Nutr*. 1978;31(1):169-75.
- Nemeti B, Gregus Z. Reduction of arsenate to arsenite by human erythrocyte lysate and rat liver cytosol - Characterization of a glutathione- and NAD-dependent arsenate reduction linked to glycolysis. *Toxicol Sci*. 2005;85(2):847-58.
- Nemeti B, Regonesi ME, Tortora P, Gregus Z. Polynucleotide Phosphorylase and Mitochondrial ATP Synthase Mediate Reduction of Arsenate to the More Toxic Arsenite by Forming Arsenylated Analogues of ADP and ATP. *Toxicol Sci*. 2010;117(2):270-81.
- Nesnow S, Roop BC, Lambert G, Kadiiska M, Mason RP, Cullen WR, et al. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol*. 2002;15(12):1627-34.
- Neuhoff S, Ungell AL, Zamora I, Artursson P. pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci*. 2005;25(2-3):211-20.
- Ng JC, Kratzmann SM, Qi LX, Crawley H, Chiswell B, Moore MR. Speciation and absolute bioavailability: risk assessment of arsenic-contaminated sites in a residential suburb in Canberra. *Analyst*. 1998;123(5):889-92.
- Niquet J, Baldwin RA, Allen SG, Fujikawa DG, Wasterlain CG. Hypoxic neuronal necrosis: Protein synthesis-independent activation of a cell death program. *P Natl Acad Sci USA*. 2003;100(5):2825-30.
- Nolleaux G, Deville C, El Moualij B, Zorzi W, Deloyer P, Schneider YJ, et al. Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-5M21). *Bmc Cell Biol*. 2006;7.
- NRC. 1999. Arsenic in Drinking Water. *Arsenic in Drinking Water* [Online].
- OMS (Organización Mundial de la Salud) Guidelines for drinking-water quality. Vol. 1 recommendations, 2nd edn. 1993. World Health Organization (WHO), Geneva.
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 2001. Air quality Guidelines for Europe, 2<sup>nd</sup> ed. WHO Regional Publications, Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- Oomen AG, Hack A, Minekus M, Zeijdner E, Cornelis C, Schoeters G, et al. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ Sci Technol*. 2002;36(15):3326-34.
- Pade V, Stavchansky S. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. *J Pharm Sci-US*. 1998;87(12):1604-7.
- Parlesak A, Haller D, Brinz S, Baeuerlein A, Bode C. Modulation of cytokine release by differentiated CACO-2 cells in a compartmentalized coculture model with mononuclear leucocytes and nonpathogenic bacteria. *Scand J Immunol*. 2004;60(5):477-85.
- Parvez F, Wasserman GA, Factor-Litvak P, Liu XH, Slavkovich V, Siddique AB, et al. Arsenic Exposure and Motor Function among Children in Bangladesh. *Environ Health Persp*. 2011;119(11):1665-70.

- Pederson T. As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? *J Cell Biol.* 2008;180(6):1061-4.
- Pellegrina CD, Perbellini O, Scupoli MT, Tomelleri C, Zanetti C, Zoccatelli G, et al. Effects of wheat germ agglutinin on human gastrointestinal epithelium: Insights from an experimental model of immune/epithelial cell interaction. *Toxicol Appl Pharm.* 2009;237(2):146-53.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* 2003;133(9):2812-9.
- Petrack JS, Jagadish B, Mash EA, Aposhian HV. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD50 in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(6):651-6.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(9).
- Pinto M, Robineleon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, et al. Enterocyte-Like Differentiation and Polarization of the Human-Colon Carcinoma Cell-Line Caco-2 in Culture. *Biol Cell.* 1983;47(3):323-30.
- Pitman RS, Blumberg RS. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. *J Gastroenterol.* 2000;35(11):805-14.
- Podsedek A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *Lwt-Food Sci Technol.* 2007;40(1):1-11.
- Polya DA, Gault AG, Diebe N, Feldman P, Rosenboom JW, Gilligan E, et al. Arsenic hazard in shallow Cambodian groundwaters. *Mineral Mag.* 2005;69(5):807-23.
- Pomroy C, Charbonneau SM, Mccullough RS, Tam GKH. Human Retention Studies with as-74. *Toxicol Appl Pharm.* 1980;53(3):550-6.
