



TESIS DOCTORAL

Efecto del arsénico inorgánico presente en los alimentos sobre el epitelio intestinal

Gabriela de Matuoka e Chiocchetti

Directoras: Vicenta Devesa y Dinoraz Vélez

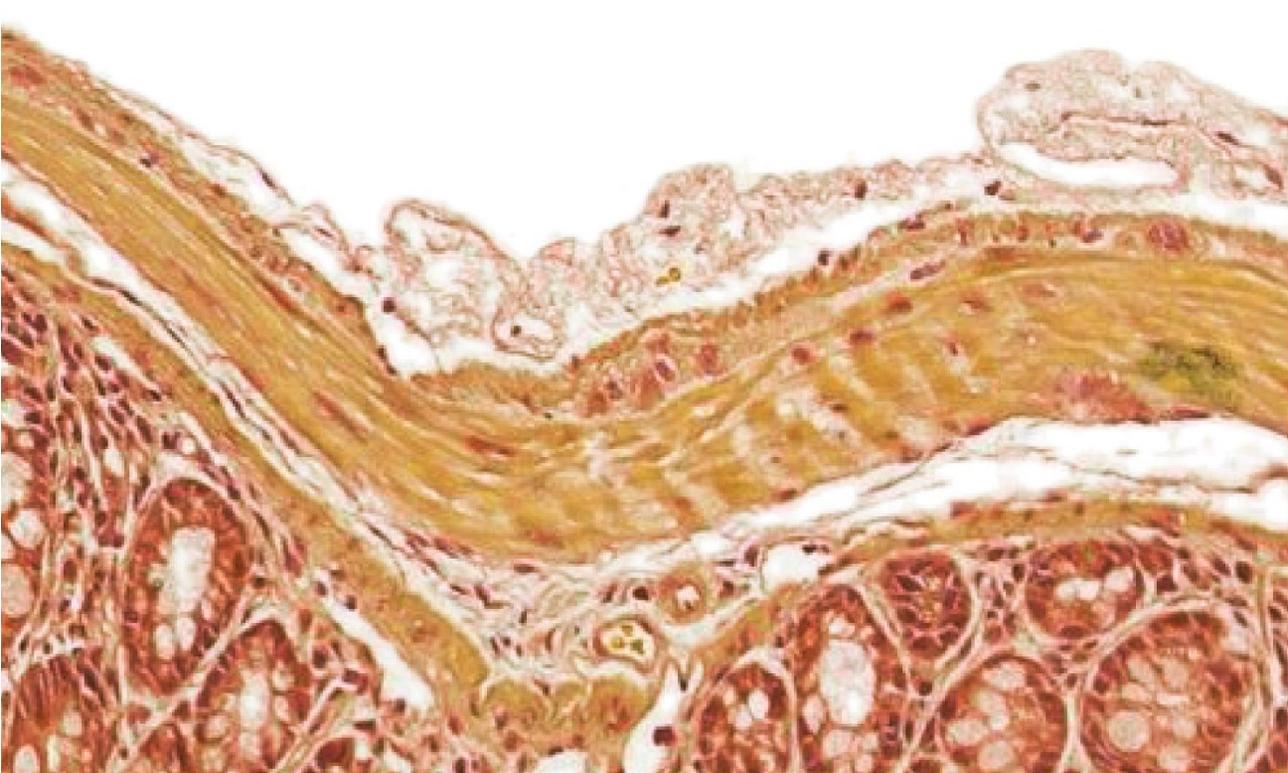
Septiembre 2018

Programa de Doctorado en Ciencias de la Alimentación

Universitat de València



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA





VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Efecto del arsénico inorgánico presente en los alimentos sobre el epitelio intestinal

Tesis doctoral presentada por:

Gabriela de Matuoka e Chiocchetti

Dirigida por:

Dra. Vicenta Devesa i Pérez

Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Valencia, septiembre de 2018

Programa de Doctorado en Ciencias de la Alimentación
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la
Alimentación, Toxicología y Medicina Legal
Universitat de València



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

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 **“Efecto del arsénico inorgánico presente en los alimentos sobre el epitelio intestinal”**, que presenta Dña. Gabriela de Matuoka e Chiocchetti 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 su dirección y que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctora.

Valencia, septiembre de 2018

Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Dra. Vicenta Devesa i Pérez

*A mis queridos padres Yumi y Lazaro,
por vuestro amor incondicional*

*De todo quedaron tres cosas:
la certeza de que estaba siempre comenzando,
la certeza de que había que seguir
y la certeza de que podemos ser interrumpidos antes de terminar.*

*Hacer de la interrupción un camino nuevo
de la caída, un paso de danza,
del miedo, una escalera,
del sueño, un puente,
de la búsqueda...un encuentro.*

Fernando Sabino

Agradecimientos

Quien termina la tesis no es la misma persona que la empieza. Han sido cuatro años de aprendizaje profesional y personal, que seguramente me han cambiado a mí y a mi vida. Llegué a España con mucha inseguridad y sin saber lo que me esperaba, teniendo delante de mí un nuevo país y muchos desafíos y atrás todo mi confort y seguridad. Ahora termino la tesis con la sensación de haber cumplido una de las grandes etapas de la vida. Aunque el futuro se vea todavía como algo borroso y misterioso, estoy segura que esta ha sido una gran oportunidad en mi vida y estoy muy agradecida a todas las personas que me encontré en este camino a lo largo de estos años y que hicieron posible la realización de este trabajo.

Primero me gustaría agradecer a mis jefas Vicenta y Deni, por ser dos ejemplos de mujeres fuertes, con ganas y capacidad de realizar un buen trabajo. Os agradezco por haberme confiado esta desafiadora tesis. Me habéis enseñado mucho en estos años y siempre habéis estado presentes cuando lo he necesitado, tanto en mi vida profesional, como en la personal.

Agradezco también a todo el personal administrativo del IATA/CSIC y de la Universidad de Valencia, por haberme ayudado con toda la burocracia necesaria para la admisión en el doctorado. También agradezco al Gobierno brasileño (CAPES), la beca concedida para el desarrollo de la tesis.

A mis compañeros de tesis Carlos y Chusa, por su amistad y buenos momentos compartidos. Carlos, eres una de las mejores personas que he conocido en mi vida. Tienes siempre una sonrisa en el rostro, entregas lo mejor de ti en lo que haces y esperas lo mejor de las personas. Chusa, tú has sido una gran compañera durante estos años. Hemos compartido todas las alegrías y angustias de la tesis doctoral. Os deseo todo lo mejor que la vida os pueda ofrecer.

A Manu, Marina y Adrián, por vuestra importante contribución en la realización de los trabajos de la tesis y por los buenos momentos compartidos en el laboratorio. Además, a todas las personas que realizaron prácticas en el laboratorio de Elementos Trazas a lo largo de estos años: Alessandra, Ali, Álvaro,

Cris, Diana, Mahboobeh, Magda, Maleles, Marta, Jonatán, José, Paloma, Teresa y Virginia, por los momentos y almuerzos compartidos. En especial a Raquel Domínguez, que compartió conmigo los primeros momentos en la sala de cultivo celular, donde tanto aprendimos.

A mis compañeros, colegas y amigos que pasaron por IATA durante estos años. He tenido la oportunidad de convivir con personas tan distintas, de distintos países. De todos he aprendido algo. En especial agradezco a Flor, Jaime y Mari Carmen, por los buenos momentos y comidas compartidas. Agradezco también a mis compañeros de planta (Gracia, Temo, Diana, Laura H., Laura S., Aída, Raquel, Patricia, Arantxa y Mónica, de los laboratorios de Envases, Propiedades físicas y sensoriales de alimentos y de Procesos de conservación y evaluación de riesgos en alimentos) por los préstamos de equipos y reactivos y por los momentos de conversación en el pasillo que tanto alegran el día.

A Vicente Monedero y Manuel Zúñiga, del grupo de Bacterias lácticas y probióticos del IATA, por la colaboración en los estudios con bacterias lácticas y de experimentación animal. Agradezco también a Christine Bäuerl, por toda ayuda, amistad y por compartir sus preciosos conocimientos conmigo, así como el personal de Laboratorio de Ecología microbiana, Nutrición y Salud (Alfonso, Eva, Isabel, Kevin, Mamen, Marina, Inma, y Zohran) por todos los conocimientos compartidos y por el préstamo de materiales y reactivos.

La realización de esta tesis no sería posible sin la gran ayuda y apoyo que he recibido del personal técnico de IATA. Muchas gracias a Ana Cris Tavares, Antonio Ruiz, José Gimeno, Lola Abolafio y Lorena Perales por toda la ayuda técnica que me han dado durante estos años. Vuestras experiencias fueron muy importantes para el desarrollo de la tesis. En especial me gustaría agradecer a Pepe Coll, por las horas compartidas en el microscopio de fluorescencia y por su gran interés en ayudar en todo lo posible y su buena voluntad en compartir su conocimiento.

Me gustaría también agradecer a todo el personal de la sección de producción animal de la Universidad de Valencia (Eli, Jesús, Ilra e Inma) por las risas y buenos momentos compartidos, que hicieron que esa pesada etapa del trabajo fuera más liviana. En especial a Inma Noguera por toda su ayuda, enseñanzas y disposición en ayudar en todo lo necesario.

Fuera de IATA, también he conocido muchas personas que fueran importantes en mi vida durante estos años. Mi eterno agradecimiento a mis queridos amigos latinos que conocí en Valencia (Adriane, Emanuel, Fabio, Francisco, Lorena, Natalia, Rosa, Yamile) por la compañía y amistad. Fueron muchas cenas, viajes, risas y preciosos momentos compartidos... Sin vosotros, mi primer año en Valencia seguramente no habría sido lo mismo. Agradezco también a mis compañeros del curso de español, Bea, Claudio y Mariana, así como las profesoras Inés y María. Habéis transformado la tarea de aprender un nuevo idioma en un país extranjero en algo divertido y sencillo.

A Dulce, por haber sido la mejor compañera de piso que podría tener, con la cual tuve la oportunidad de compartir tanto en mis primeros años en Valencia y que me enseñó mucho sobre España y su cultura. Gracias también a Hyemin, Lara y Debora por los buenos momentos compartidos en la calle Serrería.

Agradezco también a todas mis amigas que se quedaron en Brasil (Thaís, María Eduarda, María Elisa, Ligia, Larissa, Helô, Mayra, Nataly y Tassiane). Aunque distantes, no hay un solo día en que no piense en vosotras y os eche de menos. Formáis parte de la historia de mi vida y sin vosotras seguramente no sería quien soy ahora.

Gracias especialmente a Pablo, por enseñarme que la vida puede ser maravillosa, cuando nos permitimos vivirla. Tu intensidad y ganas de vivir han cambiado mi forma de ver la vida y me han dado mucha fuerza para enfrentar todos los retos que se han presentado en este desafío. Seguramente estos años habrían sido muy tediosos sin ti. Por eso y por tu amor, te agradezco.

Por último, pero no menos importante, me gustaría agradecer a mi familia: mis padres (Lazaro e Yumi), mis hermanos (Rafael y Juliana), mis cuñados (Taty y Scott), mi querida tía Maria Tereza y mi abuela Mieko. Gracias por hacer que me sienta amada aun estando tan lejos, y por perdonar mi ausencia en estos años, apoyándome siempre en mis decisiones. En especial agradezco a mis sobrinos Luca y Emilia, por haber cambiado totalmente nuestras vidas y traernos de vuelta la paz y la alegría que necesitábamos en estos últimos años.

A todos con los que he compartido algún momento durante estos años, os dejo mis sinceros agradecimientos. Muito obrigada!

RESUMEN

El arsénico es un metaloide tóxico ampliamente distribuido en el medioambiente. Su forma inorgánica [As(III) y As(V)] es la más tóxica encontrada en agua y alimentos. La exposición a arsénico inorgánico, descrita en numerosas zonas del planeta y que en la actualidad se estima que afecta a 200 millones de personas, aumenta la incidencia de determinados tipos de cáncer y otras patologías no cancerígenas. Teniendo en cuenta que la principal vía de exposición es la oral, el tracto gastrointestinal se considera la puerta de entrada de este tóxico al organismo; sin embargo, los estudios para determinar los efectos tóxicos del arsénico inorgánico a nivel intestinal son escasos. Esta tesis doctoral tiene como objetivo evaluar la toxicidad del arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal en diferentes tipos de exposición *in vitro* e *in vivo*, así como la búsqueda de componentes de la dieta que puedan contrarrestar este efecto tóxico. Para tal fin se han empleado modelos celulares de colon (Caco-2, células procedentes de un adenocarcinoma y NCM460, línea celular no transformada) y ratones BALB/c. Como posibles estrategias de reducción de la toxicidad intestinal de este metaloide se han ensayado cepas de bacterias lácticas y suplementos dietéticos.

Los estudios *in vitro* ponen de manifiesto que las exposiciones de corta duración a arsénico inorgánico (2-24 h) generan un aumento de la liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 y de la generación de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno en células Caco-2 y NCM460. Esta respuesta pro-inflamatoria puede ser la responsable de las modificaciones estructurales que cursan con cambios en los patrones de distribución de la zonula occludens 1 y de expresión de la claudina 1, proteínas de las uniones intercelulares que interviene en el mantenimiento de la estructura del epitelio. Paralelamente a estos efectos se evidencia una pérdida de la función barrera de las monocapas intestinales.

En las exposiciones subcrónicas *in vitro* (7-21 días), también se pone de manifiesto una respuesta pro-inflamatoria que se mantiene durante todo el tratamiento. Esta respuesta viene acompañada de cambios en el programa de

proliferación celular y diferenciación, lo que conduce a un detrimento del proceso de reparación celular. Además, la exposición subcrónica afecta igualmente a la estructura epitelial, causando la pérdida de microvellosidades, y a la función de barrera del epitelio intestinal. Estos datos evidencian que la exposición aguda y subcrónica a arsénico inorgánico puede alterar la homeostasis intestinal, afectando la capa de la mucosa, que realiza las funciones más importantes de la pared intestinal.

Adicionalmente se ha evidenciado *in vitro* que exposiciones más prolongadas (6 meses) favorecen la adquisición de características tumorogénicas en células NCM460, en parte debido al mantenimiento de la respuesta pro-inflamatoria. En las células expuestas crónicamente se observa un aumento de la expresión de *CDI33*, disminución de la expresión de *CDX1* y *CDX2*, mayor secreción de la metaloproteínasa de matrix MMP-2, modificaciones en el perfil de acetilación de la histona H3, aumento de la hiperproliferación y la formación de esferas flotantes. En general, estos datos sugieren que la exposición de células epiteliales de colon humano a As(III) provoca la adquisición de características de células transformadas.

Los resultados obtenidos en la exposición subcrónica *in vivo* confirman los datos obtenidos *in vitro*. Esta exposición genera estrés oxidativo y una respuesta pro-inflamatoria, evidenciada por una mayor expresión génica y proteica de las citoquinas IL-1 β , IL-2 e IL-6 en el intestino grueso de animales tratados con As(III). Asimismo, se observa un efecto sobre la morfología del epitelio, con evidencias de hiperplasia en las criptas. Los tratamientos con arsénico también reducen la expresión de la mucina 2 y posiblemente la formación de mucus. Estos efectos tóxicos pueden ser los causantes del aumento de permeabilidad observado en los animales tratados con arsénico. Este es el primer estudio que evidencia la pérdida de la función barrera del epitelio intestinal *in vivo* debido a una exposición a arsénico inorgánico.

Finalmente, los ensayos *in vitro* para evaluar el papel protector de componentes de la dieta ponen de manifiesto que determinadas cepas de *Lactobacillus* y ciertos suplementos dietéticos modulan la toxicidad que el arsénico inorgánico ejerce sobre el epitelio intestinal. La recuperación de la función barrera y/o de la capacidad de regeneración celular tras los tratamientos indica que estas estrategias, cuya seguridad alimentaria está probada, podrían emplearse para aminorar los efectos que ejerce el arsénico inorgánico a nivel intestinal, y posiblemente a nivel sistémico, en poblaciones afectadas.

RESUM

L'arsènic és un metal·loide tòxic àmpliament distribuït en el medi ambient. La seva forma inorgànica [As(III) i As(V)] és la més tòxica present en aigua i aliments. L'exposició a arsènic inorgànic, descrita en nombroses zones del planeta i que en l'actualitat afecta a aproximadament 200 milions de persones, augmenta la incidència de determinats tipus de càncer i altres patologies no cancerígenes. Tenint en compte que la principal via d'exposició és l'oral, el tracte gastrointestinal es considera la porta d'entrada d'aquest tòxic a l'organisme; no obstant això, els estudis per determinar els efectes tòxics de l'arsènic inorgànic a nivell intestinal són escassos. Aquesta tesi doctoral té com a objectiu avaluar la toxicitat de l'arsènic inorgànic en l'epiteli intestinal en diferents tipus d'exposició *in vitro* i *in vivo*, així com la cerca de components de la dieta que puguin contrarestar aquest efecte tòxic. Per a tal fi s'han emprat models cel·lulars de còlon (Caco-2, cèl·lules procedents d'un adenocarcinoma i NCM460, línia cel·lular no transformada) i ratolins BALB/c. Com a possibles components pal·liatius de la toxicitat d'aquest metal·loide s'han assajat soques de bacteris làctics i suplementes dietètics.

Els estudis *in vitro* posen de manifest que les exposicions de curta durada a arsènic inorgànic (2-24 h) generen un augment de l'alliberament de la citocina pro-inflamatòria IL-8 i un augment de la generació d'espècies reactives d'oxigen i/o nitrogen en cèl·lules Caco-2 i NCM460. Aquesta resposta pro-inflamatòria pot ser la responsable de les modificacions estructurals que cursen amb canvis en els patrons de distribució de la zònula occludens 1 i d'expressió de la claudina 1, proteïnes de les unions intercel·lulars que intervenen en el manteniment de l'estructura de l'epiteli. Paral·lelament a aquests efectes s'evidencia una pèrdua de la funció barrera de les monocapes intestinals.

En les exposicions subcròniques *in vitro* (7-21 dies), també es posa de manifest una resposta pro-inflamatòria que es manté durant tot el tractament. Aquesta resposta ve acompanyada de canvis al programa de proliferació cel·lular i diferenciació, la qual cosa condueix a un detriment del procés de reparació

cel·lular. A més, l'exposició subcrònica afecta igualment a l'estructura epitelial, causant la pèrdua de microvellositats, i a la funció de barrera de l'epiteli intestinal. Aquestes dades evidencien que l'exposició aguda i subcrònica a arsènic inorgànic pot alterar l'homeòstasi intestinal, afectant la capa de la mucosa, que realitza les funcions més importants de la paret intestinal.

Adicionalment s'ha evidenciat *in vitro* que exposicions més perllongades (6 mesos) afavoreixen l'adquisició de característiques tumorigèniques en cèl·lules NCM460, possiblement hagut d'en part al manteniment de la resposta pro-inflamatòria. En les cèl·lules exposades crònicament s'observa un augment de l'expressió de *CD133*, disminució de l'expressió de *CDX1* i *CDX2*, major secreció de metaloproteïna de matriu MMP-2, modificacions en el perfil d'acetilació de l'histona H3, augment de la hiperproliferació i la formació d'esferes flotants. En general, aquestes dades suggereixen que l'exposició de cèl·lules epitelials de còlon humà a As(III) provoca l'adquisició de característiques de cèl·lules transformades.

Els resultats obtinguts en l'exposició subcrònica *in vivo* confirmen les dades obtingudes *in vitro*. Aquesta exposició genera estrès oxidatiu i una resposta pro-inflamatòria, evidenciada per una major expressió gènica i proteica de les citocines IL-1 β , IL-2 i IL-6, en l'intestí gros d'animals tractats amb As(III). Així mateix, s'observa un efecte directe sobre la morfologia de l'epiteli, amb evidències d'hiperplàsia en les criptes. Els tractaments amb arsènic també redueixen l'expressió de la mucina 2 i possiblement la formació de mucus. Aquests efectes tòxics poden ser els causants de l'augment de permeabilitat observat en els animals tractats amb arsènic. Est és el primer estudi que evidencia la pèrdua de la funció barrera de l'epiteli intestinal *in vivo* a causa d'una exposició a arsènic inorgànic.

Finalment, els assajos *in vitro* per avaluar el paper protector de components de la dieta posen de manifest que determinades ceps de *Lactobacillus* i certs suplementes dietètics modulen la toxicitat que l'arsènic inorgànic exerceix sobre l'epiteli intestinal. La recuperació de la funció barrera i/o de la capacitat de regeneració cel·lular després dels tractaments indica que aquestes estratègies, la

seguretat alimentària de les quals està provada, podrien emprar-se per minorar els efectes que exerceix l'arsènic inorgànic a nivell intestinal i possiblement a nivell sistèmic en poblacions afectades.

ABSTRACT

Arsenic is a toxic metalloid widely distributed in the environment. Its inorganic form [As(III) and As(V)] is the most toxic form found in water and food. Human exposure to inorganic arsenic, described in numerous areas of the planet and that currently affects approximately 200 million people, increases the incidence of certain types of cancer and other non-cancer pathologies. Taking into account that the main route of the arsenic exposure is oral, the gastrointestinal tract is considered the entry of this contaminant into the organism; however, studies to determine the toxic effects of inorganic arsenic at the intestinal level are scarce. This thesis aims to evaluate the toxicity of inorganic arsenic in the intestinal epithelium in different types of exposure *in vitro* and *in vivo*, as well as the search for dietary components that can counteract this toxic effect. For this purpose, human cellular models of colon (Caco-2, cells from an adenocarcinoma and NCM460, a non-transformed cell line) and BALB/c mice were used. Strains of lactic acid bacteria and dietary supplements have been tested as possible strategies to reduce the toxic effect of the metalloid.

In vitro studies show that acute exposures to inorganic arsenic (2-24 h) generates an increase in the release of the pro-inflammatory cytokine IL-8 and in the generation of reactive oxygen species and/or nitrogen in Caco-2 and NCM460 cells. This pro-inflammatory response may be responsible for the structural modifications that occur with changes in the distribution patterns of zonula occludens 1 and in the expression of claudin 1, proteins of the intercellular junctions involved in the maintenance of the structure of the epithelium. In addition to these effects, a loss of the barrier function of the intestinal monolayers is evidenced.

In the subchronic exposures *in vitro* (7-21 days), a pro-inflammatory response is also observed, and it is maintained throughout the treatment. This response is accompanied by modifications in the cell proliferation and differentiation program, which leads to an impairment of the cell repair process. Subchronic

exposure also affects the epithelial structure, causing loss of microvilli, and the barrier function of the intestinal epithelium. These data show that acute and subchronic exposure to inorganic arsenic can alter intestinal homeostasis, affecting the mucosal layer, which performs the most important functions of the intestinal wall.

Additionally, it has been demonstrated *in vitro* that chronic exposures (6 months) stimulate the acquisition of tumorigenic characteristics in NCM460 cells, possibly due to the maintenance of the pro-inflammatory response. In cells chronically exposed, an increase in *CD133* expression, a downregulation of *CDX1* and *CDX2* expression, an increase of the matrix metalloproteinase MMP-2 secretion, modifications in the histone H3 acetylation profile, an increase in the hyperproliferation and the formation of free-floating spheres were observed. In general, these data suggest that chronic exposure of human colon epithelial cells to As(III) causes the acquisition of transformed cell characteristics.

The results obtained in subchronic exposure *in vivo* confirm the data obtained *in vitro*. This exposure generates oxidative stress and a pro-inflammatory response, evidenced by a higher gene and protein expression of the cytokines IL-1 β , IL-2 and IL-6, in the large intestine of animals treated with As(III). In addition, a modification on the epithelium morphology is observed, with hyperplasia of the crypts. Arsenic treatments also reduce the expression of mucin 2 and possibly the formation of mucus. These toxic effects may be the cause of the increased permeability observed in animals treated with arsenic. This is the first study that demonstrates the loss of the intestinal epithelial barrier function *in vivo* due to exposure to inorganic arsenic.

Finally, *in vitro* assays to evaluate the protective role of dietary components show that certain strains of *Lactobacillus* and certain dietary supplements modulate the toxicity exerted by the inorganic arsenic on the intestinal epithelium. The recovery of the barrier function and/or the capacity of cell regeneration after treatments indicate that these strategies, whose food safety has been proven, could

be used to reduce the toxic effects exerted by inorganic arsenic at intestinal level and possibly at systemic level in affected populations.