- Pontier C, Pachot J, Botham R, Lenfant B, Arnaud P. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer. *J Pharm Sci-U.S.* 2001;90(10):1608-19.
- Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(2):99-104.
- Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(1):156-70.
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res.* 2003;283(1):1-16.
- Pulido MD, Parrish AR. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res-Fund Mol M.* 2003;533(1-2):227-41.
- Raab A, Feldmann J, Meharg AA. The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiol.* 2004;134(3):1113-22.
- Raab A, Ferreira K, Meharg AA, Feldmann J. Can arsenic-phytochelatin complex formation be used as an indicator for toxicity in *Helianthus annuus*? *J Exp Bot.* 2007;58(6):1333-8.
- Rahman MM, Owens G, Naidu R. Arsenic levels in rice grain and assessment of daily dietary intake of arsenic from rice in arsenic-contaminated regions of Bangladesh-implications to groundwater irrigation. *Environ Geochem Hlth.* 2009;31:179-87.

- Raml R, Rumpler A, Goessler W, Vahter M, Li L, Ochi T, et al. Thio-dimethylarsinate is a common metabolite in urine samples from arsenic-exposed women in Bangladesh. *Toxicol Appl Pharm.* 2007;222(3):374-80.
- Ramoutar RR, Brumaghim JL. Antioxidant and Anticancer Properties and Mechanisms of Inorganic Selenium, Oxo-Sulfur, and Oxo-Selenium Compounds. *Cell Biochem Biophys.* 2010;58(1):1-23.
- Rando OJ, Zhao KJ, Crabtree GR. Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol.* 2000;10(3):92-7.
- Raqib R, Ahmed S, Sultana R, Wagatsuma Y, Mondal D, Hoque AMW, et al. Effects of in utero arsenic exposure on child immunity and morbidity in rural Bangladesh. *Toxicol Lett.* 2009;185(3):197-202.
- Ravenscroft P. Predicting the global extent of arsenic pollution of groundwater and its potential impact on human health. 2007. New York, USA: Report prepared for UNICEF.
- Regmi R, Milne BF, Feldmann J. Hydride generation activity of arsenosugars and thioarsenicals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2007;388(4):775-82.
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, et al. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol.* 1996a;16(3):144-50.
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, et al. Increased production of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut.* 1996b;39(5):684-9.
- Ren XF, Aleshin M, Jo WJ, Dills R, Kalman DA, Vulpe CD, et al. Involvement of N-6 Adenine-Specific DNA Methyltransferase 1 (N6AMT1) in Arsenic Biomethylation and Its Role in Arsenic-Induced Toxicity. *Environ Health Persp.* 2011;119(6):771-7.
- Roberts SM, Weimar WR, Vinson JRT, Munson JW, Bergeron RJ. Measurement of arsenic bioavailability in soil using a primate model. *Toxicol Sci.* 2002;67(2):303-10.
- Rossmann TG. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat Res-Fund Mol M.* 2003;533(1-2):37-65.
- Rousselot P, Larghero J, Arnulf B, Poupon J, Royer B, Tibi A, et al. A clinical and pharmacological study of arsenic trioxide in advanced multiple myeloma patients. *Leukemia.* 2004;18(9):1518-21.
- Rubas W, Jezyk N, Grass GM. Comparison of the Permeability Characteristics of a Human Colonic Epithelial (Caco-2) Cell-Line to Colon of Rabbit, Monkey, and Dog Intestine and Human Drug Absorption. *Pharm Res-Dordr.* 1993;10(1):113-8.
- Rubio LA, Clemente A. In vivo (rat) and in vitro (Caco-2 cells) absorption of amino acids from legume protein isolates as compared to lactalbumin or casein. *Arch Anim Nutr.* 2009;63(5):413-26.
- Ruby MV, Davis A, Schoof R, Eberle S, Sellstone CM. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environ Sci Technol.* 1996;30(2):422-30.
- Ruby MV, Schoof R, Brattin W, Goldade M, Post G, Harnois M, et al. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environ Sci Technol.* 1999;33(21):3697-705.

- Ryan P, Hynes MJ. The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behaviour of the polyphenols EGCg and ECG with iron(III). *J Inorg Biochem.* 2007;101(4):585-93.