Índice general

<i>Índice general</i>	<i>I</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>VII</i>
<i>Índice de Tablas</i>	<i>XI</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>XIII</i>
INTRODUCCIÓN	1
1. Características generales del arsénico	3
2. Usos del arsénico	4
3. Fuentes de exposición humana a arsénico	6
3.1. Exposición a través del aire y el suelo	6
3.2. Exposición a través del agua	7
3.3. Exposición a través de los alimentos	9
4. Toxicocinética del arsénico	12
5. Toxicidad del arsénico	14
5.1. Toxicidad gastrointestinal	15
5.2. Mecanismos de toxicidad	16
5.3. Modulación de la toxicidad mediante componentes de la dieta	19
6. Fisiología y estructura del intestino	21
6.1. Mucosa intestinal	22
6.2. Tejido linfoide asociado al intestino (GALT)	26
6.3. Función barrera intestinal	27
7. Modelos para el estudio de la toxicidad sobre el epitelio intestinal	28
7.1. Modelos animales	28
7.2. Modelos <i>in vitro</i>	30
7.2.1. Células Caco-2	32
7.2.2. Células NCM460	33
OBJETIVOS	35

METODOLOGÍA	39
1. Especies arsenicales	41
2. Modelos celulares y animales empleados	41
2.1. Líneas celulares humanas	41
2.2. Modelos animales	42
3. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de una exposición aguda a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal	43
3.1. Ensayos de viabilidad celular	43
3.2. Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o nitrógeno (RNS)	44
3.3. Respuesta pro-inflamatoria	45
3.4. Expresión de proteínas de estrés y de las uniones estrechas	45
3.5. Inmunolocalización de ZO-1	48
3.6. Evaluación de la permeabilidad de las monocapas celulares	48
4. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de una exposición subcrónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal	50
4.1. Respuesta pro-inflamatoria	51
4.2. Cambios en la proliferación celular	51
4.3. Expresión de marcadores de diferenciación celular	52
4.4. Evaluación de la permeabilidad intestinal de las monocapas celulares	54
4.5. Estudio de la estructura de la monocapa celular	54
4.6. Evaluación de la regeneración celular	55
5. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de una exposición crónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal	55
5.1. Respuesta pro-inflamatoria	56
5.2. Evaluación de la modificación de histonas	56
5.3. Expresión de genes relacionados con cánceres colorrectales	57
5.4. Proliferación celular en medio con baja cantidad de suero	59
5.5. Actividad de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP)	59

5.6. Ensayo de formación de colonias en agar blando _____	60
5.7. Formación de tumoroesferas <i>in vitro</i> _____	61
6. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de una exposición subcrónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal _____	61
6.1. Tratamiento y recolección de muestras _____	61
6.2. Acumulación tisular de arsénico _____	62
6.3. Evaluación de marcadores de toxicidad en el intestino _____	63
6.3.1. Determinación de la generación de ROS y/o RNS _____	63
6.3.2. Expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias, mucina y proteínas de las uniones celulares _____	64
6.3.3. Cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias _____	64
6.3.4. Determinación de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos (i-FABP) _____	67
6.4. Estudio histopatológico del intestino _____	67
6.5. Evaluación de la permeabilidad intestinal _____	67
7. Efecto <i>in vitro</i> de bacterias lácticas y suplementos dietéticos sobre la toxicidad intestinal del arsénico inorgánico _____	68
7.1. Bacterias lácticas y obtención de medios condicionados _____	68
7.2. Preparación de los suplementos dietéticos o extractos vegetales _____	69
7.3. Tratamientos realizados _____	70
7.4. Parámetros evaluados _____	71
7.4.1. Generación de ROS y/o RNS y respuesta pro-inflamatoria _____	71
7.4.2. Inmunolocalización de ZO-1 _____	72
7.4.3. Evaluación de la permeabilidad de las monocapas celulares _____	72
7.4.4. Evaluación de la regeneración celular _____	72
8. Extracción de ARN, retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) _____	73
8.1. Extracción del ARN total _____	73
8.2. Condiciones de la RT _____	73
8.3. Condiciones de la qPCR _____	74
9. Análisis estadístico _____	75

CAPÍTULO 1 - Evaluación <i>in vitro</i> de los efectos de una exposición aguda a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal	77
RESULTADOS	79
1. Búsqueda de las condiciones óptimas para los ensayos de exposición aguda	79
2. Evaluación del estrés oxidativo y de la respuesta pro-inflamatoria	81
3. Efecto sobre la expresión de proteínas de estrés	86
4. Efecto sobre las proteínas de las uniones intercelulares y la permeabilidad	90
DISCUSIÓN	95
CONCLUSIONES	98
CAPÍTULO 2 - Evaluación <i>in vitro</i> de los efectos de una exposición subcrónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal	99
RESULTADOS	101
1. Búsqueda de las condiciones óptimas para los ensayos de exposición subcrónica	101
2. Evaluación de la respuesta pro-inflamatoria	102
3. Efecto sobre la proliferación celular	104
4. Efecto sobre la diferenciación celular	105
5. Efecto sobre la estructura del epitelio intestinal	108
6. Efecto sobre la permeabilidad del epitelio intestinal	110
7. Efecto sobre la regeneración celular	112
DISCUSIÓN	115
CONCLUSIONES	117
CAPÍTULO 3 - Evaluación <i>in vitro</i> de los efectos de una exposición crónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal	119
RESULTADOS	121

1. Efecto sobre la respuesta pro-inflamatoria _____	121
2. Modificación de las histonas _____	123
3. Cambios en la expresión de genes relacionados con cáncer colorrectal ____	124
4. Proliferación celular en medio con baja concentración de suero _____	126
5. Crecimiento independiente de anclaje en células intestinales _____	128
6. Actividad de la MMP-2 y MMP-9 _____	130
7. Capacidad de formación de esferas flotantes _____	131
DISCUSIÓN _____	133
CONCLUSIONES _____	136
CAPÍTULO 4 - Evaluación <i>in vivo</i> de los efectos de una exposición subcrónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio _____	137
RESULTADOS _____	139
1. Acumulación de arsénico en el intestino _____	140
2. Evaluación del estrés oxidativo en el intestino _____	141
3. Evaluación de la respuesta pro-inflamatoria intestinal _____	142
3.1. Expresión génica de citoquinas _____	142
3.2. Expresión proteica de citoquinas _____	142
4. Evaluación del daño tisular intestinal _____	144
5. Estudios estructurales del intestino _____	145
6. Evaluación de la permeabilidad intestinal _____	146
7. Efecto sobre la expresión de las proteínas de las uniones intercelulares ____	147
DISCUSIÓN _____	149
CONCLUSIONES _____	151

CAPÍTULO 5 - Evaluación del efecto protector de bacterias lácticas y suplementos dietéticos sobre la toxicidad intestinal del arsénico inorgánico	153
RESULTADOS	155
1. Efecto de las estrategias sobre el estrés oxidativo	155
2. Efecto de las estrategias sobre la respuesta pro-inflamatoria	157
3. Efecto de las estrategias sobre la modificación de la distribución de ZO-1	162
4. Efecto de las estrategias sobre la modificación de la permeabilidad	164
5. Efecto de las estrategias sobre las alteraciones en el proceso de regeneración celular	167
DISCUSIÓN	170
CONCLUSIONES	175
Conclusiones generales	177
Bibliografía	183
Anexo	217

Índice de Figuras

Figura 1. Partes del intestino y estructura de la pared intestinal.	22
Figura 2. Proceso de renovación del epitelio intestinal.	24
Figura 3. Uniones intercelulares en células de epitelio intestinal.	26
Figura 4. Modelos <i>in vitro</i> del epitelio intestinal.	30
Figura 5. Representación esquemática del sistema de cultivo sobre insertos Transwell®.	49
Figura 6. Viabilidad celular de células intestinales expuestas a As(III).	80
Figura 7. Viabilidad celular de células intestinales expuestas a As(V).	81
Figura 8. Generación de ROS y/o RNS por células Caco-2 expuestas a As-i.	82
Figura 9. Generación de ROS y/o RNS por células NCM460 expuestas a As-i.	83
Figura 10. Respuesta pro-inflamatoria en células Caco-2 expuestas a As-i.	85
Figura 11. Respuesta pro-inflamatoria en células NCM460 expuestas a As-i.	86
Figura 12. Efecto del As-i sobre la distribución de ZO-1.	92
Figura 13. Efecto del As-i sobre la permeabilidad de células Caco-2.	94
Figura 14. Respuesta pro-inflamatoria en células Caco-2 expuestas subcrónicamente a As(III).	103
Figura 15. Respuesta pro-inflamatoria en células Caco-2 expuestas subcrónicamente a As(V).	104
Figura 16. Efecto de los tratamientos subcrónicos con As-i sobre del ciclo celular.	105
Figura 17. Efecto de la exposición subcrónica a i-As sobre la estructura de células Caco-2.	109
Figura 18. Efecto de la exposición subcrónica a As(III) sobre la permeabilidad de células Caco-2.	110

Figura 19. Efecto de la exposición subcrónica a As(V) sobre la permeabilidad de células Caco-2.....	111
Figura 20. Imágenes del proceso de cierre de la herida en células Caco-2 tras una exposición subcrónica a As-i.	113
Figura 21. Efecto de una exposición subcrónica a As-i sobre la regeneración celular.....	114
Figura 22. Respuesta pro-inflamatoria en células NCM460 crónicamente expuestas a As(III).	122
Figura 23. Respuesta pro-inflamatoria en células NCM460 crónicamente expuestas a As(V).	123
Figura 24. Modificación de las histonas en células NCM460 tratadas crónicamente con As(III).	124
Figura 25. Tasa de proliferación de células NCM460 crónicamente expuestas a As(III) en medio con baja concentración de suero.	127
Figura 26. Tasa de proliferación de células NCM460 crónicamente expuestas a As(V) en medio con baja concentración de suero.....	128
Figura 27. Imágenes de formación de colonias independientes de anclaje en células NCM460 expuestas crónicamente con As-i.....	129
Figura 28. Formación de colonias independientes de anclaje en células NCM460 expuestas crónicamente a As(III).....	129
Figura 29. Actividad de MMP-2 y MMP-9 en células NCM460 crónicamente expuestas a As-i.	130
Figura 30. Imágenes de formación de tumoroesferas en células NCM460 crónicamente expuestas a As-i.....	131
Figura 31. Formación de tumoroesferas en células NCM460 expuestas crónicamente a As-i.	132
Figura 32. Acumulación de As en intestino grueso y delgado de ratones tratados con As(III).....	140
Figura 33. Generación de ROS y/o RNS en intestino grueso y delgado de ratones tratados con As(III).	141

Figura 34. Concentración de citoquina pro-inflamatoria IL-2 (A) e IL-6 (B) en intestino grueso de ratones tratados con As(III). 143

Figura 35. Concentración sérica de iFABP en ratones tratados con As(III)... 145

Figura 36. Estudio histológico del intestino grueso de ratones tratados con As(III). 146

Figura 37. Efecto de la exposición crónica a As(III) sobre la permeabilidad intestinal en ratones..... 147

Figura 38. Efecto de bacterias lácticas y sus medios condicionados sobre la generación de ROS y/o RNS ocasionada por el As(III)..... 156

Figura 39. Efecto de los suplementos dietéticos sobre la generación de ROS y/o RNS ocasionada por el As(III)..... 157

Figura 40. Efecto de bacterias lácticas sobre la respuesta pro-inflamatoria ocasionada por el As-i en células intestinales. 159

Figura 41. Efecto de los medios condicionados de bacterias lácticas sobre la respuesta pro-inflamatoria ocasionada por el As-i en células intestinales. 160

Figura 42. Efecto de los suplementos dietéticos sobre la respuesta pro-inflamatoria ocasionada por el As-i en células intestinales. 161

Figura 43. Efecto de las bacterias lácticas sobre la redistribución de ZO-1 causada por As(III) en células Caco-2. 163

Figura 44. Efecto de los suplementos dietéticos sobre la redistribución de ZO-1 causada por As(III). 164

Figura 45. Efecto de los medios condicionados de cepas de bacterias lácticas sobre los cambios en la permeabilidad intestinal causados por As(III). .. 166

Figura 46. Efecto de los suplementos dietéticos sobre las modificaciones de la permeabilidad intestinal causados por el As(III). 167

Figura 47. Imágenes del cierre de la herida en células Caco-2 tras una exposición subcrónica a As-i y suplementos dietéticos. 168

Figura 48. Cierre de la herida en células Caco-2 tratadas con As(III) y suplementos dietéticos. 169

Índice de Tablas

Tabla 1. Formas arsenicales más comunes	4
Tabla 2. Concentración de As en aguas subterráneas	9
Tabla 3. Niveles máximos de As-i en arroz y derivados permitidos en Europa.	12
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en el estudio de expresión de proteínas de estrés y de uniones intercelulares.....	47
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en el estudio de la expresión de marcadores de diferenciación.....	53
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en el estudio de la expresión de genes relacionados con cáncer colorrectal.	58
Tabla 7. Condiciones instrumentales utilizadas en la cuantificación de As mediante HG-AFS.	63
Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en el estudio de la expresión <i>in vivo</i>	65
Tabla 9. Cepas de bacterias lácticas ensayadas.....	69
Tabla 10. Suplementos dietéticos utilizados.	70
Tabla 11. Reactivos empleados en la retrotranscripción.....	74
Tabla 12. Efecto del As-i sobre la expresión de proteínas de estrés en células Caco-2.....	88
Tabla 13. Efecto del As-i sobre la expresión de proteínas de estrés en células NCM460.	89
Tabla 14. Efecto del As-i sobre la expresión de las proteínas de las uniones intercelulares.....	91
Tabla 15. Efecto de la exposición subcrónica a As-i sobre la diferenciación celular.....	107
Tabla 16. Efecto de la exposición crónica a As-i sobre la expresión de genes relacionados con cáncer colorrectal.	125

Tabla 17. Efecto de la exposición a As(III) sobre la expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias en el intestino grueso de ratones. 142

Tabla 18. Efecto de la exposición a As(III) sobre la expresión génica de las proteínas de las uniones intercelulares en el intestino grueso de ratones. 148

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
AB	Arsenobetaina
AC	Arsenocolina
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
As	Arsénico
As-i	Arsénico inorgánico
As(III)	Arsenito
As(V)	Arseniato
As3MT	Arsénico (estado de oxidación +3) metiltransferasa
ATCC	Colección estadounidense de cultivos tipo
ATSDR	Agencia de Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades
BMLD	Benchmark dose lower confidence limit
CDX	Genes homeobox
CLDN	Claudina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DHCF-DA	2',7'-diacetato de dihidroclorofluoresceína
DMA(III)	Ácido dimetilarsinoso
DMA(V)	Ácido dimetilarsínico
DMA	Formas arsenicales dimetiladas, [DMA(III) + DMA(V)]
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMEMc	Medio DMEM suplementado para células Caco-2
DMEM F-12	Mezcla de DMEM con nutrientes de Ham F-12
DMEM-HEPES	Medio DMEM suplementado con HEPES 10 mM
DO	Densidad óptica

DPP	Dipeptidil peptidasa
ECACC	Colección Europea de Cultivos Celulares
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
FDA	Administración estadounidense de Alimentos y Medicamentos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GADPH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GSH	Glutatión reducido
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HG-AFS	Generación de hidruros acoplada a espectroscopia de fluorescencia atómica
HSP	Proteínas de shock térmico
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
iFABP	Proteína intestinal de unión a ácidos grasos
IFN	Interferón
IL	Interleucinas
JAM	Moléculas de adhesión intercelular
JECFA	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
LY	Lucifer Yellow
MEM	Medio esencial mínimo con sales de Earle
MEMc	Medio MEM suplementado
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MMA(III)	Ácido monometilarsenioso
MMA(V)	Ácido monometilarsónico

MMA	Formas arsenicales monometiladas [MMA(III) + MMA(V)],
MMP	Metaloproteinasas de matriz celular
MRS	Medio Man, Rogosa y Sharpe
MT	Metalotioneínas
MUC	Mucina
NCM-DMEMc	Medio DMEM suplementado para células NCM640
OCNLN	Ocludina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAF	Paraformaldehído
PBS	Tampón fosfato salino
pc	Peso corporal
ps	Peso seco
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RET	Resistencia eléctrica transepitelial
REST	Relative expression software tool
RN18S	Gen ribosomal 18S
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Retrotranscripción
SFB	Suero fetal bovino
SI	Sucrosa- isomaltasa
SOD	Superóxido dismutasa
Tampón RIPA	Disolución tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación
TMA ⁺	Íon tetrametilarsonio
TMAO	Óxido de trimetilarsina
TNF	Factor de necrosis tumoral

UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
U.S. EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
VIL	Villina
ZO	Proteína de la zonula occludens

Introducción

1. Características generales del arsénico

El arsénico es un elemento químico perteneciente al grupo de los metaloides, su símbolo es As y su número atómico 33. Es uno de los 22 elementos conocidos que se componen de un solo nucleído estable (As^{75}), con un peso atómico de 74. Sus valencias en la naturaleza son -3, 0, +3 y +5. Los estados de oxidación predominantes bajo condiciones reductoras y oxigenadas son el arsenito [As(III)] y el arseniato [As(V)], respectivamente (IARC, 2012).

Este metaloide se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, donde forma parte de más de 200 minerales. Aproximadamente un tercio del flujo atmosférico del As ocurre por causas naturales, debido a las erupciones volcánicas y la erosión de rocas que movilizan el As de los minerales. Además, la actividad humana relacionada con el uso del As (apartado 2, introducción), también puede causar la dispersión de este elemento en el medioambiente. El flujo de As permite su dispersión y también favorece su transformación, debido a la acción microbiana y de organismos superiores, dando lugar a una serie de formas orgánicas. En la tabla 1 se detallan las formas arsenicales más comunes (EFSA, 2009).

En el año 2000, la Agencia de Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR) clasificó al As como una de las 20 sustancias más peligrosas presentes en el medio ambiente (ATSDR, 2000), siendo la forma inorgánica [As(III) y As(V)], y sus metabolitos trivalentes [ácido monometilarsinoso, MMA(III) y ácido dimetilarsinoso, DMA(III)] las formas más tóxicas (apartado 5, introducción).

Tabla 1. Formas arsenicales más comunes (EFSA, 2009).

Especie inorgánicas (As-i)	Fórmula
Arsenito, As(III)	$\text{As}(\text{O}^-)_3$
Arseniato, As(V)	$\text{O}=\text{As}(\text{O}^-)_3$
Especie orgánicas	Fórmula
Ácido monometilarsónico, MMA(V)	$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{O}^-)_2$
Ácido monometilarsonioso, MMA(III)	$\text{CH}_3\text{As}(\text{O}^-)_2$
Ácido dimetilarsínico, DMA(V)	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{O}^-)$
Ácido dimetilarsinioso, DMA(III)	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}^-$
Óxido de trimetilarsina, TMAO	$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$
Ion tetrametilarsonio, TMA ⁺	$(\text{CH}_3)_4\text{As}^+$
Arsenobetaina, AB	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$
Trimetilarsoniopropionato, TMAP	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{H}_2\text{COO}^-$
Arsenocolina, AC	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
Ácido monometilmonotioarsónico, MMMTA(V)	$[\text{CH}_3\text{As}(\text{O})\text{S}]$
Ácido dimetilmonotioarsínico, DMMTA(V)	$[(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{S}]$
Ácido dimetilditioarsínico DMDTA(V)	$[(\text{CH}_3)_2\text{AsS}_2]$
Arsenolípidos	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}]$
Arsenoazúcares dimetilados Y= -OH; -OPO ₃ HCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH -SO ₃ H -OSO ₃ H	

2. Usos del arsénico

El As se ha utilizado comercialmente durante siglos. En la industria, el As elemental se emplea en la fabricación de aleaciones, principalmente asociado con plomo y cobre. El arseniuro de galio (GaAs) es un compuesto ampliamente

utilizado en las industrias de semiconductores y electrónica. Otros usos incluyen la fabricación de pigmentos y conservantes de cuero, su uso en catalizadores, pirotecnia, pinturas, cerámica, soldaduras de automóviles y radiadores, y en electrofotografía (IARC, 2012).

En la agricultura, el As se ha utilizado como ingrediente en pesticidas, herbicidas, insecticidas, desecantes de algodón, defoliantes y esterilizantes del suelo. En 2009, la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (U.S. EPA) emitió una orden para la eliminación del uso de pesticidas arsenicales orgánicos antes de 2013 (U.S. EPA, 2009). La única excepción a la orden es el uso del metanoarsonato monosódico (MSMA), un herbicida que sigue estando aprobado para su uso en la producción de algodón. Además, otras formas orgánicas (roxarsone, ácido p-arsanílico y sus derivados) se utilizan como aditivos para aumentar la tasa de crecimiento y engorde, mejorar la pigmentación y tratar y prevenir enfermedades infecciosas en aves de corral y cerdos (IARC, 2012).

En medicina, el tónico de Fowler (solución de arsenito de potasio 1%) se empleó en el tratamiento de la psoriasis y el asma bronquial crónico y como antibiótico para el tratamiento de infecciones por espiroquetas y protozoos desde el siglo XVIII hasta la década de los 70 del siglo pasado (Silva, 2013). A pesar del abandono del As en el tratamiento de ciertas enfermedades para las que en la actualidad existen fármacos más efectivos y seguros, en los últimos años se ha evidenciado la utilidad del trióxido de As (Trisenox[®]) para el tratamiento de determinadas leucemias, especialmente la leucemia promielolítica aguda o el síndrome mielodisplásico (List *et al.*, 2003; Mathews *et al.*, 2010).

En la medicina tradicional oriental, el As continúa siendo un componente esencial, especialmente el rejalgar (sulfuro de As). Sus preparaciones se emplean para tratar la psoriasis, sífilis, asma, reumatismo, hemorroides y también se recetan como tónico analgésico, antiinflamatorio y como tratamiento para

algunos tumores malignos. Algunos estudios han reportado concentraciones muy elevadas de As (hasta 114 g/kg) en productos en base a hierbas tradicionales chinas, comercializados en EEUU y Holanda (Ko, 1999; Martena *et al.*, 2010).

3. Fuentes de exposición humana a arsénico

El aire y el suelo se pueden considerar formas minoritarias de exposición a As inorgánico (As-i), siendo la ruta más importante de exposición humana la derivada del consumo de alimentos y agua de bebida.

3.1. Exposición a través del aire y el suelo

Los niveles de As en el aire varían en un rango muy amplio. La Comisión Europea (2000) ha reportado niveles menores a 1 ng/m³ en áreas remotas, entre 0.2-1.5 ng/m³ en áreas rurales y de aproximadamente 50 ng/m³ en zonas cercanas a industrias. La inhalación de As es una vía de exposición puntual, restringida a exposiciones ocupacionales o a individuos que viven próximos a zonas donde la concentración de As en la atmósfera es elevada. En Europa, el aire contribuye a menos del 1% de la exposición, incluso para personas que viven en áreas industrializadas (Comisión Europea, 2000).

La concentración de As en el suelo también varía ampliamente, oscilando entre 1-40 mg/kg, con un nivel medio de 3-4 mg/kg (ATSDR, 2000). El As en el suelo se presenta mayoritariamente en la forma inorgánica, excepto en áreas donde el As orgánico ha sido empleado con motivos agrícolas. Aunque el uso de pesticidas con As ha sido limitado, se estima que millones de hectáreas de campos siguen contaminadas (Hughes *et al.*, 2011). Además, en los suelos cercanos a minas y plantas de fundición, también pueden existir niveles elevados en suelos. Williams *et al.* (1998) reportan concentraciones de hasta 12 g/kg en un área

minera de Tailandia y Razo *et al.* (2004) muestran contenidos de hasta 17 g/kg en suelos contaminados por actividad minera en México.

La exposición humana a As a través del suelo ocurre principalmente por ingestión accidental. Además de tratarse de ingestas poco habituales, se ha evidenciado que la biodisponibilidad (cantidad del tóxico que llega a la circulación sistémica tras la ingesta) del As presente en los suelos es inferior al 50% (Roberts *et al.*, 2002; Carrizales *et al.*, 2006), por lo tanto son ingestas que en principio no revisten riesgo. Otra forma potencial de exposición a As a través del suelo es la absorción de este elemento por la piel (Hughes *et al.*, 2011). En ambos casos, los niños son la población con mayor riesgo. Hwang *et al.* (1997), en un estudio conducido en Montana (EEUU), muestran que el contenido de As en la orina de niños está positivamente correlacionado con la concentración de As en el suelo.

3.2. Exposición a través del agua

Por lo general, el As está presente naturalmente en aguas en concentraciones menores a 1-2 µg/L. Sin embargo, las concentraciones de As son más elevadas en aguas subterráneas cercanas a depósitos minerales de sulfuro o depósitos sedimentarios derivados de rocas volcánicas, donde pueden alcanzarse 12 mg/L (OMS, 2017). Las especies arsenicales encontradas en agua incluyen As(III), As(V), MMA(V), MMA(III), DMA(V), DMA(III) y TMAO (IARC, 2004). La principal forma arsenical presente en el agua 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 exposición humana a As a través del agua de bebida es la principal vía de exposición en zonas con arsenicismo crónico endémico. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece un nivel máximo recomendable de 10 µg/L

de As en el agua de bebida, sin embargo se estima que aproximadamente 200 millones de personas consumen diariamente agua con concentraciones superiores a las recomendadas (OMS, 2017). Solamente en América Latina, Castro de Esparza (2008) estima que al menos 4.5 millones de personas están expuestas al agua de bebida con concentraciones superiores a 50 µg/L de As. Sin embargo, si se considera el límite de 10 µg/L establecido por la OMS, el número de personas potencialmente expuestas aumentaría a alrededor de 14 millones.

En la tabla 2 se puede observar la concentración de As en aguas subterráneas y la totalidad de la población potencialmente expuesta en diferentes continentes (Nordstrom, 2002). Los países más afectados se encuentran en Asia meridional y América Latina (Bundschuh *et al.*, 2012; George *et al.*, 2014; Yunus *et al.*, 2016). Los valores de ingesta de As-i en algunos de estos países pueden superar la ingesta máxima recomendada por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) (BMLD: 3.0 µg/kg peso corporal (pc)/día, JECFA, 2010). De hecho, en Bengala Occidental (India), Roychowdhury *et al.* (2003) reportan ingestas diarias de As que varían entre 351-801 µg, similares a las reportadas en Bangladesh (43-500 µg As/día; Ohno *et al.*, 2007). En estos países, los alimentos cocinados con agua contaminada también presentan elevados contenidos de As-i (Bae *et al.*, 2002; Ackerman *et al.*, 2005). Esta fuente de exposición normalmente no se considera en muchos de los estudios epidemiológicos; sin embargo, puede llegar a representar porcentajes importantes del As ingerido (> 40%) (Calatayud *et al.*, 2008).

Tabla 2. Concentración de As en aguas subterráneas (Nordstrom, 2002).

País/región	Población potencialmente expuesta	Concentración (µg/L)
Alemania	—	< 10 a 150
Argentina	2000000	< 1 a 9900
Bangladesh	30000000	< 1 a 2500
Bengala Occidental (India)	6000000	< 10 a 3200
Bolivia	50000	—
Brasil	—	0.4 a 350
Chile	400000	100 a 1000
EEUU y Canadá	—	< 1 a > 100 000
España	>50000	< 1 a 100
Ghana	<100000	< 1 a 175
Grecia	150000	—
Hungría, Rumania	400000	< 2 a 176
México	400000	8 a 620
Mongolia interior	100000 a 600000	< 1 a 2400
Reino Unido	—	< 1 a 80
Tailandia	15000	1 a > 5000
Taiwán	100000 a 200000	10 a 1820
Vietnam	>1000000	1 a 3050
Xinjiang, Shanxi	>500	40 a 750

3.3. Exposición a través de los alimentos

En países donde no hay contaminación endémica por As, los alimentos son la principal fuente de exposición a As-i. Los factores que influyen en la concentración y forma de As en alimentos incluyen: tipo de alimento, condiciones de cultivo (tipo de suelo, agua de regadío, uso de pesticidas con As) y técnicas de procesamiento (IARC, 2012).

El contenido de As total es particularmente notable en ciertos productos pesqueros. Los mariscos pueden presentar niveles elevados de As total (1.2-26.2 mg/kg) (Muñoz *et al.*, 2000; Falcó *et al.*, 2006; Sloth y Julshman, 2008; Rangkadilok *et al.*, 2015). En pescados, la concentración de As total usualmente no supera 5 mg/kg (Muñoz *et al.*, 2000; Ruttens *et al.*, 2012). Sin embargo, Julshamn *et al.* (2012) reportan concentraciones de hasta 100 mg/kg en muestras de bacalao del Ártico noroeste. El pescado enlatado, generalmente presenta concentraciones inferiores a 1 mg/kg (dos Santos *et al.*, 2009; Olmedo *et al.*, 2013).

La forma arsenical predominante en pescados y mariscos es la arsenobetaina (AB), que se considera prácticamente inocua. Además, los pescados y mariscos generalmente presentan bajas concentraciones de As-i (< 0.2 mg/kg) (Muñoz *et al.*, 2000; Uneyama *et al.*, 2007; Julshamn *et al.*, 2012; Copat *et al.*, 2013). Por lo tanto, aunque el contenido total de As puede ser elevado, el consumo de estos alimentos no se considera un riesgo para los consumidores.

Dentro del grupo de alimentos de origen marino, el contenido de As total encontrado en algas es especialmente notable, variando entre 1.84-149 mg/kg peso seco (ps) (Almela *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2015). Las formas arsenicales predominantes en la mayoría de las algas son los arsenoazúcares, representando usualmente más del 70% del As total (Lai *et al.*, 1997). Una excepción es el alga parda *Hizikia fusiforme*, en la cual se han detectado sistemáticamente altas concentraciones de As-i, algunas veces superiores a los 100 mg/kg ps (Almela *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2007; Besada *et al.*, 2009).

En los alimentos de origen terrestre, son notables las concentraciones de As encontradas en setas comestibles y arroz. Se han descrito concentraciones elevadas en setas del género *Laccaria* (1.8-163 mg/kg ps) (Slekovec y Irgolic,

1996; Vetter, 2004; Zhang *et al.*, 2015). Los datos de especiación han revelado que en este tipo de alimento pueden existir una amplia variedad de formas arsenicales, pudiendo el As-i llegar a constituir la especie arsenical mayoritaria (Llorente-Mirandes *et al.*, 2014; Nearing *et al.*, 2014).

El arroz es el alimento de origen terrestre más estudiado por ser un componente básico de la dieta y por tanto uno de los que más contribuyen a la exposición dietética a As-i. Los contenidos de As encontrados en arroz son más elevados que en otros cereales (0.030-2.05 mg/kg) (Xie y Huang, 1998; Heitkemper *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2005; Mihucz *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2009). El As-i representa porcentajes muy variables de As total (27-93%) (Williams *et al.*, 2005; Torres-Escribano *et al.*, 2008; Zavala *et al.*, 2008). En los productos derivados del arroz tales como el miso, amasake, leche de arroz y alimentos infantiles, el As-i representa 63-90% del As total (Signes-Pastor *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009).

La legislación existente en la mayoría de países limita el contenido de As total en algunos alimentos, pero son escasas las legislaciones que limitan el contenido de As-i. La Unión Europea ha establecido recientemente un límite máximo de As-i en arroz y productos derivados del arroz (Reglamento CE, 2015) (tabla 3). En 2016, EEUU estableció, en paralelo con la Unión Europea, un límite de 0.1 mg/kg de As-i para arroz destinado a alimentación infantil (FDA, 2016). China establece, por el contrario, límites para un amplio rango de alimentos, con un nivel máximo permitido en arroz (0.15 mg/kg) inferior al propuesto por la UE (GB2762, 2014).

Tabla 3. Niveles máximos de As-i en arroz y derivados permitidos en Europa.

Alimento	As-i (mg/kg)
Arroz elaborado (pulido o blanco), no vaporizado	0.20
Arroz vaporizado y arroz descascarillado	0.25
Tortitas, obleas, galletitas y pasteles de arroz	0.30
Arroz destinado a la producción de alimentos para lactantes y niños de corta edad	0.10

En Europa, la exposición a As-i oscila entre 0.13-0.56 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ (equivalente a 8.5-36.4 $\mu\text{g}/\text{día}$ para un adulto de 65 kg de pc), siendo los cereales, el agua embotellada, el café, la cerveza, el arroz, los pescados y los vegetales los mayores contribuyentes (EFSA, 2009). La ingesta de As-i reportada en Japón es similar a la europea (aproximadamente 24 $\mu\text{g}/\text{día}$); con los cereales y las algas representando el 90% de la ingesta de As-i en adultos (Oguri *et al.*, 2014). Yost *et al.* (1998) reportan una ingesta inferior de As-i para EEUU (8.3-14 $\mu\text{g}/\text{día}$) y Canadá (4.8-12.7 $\mu\text{g}/\text{día}$). Todas estas ingestas están por debajo del BMDL propuesto para As-i; sin embargo, algunos informes indican que ciertos grupos poblacionales pueden estar en riesgo. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) advierte que los consumidores extremos de arroz y productos derivados de algas podrían ser uno de estos grupos de riesgo (EFSA, 2009).

4. Toxicocinética del arsénico

Los estudios en animales muestran que la mayoría del As-i ingerido se absorbe. Juhasz *et al.* (2006) reportan una biodisponibilidad en cerdos muy elevada para As(III) ($103.9 \pm 25.8\%$) y As(V) ($92.5 \pm 22.3\%$). En monos, la biodisponibilidad absoluta estimada para As(V) es también considerable ($74.4 \pm 4.7\%$) (Roberts *et al.*, 2002).

La distribución del As en sangre es la principal forma de transporte a los distintos órganos y su eliminación de la misma es un proceso relativamente rápido. Las especies inorgánicas de As se unen a grupos sulfhidrilo de proteínas y moléculas de bajo peso molecular como el glutatión (GSH) (Vahter, 2002), y así se distribuyen a los órganos. El As-i se acumula principalmente en riñones, hígado, vejiga, piel y pulmones. Los niveles de retención en los órganos de animales expuestos a As(III) son superiores (2-25 veces) a los observados para As(V) (U.S. EPA, 2009).

El As-i se transforma principalmente en el hígado por la acción de la enzima As (estado de oxidación +3) metiltransferasa (As3MT), en una serie de metabolitos mono y dimetilados con estados de oxidación +3 y +5, que pueden estar ligados a grupos tiol (Thomas *et al.*, 2007). Las formas dimetiladas (DMA) son los productos finales de este proceso en humanos. Se ha evidenciado que el perfil de metabolitos acumulados depende de la duración del tratamiento. Tras una única dosis oral de As(V) (0.5 mg As/kg), el DMA es la forma predominante en el hígado de ratones (Kenyon *et al.*, 2005). Las exposiciones continuadas, sin embargo, conllevan una reducción de la proporción de DMA en órganos y un aumento de la de As-i, probablemente debido a una saturación del proceso metabólico (Hughes *et al.*, 2003).

El As-i se excreta principalmente por la orina, siendo el DMA la especie mayoritaria (60-80%), seguida por el As-i (10-30%) y el MMA (10-20%) (Vahter *et al.*, 1995). Un elevado metabolismo favorece la excreción urinaria del metaloide (Vahter, 2002). La presencia de elevadas cantidades de DMA en la orina indica un progreso adecuado del proceso metabólico. Contrariamente, la presencia de cantidades superiores a las habituales de MMA o de As-i, indican una menor tasa de metabolismo.

5. Toxicidad del arsénico

La toxicidad del As depende de su forma química, de la dosis, frecuencia y duración de su exposición, así como de la edad, género, estilo de vida, factores nutricionales y genéticos del individuo expuesto y de su microbiota intestinal (Tchounwou *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2004; Hernández y Marcos, 2008; Chi *et al.*, 2018).

En líneas generales, el As-i es la forma más tóxica encontrada en agua y alimentos. Las formas orgánicas AB, arsenocolina (AC) y óxido de trimetilarsina (TMAO) se consideran prácticamente inocuas. El ion tetrametilarsonio (TMA^+) presenta un grado de toxicidad similar al de las formas mono y dimetiladas, MMA(V) (ácido monometilarsónico) y DMA(V) (ácido dimetilarsínico). Los metabolitos trivalentes del As-i presentan una toxicidad similar [DMA(III)] o superior [MMA(III)] a la del As(III) (Styblo *et al.*, 2000).

El As-i está considerado un carcinógeno para el hombre, mientras que el DMA(V) se clasifica como probable cancerígeno (IARC, 2012). Numerosos estudios epidemiológicos han relacionado la exposición a As-i con un aumento de la incidencia de cáncer de pulmón, vejiga, piel, riñón e hígado (Chen *et al.*, 1988; Hopenhayn-Rich *et al.*, 1996; Hopenhayn-Rich *et al.*, 1998; Ferreccio *et al.*, 2000; Karagas *et al.*, 2001; Bates *et al.*, 2004). También se ha asociado la exposición crónica a As-i a varias patologías no cancerígenas, como lesiones en la piel (Ahsan *et al.*, 2006), enfermedades respiratorias (Mazumder *et al.*, 2000) y cardiovasculares (Mumford *et al.*, 2007), diabetes tipo II (Lai *et al.*, 1994) y retrasos en el desarrollo neuroconductual en la población infantil (Tyler y Allan, 2014).

5.1. Toxicidad gastrointestinal

Teniendo en cuenta que la principal vía de exposición humana al As-i es la oral, el tracto gastrointestinal es la puerta de entrada de este tóxico al organismo. Sin embargo, existen escasos estudios sobre el efecto de este metaloide a nivel gastrointestinal.

En macacos Rhesus expuestos subcrónicamente a As(III) (7.5 mg/kg pc/día), se observan signos de inflamación aguda y hemorragia del intestino delgado (Heywood y Sortwell, 1978). Exposiciones prolongadas (104 semanas) en roedores a MMA(V) (10-1000 mg/L), uno de los metabolitos del As-i, ponen de manifiesto que el intestino grueso es uno de los órganos diana de esta especie arsenical (Arnold *et al.*, 2003). En general se evidencian engrosamientos de la pared gastrointestinal, edemas, hemorragias y necrosis, ulceraciones o perforaciones de la mucosa del intestino grueso; así como un aumento significativo de la incidencia de metaplasia escamosa de las células epiteliales del colon y recto.

En humanos, las exposiciones agudas están relacionadas con gastroenteritis, diarreas hemorrágicas, náusea, vómitos y otros trastornos gastrointestinales (Uede y Furukawa, 2003; Pimparkar y Bhave, 2010). Los síntomas gastrointestinales en exposiciones crónicas son similares a los observados en exposiciones agudas, aunque más moderados. En poblaciones expuestas crónicamente a As-i a través del agua de bebida se han puesto de manifiesto síntomas de dispepsia, gastroenteritis, dolor abdominal y diarrea crónica (Borgoño *et al.*, 1977; Majumdar *et al.*, 2009; Guha Mazumder y Dasgupta, 2011). Chen *et al.* (1985) evidencian incluso mayor prevalencia de cáncer de colon en una población expuesta a altas concentraciones de As-i en el agua de bebida (0.35-1.14 mg/L) en un estudio epidemiológico realizado en Taiwán.

Los estudios *in vitro* han mostrado que hay un importante efecto del As-i y sus metabolitos trivalentes en células humanas de epitelio colónico. Nakagawa *et al.* (2002) reportan que la exposición de As(III) induce una supresión del crecimiento celular y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las líneas celulares SW480, DLD-1 y COLO201. En células Caco-2, la exposición a As(III), MMA(III) y DMA(III) genera una respuesta pro-inflamatoria (aumento de las citoquinas IL-6 e IL-8 y del factor de necrosis tumoral TNF α) que se traduce en un aumento de la permeabilidad de la monocapa epitelial (Calatayud *et al.*, 2013, 2014). También se ha evidenciado en este tipo celular un aumento de la producción de ROS y modificaciones en el ciclo celular (Laparra *et al.*, 2008). Todos estos estudios, que hacen referencia a exposiciones agudas a dosis relativamente altas, indican que las células intestinales pueden ser diana de la toxicidad del As-i debido a la generación de estrés oxidativo y una respuesta pro-inflamatoria.

5.2. Mecanismos de toxicidad

Los mecanismos de toxicidad de este metaloide son variados y dependen de su forma química. El As(III) se une a los grupos tiol de numerosas proteínas, inactivándolas. Se ha evidenciado que inhibe la actividad de la piruvato deshidrogenasa, lo que resulta en una menor conversión del piruvato a acetil coenzima A y, por tanto, una disminución de la producción celular de ATP (Bergquist *et al.*, 2009). También se ha demostrado la capacidad del As(III) de afectar el citoesqueleto celular por interacción con los grupos tiol de la tubulina y de las proteínas asociadas al microtúbulo, hecho que afecta, entre otros procesos, el de mitosis celular (Zhao *et al.*, 2012). Además, altera la función de varias enzimas y moléculas de señalización, influyendo notablemente en la expresión génica (Miller *et al.*, 2002). El tratamiento con As(III) da como

resultado la activación de las tres rutas principales de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK): ERK, JNK y p38 (Cavigelli *et al.*, 1996). Esta activación de MAPK podría explicar la capacidad del As(III) para actuar como promotor tumoral.

El estrés oxidativo es el mecanismo de toxicidad del As-i más ampliamente estudiado (Flora, 2011). Estudios *in vitro* han demostrado que la exposición a As(III) induce la formación de ROS en células humanas de pulmón (Li *et al.*, 2002), vejiga (Eblin *et al.*, 2006), hígado (Moore *et al.*, 2010) y colon (Nakagawa *et al.*, 2002; Laparra *et al.*, 2008). Wu *et al.* (2001) muestran que la concentración de As en sangre esta correlacionada positivamente con la concentración de ROS y negativamente con la capacidad antioxidante en plasma de individuos expuestos crónicamente a As.

Los datos bibliográficos sugieren que el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es la principal especie inducida por As y que la formación de $O_2^{\cdot-}$ conduce a la generación de otras ROS como H_2O_2 y $\cdot OH$ (Shi *et al.*, 2004). Los mecanismos implicados en la generación de ROS por el As(III) son variados. Su efecto sobre las diferentes rutas de señalización, es sin lugar a duda, una de las causas del desequilibrio redox celular. Varios estudios también apuntan al papel de la activación de la NADPH oxidasa en la generación de ROS en células expuestas a As(III) (Smith *et al.*, 2001; Chou *et al.*, 2004). Por otro lado, esta forma arsenical afecta directamente la maquinaria antioxidante celular. Se ha puesto de manifiesto que el As(III) reduce la síntesis de GSH e inactiva enzimas antioxidantes como la catalasa o la superóxido dismutasa (SOD) (Banerjee *et al.*, 2009). Otro posible mecanismo implicado en la generación de ROS es la liberación de hierro (Fe) de la ferritina, puesto de manifiesto en exposiciones a los metabolitos dimetilados del As-i (Ahmad *et al.*, 2000). Este Fe libre juega un papel central en la generación de especies altamente reactivas de oxígeno, ya que promueve la conversión de $O_2^{\cdot-}$

y H_2O_2 a $\cdot\text{OH}$ a través de la reacción de Haber-Weiss. El efecto del As-i sobre las rutas de señalización, anteriormente mencionado, puede ser debido a su acción directa y/o a la acción de las especies reactivas que genera. Se ha evidenciado que las ROS y las RNS (especies reactivas de nitrógeno) pueden afectar moléculas de numerosas rutas de señalización (NF- κ B, MAPKs, Keap1-Nrf2-ARE y PI3K-Akt) (Zhang *et al.*, 2016).

El efecto inmunotóxico de la forma arsenical trivalente es también uno de sus principales mecanismos de toxicidad. El As(III) se ha descrito como un estimulador de la respuesta inmunitaria; afecta la activación de NF- κ B (Barchowsky *et al.*, 1996), un factor de transcripción que juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas, ya que modula la expresión de varios genes pro-inflamatorios, incluidos los que codifican citoquinas y quimiocinas, y también participa en la regulación del inflamasoma. Además, se ha evidenciado que el As(III) también puede tener un efecto inmunosupresor. En poblaciones expuestas, inhibe la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica y altera el perfil de secreción de citoquinas de las células activadas (Vega, 2009). El As(III) también reduce la proporción de células T auxiliares (CD4) en relación con las células T citotóxicas (CD8) en niños expuestos, un parámetro que indica inmunosupresión general (Soto-Peña *et al.*, 2006).

La acción tóxica del As(V) se debe principalmente a su similitud química con el fosfato inorgánico, al cual puede substituir en numerosas rutas bioquímicas (Hughes, 2002). El As(V) desacopla la producción de ATP por un mecanismo denominado arsenolisis, el cual puede tener lugar durante la glicosis o durante la fosforilación oxidativa, y que supone la reducción de los niveles energéticos celulares (IARC, 1987). El As(V) también puede reemplazar el fosfato en la

bomba de sodio y en el sistema de transporte de intercambio aniónico (Hughes, 2002).

5.3. Modulación de la toxicidad mediante componentes de la dieta

Estudios recientes han puesto de manifiesto que algunos componentes de la dieta pueden contrarrestar el efecto tóxico causado por el As (Chi *et al.*, 2018; Jadán-Piedra *et al.*, 2018). El efecto protector puede deberse a la modulación de la toxicocinética del metaloide o a una acción directa sobre el modo de acción del tóxico.

Algunos componentes de la dieta pueden modular el metabolismo del As-i. Así, la administración de GSH en ratones expuestos a As(III) aumenta el metabolismo hepático, reduce los niveles de As en sangre y cerebro, disminuyendo el efecto del As sobre el metabolismo del óxido nítrico (Wang y Zhao, 2009). Mitra *et al.* (2004) observan, en una población expuesta de Bengala Occidental, que la disminución de la ingesta de ácido fólico está asociada con un aumento de las lesiones cutáneas causadas por el As-i. Gamble *et al.* (2005) muestran que la concentración de folato en plasma está positivamente correlacionada con la concentración urinaria de DMA y negativamente con la de MMA y As-i, indicativo que esta vitamina favorece el metabolismo del As, hecho que justificaría la vinculación de su déficit con las manifestaciones cutáneas.

En un estudio poblacional, Chen *et al.* (2007) sugieren que la ingesta dietaria de selenio (Se) podría reducir la incidencia de lesiones pre-malignas en la piel relacionadas con el arsenicismo. Estudios *in vivo* han demostrado que dietas basadas en lentejas con alta concentración de Se (0.3 mg/kg) aumentan la concentración de As en la orina y son capaces de contrarrestar la toxicidad de As en ratas (Sah *et al.*, 2013) y reducir la aterosclerosis debida a la exposición a As-i (Krohn *et al.*, 2016).

El efecto protector de los componentes de la dieta puede ser también consecuencia directa de su habilidad de contrarrestar la toxicidad por presentar una actividad antioxidante y/o anti-inflamatoria. Varios estudios han ensayado estrategias para reducir la toxicidad sistémica del As-i basadas en productos derivados de plantas con propiedades antioxidantes y/o anti-inflamatorias. El β -caroteno y la naringina (flavonoide cítrico) son capaces de normalizar el perfil hematológico y bioquímico del suero en ratones, además de modular los parámetros hepáticos y renales modificados por el As(III) (Roy *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2015). Raihan *et al.* (2009) evidencian que extractos de té negro y verde, ricos en polifenoles, son capaces de contrarrestar el estrés oxidativo causado por la administración de As(III), normalizando los niveles séricos de GSH, peróxidos lipídicos y óxido nítrico en conejos.

La administración de ácido ascórbico o α -tocopherol en ratas expuestas a As(III) supone una disminución substancial del estrés oxidativo inducido por el As, con reducciones del nivel de oxidación de proteínas, de las roturas en la doble cadena de ADN y de la generación de enlaces cruzados ADN/proteínas (Kadirvel *et al.*, 2007). Reddy *et al.* (2012) han demostrado que la cúrcuma reduce la hepatotoxicidad inducida por el As. Su administración disminuye la peroxidación lipídica hepática y la actividad de la alanina aminotransferasa y la aspartato aminotransferasa en suero. En un estudio epidemiológico en el estado de Bengala Occidental (India), Biswas *et al.* (2010) comprueban que el consumo durante 3 meses de un suplemento de cúrcuma reduce el daño al ADN, retarda la generación de ROS y disminuye la peroxidación lipídica.

Las bacterias lácticas también podrían tener un papel protector frente a la toxicidad del As-i. Al-Damegh *et al.* (2014) evalúan el efecto de la dosificación de leche enriquecida con probióticos (2% de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidubacterium bifidum*) en ratas tratadas con As(V) a través del agua de bebida. Los resultados muestran niveles séricos de creatina,

aspartato aminotransferasa y triglicéridos más bajos que los del grupo de ratas tratadas sólo con As(V). Este estudio también evidencia una protección contra la toxicidad testicular causada por esta forma arsenical.

6. Fisiología y estructura del intestino

La estructura del intestino y sus componentes son piezas fundamentales para entender su fisiología y las patologías derivadas de exposiciones a patógenos y xenobióticos. 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. Se subdivide en dos partes bien definidas, el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y el intestino grueso (ciego, colon y recto). La pared del intestino está compuesta por distintas capas (figura 1) que, empezando por la más próxima al lumen, son las siguientes:

- Capa mucosa: formada por el epitelio, 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 proporcionan nutrientes a la mucosa y a la capa muscular externa.
- Capa muscular externa: compuesta por dos bandas de musculatura lisa.
- Capa serosa: mesenterio que cubre una banda de tejido conectivo suelto que contiene vasos sanguíneos y nervios.

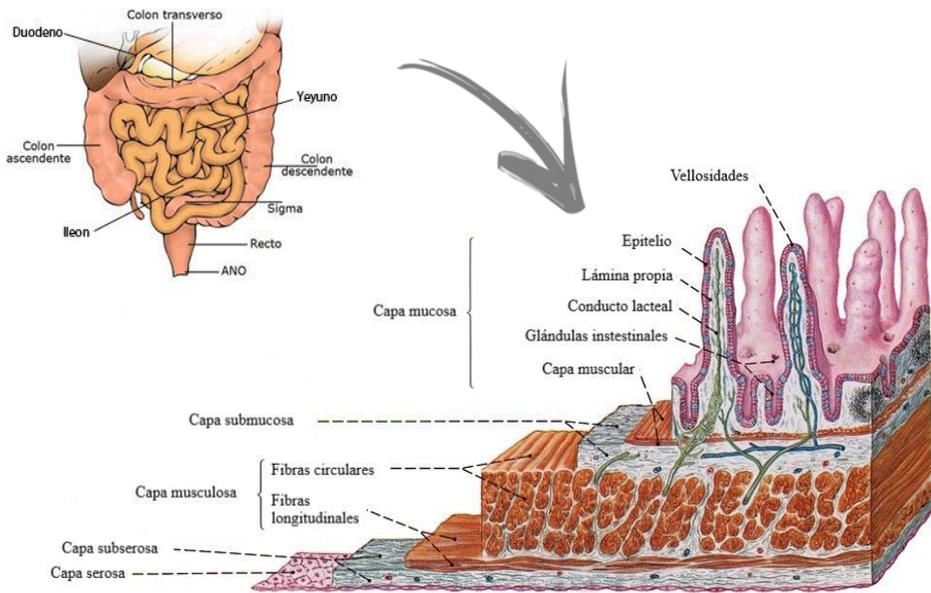


Figura 1. Partes del intestino y estructura de la pared intestinal. Imágenes adaptadas de: www.aecc.es y http://www.corpshuman.ca/en/Intestin_en.php#_

6.1. Mucosa intestinal

La mucosa intestinal es la principal responsable de las diferentes funciones del intestino. Funciona como una barrera protectora que separa los tejidos subyacentes del lumen, portador en ocasiones de sustancias tóxicas y microorganismos patógenos. Además, interviene en los procesos de digestión y de absorción de nutrientes que tienen lugar a lo largo del tracto intestinal. 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).

Esta capa intestinal está formada por un epitelio de una sola capa al cual recubre un tejido conjuntivo denominado lámina propia. La capacidad de absorción de la mucosa está incrementada por ciertos rasgos estructurales que permiten multiplicar la superficie luminal hasta 600 veces (Riverón Corteguera, 1999). Estos rasgos estructurales son los pliegues de Kerking, de los que parten las villis o vellosidades intestinales, evaginaciones de la capa mucosa hacia el lumen. Cada vellosidad intestinal está recubierta por una capa de células epiteliales columnares o enterocitos en cuyo borde apical se encuentran las microvellosidades. Cada enterocito contiene alrededor de 1700 microvellosidades y a su conjunto se le denomina borde en cepillo o superficie microvellosa. Entre las vellosidades se encuentran las criptas de Lieberkühn, invaginaciones tubulares donde se sitúan las células madre que dan lugar a la mayoría de tipos celulares que componen el intestino (Porter *et al.*, 2002). En ellas se lleva a cabo un proceso dinámico que posibilita la renovación del epitelio intestinal (figura 2). La cripta origina una población de células progenitoras que se dividen y diferencian a medida que migran hacia el lumen intestinal. Tras alcanzar la región apical de la vellosidad, las células se descaman y son eliminadas al lumen (Sancho *et al.*, 2003). Las células progenitoras en su migración se diferencian a enterocitos, células caliciformes o enteroendocrinas, mientras que las células de Paneth se diferencian en la base de la cripta (Sancho *et al.*, 2003).