- Saha JC, Dikshit AK, Bandyopadhyay M, Saha KC. A review of arsenic poisoning and its effects on human health. *Crit Rev Env Sci Tec.* 1999;29(3):281-313.
- Sai Y, Kaneko Y, Ito S, Mitsuoka K, Kato Y, Tamai I, et al. Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(8):1423-31.
- Saitoh R, Sugano K, Takata N, Tachibana T, Higashida A, Nabuchi Y, et al. Correction of permeability with pore radius of tight junctions in Caco-2 monolayers improves the prediction of the dose fraction of hydrophilic drugs absorbed by humans. *Pharm Res-Dordr.* 2004;21(5):749-55.
- Sakurai T, Kojima C, Waalkes MP, Himeno S. Effects of exogenous cysteine on inorganic and organic arsenicals-induced cytolethality. *Appl Organomet Chem.* 2006;20(9):549-56.
- Sakurai T, Ohta T, Tomita N, Kojima C, Hariya Y, Mizukami A, et al. Evaluation of immunotoxic and immunodisruptive effects of inorganic arsenite on human monocytes/macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(13):1661-73.
- Sambuy Y, Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005;21(1):1-26.
- Sands BE. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 1997;3(2):95-113.
- Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(12):953-64.
- Satsu H, Shimizu M. Food factors that regulate intestinal inflammation: Evaluation of the factors by using a coculture system. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, Vol 14.* 2006:29-37.
- Schmidt AC, Kopplet J, Neustadt M, Otto M. Mass spectrometric evidence for different complexes of peptides and proteins with arsenic(III), arsenic(V), copper(II), and zinc(II) species. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2007;21(2):153-163.
- Schnabl KL, Larcelet M, Thomson ABR, Clandinin MT. Uptake and fate of ganglioside GD3 in human intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol-Gastr L.* 2009;297(1):G52-G9.
- Scholz C, Wieder T, Starck L, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dorken B, et al. Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway. *Oncogene.* 2005;24(11):1904-13.
- Sele V, Sloth JJ, Lundebye AK, Larsen EH, Berntssen MHG, Amlund H. Arsenolipids in marine oils and fats: A review of occurrence, chemistry and future research needs. *Food Chem.* 2012;133(3):618-30.
- Sewnath ME, Poll T, Kate FJ, Obertop H, Deventer SJ, Gouma DJ. Important role for interleukin 1 in endotoxin-induced responses in cholestatic mice. *Gastroenterology.* 2000;118(4):A915-A.
- Sharma P., Varma MVS, Chawla HPS, Panchagnula R. Absorption enhancement, mechanistic and toxicity studies of medium chain fatty acids, cyclodextrins and bile salts as peroral absorption enhancers. *Il Farmaco,* 2005, 60(11-12): 884-893.

- Shaykhiev R, Bals R. Interactions between epithelial cells and leukocytes in immunity and tissue homeostasis. *J Leukocyte Biol.* 2007;82(1):1-15.
- Shen L, Yang W, Gong FR, Wu YZ, Qian JY, Sun AJ, et al. Anti-inflammatory Effect of Arsenic Trioxide Eluting Stents in a porcine coronary model. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(20):B121-B.
- Shi HL, Shi XL, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem.* 2004;255(1-2):67-78.
- Shim SM, Ferruzzi MG, Kim YC, Janle EM, Santerre CR. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chem.* 2009;112(1):46-50.
- Shimizu M. Interaction between Food Substances and the Intestinal Epithelium. *Biosci Biotech Bioch.* 2010;74(2):232-41.
- Shinkai Y, Sumi D, Toyama T, Kaji T, Kumagai Y. Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *Toxicol Appl Pharm.* 2009;237(2):232-6.
- Shore PA, Brodie BB, Hogben CAM. The Gastric Secretion of Drugs - a Ph Partition Hypothesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1957;119(3):361-9.
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Bio Med.* 1999;27(9-10):916-21.
- Signes A, Mitra K, Burlo F, Carbonell-Barrachina AA. Contribution of water and cooked rice to an estimation of the dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of West Bengal, India. *Food Addit Contam.* 2008;25(1):41-50.
- Signes-Pastor AJ, Deacon C, Jenkins RO, Haris PI, Carbonell-Barrachina AA, Meharg AA. Arsenic speciation in Japanese rice drinks and condiments. *J Environ Monitor.* 2009;11(11):1930-4.