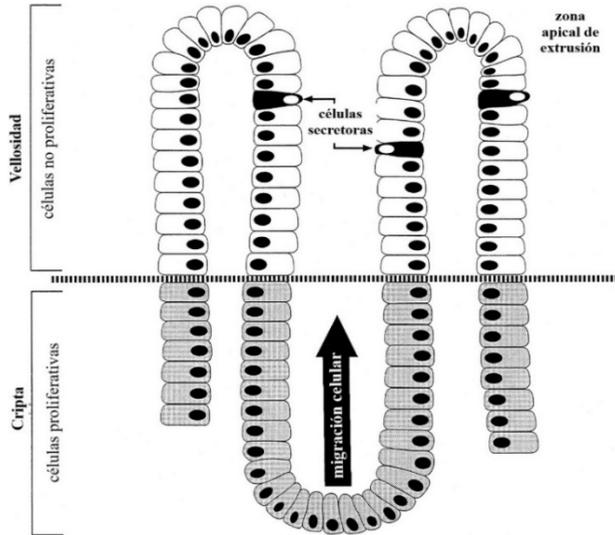


Figura 2. Proceso de renovación del epitelio intestinal.
Imagen adaptada de Mutoh *et al.* (1998).

Los enterocitos son células cilíndricas y constituyen el primer tipo celular en orden de abundancia en el epitelio intestinal (70-90%, Mahler *et al.*, 2009). Son células polarizadas, presentan un dominio apical en contacto con el lumen intestinal y un dominio basal conectado con la lámina propia y la circulación sanguínea. La membrana apical del enterocito que forma el borde en cepillo contiene enzimas (glicosidasas, peptidasas y lipasa) y transportadores esenciales para la digestión y absorción de nutrientes.

El segundo tipo celular en el epitelio intestinal son las células caliciformes, cuya ratio varía de un 10% en el intestino delgado hasta un 24% en el colon distal. La morfología de estas células está determinada por la distensión de la teca que contiene los gránulos de mucina situados por debajo de la membrana apical. Las capas intestinales de mucus secretadas por las células caliciformes son un gel viscoso compacto constituido principalmente por la mucina MUC2, que proporciona la primera línea de defensa contra los agentes endógenos y exógenos

(Kim y Ho, 2010). Esta capa mucosa tiene un grosor de aproximadamente 15 μm (Mahler *et al.*, 2009) y se considera un componente activo en los procesos de absorción y digestión.

Los otros tipos celulares del epitelio intestinal presentan una función principalmente secretora. Las células de Paneth, son células granuladas que secretan péptidos y enzimas antimicrobianas, por lo que se consideran células especializadas en la defensa de la mucosa intestinal. Las células enteroendocrinas producen y secretan diferentes hormonas de manera endocrina o paracrina.

La polaridad de los enterocitos y las células caliciformes se mantiene gracias a las uniones estrechas. Estas impiden la libre difusión de proteínas y lípidos entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática. Las uniones estrechas forman parte de las uniones intercelulares, una compleja red proteica que permite el contacto entre células adyacentes y entre células y matriz extracelular. Las uniones intercelulares se clasifican en tres grupos funcionales: oclusivas, de anclaje y comunicantes (Alberts *et al.*, 2010). Las uniones oclusivas implican un sellado entre células epiteliales al formar una capa continua que restringe la permeabilidad. Las uniones de anclaje fijan las células entre sí y con la matriz extracelular, contribuyendo a la formación y mantenimiento tisular. Finalmente, las uniones comunicantes forman poros entre células permitiendo el acoplamiento y facilitando la comunicación intercelular. Las uniones estrechas del epitelio están compuestas principalmente por uniones oclusivas y de anclaje.

Se han descrito numerosas proteínas integrantes de las uniones estrechas (figura 3) (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2006; Anderson y Van Itallie, 2009), que además de tener un papel en la polaridad intervienen en varios procesos de señalización, regulación transcripcional, ciclo celular, tráfico vesicular y regulación paracelular (Anderson y Van Itallie, 2009). Entre las proteínas de las uniones estrechas hay proteínas transmembrana [claudinas

(CLDN), ocludinas (OCLN) y moléculas de adhesión intercelular (JAM)] que conectan las membranas de las células adyacentes formando un estrecho sellado (*kissing points*). Estas proteínas transmembrana se unen a proteínas periféricas que son las que permiten su organización, su unión al citoesqueleto y la iniciación de la señalización celular. Entre las proteínas periféricas de membrana hay que destacar las proteínas de la zona ocludens (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) y la cingulina (Shin *et al.*, 2006).

Se considera que gran parte de las propiedades barrera del epitelio intestinal se deben a las uniones estrechas y, que muchas de las patologías que causan aumentos de la permeabilidad y disminuciones de la función barrera son debidas a defectos en la estructura y/o función de estas uniones estrechas.

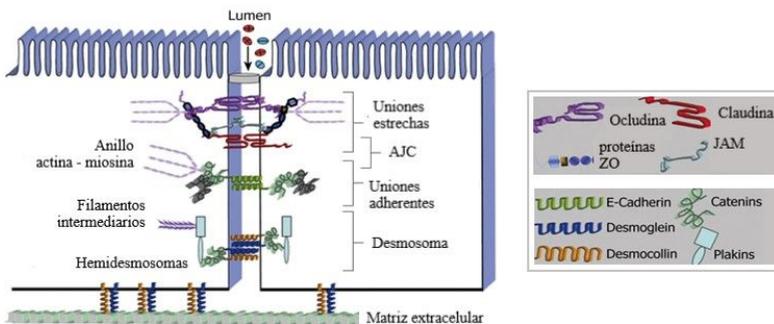


Figura 3. Uniones intercelulares en células de epitelio intestinal.
Imagen adaptada de Laukoetter *et al.* (2008).

6.2. Tejido linfoide asociado al intestino (GALT)

El GALT está constituido por folículos linfoides (acumulación de linfocitos) que se localizan a lo largo del tubo intestinal. Es el órgano linfoide más grande del cuerpo humano, con un 70% de los inmunocitos corporales (Corr *et al.*, 2007). Está formado por unos folículos linfoides dispersos o agregados (parches de

Peyer en el intestino delgado) que se disponen por debajo del epitelio intestinal, en la lámina propia y la submucosa. Los folículos son áreas ricas en células B, además poseen células dendríticas, macrófagos y linfocitos T (Cesta, 2006; Corr *et al.*, 2007). Estos folículos están recubiertos por el epitelio asociado a los folículos, constituido por enterocitos y células M (Corr *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2010). Además de los folículos, también forman parte del GALT, los linfocitos interepiteliales (IEL), linfocitos T CD8⁺ que se encuentran en el epitelio intestinal intercalados entre las células epiteliales y que son muy abundantes (1 IEL por cada 4-6 células epiteliales; Cesta, 2006). Una propiedad única de los IEL es que pueden reconocer a los antígenos de forma directa, sin procesamiento previo, y son capaces de responder con la secreción de citoquinas como el IFN- γ (Guy-Grand *et al.*, 1998).

Además del sistema GALT, las células epiteliales también juegan un papel importante en la respuesta inmune del intestino (Shen y Turner, 2006). Se ha evidenciado que existe una red interactiva entre los enterocitos y las células del sistema GALT que mantiene el balance y modula la respuesta inmune (Van De Walle *et al.*, 2010). Las células epiteliales regulan la permeabilidad y además son capaces de sintetizar y secretar mediadores de inflamación, los cuales pueden alcanzar las células del sistema GALT y favorecer el inicio de la respuesta inmune. Por otro lado, las células epiteliales pueden responder a mediadores secretados por las células inmunes, y modular la permeabilidad de la monocapa epitelial y su secreción, atenuando o amplificando de esta forma la respuesta inmune.

6.3. Función barrera intestinal

El epitelio intestinal constituye la mayor y más importante barrera corporal. Actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, que permite el paso de

nutrientes, electrolitos y agua, y a su vez mantiene una defensa efectiva contra los compuestos tóxicos, antígenos lumenales y la flora entérica (Groschwitz y Hogan, 2009). Esta función barrera, tal y como se ha comentado anteriormente, se mantiene principalmente por las uniones estrechas que sellan los espacios intercelulares de forma selectiva. El GALT es también una pieza importante en el mantenimiento de la integridad y la función barrera. El paso paracelular de antígenos en condiciones fisiológicas está controlado por el sistema GALT, el cual previene el paso de antígenos dañinos a la circulación sistémica e induce la tolerancia a los antígenos lumenales mediante un proceso en el que interviene la secreción de inmunoglobulina A y la actividad de las células T CD4⁺. El balance entre la respuesta inmune y la tolerancia es necesario, ya que una respuesta inmune inapropiada puede causar procesos inflamatorios y pérdida de la función barrera.

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han puesto de manifiesto que la permeabilidad intestinal está regulada por múltiples factores, tales como apoptosis epitelial, citoquinas, células inmunes y componentes dietéticos (Groschwitz y Hogan, 2009; Suzuki, 2013). La pérdida o déficit de la función barrera se considera un determinante crítico en la predisposición a presentar procesos inflamatorios a nivel intestinal, tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y las alergias alimentarias, incluso en desórdenes funcionales del intestino como el síndrome del intestino irritable (Camilleri *et al.*, 2012).

7. Modelos para el estudio de la toxicidad sobre el epitelio intestinal

7.1. Modelos animales

La mayoría de investigaciones sobre efectos tóxicos a nivel intestinal se centran en el estudio de procesos inflamatorios y la progresión de enfermedades

derivadas. Para estos tipos de estudios se han empleado diferentes modelos animales: roedores, cerdos, monos y el pez cebra, entre otros.

En general, los roedores son los animales más utilizados. Se han desarrollado modelos de inflamación y existe toda una serie de animales modificados genéticamente para estudiar diferentes aspectos de la inflamación intestinal y las patologías asociadas. El tracto gastrointestinal del ratón es anatómica y funcionalmente similar al de los seres humanos. Además, tienen muchas características análogas a la respuesta inmune adaptativa humana como similares poblaciones de células B y T (Jiminez *et al.*, 2015). Como cualquier modelo animal presenta ciertas limitaciones y, por tanto, la extrapolación a lo que ocurre en humanos conlleva incertidumbres. Los patrones de comportamiento en ratones, como la coprofagia, pueden afectar el equilibrio dietético y las poblaciones microbianas. Además, su pequeño tamaño hace difícil realizar un gran número de ensayos sobre los tejidos obtenidos. En este sentido la rata es mejor modelo; sin embargo, para los estudios de toxicidad vehiculada por el As-i, el modelo de roedor más idóneo es el ratón, ya que la toxicocinética de esta forma arsenical en otros roedores de pequeño tamaño difiere en mayor medida de la observada en humanos. Las ratas y los hámsteres metabolizan el As-i hasta la forma trimetilada TMAO (Yamauchi y Yamamura, 1985; Yoshida *et al.*, 2001), en lugar de tener como metabolito final el DMA, como ocurre en ratones y humanos. Además, el metabolismo en ratas es más eficaz que en ratones y humanos, los cuales presentan una menor tasa metabólica (Drobna *et al.*, 2009). Por otro lado, el tiempo de permanencia del As en sangre es mucho mayor en ratas debido a la elevada afinidad de la hemoglobina de este tipo de roedor por el As-i, motivo por el cual, la excreción urinaria de As es más lenta (Vahter, 1994).

7.2. Modelos *in vitro*

Como alternativa a los modelos animales, en la actualidad existen diferentes modelos *in vitro* 2D (células primarias o inmortalizadas) y 3D (organoides y explantes) para la investigación de la toxicidad a nivel intestinal (figura 4).

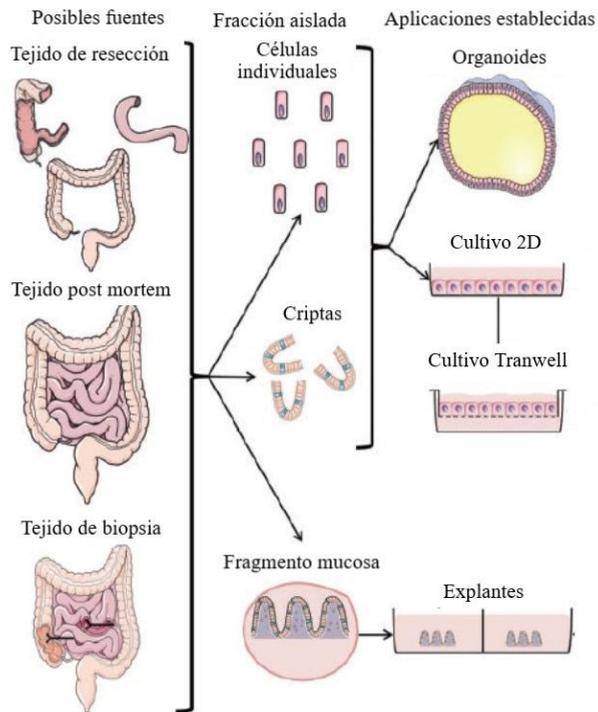


Figura 4. Modelos *in vitro* del epitelio intestinal.

Imagen adaptada de Noben *et al.* (2017).

El uso de organoides como modelo intestinal *in vitro* ha suscitado la atención en los últimos años por ser capaz de imitar la arquitectura y la composición celular del intestino (Sato *et al.*, 2011; Spence *et al.*, 2011; Hartman *et al.*, 2013). Los organoides son estructuras que se obtienen generalmente mediante la

inserción de células madre adultas o criptas derivadas de tejido intestinal en una matriz tridimensional (matrigel o colágeno). Estas estructuras son capaces de formar una mucosa con el fenotipo característico de su sitio de origen (Stelzner *et al.*, 2012; Orbach *et al.*, 2017). Los explantes son fragmentos de mucosa que contiene células epiteliales e inmunes, que tras su aislamiento se siembran en una placa de cultivo o en una cámara de Ussing (Noben *et al.*, 2017). Los modelos 3D, aunque más cercanos a la realidad, presentan la desventaja de su elevado coste. Además, su uso todavía no ha sido ampliamente adaptado para la investigación de enfermedades gastrointestinales.

En general, los modelos 2D son más accesibles y de más sencillo manejo. Las células primarias de intestino pueden utilizarse en estudios *in vitro*; sin embargo, son difíciles de cultivar y su viabilidad es baja. El desarrollo de líneas celulares inmortalizadas ha proporcionado una herramienta muy útil para la evaluación de distintos procesos relacionados con la estructura y función del intestino. Sin embargo, tiene como limitación su reducida complejidad y su menor relevancia fisiológica comparada con los modelos 3D. Este problema puede ser parcialmente solventado por el crecimiento de las células sobre un inserto poroso (Transwell®), en lugar de sobre una placa de cultivo, creando de esta forma una monocapa epitelial polarizada (Noben *et al.*, 2017).

Entre los modelos celulares más empleados se encuentran las células Caco-2, derivadas de adenocarcinoma humano de colon. Su uso suscita ciertas dudas por tratarse de células transformadas cuya respuesta puede variar respecto a la existente en células normales de epitelio. En la actualidad no existen muchos modelos celulares procedentes del epitelio intestinal que no tengan su origen en un adenocarcinoma. Las células NCM460 son una excepción; proceden de epitelio colónico no transformado y se ha evidenciado, empleando diversas razas de ratones inmunodeprimidos, que no generan tumores tras xenotransplantes (Moyer *et al.*, 1996).

Independientemente de las posibles desventajas de los sistemas *in vitro*, especialmente de los 2D, las ventajas económicas y éticas de estos sistemas frente al empleo de animales de experimentación superan sus limitaciones. En muchas ocasiones, los modelos *in vitro* se emplean en los estudios preliminares para, de esta forma, poder limitar determinados aspectos de los estudios *in vivo* y reducir el número de animales a emplear.

7.2.1. Células Caco-2

La línea celular Caco-2 fue establecida por Fogh y Trempe (1975) a partir de un adenocarcinoma de colon humano. Tras alcanzar la confluencia, las Caco-2 se diferencian espontáneamente formando una monocapa con una zona apical y otra basolateral que presentan características estructurales y funcionales similares a las de los enterocitos humanos maduros: polarización celular, formación de domas, uniones intercelulares estrechas, microvellosidades en el lado apical, transportadores de membrana típicos del intestino y enzimas metabólicas y de secreción propias de la membrana del borde en cepillo tales como fosfatasa alcalina, sucrosa-isomerasa y aminopeptidasas (Chantret *et al.*, 1988; Hidalgo *et al.*, 1989; Sun *et al.*, 2008).

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). Si bien el programa de diferenciación de Caco-2 se activa tras la confluencia, siempre existe heterogeneidad en la composición, siendo muy importante el mantenimiento de las condiciones de ensayo (densidad de siembra, número de pases, composición del medio y tiempo tras la siembra hasta la

realización del ensayo) para reducir la variabilidad experimental (Sambuy *et al.*, 2005; Zucco *et al.*, 2005).

Su capacidad para formar una monocapa polarizada y bien diferenciada con propiedades funcionales propias del epitelio intestinal humano, permite estudiar el efecto de los tóxicos sobre numerosos aspectos relacionados con la estructura y función de esta capa externa de la pared intestinal. La mayoría de las investigaciones utilizan células Caco-2 en estado diferenciado. Existen estudios que evalúan los efectos sobre la estructura de esta monocapa mediante tinción de proteínas de las uniones intercelulares o sobre su ultraestructura mediante microscopía de transmisión electrónica (Peng *et al.*, 2007; Agrawal *et al.*, 2013). También se han realizado estudios del efecto de determinados tóxicos sobre su función barrera mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial y el análisis de la permeabilidad de determinados marcadores (Pisal *et al.*, 2008; Ude *et al.*, 2017). El empleo de células transformadas, como las células Caco-2, puede tener ciertas desventajas ya que supone en numerosas ocasiones patrones de glicosilación alterados, falta de respuesta a hormonas o citoquinas o modificaciones en la expresión de proteínas, todos ellos, factores a considerar en la interpretación de los resultados, especialmente en ensayos de toxicidad.

7.2.2. Células NCM460

La línea celular NCM460 deriva de una mucosa de colon normal (Moyer *et al.*, 1996). Su morfología y sus procesos de diferenciación y proliferación celular no están tan bien caracterizados como en Caco-2. Las células NCM460 expresan antígenos asociados a células epiteliales de colon, tales como citoqueratinas y villina, y son negativas para antígenos asociados con otros tipos celulares. Algunas de las células son positivas para la síntesis de mucina, según lo

determinado por los métodos de tinción estándar, y el tiempo de duplicación de la población es de aproximadamente 32 h.

Esta línea celular ha demostrado ser útil en múltiples áreas de investigación incluyendo señalización celular, respuesta pro-inflamatoria, transporte de nutrientes y regulación génica (Said *et al.*, 2000; 2001; Circu *et al.*, 2009a; 2009b; Borthakur *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013). Su origen no tumorigénico ha permitido su uso en estudios relacionados con transformaciones fenotípicas derivadas de la exposición a sustancias con potencial tumorigénico (Alcarraz-Vizan *et al.*, 2014).

Objetivos

La exposición crónica a As-i, descrita en numerosas zonas del planeta aumenta la incidencia de determinados tipos de cáncer y otras patologías no cancerígenas; sin embargo, y aunque la vía oral es la principal forma de exposición, se han realizados pocos estudios para evaluar el efecto tóxico del As-i a nivel intestinal. Los organismos internacionales relacionados con la salud pública y la seguridad alimentaria recomiendan llevar a cabo estudios que incrementen los datos dosis-respuesta y el conocimiento de los efectos tóxicos del As con el fin de conseguir una evaluación más precisa de los riesgos derivados de la ingesta de As-i. Adicionalmente, instan a una reducción de la exposición al tóxico para disminuir las probabilidades del desarrollo de patologías asociadas.

La presente tesis tiene como objetivo **evaluar el efecto tóxico del As-i en el epitelio intestinal, en diferentes tipos de exposición *in vitro* e *in vivo*, así como la búsqueda de estrategias dietéticas que puedan contrarrestar este efecto tóxico.**

Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Evaluación *in vitro* de los efectos de una exposición aguda a As-i [As(III) y As(V)] sobre células epiteliales del intestino, para determinar la existencia de efectos tóxicos e identificar los posibles mecanismos de acción del metaloide a nivel intestinal.
- ✓ Evaluación *in vitro* de los efectos de una exposición subcrónica a As-i sobre células epiteliales del intestino, para determinar la toxicidad del As a las concentraciones halladas habitualmente en zonas endémicas.
- ✓ Evaluación *in vitro* de la capacidad del As-i para producir transformaciones en células epiteliales del intestino a las concentraciones halladas habitualmente en zonas endémicas.

- ✓ Evaluación *in vivo* de los efectos de una exposición subcrónica a As(III) sobre el epitelio intestinal con el fin de constatar los datos obtenidos *in vitro*.
- ✓ Búsqueda *in vitro* de estrategias dietéticas en base a bacterias lácticas y suplementos dietarios capaces de contrarrestar el efecto tóxico del As-i sobre el epitelio intestinal.

Metodología

1. Especies arsenicales

Para los estudios *in vitro* se preparó el patrón de As(III) a una concentración de 1000 mg/L por disolución de 1.320 g de As_2O_3 (Riedel de Haën) en 25 mL de KOH 20% m/v (Panreac), neutralización con H_2SO_4 20% v/v (Merck) y dilución a 1 L con H_2SO_4 1% v/v. El patrón de As(V) (1000 mg/L, As_2O_5) se adquirió a Merck. Para ambas especies arsenicales, los patrones intermedios (100 mg/L) se almacenaron a 4 °C durante un máximo de 2 meses. Los patrones de menor concentración se prepararon a partir de este patrón intermedio el día de su utilización.

Para el estudio *in vivo* se preparó un patrón de 3000 mg/L de As(III) por disolución de 0.396 g de As_2O_3 en 7.5 mL de KOH 20% m/v, neutralización con H_2SO_4 20% v/v y dilución a 50 mL con H_2SO_4 1% v/v. Semanalmente se preparó un patrón intermedio de 1000 mg/L, el cual se neutralizó a pH 7 con NaOH (Panreac).

2. Modelos celulares y animales empleados

2.1. Líneas celulares humanas

En la tesis se han empleado dos tipos celulares humanos procedentes de la región colónica: una línea aislada de un adenocarcinoma (Caco-2) y otra línea no transformada (NCM460).

Las células Caco-2 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, número 86010202). El mantenimiento de estas células se llevó a cabo en frascos de 75 cm² 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 suero fetal bovino (SFB) 10% v/v, aminoácidos no esenciales 1% v/v, penicilina 100 U/mL,

estreptomycin 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL, piruvato de sodio 1 mM y ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 10 mM. Este medio suplementado se denominará DMEMc a lo largo de la tesis. Todos los ensayos se realizaron con células entre los pases 10 y 35. Los reactivos utilizados se adquirieron a Hyclone.

Las células NCM460 se adquirieron a INCELL Corporation. El mantenimiento de las células se llevó a cabo en frascos de 75 cm², a los que se adicionaron 10 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 SFB 10% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL y piruvato de sodio 1 mM. Este medio se denominará NCM-DMEMc a lo largo de la tesis. Todos los ensayos se realizaron con células entre los pases 5 y 20, con excepción del experimento de exposición crónica.

Ambas líneas celulares se incubaron a 37 °C en atmósfera controlada con una humedad relativa del 95% y un flujo de CO₂ del 5%. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Cuando la monocapa celular alcanzó el 80% de confluencia, las células se recuperaron por incubación con una disolución de tripsina (0.5 mg/L, Hyclone) y ácido etilendiamino tetracético (EDTA, 0.22 g/L, Hyclone) durante 10 min a 37 °C y se sembraron en frascos de 75 cm² a una densidad de 5 × 10⁴ células/cm².

2.2. Modelos animales

Para el estudio *in vivo* se han utilizado ratones hembras BALB/c procedentes de Envigo (n=36). Los animales se adquirieron con edad de 6 semanas y con un peso que oscilaba entre 15 y 20 g. A lo largo del estudio los animales se mantuvieron en condiciones ambientales controladas (ciclos de 12 h de luz y oscuridad, temperatura ambiente de 22 °C y humedad del recinto de 75%). Los ratones se

alimentaron *ad libidum* con pienso de mantenimiento estándar para roedores cuyo contenido en As es reducido (50 ng/g).

Los protocolos de experimentación aplicados a los animales se diseñaron conforme a la normativa para el uso de animales de experimentación (Real Decreto 53/2013) y fueron aprobados por la Consellería de d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Generalitat Valenciana.

3. Evaluación *in vitro* del efecto de una exposición aguda a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal

En este estudio se utilizaron las líneas celulares Caco-2 y NCM460, las cuales se sembraron en DMEMc o NCM-DMEMc, respectivamente, en soportes diferentes según el parámetro a evaluar. Tras 7-9 días de siembra, las células se expusieron a diferentes concentraciones de As(III) o As(V) preparados en medio esencial mínimo con sales de Earle (MEM, Lonza) suplementado con penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL y HEPES 10 mM, medio que se denominará MEMc a lo largo de la tesis.

3.1. Ensayos de viabilidad celular

Previo a los estudios de toxicidad, se evaluó el efecto del As-i sobre la viabilidad de los dos tipos celulares, con el fin de trabajar en condiciones subletales de exposición. La evaluación de la viabilidad se basó en la capacidad de las células viables de reducir resazurina sódica (sal sódica de 10-óxido de 7-hidroxi-3-hidrofenoquin-3-ona, Sigma) a resorufina, medibles ambas por métodos colorimétricos. Esta conversión es intracelular, facilitada por oxidoreductasas mitocondriales, citosólicas y microsomales (O'Brien *et al.*, 2000).

Las células Caco-2 y NCM460 se sembraron a una densidad de 2.5×10^4 células/cm² en placas de 24 pocillos en medio DMEMc o NCM-DMEMc respectivamente. Tras 7 días de siembra, las células se expusieron a As(III) (0.5-5 mg/L) o As(V) (3-10 mg/L) durante 24 h en MEMc. Finalizada la exposición, se retiró el medio y la monocapa celular se lavó con tampón fosfato salino (PBS, Biowest). Posteriormente, se añadieron 500 µL de resazurina sódica 10 µg/mL en MEMc (Sigma) y la placa se incubó durante 2 h a 37 °C, 95% humedad relativa y flujo de CO₂ del 5%. Tras la incubación, se transfirieron 100 µL del medio de incubación a una placa de 96 pocillos y la reducción de la resazurina se determinó por espectrofotometría con lecturas a 570 y 600 nm (PowerWave HT Microplate Scanning Spectrophotometer, BioTek instruments).