- Siissalo S, Hannukainen J, Kolehmainen J, Hirvonen J, Kaukonen AM. A Caco-2 cell based screening method for compounds interacting with MRP2 efflux protein. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(2):332-8.
- Silano M, Vincentini O, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, De Vincenzi M. MP-chitosan protects Caco-2 cells from toxic gliadin peptides. *Carbohydr. Polym.* 2004, 58(2): 215-219.
- Singer M, Trugnan G, Chelbi-Alix MK. Arsenic trioxide reduces 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced murine colitis via nuclear factor-kappa B down-regulation and caspase-3 activation. *Innate Immun-London.* 2011;17(4):365-74.
- Singh KP, Kumari R, Treas J, DuMond JW. Chronic Exposure to Arsenic Causes Increased Cell Survival, DNA Damage, and Increased Expression of Mitochondrial Transcription Factor A (mtTFA) in Human Prostate Epithelial Cells. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(3):340-9.
- Smith AH, Liaw J, Steinmaus C, Basu A, Mitra S, Kalman D. Relationship of Creatinine and Nutrition with Arsenic Metabolism: Smith et al. *Respond. Environ Health Persp.* 2012;120(4):A146-A7.
- Smith NM, Lee R, Heitkemper DT, Cafferky KD, Haque A, Henderson AK. Inorganic arsenic in cooked rice and vegetables from Bangladeshi households. *Sci Total Environ.* 2006;370(2-3):294-301.
- Smith AH, Marshall G, Yuan Y, Ferreccio C, Liaw J, von Ehrenstein O, et al. Increased mortality from lung cancer and bronchiectasis in young adults after exposure to arsenic in utero and in early childhood. *Environ Health Persp.* 2006;114(8):1293-6.

- Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev.* 2005;206:149-59.
- Soergel KH, Whalen GE, Harris JA. Passive Movement of Water and Sodium across Human Small Intestinal Mucosa. *J Appl Physiol.* 1968;24(1):40-&.
- Sonnier DI, Bailey SR, Schuster RM, Lentsch AB, Pritts TA. TNF-alpha Induces Vectorial Secretion of IL-8 in Caco-2 Cells. *J Gastrointest Surg.* 2010;14(10):1592-8.
- Sonoyama K, Suzuki K, Kasai T. Peptide YY stimulates the expression of apolipoprotein A-IV gene in Caco-2 intestinal cells. *P Soc Exp Biol Med.* 2000;223(3):270-5.
- Soto-Pena GA, Luna AL, Acosta-Saavedra L, Conde-Moo P, Lopez-Carrillo L, Cebrian ME, et al. Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *Faseb J.* 2006;20(2):779-+.
- Soto-Pena GA, Vega L. Arsenic interferes with the signaling transduction pathway of T cell receptor activation by increasing basal and induced phosphorylation of Lck and Fyn in spleen cells. *Toxicol Appl Pharm.* 2008;230(2):216-26.
- Spiegelstein O, Lu XF, Le XC, Troen A, Selhub J, Melnyk S, et al. Effects of dietary folate intake and folate binding protein-1 (Folbp1) on urinary speciation of sodium arsenate in mice. *Toxicol Lett.* 2003;145(2):167-74.
- Steinmaus C, Carrigan K, Kalman D, Atallah R, Yuan Y, Smith AH. Dietary intake and arsenic methylation in a US population. *Environ Health Persp.* 2005;113(9):1153-9.
- Styblo M, Serves SV, Cullen WR, Thomas DJ. Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols. *Chem Res Toxicol.* 1997;10(1):27-33.
- Styblo M, Thomas DJ. Binding of arsenicals to proteins in an in vitro methylation system. *Toxicol Appl Pharm.* 1997;147(1):1-8.
- Styblo M, Del Razo LM, LeCluyse EL, Hamilton GA, Wang CQ, Cullen WR, et al. Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* 1999b;12(7):560-5.
- Styblo M, Del Razo LM, Vega L, Germolec DR, LeCluyse EL, Hamilton GA, et al. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol.* 2000;74(6):289-99.