3.2. Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o nitrógeno (RNS)

La generación de ROS y/o RNS se determinó mediante la técnica de oxidación de la 2',7'-dihidroclorofluoresceína diacetato (DHCF-DA, Sigma) a diclorofluoresceína (DCF), compuesto fluorescente. Las células se sembraron a una densidad de 3×10^4 células/cm² en placas de 12 pocillos. Tras 7 días de siembra, las monocapas se expusieron a As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) (5 y 8 mg/L) preparados en MEMc durante 2, 4 y 24 h. Trascorrido el tiempo de tratamiento, el medio fue eliminado, la monocapa celular se lavó con PBS y se incubó (30 min, 37 °C) con una disolución de 200 µL de DHCF-DA 100 µM en PBS. Tras la incubación, la disolución de DHCF-DA se transfirió a una placa de 96 pocillos para la posterior lectura de fluorescencia. Las células se lavaron con PBS y se lisaron utilizando 300 µL de Tritón X-100 (0.1% m/v en PBS, Sigma). El lisado celular, tras sonicación (10 min, 4 °C), se centrifugó (11000 rpm, 3 min) y en el sobrenadante se determinó la fluorescencia. Se utilizó un lector de microplacas

PolarSTAR OPTIMA (BMG-Labtech) (λ excitación = 488 nm; λ emisión = 530 nm). Los valores de fluorescencia obtenidos se normalizaron por cantidad de proteínas, cuantificada de acuerdo con el método de Bradford (Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad laboratories).

3.3. Respuesta pro-inflamatoria

Las células se sembraron a una densidad de 3×10^4 células/cm² en placas de 12 pocillos. Tras 7 días de siembra, las monocapas se expusieron durante 4, 8 y 24 h a As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) (5 y 8 mg/L) preparados en MEMc. Transcurrido el tiempo de exposición, los medios se recuperaron para el análisis de las citoquinas pro-inflamatorias IL-2, IL-6, IL-8 y TNF α , mediante kits de ELISA específicos [IL-2 Human Instant ELISA™ Kit (Invitrogen), Human IL-6 ELISA Kit (Sigma), Human IL-8/CXCL8 ELISA Kit (Sigma), TNF alpha Human ELISA Kit (Invitrogen)], siguiendo las instrucciones del fabricante. La monocapa celular se lavó con PBS, se recuperó con una disolución de tripsina/EDTA y se lisó con Tritón X-100 0.1% v/v para la determinación del contenido de proteínas de acuerdo con el método de Bradford. Los resultados se normalizaron por mg de proteínas.

3.4. Expresión de proteínas de estrés y de las uniones estrechas

En este ensayo se evaluó la expresión génica de la metalotioneína 2A (*MT2A*), la proteína de choque térmico (*HSP70*) y de las proteínas de las uniones estrechas *OCLN* y *CLDN-1*. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 4×10^4 células/cm² y tras 7 días se trataron con As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) (5 y 8 mg/L) preparados en MEMc durante 4, 8 y 24 h. Transcurrido el tiempo de exposición, la monocapa celular se lavó con PBS y las células se recuperaron con

tripsina/EDTA para la extracción del ARN total, obtención del ADNc por transcripción reversa (RT) y evaluación de la expresión por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) siguiendo los protocolos descritos en el apartado 8. Los datos obtenidos se normalizaron empleando el gen de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GADPH*). Los oligonucleótidos y sus eficacias se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en el estudio de expresión de proteínas de estrés y de uniones intercelulares.

Gen	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (bp)	Eficacia	Referencia
<i>GADPH</i>	NM_0012897 46.1	F: 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3' R: 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'	113	1.95 ± 0.06	Cario <i>et al.</i> (2000)
<i>HSPA1A</i> (<i>hsp70</i>)	NM_005345.5	F: 5'-GGAAQGGACCGAGCTCTTCTCGC-3' R: 5'-CAGGAGTAGGTGGTGGCCAGGTC-3'	138	2.18 ± 0.06	Alard <i>et al.</i> (2009)
<i>MT2A</i>	NM_005953.3	F: 5'-AAAGGGGCGTCGGACAAGT-3' R: 5'-TAGCAAACGGTCACGGTCAG-3'	126	2.10 ± 0.18	Song y Freedman (2005)
<i>CLDN-1</i>	NM_021101.4	F: 5'-CCGGCGACAACATCGTGAC-3' R: 5'-CGGGTTGCTTGCAATGTGC-3'	136	2.07 ± 0.06	Kaarteenaho <i>et al.</i> (2010)
<i>OCLN</i>	NM_002538.2	F: 5'-AAGAGTTGACAGTCCCATGGCATAC-3' R: 5'-ATCCACAGGCGAAGTTAATGGAAG-3'	133	1.93 ± 0.05	Cui <i>et al.</i> (2010)

3.5. Inmunolocalización de ZO-1

Las células se sembraron a una densidad de 4×10^4 células/cm² sobre cubreobjetos (12 cm diámetro) colocados en placas de 24 pocillos. Tras 7 días de siembra, las células se trataron durante 24 h con As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) (5 y 8 mg/L) preparados en MEMc. Trascurrido el tiempo de exposición, las monocapas se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído (PAF) 4% v/v en PBS (Sigma), se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% (v/v en PBS) y se bloquearon con suero de cabra al 10% (v/v en PBS, Santa Cruz Biotechnology).

Para la inmunolocalización de ZO-1, la monocapa celular se incubó a 4 °C durante toda la noche con un anticuerpo policlonal anti-ZO-1 (ab216880, Abcam) diluido 1:200 en 2% de suero de cabra. Posteriormente, para la detección, se incubó (1 h, temperatura ambiente) con anticuerpo anti-conejo tipo IgG generado en cabra y conjugado con Alexa 488 (R37116, Invitrogen), diluido 1:200 en 2% de suero de cabra. A continuación, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) diluido 1:200 en PBS con el fin de visualizar los núcleos celulares. Finalmente, las muestras se montaron con ProLong[®] Antifade (Molecular Probe) y se examinaron al microscopio de epi-fluorescencia (Nikon eclipse 90i) (Alexa 488: λ excitación = 488 nm, λ emisión = 519 nm; DAPI: λ excitación = 340 nm, λ emisión = 485 nm).

3.6. Evaluación de la permeabilidad de las monocapas celulares

Las células se sembraron a una densidad de 4×10^5 células/cm² sobre una placa de seis pocillos con insertos porosos Transwell[®] (diámetro 24 mm, poro 0.4 μ m, Corning). Este sistema de cultivo intenta emular de forma simplificada el entorno de la pared intestinal, ya que posibilita el crecimiento del cultivo celular sobre una membrana semipermeable de poliéster que separa el pocillo en dos compartimentos; el compartimento superior o apical, que emularía el lumen

intestinal y el inferior o basolateral, que emularía los vasos linfáticos-circulación sanguínea (figura 5).

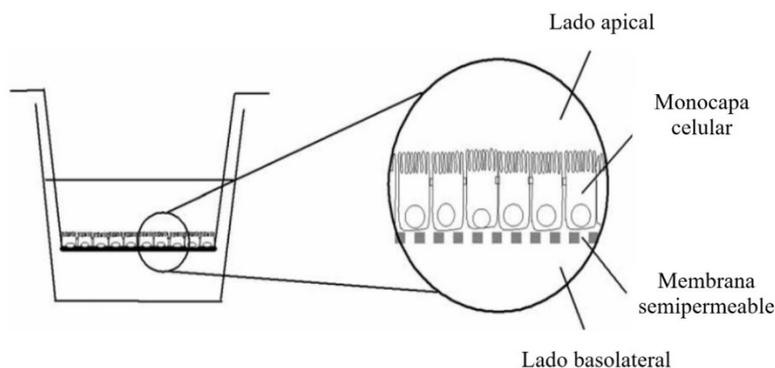


Figura 5. Representación esquemática del sistema de cultivo sobre insertos Transwell®. Imagen modificada de Hubatsch *et al.* (2007).

Durante el tiempo de crecimiento y diferenciación celular en el sistema bicameral, se monitorizó la confluencia y desarrollo de la monocapa celular mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) empleando un voltímetro Millicell®-ERS (Millipore Corporation). 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. Se consideró que las monocapas estaban formadas cuando los valores de RET fueron estables y superiores a $600 \text{ Ohms} \times \text{cm}^2$.

Tras 9 días de siembra, las células fueron tratadas con As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) (5 y 8 mg/L) preparados en MEMc. La permeabilidad de la monocapa se monitorizó mediante la medida del transporte de Lucifer Yellow (LY) (Sigma) o dextranos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) de diferentes pesos moleculares (4 y 20 k) (Sigma), añadidos en el compartimento apical a la concentración de $100 \mu\text{M}$, al mismo tiempo que los tratamientos. Durante el

ensayo, se extrajeron alícuotas (100 μ L) del compartimento basolateral a las 8 y 24 h del tratamiento. Los contenidos de LY o dextrano en las alícuotas se determinaron a través de la lectura de la fluorescencia (λ excitación = 488 nm; λ emisión = 530 nm) utilizando un lector de microplacas PolarSTAR OPTIMA.

4. Evaluación *in vitro* del efecto de una exposición subcrónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal

En este estudio se empleó únicamente la línea celular Caco-2 debido a que algunos de los procesos celulares evaluados en este tipo de exposición (diferenciación, proliferación y reparación celular) han sido bien caracterizados en esta línea (Rousset, 1986; Ricchi *et al.*, 1997); sin embargo no existen antecedentes para las células NCM460.

Previo a los ensayos encaminados a evaluar los parámetros toxicológicos, se llevó a cabo un estudio para determinar las condiciones óptimas de tratamiento en el que se modificaron dos variables: la cantidad de SFB y las concentraciones de As(III) y As(V). Se consideraron óptimas aquellas condiciones que permitieron mantener la integridad de la monocapa, evaluada por visualización microscópica. Tras fijar las condiciones de estudio se llevaron a cabo los ensayos que se detallan en los apartados 4.1-4.6. En todos ellos, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de As(III) y As(V) desde el momento de la siembra, cambiando el medio cada 2 días para evitar la oxidación del As(III). Los soportes de siembra y la duración del tratamiento fueron diferentes en función del parámetro a evaluar.

4.1. Respuesta pro-inflamatoria

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 2.6×10^4 células/cm² y desde el inicio se expusieron a As(III) (0.025, 0.075 y 0.1 mg/L) y As(V) (0.25, 0.75 y 1 mg/L) en DMEM suplementado con SFB 7.5% v/v, aminoácidos no esenciales 1% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomina 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL, piruvato de sodio 1 mM y HEPES 10 mM. Este medio se denominará DMEM-7.5%SFB a lo largo de la tesis. A los tiempos estipulados (7, 14 y 21 días), los medios se recuperaron para el análisis de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 mediante el kit ELISA Human IL-8/CXCL8. La monocapa celular se lavó con PBS y se recuperó con una disolución de tripsina/EDTA para la determinación del número de células por tinción con azul tripán 0.4% (Sigma). Los resultados se normalizaron por número de células.

4.2. Cambios en la proliferación celular

La proliferación celular se evaluó determinando el número de células en cada etapa del ciclo celular (G0/G1, S, G2/M) mediante el análisis de la cantidad de ADN. Para este ensayo se sembraron placas de 6 pocillos a una densidad de 2.6×10^4 células/cm² y se expusieron a As(III) (0.025, 0.075 y 0.1 mg/L) y As(V) (0.25, 0.75 y 1 mg/L) en DMEM-7.5%SFB desde el momento de la siembra.

Tras 2, 5 y 7 días, las células se lavaron con PBS, se recuperaron con tripsina/EDTA y fueron procesadas con el kit BD Cycletest™ Plus DNA (BD Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron por citometría de flujo (Beckman Coulter Epics XL-MCL). Todos los ensayos se realizaron por triplicado en dos días independientes, analizándose en cada lectura 10000 eventos.

4.3. Expresión de marcadores de diferenciación celular

El progreso de la diferenciación de las células intestinales se evaluó mediante el análisis de la expresión génica de marcadores de diferenciación celular [sucrosa-isomerasa (*SI*), dipeptidil peptidasa 4 (*DPP4*), villina 1 (*VILI*) y *MYC*]. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 2.6×10^4 células/cm² y se trataron con As(III) (0.025, 0.075 y 0.1 mg/L) y As(V) (0.25, 0.75 y 1 mg/L) en DMEM-7.5%SFB durante 5, 7, 14 y 21 días. Transcurrido el tiempo de exposición, la monocapa celular se lavó con PBS y las células se recuperaron con tripsina/EDTA para la extracción del ARN, obtención del ADNc y determinación de la expresión por qPCR (apartado 8). Los datos obtenidos se normalizaron empleando el gen de referencia ARN ribosomal 18S (*RN18S*). Los oligonucleótidos y sus eficacias se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en el estudio de la expresión de marcadores de diferenciación.

Gen	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (bp)	Eficacia	Referencia
<i>SI</i>	<i>NM_001041</i>	F: AATCAGACACCCAATCGTTTCC R: GGGCAACCTTCACATCATACAA	134	2.12 ± 0.17	<i>Wang et al. (2011)</i>
<i>DPP4</i>	NM_001935.3	F: GTGGCGTGTTCAAGTGTGG R: CAAGGTTGTCTTCTGGAGTTGG	111	2.01 ± 0.32	<i>Varona et al. (2010)</i>
<i>MYC</i>	NM_002467.4	F: GTCAAGAGGCGAACACACAAC R: TTGGACGGACAGGATGTATGC	173	2.02 ± 0.07	<i>Zou et al. (2016)</i>
<i>VILI</i>	NM_007127.2	F: CTGAGCGCCCAAGTCAAAG R: AGCAGTCACCATCGAAGAAGC	127	2.04 ± 0.01	<i>Kraiczky et al. (2017)</i>
<i>RNI8S</i>	NR_003286.2	F: CCATCCAATCGGTAGTAGCG R: GTAACCCGTTGAACCCCAT	151	2.00 ± 0.01	<i>Wang et al. (2011)</i>

4.4. Evaluación de la permeabilidad intestinal de las monocapas celulares

Las células se sembraron a una densidad de 4×10^6 células/cm² sobre placas de 6 pocillos con insertos Transwell® (diámetro 24 mm, poro 0.4 µm). Desde el momento de la siembra, las células se expusieron a As(III) (0.025, 0.075 y 0.1 mg/L) y As(V) (0.25, 0.75 y 1 mg/L) en DMEM-7.5%SFB en el lado apical (1.5 mL). Tras 7, 14 y 21 días de siembra, se evaluó el transporte de LY al lado basolateral durante 1 h, tras adicionar el marcador al lado apical a una concentración de 100 µM. La concentración de LY se determinó siguiendo el protocolo descrito en el 3.6.

4.5. Estudio de la estructura de la monocapa celular

El estudio de la estructura de la monocapa celular se llevó a cabo mediante microscopía de transmisión electrónica. Las células se sembraron a una densidad de 1.1×10^4 células/cm² sobre placas de 12 pocillos con insertos Transwell® (diámetro 12 mm, poro 0.4 µm). Desde el inicio las células se expusieron a As(III) (0.025, 0.075 y 0.1 mg/L) y As(V) (0.25, 0.75 y 1 mg/L) en DMEM-7.5%SFB. Tras 7 y 14 días de tratamiento, se procedió a fijar las monocapas sobre los insertos con una disolución de PAF 2.5% v/v en PBS y glutaraldehído 0.5%, la cual se añadió a ambos compartimentos (0.5 mL en el apical y 1 mL en el basolateral). Tras 15 min de incubación, se retiró el fijador y las células se lavaron con la disolución tampón de Sorënsen (0.1 M, pH 7.3), manteniéndose en esta solución salina hasta el momento de su preparación.

Las monocapas fijadas se incubaron con una disolución de tetraóxido de osmio al 1% (London Resin Company Ltd) a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, la preparación se deshidrató por inmersiones sucesivas en etanol a concentraciones crecientes (30, 50, 70 y 90%). Tras eliminar el inserto, se realizó una inclusión en resina LR-White, incubando la polimerización en estufa

a 60 °C. Posteriormente se realizó una tinción con citrato de plomo y acetato de uranilo y se llevaron a cabo cortes ultrafinos de 60 a 90 nm con cuchillas de diamante en el equipo Ultracut UC6 Leica. Las preparaciones se observaron en el microscopio de transmisión electrónica JEM-1010 (Jeol).

4.6. Evaluación de la regeneración celular

Los estudios de regeneración celular se realizaron mediante el ensayo de cierre de herida. Las células se sembraron en placas de seis pocillos a una densidad de 2.6×10^4 células/cm² y desde el inicio se expusieron a As(III) (0.025, 0.075 y 0.1 mg/L) y As(V) (0.25, 0.75 y 1 mg/L) en DMEM-7.5%SFB. Tras 7 días de exposición, las células se recuperaron con tripsina/EDTA y se sembraron a una densidad de 8.5×10^4 células/cm² sobre una placa *culture-insert 2 well 24* (Ibidi), que consiste en una placa de 24 pocillos, cada uno de ellos separado en dos compartimentos por una pared de 500 µm. Después de alcanzar la confluencia, los insertos se retiraron creando una línea central libre de células de aproximadamente 500 µm. Posteriormente, se adicionó DMEMc-7.5%SFB a los pocillos y se observó el cierre del espacio libre de células durante 48 h. El cálculo del área de la herida se llevó a cabo con el programa NIS Elements BR (Nikon Instruments).

5. Evaluación *in vitro* del efecto de una exposición crónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal

En este estudio se evaluó si la exposición crónica a As-i favorecía la adquisición de fenotipos tumorigénicos en células epiteliales del intestino, tal y como se ha evidenciado en otros tipos celulares (Tokar *et al.*, 2010; Person *et al.*, 2015). Por

ese motivo, únicamente se emplearon células NCM460, línea celular no transformada (Moyer *et al.*, 1996).

Las células se sembraron a una densidad de 4×10^4 células/cm² en frascos de 25 cm² y desde el inicio se expusieron a disoluciones de As(III) (0.01, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L) y As(V) (0.5 y 1 mg/L) preparadas en DMEM suplementado con 7.5% (v/v) de SFB, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomina, 0.0025 mg/mL de anfotericina B y 1 mM de piruvato de sodio. Este medio se denominará DMEM-crónica a lo largo de la tesis. La exposición se prolongó 24 semanas, con cambios de medio cada 2-3 días y pases cada 7 días. Tras el pase celular, las células del nuevo pase se expusieron a las mismas concentraciones de As-i en frascos de 25 cm². Paralelamente se realizaron pases de células no expuestas a As-i, las cuales se emplearon como células control.

5.1. Respuesta pro-inflamatoria

Cada 2 semanas, durante el pase celular, los medios de cada tratamiento se recuperaron para el análisis de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 realizada mediante el kit ELISA Human IL-8/CXCL8, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de liberación de IL-8 se normalizaron por número de células determinado por tinción con azul tripán 0.4%.

5.2. Evaluación de la modificación de histonas

A partir de la sexta semana, durante el pase celular, aproximadamente 1×10^6 células procedentes de cada uno de los tratamientos se recuperaron para el análisis de histonas modificadas. La extracción de las histonas se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Shechter *et al.* (2007). El contenido total de proteínas en el extracto se determinó por el método de Bradford.

Las proteínas (20 μg) se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida 12% y se transfirieron a una membrana Hybond-P PVDF (GE Healthcare) por electroelución durante 1 h. Tras la transferencia, las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino 5% m/v (Biowest) en disolución salina tamponada con Tris (TBS) durante 1 h. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-Histone H3 (acetyl K9 + K14 + K18 + K23 + K27) (ab47915, Abcam), diluido 1:2000 en disolución de bloqueo. A continuación, se lavaron e incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario (anti-conejo tipo IgG generado en cabra) diluido 1:10000 en disolución de bloqueo. Las bandas obtenidas se detectaron con el reactivo de detección Amersham™ ECL Select™ Western Blot Detection Reaction (GE Healthcare). El análisis densiométrico de las bandas se llevó a cabo con el programa ImageJ (NIH).

5.3. Expresión de genes relacionados con cánceres colorrectales

En este ensayo se evaluó la expresión génica de los genes homeobox *CDX1* y *CDX2* y *CDI33*. A partir de la tercera semana, durante el pase celular, se aislaron 1×10^6 células de cada tratamiento para la extracción del ARN total, obtención del ADNc y evaluación de la expresión por qPCR (apartado 8). Los datos obtenidos se normalizan empleando el gen de referencia *RN18S*. Los oligonucleótidos y sus eficacias se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en el estudio de la expresión de genes relacionados con cáncer colorrectal.

Gen	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplión (bp)	Eficacia	Referencia
<i>CDX1</i>	NM_001804.2	F: CACAATCCGGCCGAAATC R: TCACTTTGCGCTCCTTTGC	101	2.08 ± 0.07	Takahashi <i>et al.</i> (2007)
<i>CDX2</i>	NM_001265.4	F: GCTGGAGAAGGAGTTTCACTACAGT R: TAACCAGATTTTAACCTGCCTCTCA	103	2.11 ± 0.19	Takahashi <i>et al.</i> (2007)
<i>CD133</i>	NM_006017.2	F: TTGGCTCAGACTGGTAAATCCC R: ATAGGAAGGACTCGTTGCTGGT	161	2.10 ± 0.19	De Carlo <i>et al.</i> (2013)
<i>RN18S</i>	NR_003286.2	F: CCATCCAATCGGTAGTAGCG R: GTAACCCGTTGAACCCATT	151	2.00 ± 0.01	Wang <i>et al.</i> (2011)

5.4. Proliferación celular en medio con baja cantidad de suero

Este ensayo se realizó con las células obtenidas tras 6, 10 y 18 semanas de tratamiento con As-i. La proliferación celular se determinó a través de la siembra de 2.6×10^5 células/cm² en placas de 12 pocillos en medio DMEM suplementado con SFB 1% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL y piruvato de sodio 1 mM. Las células se incubaron a 37 °C durante 7 días. Tras la incubación, la monocapa celular se lavó con PBS y se recuperó con una disolución de tripsina/ EDTA para la determinación del número de células por tinción con azul tripán 0.4%.

5.5. Actividad de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP)

Las células expuestas crónicamente a As-i durante 6, 12 y 24 semanas se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 2.6×10^5 células/cm² en DMEM sin suplementación. Tras 48 h, el medio se recuperó y se centrifugó (1400 rpm, 5 min) para eliminar los posibles restos celulares. La fracción proteica se concentró (\approx 50 veces) utilizando tubos Amicon Ultra-2 30K (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad gelatinolítica de la MMP-2 y MMP-9 se evaluó a través de un método zimográfico basado en el protocolo descrito por Hu y Beeton (2010).

El medio, tras dilución 1:1, se sometió a una electroforesis (125 V, 1 h) en gel 10% Tris-glicina con gelatina al 0.1% como sustrato (Novex, Invitrogen). Posteriormente, el gel se incubó con un tampón renaturalizador 1× (Novex) durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Se substituyó el tampón renaturalizador por un tampón revelador (Novex) y se incubó a 37 °C durante toda la noche para obtener máxima sensibilidad. Los geles se tiñeron durante 3 h con Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma) preparado en ácido acético 10% v/v (Sigma). Posteriormente se sumergieron durante 30 min en una disolución de

metanol 20% v/v (Scharlau) y ácido acético 10% v/v. Las áreas de lisis se midieron densiométricamente con el software ImageJ. Se utilizaron las proteínas recombinantes MMP-9 (Life technologies) y MMP-2 (Abcam) como controles positivos.

5.6. Ensayo de formación de colonias en agar blando

El crecimiento independiente de anclaje se determinó a través del ensayo de formación de colonias en agar blando, donde las células sembradas a una densidad baja, crecen suspendidas en una capa de agar superior (0.35%) que yace sobre una capa de agar base, menos blando (0.5%), permitiendo que las células tumorales formen colonias visibles en el agar.

El agar base se preparó mezclando agar 1% v/v en H₂O con medio NCM-DMEMc 2× en una proporción 1:1, obteniendo como producto final agar al 0.5%. A cada pocillo de una placa de 6 pocillos se añadió 1.5 mL de esta mezcla y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su solidificación. Posteriormente se preparó la capa de agar superior mezclando agar 0.7% v/v en H₂O con medio NCM-DMEMc 2X en una proporción 1:1, obteniendo como producto final agar al 0.35%. Esta mezcla se empleó para preparar la suspensión celular (7×10^3 células/mL), la cual se sembró (1.5 mL) sobre la capa de agar de 0.5% y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su solidificación. Las células se incubaron a 37 °C, añadiendo 0.5 mL de NCM-DMEMc sobre la capa superior de agar 1-2 veces por semana para evitar la deshidratación del agar. Tras 21 días, se añadió cristal violeta 0.01% v/v (Merck) para visualizar las colonias formadas.

5.7. Formación de tumoresferas *in vitro*

Para obtener esferas flotantes se siguió el protocolo descrito por Johnson *et al.* (2013). Las células procedentes del pase de las semanas 18 y 24 se sembraron (1.5×10^4 células/mL) en placas de 96 pocillos de baja adherencia (Corning), en medio DMEM/F-12 (Gibco) suplementado con factor de crecimiento epidérmico 20 ng/mL (Immuno tools), factor de crecimiento de fibroblastos básico 10 ng/mL (Immuno tools), insulina 5 µg/mL (Sigma), albúmina de suero bovino 0.4% y suplemento B-27 (Gibco). Tras una semana de incubación (37 °C), se evaluó la cantidad y tamaño de las tumoresferas por microscopia.

6. Evaluación *in vivo* del efecto de una exposición subcrónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal

6.1. Tratamiento y recolección de muestras

Para los estudios *in vivo*, los ratones BALB/c se dividieron en cuatro grupos de nueve animales. El primer grupo se utilizó como control y a los otros tres grupos se les administró durante dos meses diferentes dosis de As(III) a través del agua de bebida (20, 50, 80 mg/L, equivalente a aproximadamente 3, 7.5 y 12 mg/kg pc/día). Cada 3-4 días se cambió el agua para reducir las posibilidades de oxidación del As(III). A lo largo del experimento, se monitorizó el peso corporal, la cantidad de agua ingerida y aspectos físicos y comportamentales de los ratones. Las dosis se eligieron en base a los estudios previos donde se dosifican ratones a tiempos similares, y atendiendo a los datos toxicológicos reportados para ratones en exposiciones subcrónicas (ATSDR, 2000).