- Styblo M, Lin S, Del Razo LM, Thomas DJ. Trivalent methylated arsenicals: Toxic products of the metabolism of inorganic arsenic. *Arsenic Exposure and Health Effects Iv.* 2001:325-37.
- Styblo M, Vega L, Germolec DR, Luster MI, Del Razo LM, Wang C, Cullen WR, Thomas DJ. Metabolisms and toxicity of arsenicals in cultured cells. 1999a. Chappell, W., Abernathy, C.O., Calderon, R.L. (Eds), *Arsenic Exposure and Health Effects.* Elsevier Science, Ltd, UK., pp 311-334.
- Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L, et al. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(8):597-614.
- Sumazian Y, Syahida A, Hakiman M, Maziah M. Antioxidant activities, flavonoids, ascorbic acid and phenolic contents of Malaysian vegetables. *J Med Plants Res.* 2010;4(10):881-90.
- Sun DX, Lennernas H, Welage LS, Barnett JL, Landowski CP, Foster D, et al. Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs. *Pharm Res-Dordr.* 2002;19(10):1400-16.

- Sun GX, Williams PN, Zhu YG, Deacon C, Carey AM, Raab A, et al. Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments. *Environ Int.* 2009;35(3):473-5.
- Suñer MA, Devesa V, Clemente MJ, Velez D, Montoro R, Urieta I, et al. Organoarsenical species contents in fresh and processed seafood products. *J Agr Food Chem.* 2002;50(4):924-32.
- Suwalsky M, Rivera C, Villena F, Sotomayor CP, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K. Arsenite interactions with phospholipid bilayers as molecular models for the human erythrocyte membrane. *Biophys Chem.* 2007;127(1-2):28-35.
- Suzuki KT, Mandal BK, Katagiri A, Sakuma Y, Kawakami A, Ogra Y, et al. Dimethylthioarsenicals as arsenic metabolites and their chemical preparations. *Chem Res Toxicol.* 2004;17(7):914-21.
- Suzuki KT, Tomita T, Ogra Y, Ohmichi M. Glutathione-conjugated arsenics in the potential hepato-enteric circulation in rats. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(12):1604-11.
- Sylvester PA, Myerscough N, Warren BF, Carlstedt I, Corfield AP, Durdey P, et al. Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer. *J Pathol.* 2001;195(3):327-35.
- Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IFF. Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. *Brit J Nutr.* 2002;87(1):55-9.
- Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2010;11(9):621-32.
- Tak PP, Firestein GS. NF-kappa B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001;107(1):7-11.
- Takeda E, Taketani Y, Morita K, Tatsumi S, Katai K, Nii T, et al. Molecular mechanisms of mammalian inorganic phosphate homeostasis. *Adv Enzyme Regul.* 2000;40:285-302.
- Takeda K, Akira S. Microbial recognition by toll-like receptors. *J Dermatol Sci.* 2004;34(2):73-82.
- Tam GKH, Charbonneau SM, Bryce F, Pomroy C, Sandi E. Metabolism of Inorganic Arsenic (as-74) in Humans Following Oral Ingestion. *Toxicol Appl Pharm.* 1979;50(2):319-22.
- Tavelin S, Taipalensuu J, Soderberg L, Morrison R, Chong SH, Artursson P. Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers. *Pharm Res-Dordr.* 2003;20(3):397-405.
- Thomas DJ, Li JX, Waters SB, Xing WB, Adair BM, Drobna Z, et al. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Exp Biol Med.* 2007;232(1):3-13.
- Thorburn AL. Paul Ehrlich: pioneer of chemotherapy and cure by arsenic (1854-1915). *The British journal of venereal diseases.* 1983;59(6):404-5. Epub 1983/12/01.
- Tokar EJ, Qu W, Liu J, Liu W, Webber MM, Phang JM, et al. Arsenic-Specific Stem Cell Selection During Malignant Transformation. *J Natl Cancer I.* 2010;102(9):638-49.
- Torres-Escribano S, Denis S, Blanquet-Diot S, Calatayud M, Barrios L, Velez D, et al. Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials *Fucus* sp (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). *Sci Total Environ.* 2011;409(3):604-11.
- Torres-Avila M, Leal-Galicia P, Sanchez-Pena LC, Del Razo LM, Gonshebbat ME. Arsenite induces aquaglyceroporin 9 expression in murine livers. *Environ Res.* 2010;110(5):443-7.