Tras anestesia por inhalación de isofluorano, se recolectó la sangre por punción cardíaca y posteriormente se realizó el sacrificio por dislocación cervical. Inmediatamente se recuperó el intestino, se lavó abundantemente con

NaCl 0.9% m/v y tras su separación en diferentes fragmentos, se almacenó a -80 °C para los posteriores análisis. Algunos de los fragmentos requirieron técnicas específicas de almacenaje o preparación, las cuales se detallan en cada apartado.

6.2. Acumulación tisular de arsénico

El análisis de As se realizó por mineralización vía seca y posterior determinación por generación de hidruros (HG) acoplada a espectroscopía de fluorescencia atómica (AFS). Las muestras de intestino delgado (0.5-1 g) o grueso (50-100 mg) se trataron con 1 mL de agente de mineralización [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 20% m/v (Panreac) + MgO 2% m/v (Merck)] y 5 mL de HNO_3 14 M (Merck). La mezcla se evaporó a sequedad en un baño de arena termostatado (Raypa, modelo PL 5125) y posteriormente se mineralizó en un horno mufla (Heraeus, modelo K 1253), aplicando un ciclo temperatura-tiempo en el que tras una subida paulatina de la temperatura (50 °C/h), las muestras se mantuvieron a 450 °C durante 12 h.

Tras el proceso de mineralización, las cenizas se disolvieron en HCl 6 M y en una disolución reductora [KI 5% m/v (Panreac) y ácido ascórbico 5% m/v (Merck)]. La proporción de reductor adicionado con respecto al volumen final de disolución fue de 1:5. Transcurridos 30 min, la disolución se filtró a través de papel Whatman nº 1 y se llevó a volumen final (10 mL) con HCl 6 M. Las condiciones instrumentales para la cuantificación de As mediante HG-AFS se detallan en la tabla 7.

El control de calidad de la cuantificación de As se realizó a través del análisis de la muestra de agua de referencia certificada con un contenido en As de $30.2 \pm 0.293 \mu\text{g/L}$ (RTC QCI-049-1, LGC Standards).

Tabla 7. Condiciones instrumentales utilizadas en la cuantificación de As mediante HG-AFS.

Muestra	9 mL/min
Disolución reductora	NaBH ₄ 1.2% (m/v) en NaOH 0.1 M. Flujo 4 mL/min
Disolución ácida	HCl 4.5 M. Flujo 9 mL/min
Gas transportador	Argón. Flujo 300 mL/min
Gas de secado	Aire. Flujo 2.5 L/min
Corriente primaria	27.5 mA
Corriente de estímulo	35.0 mA
Tiempo de demora	10 s
Tiempo de medida	20 s
Tiempo de retorno	40 s

6.3. Evaluación de marcadores de toxicidad en el intestino

6.3.1. Determinación de la generación de ROS y/o RNS

Las muestras de intestino se homogenizaron mediante el disruptor de tejidos TissueRuptor II (Qiagen) empleando 3 ciclos de 30 s a 4 °C, en tampón RIPA modificado [NaCl 150 mM (Panreac), tampón Tris 50 mM pH 8 (Sigma), EDTA 5 mM (Sigma), Tritón X-100 1% v/v, sodio desoxicolato 0.5% m/v (Sigma), inhibidor de proteasa 10% m/v (Roche)] a una proporción 1:20. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación (10000 rpm, 5 min) se utilizó para la determinación de ROS/RNS empleando la técnica de oxidación de DHCF-DA. El sobrenadante (100 µL) se incubó (30 min, 37 °C) con 5 µL de una disolución de DHCF-DA 10 µM en PBS. Transcurrido este tiempo, la fluorescencia se determinó utilizando un lector de microplacas CLARIOstar (BMG-Labtech) (λ excitación = 488 nm; λ emisión = 530 nm). Los valores de fluorescencia obtenidos se normalizaron por gramos de tejido.

6.3.2. Expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias, mucina y proteínas de las uniones celulares

El tejido obtenido tras el sacrificio se sumergió inmediatamente en una disolución de RNA later (Qiagen) durante 24 h a 4 °C y posteriormente, tras eliminar el RNA later, se almacenó a -80 °C hasta el momento de la extracción de ARN. La expresión génica de la mucina 2 (*Muc2*), la proteína inflamatoria de macrófagos (*Mip2*), las citoquinas *Tnfa*, *Il-1β*, *Il-2* e *Il-6* y las proteínas de las uniones estrechas *Cldn-1*, *Cldn-2*, *Cldn-4* y *Zo-1* se evaluó por RT-qPCR (apartado 8). Los datos obtenidos se normalizan empleando el gen de referencia *Rn18s*. Los oligonucleótidos y sus eficacias se describen en la tabla 8.

6.3.3. Cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias

Las muestras de intestino se homogenizaron tal y como se describe en el apartado 6.3.1. En el sobrenadante obtenido se determinaron las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-2 mediante kits de ELISA específicos (ELISA Mouse Platinum, eBioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se normalizaron por gramos de tejido.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en el estudio de la expresión *in vivo*.

Gen	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (bp)	Eficacia	Referencia
<i>Muc2</i>	NM_023566.3	F: GCTGACGAGTGGTTGGTGAAT R: GATGAGGTGGCAGACAGGAGA	135	1.98 ± 0.09	Michael <i>et al.</i> (2015)
<i>Mip2</i>	NM_009140-2	F: CCAACCACCAGGCTACAGG R: GCGTCACACTCAAGCTCTG	108	2.12 ± 0.04	Yan <i>et al.</i> (2016)
<i>Il-1β</i>	NM_008361.4	F: CCAAGCAACGACAAAATACC R: GTTGAAGACAAACCGTTTTTCC	156	1.95 ± 0.06	Sun <i>et al.</i> (2012a)
<i>Il-2</i>	NM_008366.3	F: AGCAGCACCTGGAGCAGCTG R: GTCCACCACAGTTGGTGACT	320	1.85 ± 0.07	Olguín <i>et al.</i> (2018)
<i>Il-6</i>	NM_031168.1	F: CTGCAAGAGACTTCCATCCAG R: AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG	131	1.75 ± 0.06	Li <i>et al.</i> (2016b)
<i>Tnfa</i>	NM_013693.2	F: CAGGCGGTGCCTATGTCTC R: CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG	89	1.82 ± 0.05	Liu <i>et al.</i> (2017)
<i>Cldn-1</i>	NM_016674.4	F: AGGTCTGGCGACATTAGTGG R: CGTGGTGTGGGTAAGAGGT	204	2.05 ± 0.03	Acharya <i>et al.</i> (2004)
<i>Cldn-2</i>	NM_016675.4	F: TATGTTGGTGCCAGCATTGT R: TCATGCCACCACAGAGATA	205	1.98 ± 0.05	Liu <i>et al.</i> (2016)

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en el estudio de la expresión diferencial *in vivo* (continuación).

Gen	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicon (bp)	Eficacia	Referencia
<i>CLDN-4</i>	NM_009903.2	F: CGCTACTCTTGCCATTACG R: ACTCAGCACACCATGACTTG	71	1.89 ± 0.10	Bergmann <i>et al.</i> (2013)
<i>ZO-1</i>	NM_009386.2	F: GCTAAGAGCACAGCAATGGA R: GCATGTTCAACGTTATCCAT	245	2.11 ± 0.08	Katsuno <i>et al.</i> (2008)
<i>RN18S</i>	NM:023566.3	F: CGGACAGGATTGACAGATTG R: CAAATCGCTCCACCAACTAA	98	2.03 ± 0.00	Cieslik <i>et al.</i> (2015)

6.3.4. Determinación de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos (i-FABP)

La sangre obtenida tras el sacrificio se recolectó en tubos Vacutest[®] con barrera de gel inerte y activador de la coagulación (KIMA). El suero se separó por centrifugación (3000 rpm, 10 min, temperatura ambiente) y se diluyó 1:1 en PBS. La concentración sérica de i-FABP se determinó mediante el kit de ELISA Fatty Acid Binding Protein 2 (FABP2) (Cloud-Clone Corp.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.4. Estudio histopatológico del intestino

Este estudio se realizó en colaboración con la Dra. Kühl (Charité-Universitätsmedizin, Berlin). Una fracción del intestino delgado y grueso (≈ 1 cm) se fijó con PAF 4% durante 12-24 h y posteriormente se embebió en parafina. Se cortaron y desecaron secciones de parafina (1-2 μm), que se tiñeron con hematoxilina/eosina (Merck). Para la detección de células caliciformes, se realizó una tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) (Sigma) de acuerdo con los métodos estándar. Las imágenes se obtuvieron empleando un microscopio AxioImager Z1 (Carl Zeiss MicroImaging). La evaluación de las muestras se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Erben *et al.* (2014).

6.5. Evaluación de la permeabilidad intestinal

La permeabilidad intestinal se evaluó mediante la determinación de la concentración de albúmina en heces. Para la extracción de las proteínas, las heces (≈ 50 mg) se homogeneizaron en 0.5 mL de tampón RIPA modificado. La homogenización se realizó empleando un *bead beater* (FastPrep-24TM 5G Instrument, MP Biomedical) con bolas de vidrio (0.1 mm diámetro) con tres

ciclos de 60 s y velocidad de 6 m/s, durante los cuales las muestras se mantuvieron en hielo. El homogenizado se centrifugó (1000 rpm, 5 min, 4 °C) y la concentración de albúmina fecal se determinó en el sobrenadante mediante el kit de Mouse albumin ELISA (CUSABIO), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se normalizaron por mg de heces.

7. Efecto *in vitro* de bacterias lácticas y suplementos dietéticos sobre la toxicidad intestinal del arsénico inorgánico

En este estudio se llevó a cabo una búsqueda de bacterias lácticas de uso alimentario y suplementos dietéticos capaces de reducir los efectos tóxicos *in vitro* del As-i sobre el epitelio intestinal. Se empleó la línea celular Caco-2 y diferentes cepas de bacterias lácticas o sus correspondientes medios condicionados, así como diferentes suplementos dietéticos comerciales.

7.1. Bacterias lácticas y obtención de medios condicionados

Las cepas de bacterias lácticas empleadas se describen en la tabla 9. Las bacterias se crecieron en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (BD Difco) a 30 °C o 37 °C, dependiendo de la temperatura de crecimiento óptimo de la cepa, en condiciones estáticas. Las cepas se recogieron por centrifugación (3500 rpm, 10 min) y se resuspendieron en DMEM suplementado con HEPES 10 mM (DMEM-HEPES) a la densidad óptica (DO) necesaria para cada ensayo.

Tabla 9. Cepas de bacterias lácticas ensayadas (proporcionadas por el laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, IATA-CSIC).

Designación	Nombre	Cepa
BL17	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC ^a 4356
BL23	<i>Lactobacillus casei</i>	BL23 ^b
BL36	<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC ^a 4356

^a American Type Strain Culture Collection; ^bMazé *et al.* (2010).

Para la obtención del medio condicionado, las cepas de bacterias lácticas se incubaron a 30 °C o 37° C, durante 24 h a una DO inicial de 0.3 en DMEM-HEPES. Posteriormente las cepas se centrifugaron (4000 rpm, 10 min), el medio condicionado obtenido se esterilizó a través de filtros de 0.2 µm y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Para los ensayos de exposición aguda (apartado 7.3, tratamientos a-e), se empleó el medio condicionado sin adición de SFB mientras que en el ensayo de exposición subcrónica (apartado 7.3, tratamientos f-i), se adicionó SFB a una concentración final de 7.5%.

7.2. Preparación de los suplementos dietéticos o extractos vegetales

Se evaluaron un total de 10 suplementos dietarios o extractos vegetales comerciales (tabla 10). Los extractos se prepararon mezclando 50 mg de los suplementos con 5 mL de H₂O. Las disoluciones se sonicaron (20 min, 4 °C) y se centrifugaron (4000 rpm, 5 min, 4 °C). Para el tratamiento celular, los extractos acuosos se diluyeron hasta la concentración deseada en MEMc o DMEM-7.5%SFB, según el tipo de exposición. Los extractos se prepararon inmediatamente antes de su uso.

Tabla 10. Suplementos dietéticos utilizados.

Suplemento	Marca comercial
Extracto de brécol	Soria Natural
Cápsulas de ajo	Soria Natural
Extracto de semilla de uva	The Nature Network
Extracto de alcachofa	Sakai Laboratorios
Capsulas de glutatión, cisteína y vitamina C	Life Extension
Extracto de cacao 45%	Naturex
Extracto de té	Naturex
Cápsulas de ácido lipoico alfa	Life Extension
Extracto de zanahoria negra	Roha

7.3. Tratamientos realizados

Se plantearon dos tipos de exposición: 1) una exposición aguda (24 h) para evaluar el efecto de las bacterias lácticas, sus medios condicionados y de los suplementos dietéticos sobre la respuesta pro-oxidante y pro-inflamatoria y la redistribución de ZO-1 causada por el As-i; 2) una exposición subcrónica (7 días) para evaluar el efecto del medio condicionado de las bacterias lácticas y de los suplementos dietéticos sobre las alteraciones de la permeabilidad paracelular y de la regeneración celular causadas por la exposición a As-i. En todos los estudios se emplearon células Caco-2 crecidas en diferentes soportes y densidades en función del parámetro a analizar.

En las exposiciones agudas (24 h) se realizaron los siguientes tratamientos:

- Tratamientos con medio: DMEM-HEPES (bacterias lácticas) o MEMc (suplementos) sin As-i ni estrategias (control negativo).
- Tratamientos con As-i: As(III) (1 y 3 mg/L) o As(V) (8 mg/L) preparados en DMEM-HEPES o MEMc (control positivo).

- c. Tratamiento con medio condicionado y As-i: co-incubación con As(III) (1 y 3 mg/L) o As(V) (8 mg/L) y medio condicionado de las bacterias lácticas.
- d. Tratamiento con cepas de bacterias lácticas y As-i: pre-incubación con las bacterias lácticas (0.3 OD/mL) durante 6 h, eliminación del microorganismo, lavado de la monocapa con PBS y exposición a As(III) (1 y 3 mg/L) o As(V) (8 mg/L).
- e. Tratamiento con suplementos dietéticos y As-i: pre-incubación con los suplementos (100 mg/L) durante 2 h y posterior co-exposición con As(III) (1 y 3 mg/L) o As(V) (8 mg/L).

Para las exposiciones subcrónicas (7 días), las células Caco-2 se expusieron desde el inicio de la siembra a los siguientes tratamientos:

- f. Tratamiento con medio: DMEM-7.5%SFB (control negativo).
- g. Tratamientos con As: As(III) (0.1 mg/L) preparado en DMEM-7.5%SFB (control positivo).
- h. Tratamiento con medio condicionado y As: co-incubación con As(III) (0.1 mg/L) y medio condicionado de las bacterias lácticas.
- i. Tratamiento con suplementos dietéticos y As: co-incubación con los suplementos (10 mg/L) y As(III) (0.1 mg/L) preparados en DMEM-7.5%SFB.

7.4. Parámetros evaluados

7.4.1. Generación de ROS y/o RNS y respuesta pro-inflamatoria

Las células se sembraron a una densidad de 3×10^4 células/ cm² en placas de 12 pocillos en DMEMc. Tras 7 días de siembra, se sometieron a los tratamientos descritos anteriormente (a-e). Las células se recuperaron para la evaluación de la

generación de ROS y/o RNS, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2. Los medios se emplearon para el análisis de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 mediante el kit ELISA Human IL-8/CXCL8, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se normalizaron por contenido de proteínas, determinado de acuerdo con el método de Bradford.

7.4.2. Inmunolocalización de ZO-1

Las células se sembraron a una densidad de 4×10^4 células/cm² sobre cubreobjetos colocados dentro de placas de 24 pocillos en DMEMc. Tras 7 días de siembra, las células se expusieron a los tratamientos descritos (a-e) y la inmunolocalización de ZO-1 se determinó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.5.

7.4.3. Evaluación de la permeabilidad de las monocapas celulares

Las células se sembraron a una densidad de 4×10^5 células/cm² sobre una placa de seis pocillos con insertos Transwell[®] (diámetro 24 mm, poro 0.4 μm) en DMEM-7.5%FBS y desde el inicio de la siembra, las células se sometieron a los tratamientos descritos previamente (f-i). Tras 7 días de siembra, se evaluó el transporte de LY al lado basolateral durante 24 h, tras adicionar el marcador al lado apical a una concentración de 100 μM. La concentración de LY se determinó siguiendo el protocolo descrito en el 3.6.

7.4.4. Evaluación de la regeneración celular

Las células se sembraron en placas de seis pocillos a una densidad de 2.6×10^4 células/cm² en DMEM-7.5%FBS y desde el inicio de la siembra se

expusieron a los tratamientos descritos previamente (f-i). Tras la exposición, las células se recuperaron con tripsina/EDTA y se sembraron a una densidad de 8.5×10^4 células/cm² sobre una placa *culture-insert 2 well 24*, para la realización del ensayo de cierre de herida de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 4.6.

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

8.1. Extracción del ARN total

Para la obtención del ARN se utilizaron aproximadamente 1×10^6 células o 10 mg de tejido homogeneizado. La extracción se realizó empleando un kit comercial (NucleoSpin RNA II kit, Macherey-Nagel) y se siguió el protocolo indicado por el fabricante.

El ARN se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se comprobó la calidad del mismo por la relación 260/280 nm (Nanodrop ND-1000, NanoDrop Technologies). Adicionalmente, la calidad del ARN se verificó visualmente tras una electroforesis en gel de agarosa D1 bajo EEO (1% m/v, Pronadisa), comprobándose la presencia de las bandas de ARN ribosómico (18S y 28S).

8.2. Condiciones de la RT

Para realizar la RT en las muestras de cultivos celulares se utilizó un kit comercial Reverse Transcriptase Core (Eurogentec Headquarters), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para un volumen final de reacción de 10 µL se llevó a cabo la mezcla de reactivos que aparece en la tabla 11. Esta mezcla se sometió a una etapa inicial de calentamiento (25 °C, 10 min), la RT se llevó a

cabo a 48 °C durante 30 min, y la inactivación del enzima se realizó por calentamiento (95 °C, 5 min).

Tabla 11. Reactivos empleados en la retrotranscripción.

Componente	Volumen (µL)	Concentración final
10× tampón de reacción	1	1×
25 mM MgCl ₂	2	5 mM
2.5 mM dNTP	2	500 µM cada dNTP
Oligo dT	0.5	2.5 µM
Inhibidor RNasas	0.2	0.4 U/µL
Retrotranscriptasa (EuroScript RT)	0.25	1.25 U/µL
Agua libre de ARNasas	3.05	—
Muestra (100 ng/µL)	1	100 ng ARN total

Para las muestras de tejido animal, la RT se llevó a cabo utilizando el kit SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para un volumen final de reacción de 10 µL se empleó 1 µg de ARN, 2.5 µL de Vilo Reaction Mix (5×) y 1 µL de Superscript Enzyme (10×). La mezcla de reacción se sometió a una etapa inicial de calentamiento (25 °C, 10 min), la RT se llevó a cabo a 42 °C durante 60 min, y la inactivación del enzima se realizó por calentamiento (85 °C, 5 min).

8.3. Condiciones de la qPCR

A partir del ADNc obtenido en el apartado anterior, se amplificaron los genes de interés mediante qPCR, empleando el equipo LightCycler® 480 Real-Time qPCR

System (Roche Diagnostics). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 μ L, empleando los siguientes volúmenes:

- 5 μ L de LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Mix (2 \times , Roche).
- 2.5 μ L de ADNc (20 ng/mL).
- 0.5 μ L de cada oligonucleótido (10 μ M) (Biolegio).
- 1.5 μ L de agua libre de ARNasa.

La reacción qPCR se llevó a cabo con una etapa inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos consistentes en una etapa de desnaturalización (95 °C, 10 s), una de alineamiento (55 °C, 10 s) y una de elongación (72 °C, 20 s). En cada ensayo se evaluaron controles sin ADNc para verificar la ausencia de ADN genómico. Las curvas de disociación se analizaron tras cada ensayo para confirmar la especificidad del producto obtenido en la reacción. Todos los ensayos se realizaron por triplicado al menos en dos ensayos independientes. Las curvas de eficiencia para cada gen se calcularon empleando 5 diluciones seriadas sobre una mezcla de muestras no tratadas, ensayando 3 réplicas en 2 ensayos independientes. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software REST 2009.

9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó aplicando la prueba t-student o el análisis de la varianza con un solo factor (ANOVA) con comparaciones múltiples post hoc mediante la prueba de Tukey o Fisher HSD (SigmaPlot versión 13.5, XLSTAT). Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$.

La determinación del tamaño muestral necesario para los ensayos de toxicidad *in vivo* (capítulo 5) se llevó a cabo empleando el programa GPower 3.1, con un $\alpha = 0.05$ y una potencia (1- β) de 0.8.

Capítulo 1

Evaluación *in vitro* de los efectos de una exposición aguda a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal

Los antecedentes bibliográficos han mostrado que el As(III) genera estrés oxidativo y una respuesta pro-inflamatoria en Caco-2, línea de células epiteliales de intestino procedente de un adenocarcinoma de colon (apartado 5.1, introducción). Sin embargo, no existen estudios que evidencien el efecto en células no transformadas de epitelio colónico y también se desconoce el efecto de la forma inorgánica mayoritaria en alimentos, el As(V). Adicionalmente, es necesario determinar si este efecto pro-inflamatorio y pro-oxidante afecta a la estructura y función del epitelio intestinal. El objetivo de este capítulo es determinar la toxicidad de las formas inorgánicas de As [As(III) y As(V)] sobre las células epiteliales del intestino en exposiciones a corto plazo. Para tal fin se han empleado dos modelos celulares de epitelio intestinal: células epiteliales no transformadas de colon humano (NCM460) y células epiteliales procedentes de un adenocarcinoma colorrectal humano (Caco-2).

RESULTADOS

1. Búsqueda de las condiciones óptimas para los ensayos de exposición aguda

Se realizaron estudios preliminares para evaluar el efecto del As-i sobre la viabilidad de los dos tipos celulares empleados, con el fin de trabajar en condiciones subletales. Los resultados de los ensayos de viabilidad celular realizados para exposiciones a As(III) y As(V), basados en la capacidad de las células viables de reducir la resazurina sódica a resorufina, se muestran en las figuras 6 y 7, respectivamente. Se consideraron condiciones subletales aquellas en las que se observaron reducciones de la viabilidad $\leq 20\%$ y en las que no se apreciaron desestructuraciones de la monocapa celular. De todas las concentraciones ensayadas, sólo la exposición a As(III) 5 mg/L (figura 6) genera una reducción superior al 20% de la viabilidad en las células NCM460. Teniendo

en cuenta estos resultados, las concentraciones elegidas para el estudio fueron: As(III) 1 y 3 mg/L; As(V) 5 y 8 mg/L.

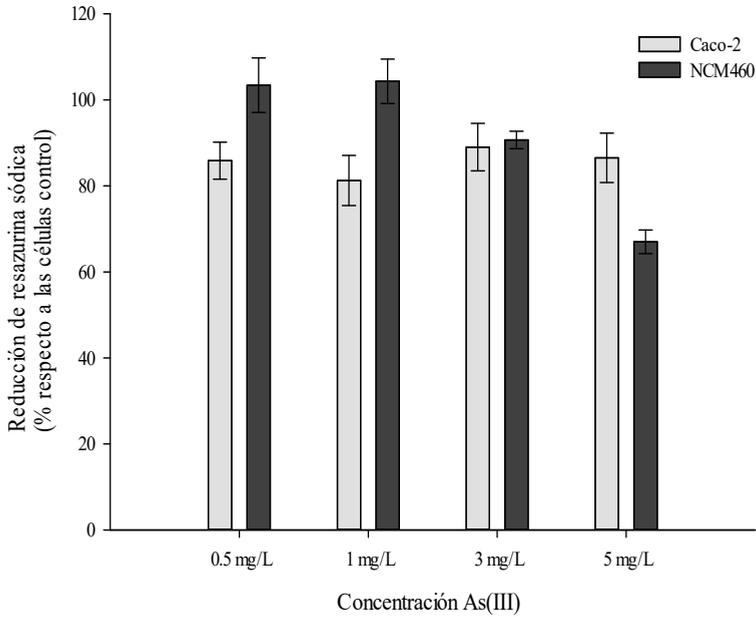


Figura 6. Viabilidad celular de células intestinales expuestas a As(III). Porcentaje de reducción de resazurina sódica a resofurina por células Caco-2 y NCM460 expuestas a As(III) (0.5 a 5 mg/L) durante 24 h con respecto a células control. Valores expresados como media \pm SD (n=3).

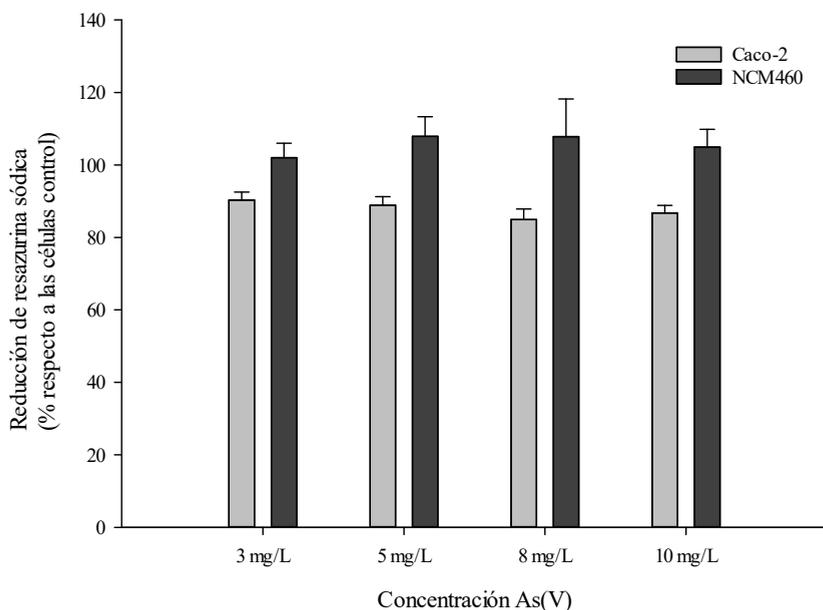


Figura 7. Viabilidad celular de células intestinales expuestas a As(V). Porcentaje de reducción de resazurina sódica a resofurina por células Caco-2 y NCM460 expuestas a As(V) (3 a 10 mg/L) durante 24 h con respecto a células control. Valores expresados como media \pm SD (n=3).