- Torres-Escribano S, Leal M, Velez D, Montoro R. Total and inorganic arsenic concentrations in rice sold in Spain, effect of cooking, and risk assessments. *Environ Sci Technol*. 2008;42(10):3867-72.
- Ueno Y, Matsuda H, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. Involvement of Specific Transport System on Uptake of Lactone Form of SN-38 in Human Intestinal Epithelial Cell Line Caco-2. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(1):54-8.
- Vahter M. Variation in human metabolism of arsenic. *Arsenic Exposure and Health Effects*. 1999;267-79.
- Vahter ME. Interactions between arsenic-induced toxicity and nutrition in early life. *J Nutr*. 2007;137(12):2798-804.
- Valencia E, Marin A, Hardy G. Glutathione-nutritional and pharmacologic viewpoints: Part I. *Nutrition*. 2001;17(5):428-9.
- Valenzuela A, Balladares E, Cordero D, Sanchez M. Arsenic management in the metallurgical industry: The Chilean experience. *Sohn International Symposium Advanced Processing of Metals and Materials*, Vol 9. 2006:407-22.
- Van Campen DR, Glahn RP. Micronutrient bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations. *Field Crop Res*. 1999;60(1-2):93-113.
- Van De Walle J, Hendrickx A, Romier B, Larondelle Y, Schneider YJ. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicol in Vitro*. 2010;24(5):1441-9.
- Van de Wiele T, Gallawa CM, Kubachka KM, Creed JT, Basta N, Dayton EA, et al. Arsenic Metabolism by Human Gut Microbiota upon in Vitro Digestion of Contaminated Soils. *Environ Health Persp*. 2010;118(7):1004-9.
- Vanbeers EH, Buller HA, Grand RJ, Einerhand AWC, Dekker J. Intestinal Brush-Border Glycohydrolases - Structure, Function, and Development. *Crit Rev Biochem Mol*. 1995;30(3):197-262.
- Vasanthi HR, Mukherjee S, Das DK. Potential Health Benefits of Broccoli- A Chemico-Biological Overview. *Mini-Rev Med Chem*. 2009;9(6):749-59.
- Vasiluk L, Dutton MD, Hale B. In vitro estimates of bioaccessible nickel in field-contaminated soils, and comparison with in vivo measurement of bioavailability and identification of mineralogy. *Sci Total Environ*. 2011;409(14):2700-6.
- Vega L, Styblo M, Patterson R, Cullen W, Wang CQ, Germolec D. Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharm*. 2001;172(3):225-32.
- Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol-Renal*. 2000;278(1):F13-F28.
- Versantvoort CHM, Oomen AG, Van de Kamp E, Rempelberg CJM, Sips AJAM. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(1):31-40.
- Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I. Antioxidant role of metallothioneins: A comparative overview. *Cell Mol Biol*. 2000;46(2):407-17.
- Villa-Bellosta R, Sorribas V. Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate. *Toxicol Appl Pharm*. 2008;232(1):125-34.

- Villa-Bellosta R, Sorribas V. Arsenate transport by sodium/phosphate cotransporter type IIb. *Toxicol Appl Pharm.* 2010;247(1):36-40.
- Virkki LV, Biber J, Murer H, Forster IC. Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families. *Am J Physiol-Renal.* 2007;293(3):F643-F54.
- Visco V, Bava FA, D'Alessandro F, Cavallini M, Ziparo V, Torrisi MR. Human Colon Fibroblasts Induce Differentiation and Proliferation of Intestinal Epithelial Cells Through the Direct Paracrine Action of Keratinocyte Growth Factor. *J Cell Physiol.* 2009;220(1):204-13.
- Vitkus SJD, Hanifin SA, McGee DW. Factors affecting Caco-2 intestinal epithelial cell interleukin-6 secretion. *In Vitro Cell Dev-An.* 1998;34(8):660-4.
- Wang S, Evers BM. Caco-2 cell differentiation is associated with a decrease in Stat protein levels and binding. *J Gastrointest Surg.* 1999;3(2):200-7.
- Wanibuchi H, Salim EI, Kinoshita A, Shen J, Wei M, Morimura K, et al. Understanding arsenic carcinogenicity by the use of animal models. *Toxicol Appl Pharm.* 2004;198(3):366-76.
- Wasserman GA, Liu XH, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, Kline J, et al. Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Araihazar, Bangladesh. *Environ Health Persp.* 2007;115(2):285-9.
- Watanabe T, Ohta Y, Mizumura A, Kobayashi Y, Hirano S. Analysis of arsenic metabolites in HepG2 and AS3MT-transfected cells. *Arch Toxicol.* 2011;85(6):577-88.
- Waters SB, Lin S, Styblo M, Thomas DJ. A novel S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase from rat liver cytosol catalyzes the formation of methylated arsenicals. *Arsenic Exposure and Health Effects V.* 2003:255-66.
- Waters SB, Devesa V, Del Razo LM, Styblo M, Thomas DJ. Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat Cyt19, an arsenic methyltransferase. *Chem Res Toxicol.* 2004a;17(3):404-9.
- Waters SB, Devesa V, Fricke MW, Creed JT, Styblo M, Thomas DJ. Glutathione modulates recombinant rat arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase-catalyzed formation of trimethylarsine oxide and trimethylarsine. *Chem Res Toxicol.* 2004b;17(12):1621-9.
- Waugh DJJ, Wilson C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6735-41.
- Wei M, Wanibuchi H, Morimura K, Iwai S, Yoshida K, Endo G, et al. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. *Carcinogenesis.* 2002;23(8):1387-97.
- Wienk KJH, Marx JJM, Beynen AC. The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur J Nutr.* 1999;38(2):51-75.
- Wikmanlarhed A, Artursson P. Cocultures of Human Intestinal Goblet (Ht29-H) and Absorptive (Caco-2) Cells for Studies of Drug and Peptide Absorption. *Eur J Pharm Sci.* 1995;3(3):171-83.
- Williams PN, Price AH, Raab A, Hossain SA, Feldmann J, Meharg AA. Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environ Sci Technol.* 2005;39(15):5531-40.
- Williams TM, Rawlins BG, Smith B, Breward N. In-vitro determination of arsenic bioavailability in contaminated soil and mineral beneficiation waste from Ron Phibun, southern Thailand: A basis for improved human risk assessment. *Environ Geochem Hlth.* 1998;20(4):169-77.

- Williams G, West JM, Koch I, Reimer KJ, Snow ET. Arsenic speciation in the freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark. *Sci Total Environ*. 2009;407(8):2650-8.
- Winski SL, Carter DE. Interactions of Rat Red-Blood-Cell Sulfhydryls with Arsenate and Arsenite. *J Toxicol Env Health*. 1995;46(3):379-97.
- Wnek SM, Kuhlman CL, Camarillo JM, Medeiros MK, Liu KJ, Lau SS, et al. Interdependent genotoxic mechanisms of monomethylarsonous acid: Role of ROS-induced DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition in the malignant transformation of urothelial cells. *Toxicol Appl Pharm*. 2011;257(1):1-13.
- Wood KM, Stone GM, Peppas NA. The effect of complexation hydrogels on insulin transport in intestinal epithelial cell models. *Acta Biomater*. 2010;6(1):48-56.
- Woywodt A, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Ludwig D, Stange EF, et al. Cytokine Expression in Intestinal Mucosal Biopsies - in-Situ Hybridization of the Messenger-Rna for Interleukin-1-Beta, Interleukin-6 and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha in Inflammatory Bowel-Disease. *Eur Cytokine Netw*. 1994;5(4):387-95.
- Xie ZM, Huang CY. Control of arsenic toxicity in rice plants grown on an arsenic-polluted paddy soil. *Commun Soil Sci Plan*. 1998;29(15-16):2471-7.
- Xu YY, Wang Y, Zheng QM, Li B, Li X, Jin YP, et al. Clinical manifestations and arsenic methylation after a rare subacute arsenic poisoning accident. *Toxicol Sci*. 2008;103(2):278-84.
- Xu YY, Wang HH, Wang Y, Zheng Y, Sun GF. Effects of folate on arsenic toxicity in Chang human hepatocytes: Involvement of folate antioxidant properties. *Toxicol Lett*. 2010;195(1):44-50.