2. Evaluación del estrés oxidativo y de la respuesta pro-inflamatoria

La liberación de citoquinas pro-inflamatorias y la generación de ROS/RNS permiten mantener la homeostasis celular. Sin embargo, cuando esta producción supera los niveles normales, se genera una situación pro-oxidante y pro-inflamatoria que, de extenderse en el tiempo, puede llevar al desarrollo de desórdenes o patologías.

Las figuras 8 y 9 representan la formación de la DCF, indicador de la generación de ROS/RNS, por células Caco-2 y NCM460, respectivamente, tratadas con As(III) y As(V).

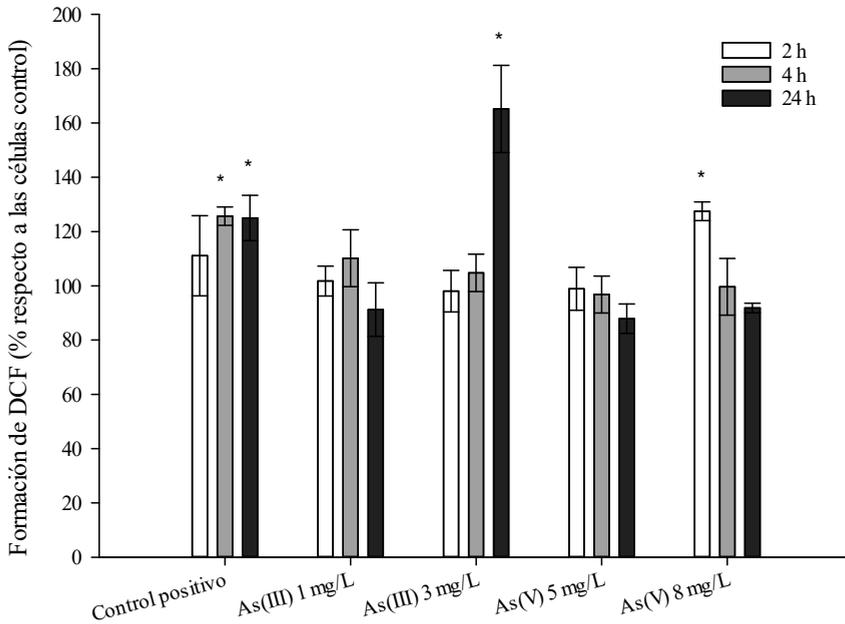


Figura 8. Generación de ROS y/o RNS por células Caco-2 expuestas a As-i. Porcentaje de formación de DCF en células expuestas a As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) (5 y 8 mg/L) durante 2, 4 y 24 h con respecto a células control. Como control positivo se ha empleado hidroperóxido de terbutilo 100 μ M. Valores expresados como media \pm SD (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

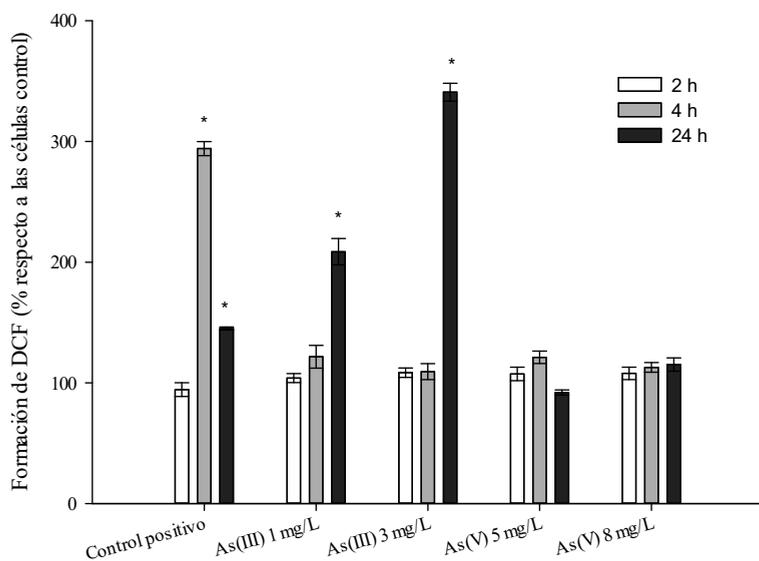


Figura 9. Generación de ROS y/o RNS por células NCM460 expuestas a As-i. Porcentaje de formación de DCF en células expuestas a As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) (5 y 8 mg/L) durante 2, 4 y 24 h con respecto a células control. Como control positivo se ha empleado hidroperóxido de terbutilo 100 μ M. Valores expresados como media \pm SD (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

En general, en las células intestinales no existe una elevada respuesta pro-oxidante tras los tratamientos con As-i, si bien tampoco son destacables las producidas por el hidroperóxido de terbutilo, empleado como control positivo por su conocido carácter pro-oxidante. En las células Caco-2, el aumento de la formación de DCF sólo se produce tras 4 h de tratamiento con As(V) 8 mg/L (27%) y tras 24 h de exposición a As(III) 3 mg/L (65%). Las células NCM460 presentan un aumento en la formación de DCF 24 h después del tratamiento con As(III) a ambas concentraciones (108–240%). Sin embargo, la exposición a As(V) no aumenta la formación de DCF en ninguna de las condiciones.

En relación a la respuesta pro-inflamatoria, los niveles de las citoquinas IL-2, IL-6 y TNF α no se modifican substancialmente tras la exposición a As-i (datos no mostrados), sin embargo, se observan cambios en los niveles de IL-8. Las figuras 10 y 11 muestran la liberación de IL-8 al medio de las células Caco-2 y NCM460 respectivamente, tras el tratamiento con As(III) y As(V). En las células Caco-2, todos los tratamientos con As(III) aumentan la liberación de IL-8 (115-1135%), con excepción de As(III) 1 mg/L tras 4 h de exposición. Los tratamientos con As(V) aumentan la liberación de IL-8 tras 8 y 24 h (28-303%), aunque la respuesta pro-inflamatoria es más baja que la desencadenada por el As(III). Para las células NCM460, los tratamientos con As(III) producen un aumento en la liberación de IL-8 tras 8 y 24 h de exposición (57-353%); sin embargo, el As(V) no genera una respuesta pro-inflamatoria. A la vista de los resultados, se concluye que la exposición a As-i, especialmente a As(III), genera una respuesta pro-inflamatoria en células humanas de origen colónico, siendo más notable la producida en células Caco-2.

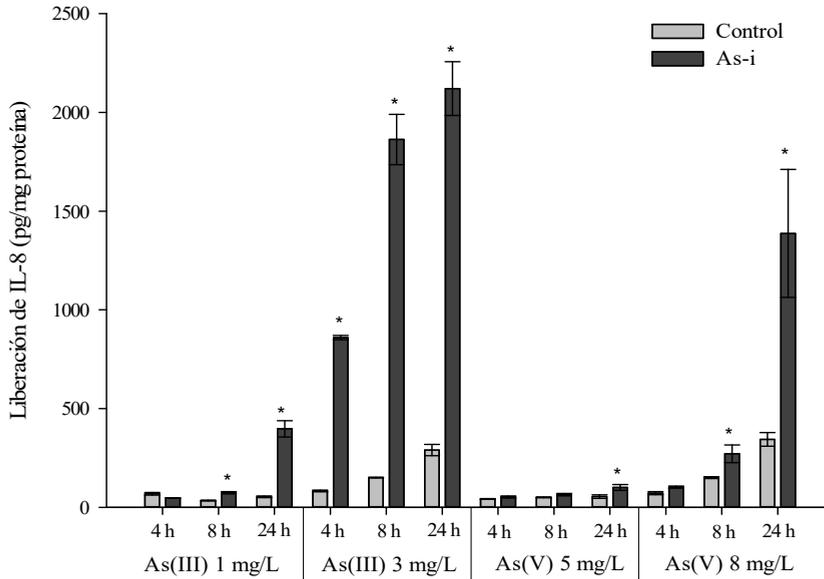


Figura 10. Respuesta pro-inflamatoria en células Caco-2 expuestas a As-i. Liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 al medio de cultivo en células control y células expuestas a As(III) (1 y 3 mg/L) o As(V) (5 y 8 mg/L). Valores expresados como pg/mg proteínas (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

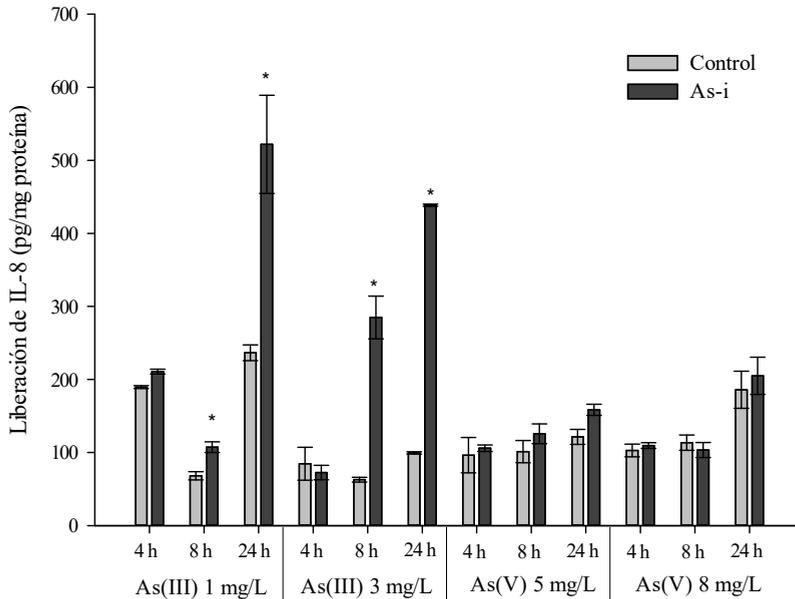


Figura 11. Respuesta pro-inflamatoria en células NCM460 expuestas a As-i. Liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 al medio de cultivo en células control y células expuestas a As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) (5 y 8 mg/L). Valores expresados como pg/mg proteínas (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

3. Efecto sobre la expresión de proteínas de estrés

La mayoría de las proteínas de estrés se expresan a niveles basales en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, su expresión aumenta cuando las células se someten a determinadas condiciones de estrés. En estas situaciones, las proteínas de estrés juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular (Tyedmers *et al.*, 2010). Las proteínas de choque térmico (HSPs) actúan como chaperonas moleculares, proporcionando un mecanismo para prevenir el daño celular causado por proteínas mal plegadas que resultan en la formación de cuerpos de inclusión tóxicos o agresomas. Las metalotioneínas (MT) tienen entre

sus funciones putativas la detoxificación de metales a través de su capacidad para eliminar ROS (Kumari *et al.*, 1998), su alta afinidad por iones metálicos libres y su papel en el intercambio de metales (Rigby Duncan *et al.*, 2008).

Las tablas 12 y 13 muestran la expresión diferencial de *MT2A* y *HSP70* en células Caco-2 y NCM460 expuestas a As-i con respecto a células control. Se observa un incremento de la expresión de *MT2A* en ambas líneas celulares con todos los tratamientos ensayados (incrementos: Caco-2, 11-8580 veces; NCM460, 4-8640 veces). Para Caco-2, el aumento de la expresión producida por ambas formas de As es similar, observándose una mayor inducción a las 8 h. En las células NCM460, el As(III) produce un aumento más elevado de la expresión, especialmente tras 24 h de exposición.

La proteína de choque térmico *HSP70* también está regulada al alza en las células Caco-2 (4-2610 veces). Los tratamientos a las 8 h son los que generan una mayor inducción de esta proteína de estrés. En las células NCM460, el aumento es menor y no se produce en todos los tratamientos [As(III): 3-83 veces; As(V): 2.7 veces].

El hecho de que estas proteínas se incrementan en situaciones de estrés oxidativo es bien conocido. También se han reportado evidencias de su asociación con los procesos inflamatorios (Van Eden *et al.*, 2005; Waeytens *et al.*, 2009). Por tanto, la generación de ROS/RNS y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias descritas previamente pueden ser las responsables de la inducción de estas proteínas, cuyo papel fundamental, tal y como se ha comentado previamente, es el de protección frente a situaciones de estrés.

Tabla 12. Efecto del As-i sobre la expresión de proteínas de estrés en células Caco-2. Expresión relativa de *HSP70* y *MT2A* en células tratadas con (12a) As(III) (1 y 3 mg/L) y (12b) As(V) (5 y 8 mg/L) durante 4, 8 y 24 h. Valores expresados como cambios en el nivel de expresión respecto al control (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican aumentos estadísticamente significativos con respecto al control ($p < 0.05$).

12a	As(III) 1 mg/L			As(III) 3 mg/L		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
<i>HSP70</i>	221 \pm 16*	486 \pm 52*	7.1 \pm 1.2*	478 \pm 94*	2610 \pm 450*	100 \pm 19*
<i>MT2A</i>	841 \pm 95*	4930 \pm 380*	2910 \pm 5*	2500 \pm 300*	8360 \pm 960*	995 \pm 203*

12b	As(V) 5 mg/L			As(V) 8 mg/L		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
<i>HSP70</i>	4.3 \pm 3.2	100 \pm 18*	4.2 \pm 0.3*	204 \pm 37*	422 \pm 64*	5.8 \pm 2.4*
<i>MT2A</i>	11 \pm 6*	149 \pm 28*	637 \pm 69*	1840 \pm 250*	8580 \pm 890*	3730 \pm 820*

Tabla 13. Efecto del As-i sobre la expresión de proteínas de estrés en células NCM460. Expresión relativa de *HSP70* y *MT2A* en células tratadas con (13a) As(III) (1 y 3 mg/L) y (13b) As(V) (5 y 8 mg/L) por 4, 8 y 24 h. Valores expresados como cambios en el nivel de expresión respecto al control (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican aumentos estadísticamente significativos con respecto al control ($p < 0.05$).

13a	As(III) 1 mg/L			As(III) 3 mg/L		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
	<i>HSP70</i>	4.0 \pm 2.2*	3.1 \pm 1.0*	1.2 \pm 0.6	83 \pm 28*	13 \pm 4*
<i>MT2A</i>	460 \pm 179*	207 \pm 60*	1700 \pm 805*	1870 \pm 239*	733 \pm 178*	8640 \pm 2500*

13b	As(V) 5 mg/L			As(V) 8 mg/L		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
	<i>HSP70</i>	0.8 \pm 0.1	1.3 \pm 0.4	0.9 \pm 0.2	2.7 \pm 0.4*	1.2 \pm 0.7
<i>MT2A</i>	3.7 \pm 0.6*	5.6 \pm 1.2*	3.5 \pm 0.5*	6.6 \pm 0.8*	10 \pm 4*	13 \pm 5*

4. Efecto sobre las proteínas de las uniones intercelulares y la permeabilidad

La permeabilidad del epitelio intestinal depende principalmente de las uniones intercelulares, formadas por un conjunto de proteínas cuya distribución es clave para mantener la estructura y funcionalidad del epitelio (Suzuki, 2013). En este estudio se observa una modificación en la expresión y en la localización de algunas proteínas de las uniones celulares como resultado de la exposición a As-i.

En las monocapas formadas por Caco-2 se observa una regulación a la baja de *CLDN-1* en todos los tratamientos con As, excepto As(V) 5 mg/L (tabla 14). En células NCM460, sin embargo, no se producen modificaciones en la expresión (datos no mostrados). Adicionalmente, se evidencia una redistribución de ZO-1 en ambas líneas celulares. La morfología de las monocapas generadas por estos dos tipos celulares es distinta (figura 12). Las células Caco-2 forman una monocapa bien definida, con una distribución de la proteína ZO-1 que le confiere un aspecto de empedrado (figura 12A). Por el contrario, las células NCM460 presentan una estructura más laxa, con las uniones intercelulares menos definidas, mostrando un crecimiento en multicapa en algunas secciones (figura 12E). Estas diferencias morfológicas hacen que el efecto de las formas inorgánicas de As sobre la morfología sea más evidente en la línea celular Caco-2 (figuras 12 A-D). En general, los tratamientos alteran la distribución de la proteína ZO-1, observándose una mayor intensidad de fluorescencia en el citoplasma de las células tratadas. Adicionalmente, la monocapa celular pierde su morfología de empedrado, hecho especialmente visible en las células Caco-2.

Tabla 14. Efecto del As-i sobre la expresión de las proteínas de las uniones intercelulares. Expresión relativa de *OCLN* y *CLDN-1* en células Caco-2 tratadas con (14a) As(III) (1 y 3 mg/L) y (14b) As(V) (5 y 8 mg/L) durante 4, 8 y 24 h. Valores expresados como cambios en el nivel de expresión respecto al control (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican disminuciones estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

14a	As(III) 1 mg/L			As(III) 3 mg/L		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
<i>OCLN</i>	1.4 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.9 \pm 0.3	3.2 \pm 0.4	0.6 \pm 0.1*
<i>CLDN-1</i>	0.9 \pm 0.1*	0.3 \pm 0.1*	0.7 \pm 0.1*	0.8 \pm 0.1*	1.0 \pm 0.1	0.2 \pm 0.03*

14b	As(V) 5 mg/L			As(V) 8 mg/L		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
<i>OCLN</i>	1.5 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2
<i>CLDN-1</i>	1.3 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1*	0.6 \pm 0.1*	0.9 \pm 0.2

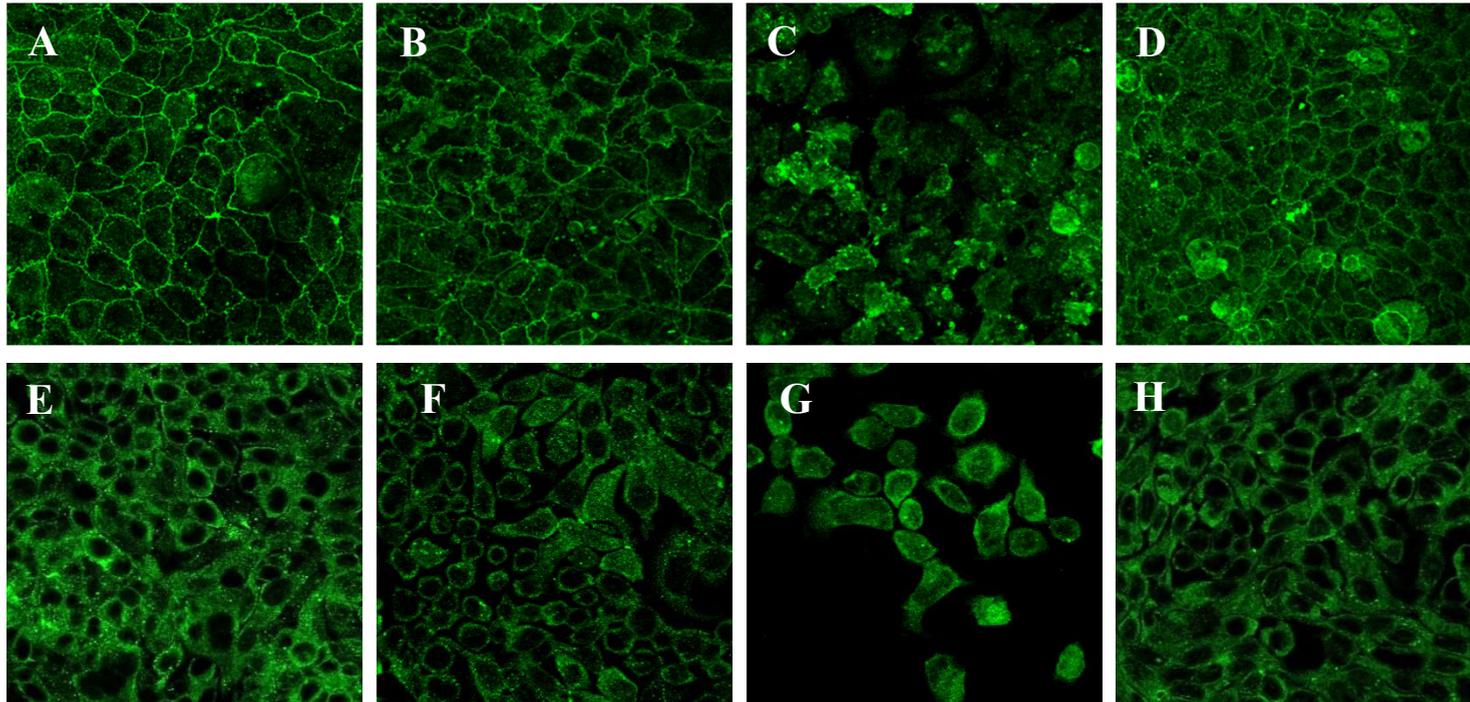


Figura 12. Efecto del As-i sobre la distribución de ZO-1. Inmunodetección de ZO-1 en monocapas de células Caco-2 (A-D) y NCM460 (E-H). A y E representan células control; B y F, células tratadas con As(III) (1 mg/L) 24 h; C y G, células tratadas con As(III) (3 mg/L) 24 h; D y H, células tratadas con As(V) (8 mg/L) 24 h. Amplificación 40 ×.

Con respecto a la permeabilidad, el comportamiento de los dos tipos celulares es distinto, tal y como era de esperar atendiendo a las diferencias morfológicas descritas previamente. Las células Caco-2 control presentan una RET que varía entre 700-1300 Ohms \times cm²; sin embargo, las NCM460 presentan una RET similar a la resistencia medida en un inserto sin células (\approx 460 Ohms \times cm²). Esto se refleja en el transporte de los marcadores fluorescentes (LY y dextranos de diferentes pesos moleculares), empleados para la evaluación de la permeabilidad paracelular debido a que su principal vía de paso es el transporte a través del espacio entre células (espacio paracelular). La media del coeficiente de permeabilidad aparente del LY en células Caco-2 control es de 2×10^{-7} cm/s. El coeficiente de permeabilidad en NCM460 es mucho mayor, incluso para el dextrano de mayor peso molecular (1.4×10^{-6} cm/s). Teniendo en cuenta los valores de los parámetros que permiten evaluar la permeabilidad, sólo se ha ensayado el efecto del tratamiento con As-i sobre las monocapas formadas por Caco-2.

La figura 13 representa el transporte de LY en células Caco-2 control y células tratadas con As-i. El tratamiento con As(V) no modifica el transporte de LY respecto a las células control en ninguna de las condiciones. Las células tratadas con As(III) muestran un mayor transporte tras 24 h de exposición, siendo el tratamiento a la concentración más elevada (3 mg/L) el que genera el mayor aumento de la permeabilidad (14 veces). El aumento del transporte de LY por As(III) indica que esta forma arsenical produce una apertura de las uniones intercelulares en células intestinales y por tanto una pérdida de la función barrera.

De los resultados obtenidos en este apartado se concluye que el As-i, especialmente el As(III), produce una redistribución y una reducción de la expresión de algunas de las proteínas de las uniones intercelulares y un aumento de la permeabilidad en células Caco-2. Este incremento de la permeabilidad no se ha evidenciado en NCM460 debido a las características de las monocapas que

forma este tipo celular; sin embargo, en estas células si se pone de manifiesto un cambio en la morfología de la monocapa.

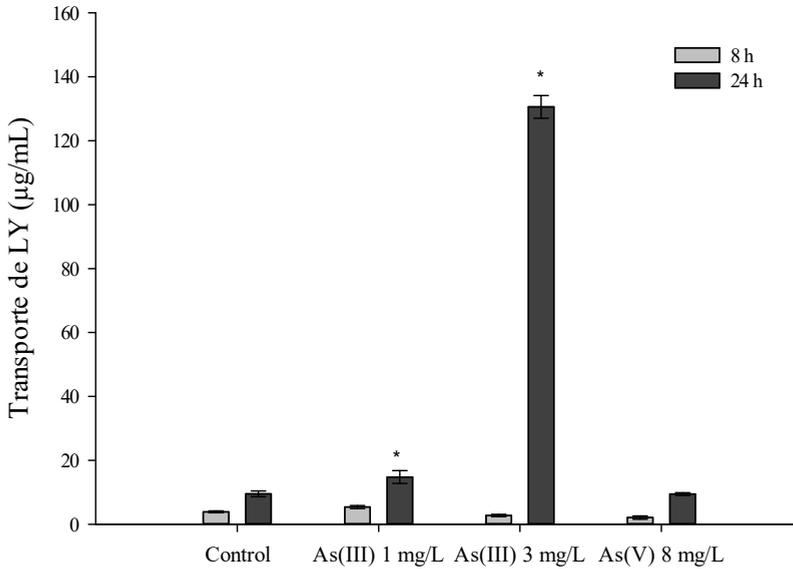


Figura 13. Efecto del As-i sobre la permeabilidad de células Caco-2. Transporte de LY a través de células control y células tratadas con As(III) (1 mg/L y 3 mg/L) y As(V) (8 mg/L) durante 8 y 24 h. Valores expresados como µg LY/mL (media ± SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

DISCUSIÓN

Las condiciones redox son determinantes en la homeostasis celular. Cantidades moderadas de ROS/RNS tienen efectos beneficiosos en varios procesos fisiológicos. Se ha evidenciado que estas especies reactivas conducen la respuesta celular en los procesos de reparación tisular y regeneración (Serras, 2016), participan en numerosas rutas de señalización, especialmente en aquellas que involucran quinasas MAPK (Genestra, 2007), y ayudan al sistema inmune en la defensa frente a patógenos (Hegner *et al.*, 2000). Adicionalmente, muchas de las respuestas mediadas por ROS/RNS protegen las células contra el propio estrés oxidativo y restablecen la homeostasis redox (Dröge, 2002). Sin embargo, la generación desproporcionada de ROS/RNS, dificulta el mantenimiento de la homeostasis, ya que supera la respuesta antioxidante celular y termina causando daño oxidativo celular y tisular, que puede favorecer el desarrollo de patologías (Dröge, 2002).