- Yamamoto S, Konishi Y, Matsuda T, Murai T, Shibata MA, Matsuiyusa I, et al. Cancer Induction by an Organic Arsenic Compound, Dimethylarsinic Acid (Cacodylic Acid), in F344/Ducrj Rats after Pretreatment with 5 Carcinogens. *Cancer Res*. 1995;55(6):1271-6.
- Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci*. 2000;10(3):195-204.
- Yang CY, Chang CC, Ho SC, Chiu HF. Is colon cancer mortality related to arsenic exposure? *J Toxicol Env Heal A*. 2008;71(8):533-8.
- Yang U-J, Yoon S-R, Chung J-H, Kim YJ, Park K-H, Park T-S, et al. Water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk.) reduced the absorption of heavy metals in an in vitro bio-mimicking model system. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(10):3862-6.
- Yang YP, Liang ZQ, Gao B, Jia YL, Qin ZH. Dynamic effects of autophagy on arsenic trioxide-induced death of human leukemia cell line HL60 cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29(1):123-34.
- Yathavakilla SKV, Fricke M, Creed PA, Heitkemper DT, Shockey NV, Schwegel C, et al. Arsenic speciation and identification of monomethylarsonous acid and monomethylthioarsonic acid in a complex matrix. *Anal Chem*. 2008;80(3):775-82.
- Yee SY. In vitro permeability across Caco3 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man - Fact or myth. *Pharm Res-Dordr*. 1997;14(6):763-6.
- Yen HT, Chiang LC, Wen KH, Chang SF, Tsai CC, Yu CL, et al. Arsenic induces interleukin-8 expression in cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 1996;288(11):716-7.

- Yokooji T, Murakami T, Yumoto R, Takano M. Role of intestinal efflux transporters in the intestinal absorption of methotrexate in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(9):1263-70.
- Yoshida T, Shimamura T, Shigeta S. Enhancement of the Immune-Response *In Vitro* by Arsenic. *Int J Immunopharmacol.* 1987;9(3):411-5.
- Yoshida T, Yamauchi H, Sun GF. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol Appl Pharm.* 2004;198(3):243-52.
- Zablotska LB, Chen Y, Graziano JH, Parvez F, van Geen A, Howe GR, et al. Protective effects of B vitamins and antioxidants on the risk of arsenic-related skin lesions in Bangladesh. *Environ Health Persp.* 2008;116(8):1056-62.
- Zakharyan RA, Aposhian HV. Arsenite methylation by methylvitamin B-12 and glutathione does not require an enzyme. *Toxicol Appl Pharm.* 1999;154(3):287-91.
- Zakharyan RA, Sampayo-Reyes A, Healy SM, Tsaprailis G, Board PG, Liebler DC, et al. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(8):1051-7.
- Zhang SA, Guo W, Ren TT, Lu XC, Tang GQ, Zhao FL. Arsenic trioxide inhibits Ewing's sarcoma cell invasiveness by targeting p38(MAPK) and c-Jun N-terminal kinase. *Anti-Cancer Drug.* 2012;23(1):108-18.
- Zhao YS, Hu ZY, Jiang RR, Yang JL, Chen F. Comment on "Permeability, Transport, and Metabolism of Solutes in Caco-2 Cell Monolayers: A Theoretical Study". *Drug Metab Dispos.* 2010;38(3):534-5.
- Zhao R, Zhao MX, Wang H, Taneike Y, Zhang XR. Arsenic speciation in moso bamboo shoot - A terrestrial plant that contains organoarsenic species. *Sci Total Environ.* 2006;371(1-3):293-303.
- Zhou LF, Zhu Y, Cui XF, Xie WP, Hu AH, Yin KS. Arsenic trioxide, a potent inhibitor of NF-kappa B, abrogates allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Respir Res.* 2006;7.
- Zucco F, Batto AF, Bises G, Chambaz J, Chiusolo A, Consalvo R, et al. An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *Atla-Altern Lab Anim.* 2005;33(6):603-18.
- Zweibaum A, Robineleon S, Simonassmann P, Triadou N, Pinto M, Dussaulx E, et al. Ectopic Expression of Small Intestinal Brush-Border Associated Enzymes in Human Colorectal Carcinomas Developed in Nude-Mice. *P Am Assoc Canc Res.* 1983;24(Mar):39.