La patogénesis y la evolución de varias enfermedades inflamatorias gastrointestinales como cáncer colorrectal y enfermedades inflamatorias crónicas (IBD: enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa) están asociadas con el estrés oxidativo (Inokuma *et al.*, 2009; Bhattacharyya *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2017). Estudios recientes han demostrado que las ROS producidas por las mitocondrias actúan como moléculas transductoras de señales que provocan un aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias a través de distintas vías (Naik y Dixit, 2011). Al igual que las especies reactivas, las citoquinas consideradas pro-inflamatorias pueden jugar un papel protector o patológico dependiendo del estado inmunológico del individuo y el tipo o fase del proceso inflamatorio. Este hecho implica que pueden favorecer la homeostasis y el mantenimiento de la barrera intestinal o la generación de inflamaciones intestinales crónicas (Bamias *et al.*, 2012).

Estudios en animales de experimentación muestran que las citoquinas pro-inflamatorias producen el desensamble de las uniones intercelulares, responsables del mantenimiento de la estructura y polarización del epitelio intestinal y aumentan la permeabilidad paracelular (Capaldo y Nusrat, 2009). El aumento de permeabilidad se asocia a numerosos desórdenes intestinales, especialmente con el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Groschwitz y Hogan, 2009). De hecho, en modelos animales de IBD, el aumento de la permeabilidad paracelular epitelial precede a la inflamación crónica de la mucosa intestinal (Pastorelli *et al.*, 2013). Una permeabilidad intestinal desregulada e inespecífica permite que sustancias o microorganismos nocivos puedan entrar en contacto con el sistema inmune presente en la lámina propia (Pastorelli *et al.*, 2013). Este contacto puede inducir una respuesta inmune exacerbada y la aparición de procesos crónicos. Toda esta cascada de eventos, que generan procesos inflamatorios del intestino, se han evidenciado en exposiciones a agentes externos tales como el alcohol (Keshavarzian *et al.*, 2009); sin embargo, no se han puesto de manifiesto en presencia de elementos traza tóxicos.

A nivel intestinal, los estudios sobre los efectos tóxicos del As son escasos. *In vitro* se ha evidenciado que las exposiciones agudas a las formas trivalentes de As [As(III), MMA(III) y DMA(III)] generan estrés oxidativo (aumento de ROS y/o RNS) y un aumento de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α e IL-8) en células Caco-2 (Calatayud *et al.*, 2013, 2014). En el presente estudio se ha visto que el As(III) también puede generar una situación de estrés y una respuesta pro-inflamatoria en células epiteliales normales del colon humano (NCM460). Además, el As(V), forma inorgánica de As considerada de menor grado de toxicidad, también genera estos efectos citotóxicos en células Caco-2 y NCM460, aunque como era de esperar, en menor medida que el As(III) y a mayores concentraciones de exposición.

El aumento de la expresión de las proteínas de estrés observado en el presente estudio puede haber contrarrestado en parte el efecto tóxico del As-i. Algunos estudios ponen de manifiesto que una mayor expresión de *HSP70* supone una menor toxicidad del As-i (Barnes *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005). Qu y Waalkes (2015) también muestran como el efecto del As(III) es mayor en células que no presentan expresión de las MT. El posible efecto protector de estas proteínas de estrés no es, sin embargo, suficiente para evitar las modificaciones estructurales y funcionales evidenciadas en las monocapas formadas por ambos tipos celulares. Los tratamientos con As(III) y As(V) producen un cambio en la morfología de las capas epiteliales, especialmente notable en Caco-2 (figura 12). Se observa un cambio en los patrones de distribución de la proteína *ZO-1* y una reducción en la expresión de la *CLDN-1*, proteínas de las uniones intercelulares que intervienen en el mantenimiento de la estructura del epitelio.

Estudios previos evidencian que el desensamble de las uniones intercelulares provocado por las citoquinas se debe a que éstas actúan modificando la expresión y/o localización de las proteínas que forman estas uniones (Capaldo y Nusrat, 2009), tal y como ocurre en el presente estudio. El efecto del As-i sobre los componentes de las uniones intercelulares se ha evidenciado previamente en un modelo celular de epitelio traqueal de ratón (Sherwood *et al.*, 2013). Estos autores muestran que las monocapas de las células epiteliales de las vías respiratorias expuestas a As(III) (0.6-290 µg/L) exhiben patrones alterados de localización de algunas proteínas de las uniones intercelulares. Los datos obtenidos en la presente tesis evidencian por primera vez, que este efecto tóxico también se produce a nivel intestinal en exposiciones agudas a As(III) y As(V).

El efecto del As-i sobre las uniones intercelulares es posiblemente el responsable del aumento del transporte paracelular (figura 13), especialmente en los tratamientos con As(III), que son precisamente los que generan una mayor respuesta pro-inflamatoria y de estrés oxidativo. Este aumento demuestra que la

exposición a las formas inorgánicas del metaloide tiene un efecto sobre la permeabilidad intestinal, causando una pérdida de la función barrera intestinal, hecho que tal y como se ha comentado previamente, podría desencadenar un proceso inflamatorio intestinal de perpetuarse en el tiempo. Además, teniendo en cuenta que el paso del As-i a través del epitelio presenta un importante componente paracelular (Calatayud *et al.* 2010, 2011), el aumento de la permeabilidad paracelular puede suponer un mayor transporte de estas formas inorgánicas a través del epitelio, aumentando posiblemente, la cantidad de As que llegue a la circulación sistémica.

CONCLUSIONES

La exposición aguda a As-i genera una respuesta pro-inflamatoria y pro-oxidante que conlleva la pérdida de estructura y funcionalidad del epitelio intestinal en modelos *in vitro*. Las concentraciones de As-i que afectan esta función barrera y/o generan el proceso inflamatorio son relativamente altas [$\text{As(III)} \geq 1 \text{ mg/L}$ y $\text{As(V)} \geq 5 \text{ mg/L}$], sólo detectables en algunos productos alimentarios (bivalvos y algas) y no representativas de las cantidades encontradas en aguas de bebida de países con arsenicismo crónico endémico. Es por tanto necesario llevar a cabo estudios que permitan evaluar este efecto tóxico sobre el epitelio intestinal a concentraciones más bajas y en tratamientos de mayor duración, con el fin de emular las condiciones existentes en zonas endémicas. Estos aspectos son los que se investigan en los capítulos 2 y 3 de la presente tesis doctoral.

Capítulo 2

Evaluación *in vitro* de los efectos de una exposición subcrónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal

Los efectos tóxicos que se han evidenciado en las células intestinales durante exposiciones agudas a As-i, posiblemente se exacerben en exposiciones crónicas, incluso a concentraciones más bajas que las ensayadas en el capítulo 1. De hecho, en poblaciones expuestas crónicamente a As-i a través del agua de bebida se han reportado síntomas de dispepsia, gastroenteritis y diarrea crónica (apartado 5.1, introducción).

El objetivo principal de este capítulo es determinar las alteraciones producidas por una exposición subcrónica a As-i sobre el epitelio intestinal empleando las células Caco-2 como modelo celular y evaluando los parámetros relacionados con la diferenciación del epitelio, su capacidad de renovación y su función barrera. En este estudio solo se ha empleado la línea celular Caco-2 debido a que su programa de diferenciación y los marcadores que lo definen están bien caracterizados (Sambuy *et al.*, 2005), al contrario de lo que ocurre con las células NCM460.

RESULTADOS

1. Búsqueda de las condiciones óptimas para los ensayos de exposición subcrónica

Previamente a la realización de los ensayos de toxicidad, se determinaron las condiciones óptimas para poder llevar a cabo un estudio de exposición continua durante 21 días. Se consideraron válidos aquellos ensayos en los que no se observó una desestructuración de la monocapa celular. Para optimizar las condiciones se modificaron dos variables: concentración de SFB (2.5% 5% y 7.5%) y concentración de las formas arsenicales [As(III): 0.025-1 mg/L; As(V): 0.25-5 mg/L].

La optimización del método se inició usando DMEM suplementado (apartado 2.1, metodología) con 2.5% de SFB, concentración relativamente baja, con el fin de evitar interferencias de los componentes del SFB debido a la posible formación de complejos con el As-i. Durante este primer ensayo se emplearon las concentraciones más altas de As(III) (0.5 y 1 mg/L) y As(V) (3 y 5 mg/L). Con estas condiciones de cultivo no se consiguió mantener la integridad de la monocapa más de 5 días. Los siguientes ensayos se llevaron a cabo con concentraciones mayores de SFB (5% y 7.5%) y las concentraciones de As-i anteriormente citadas. En este caso, la monocapa se mantuvo íntegra un tiempo superior (7 días), pero no suficiente para abordar un ensayo de exposición subcrónica. El tercer ensayo se realizó empleando concentraciones menores de As [As(III): 0.025-0.1 mg/L; As(V): 0.25-1 mg/L] a las dos concentraciones de SFB del ensayo previo (5% y 7.5%); sólo las células con 7.5% de SFB mantuvieron la integridad de la monocapa durante 21 días.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las concentraciones elegidas para el estudio fueron: As(III) 0.025, 0.075 y 0.1 mg/L; As(V) 0.25, 0.75 y 1 mg/L. Las disoluciones de las formas arsenicales se prepararon en DMEM-7.5%SFB.

2. Evaluación de la respuesta pro-inflamatoria

Las figuras 14 y 15 muestran la liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 al medio tras 7, 14 y 21 días de exposición a As(III) y As(V), respectivamente. Los tratamientos con las mayores concentraciones de As(III) (0.075 y 0.1 mg/L) dan lugar a cantidades de IL-8 en el medio estadísticamente superiores a las de células control en todos los tiempos ensayados. Los aumentos de la liberación de IL-8 son más elevados a la concentración de 0.075 mg/L (239-466%) que a la de 0.1 mg/L (166-335%). Este hecho puede ser debido a que las monocapas

expuestas a 0.1 mg/L tienen una menor capacidad de respuesta al estar sometidas a una mayor situación de estrés. En el caso del As(V), también se observa una mayor liberación de IL-8 a las concentraciones más elevadas (1 mg/L: 349-488%; 0.75 mg/L: 151-176%) (figura 15). Para esta especie arsenical, el efecto inmunotóxico es dosis dependiente. Las células tratadas con la concentración más elevada de As(V) todavía tiene una elevada capacidad de respuesta, posiblemente porque la exposición a As(V) no produce una situación de estrés celular tan acentuada como el tratamiento con As(III).

Hay que destacar que la cantidad de citoquina liberada al medio se mantiene en niveles superiores al control durante todo el tiempo de tratamiento para las concentraciones más elevadas [$\text{As(III)} \geq 0.075 \text{ mg/L}$; $\text{As(V)} \geq 0.75 \text{ mg/L}$].

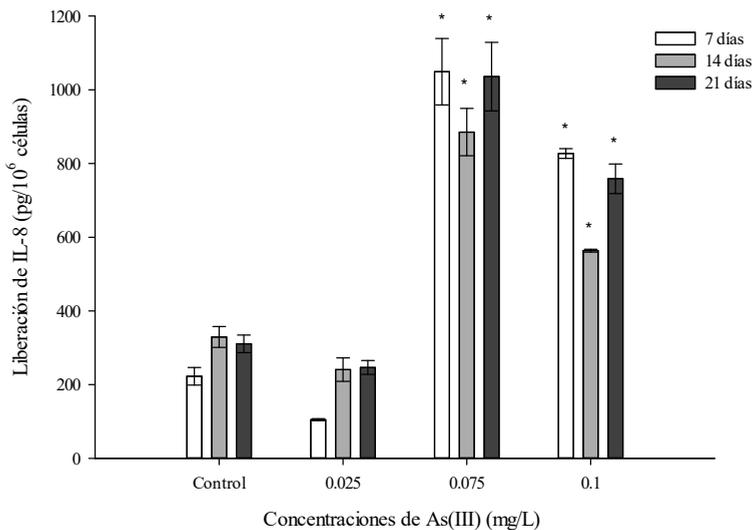


Figura 14. Respuesta pro-inflamatoria en células Caco-2 expuestas subcrónicamente a As(III). Liberación de IL-8 al medio de cultivo en células control y células expuestas a varias concentraciones de As(III) durante 7, 14 y 21 días. Valores expresados como pg/10⁶ células (media ± SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

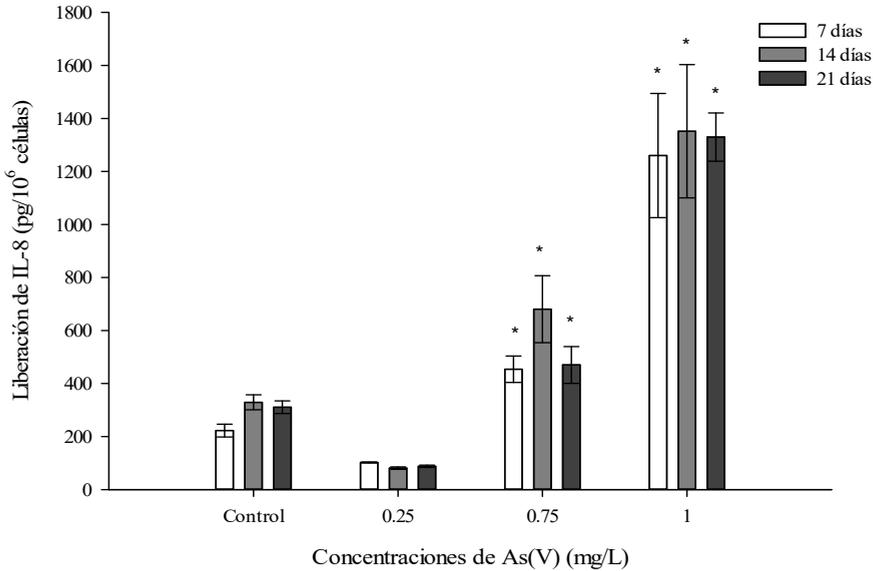


Figura 15. Respuesta pro-inflamatoria en células Caco-2 expuestas subcrónicamente a As(V). Liberación de IL-8 al medio de cultivo en células control y células expuestas a varias concentraciones de As(V) durante 7, 14 y 21 días. Valores expresados como pg/10⁶ células (media ± SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

3. Efecto sobre la proliferación celular

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que tras 2 y 5 días de exposición a As(III) y As(V) no se observan diferencias en los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo celular en relación a las células control. Los porcentajes celulares presentan los siguientes rangos: 2 días (G0/G1 48-54%, S 23-26%, G2/M 25-28%); 5 días (G0/G1 35-50%, S 25-36%, G2/M 24-30%).

Los porcentajes celulares en las distintas fases tras 7 días de exposición se muestran en la figura 16. A este tiempo, se observan diferencias entre las células control y todos los tratamientos. En las células expuestas a As-i existe un mayor

porcentaje celular en la fase S y G2/M [control: 39%; As(III): 50-54%; As(V): 44-52%]; mientras que en las células control el porcentaje celular en la fase G0/G1 es mayor [control: 60%; As(III): 42-52%; As(V): 49-56%]. Estos resultados indican que tras la exposición a As-i durante 7 días un mayor número de células se encuentra en estado proliferativo (fase S + fase G2/M) y, por tanto, un menor número de células han iniciado el proceso de diferenciación.

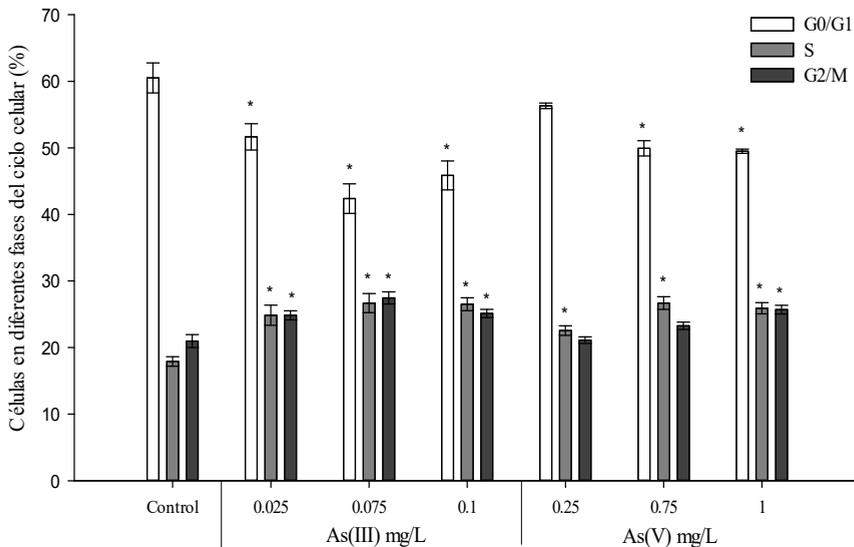


Figura 16. Efecto de los tratamientos subcrónicos con As-i sobre del ciclo celular. Porcentaje de células en las fases G0/G1, S y G2/M en células control y células tratadas con varias concentraciones de As(III) y As(V) durante 7 días. Valores expresados como media \pm SD (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

4. Efecto sobre la diferenciación celular

El proceso de diferenciación, necesario para el adecuado funcionamiento del intestino, se puede estudiar empleando células Caco-2 como modelo intestinal (Sambuy *et al.*, 2005). En este tipo celular, la diferenciación se produce

espontáneamente y tiene lugar cuando se inhibe la proliferación por contacto. Las proteínas del borde en cepillo del intestino (*SI*, *DPP4* y *VILI*) aumentan su expresión durante el proceso de diferenciación del enterocito (Devriese *et al.*, 2017), mientras que la expresión del gen *MYC*, gen diana de la vía Wnt/ β -catenina (Gregorieff y Clevers, 2005), disminuye durante las etapas iniciales de este proceso (Leoni *et al.*, 2012).

En la tabla 15 se muestran los valores de expresión diferencial de estas proteínas en células tratadas con As-i durante 5, 7, 14 y 21 días. El As-i afecta la expresión de los marcadores de diferenciación ensayados. La exposición a As(III) reduce la expresión de los genes que codifican *SI*, *DPP4* y *VILI*. Esta reducción se produce en todos los tiempos para *SI* y a partir de los 14 días de exposición para *VILI* y *DPP4*. Por el contrario, *MYC* experimenta una regulación al alza que se manifiesta desde los 5 hasta los 14 días de exposición con As(III).

Los tratamientos con As(V) modifican la expresión de los marcadores de forma similar al As(III), siendo *SI* y *MYC* los genes más afectados. La reducción de la expresión de *SI* se produce desde el quinto día para todas las concentraciones y la regulación al alza de *MYC* se manifiesta tras 7 días de exposición. A la vista de los resultados se puede concluir que los tratamientos subcrónicos con As-i conllevan una modificación del proceso de diferenciación de las células intestinales.

Tabla 15. Efecto de la exposición subcrónica a As-i sobre la diferenciación celular. Expresión relativa de *SI*, *DPP4*, *VIL1* y *MYC* en células Caco-2 expuestas a As(III) y As(V) durante 5, 7, 14 y 21 días. Valores expresados como cambios en el nivel de expresión respecto al control (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican regulaciones a la baja (en rojo) o al alza (en azul) estadísticamente significativas con respecto a las células control ($p < 0.05$).

Días	Tratamiento (mg/L)	<i>SI</i>	<i>DPP4</i>	<i>VIL1</i>	<i>MYC</i>
5	As(III) 0.025	0.51 \pm 0.07*	0.86 \pm 0.16	0.96 \pm 0.13	1.66 \pm 0.23
	As(III) 0.075	0.22 \pm 0.03*	0.90 \pm 0.14	0.76 \pm 0.13	2.14 \pm 0.39
	As(III) 0.1	0.30 \pm 0.05*	0.89 \pm 0.13	0.85 \pm 0.12	2.41 \pm 0.36*
	As(V) 0.25	0.60 \pm 0.09*	0.85 \pm 0.14	1.04 \pm 0.17	1.84 \pm 0.28
	As(V) 0.75	0.14 \pm 0.04*	0.56 \pm 0.12	0.63 \pm 0.12	2.23 \pm 0.57
	As(V) 1.0	0.11 \pm 0.02*	0.62 \pm 0.13	0.56 \pm 0.11	2.29 \pm 0.39
7	As(III) 0.025	0.40 \pm 0.08*	1.08 \pm 0.21	1.34 \pm 0.42	2.41 \pm 1.41
	As(III) 0.075	0.10 \pm 0.03*	1.20 \pm 0.27	1.08 \pm 0.31	10.80 \pm 6.16*
	As(III) 0.1	0.09 \pm 0.04*	1.50 \pm 0.42	1.03 \pm 0.34	23.83 \pm 14.0*
	As(V) 0.25	0.33 \pm 0.05*	1.32 \pm 0.19	1.06 \pm 0.17	12.86 \pm 6.97*
	As(V) 0.75	0.15 \pm 0.05*	1.22 \pm 0.32	0.86 \pm 0.29	17.02 \pm 9.84*
	As(V) 1.0	0.11 \pm 0.04*	1.75 \pm 0.49	0.88 \pm 0.29	18.5 \pm 10.9*
14	As(III) 0.025	0.41 \pm 0.06*	0.89 \pm 0.11	0.72 \pm 0.11*	1.74 \pm 0.25*
	As(III) 0.075	0.005 \pm 0.002*	1.06 \pm 0.24	0.47 \pm 0.11*	8.14 \pm 1.85*
	As(III) 0.1	0.004 \pm 0.001*	0.94 \pm 0.24	0.41 \pm 0.06*	7.50 \pm 1.30*
	As(V) 0.25	0.15 \pm 0.04*	0.58 \pm 0.08*	0.62 \pm 0.11	1.88 \pm 0.31*
	As(V) 0.75	0.006 \pm 0.001*	0.56 \pm 0.10*	0.25 \pm 0.04*	3.31 \pm 0.64*
	As(V) 1.0	0.009 \pm 0.002*	0.82 \pm 0.23	0.32 \pm 0.07*	5.12 \pm 1.08*
21	As(III) 0.025	0.95 \pm 0.22	0.75 \pm 0.09	1.06 \pm 0.18	1.04 \pm 0.34
	As(III) 0.075	0.07 \pm 0.02*	0.30 \pm 0.07*	0.44 \pm 0.10*	0.55 \pm 0.17
	As(III) 0.1	0.007 \pm 0.002*	0.23 \pm 0.04*	0.24 \pm 0.05*	0.75 \pm 0.29
	As(V) 0.25	0.21 \pm 0.09*	0.38 \pm 0.09*	0.60 \pm 0.13	0.52 \pm 0.17
	As(V) 0.75	0.02 \pm 0.004*	0.35 \pm 0.05*	0.34 \pm 0.05*	0.87 \pm 0.23
	As(V) 1.0	0.008 \pm 0.003*	0.68 \pm 0.35	0.33 \pm 0.12*	1.81 \pm 0.74

5. Efecto sobre la estructura del epitelio intestinal

Las células tratadas con As(III) a concentraciones mayores o iguales a 0.075 mg/L y con As(V) a concentraciones mayores o iguales a 0.75 mg/L muestran zonas sin microvellosidades a lo largo de la membrana, y en algunas zonas donde hay microvellosidades, éstas presentan cierto grado de desorganización. Las imágenes de la ultraestructura de las células Caco-2 tras 7 y 14 días de contacto a dos de estas concentraciones [As(III) 0.1 mg/L y As(V) 1 mg/L] se muestran en la figura 17. En las concentraciones de As(III) 0.025 mg/L y As(V) 0.25 mg/L no se observan alteraciones destacables respecto al control. Este hecho evidencia que el As-i afecta estructuras celulares muy importantes para los procesos de absorción, digestión y permeabilidad.

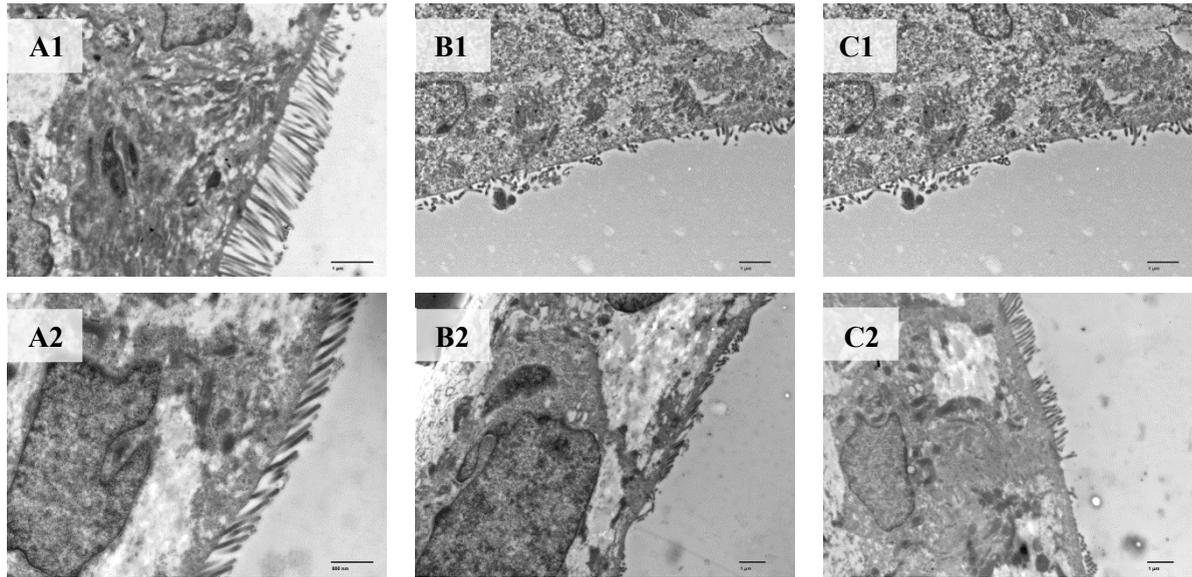


Figura 17. Efecto de la exposición subcrónica a i-As sobre la estructura de células Caco-2. Imágenes obtenidas por microscopía de transmisión electrónica de células Caco-2 sembradas sobre insertos Transwell[®]: células control (A); células expuestas a As(III) (0.1 mg/L; B) y As(V) (1 mg/L; C) durante 7 días (A1, B1, y C1) y 14 días (A2, B2, y C2).

6. Efecto sobre la permeabilidad del epitelio intestinal

Las figuras 18 y 19 muestran el transporte de LY al lado basolateral en células tratadas durante 7, 14 y 21 días con As(III) y As(V), respectivamente.

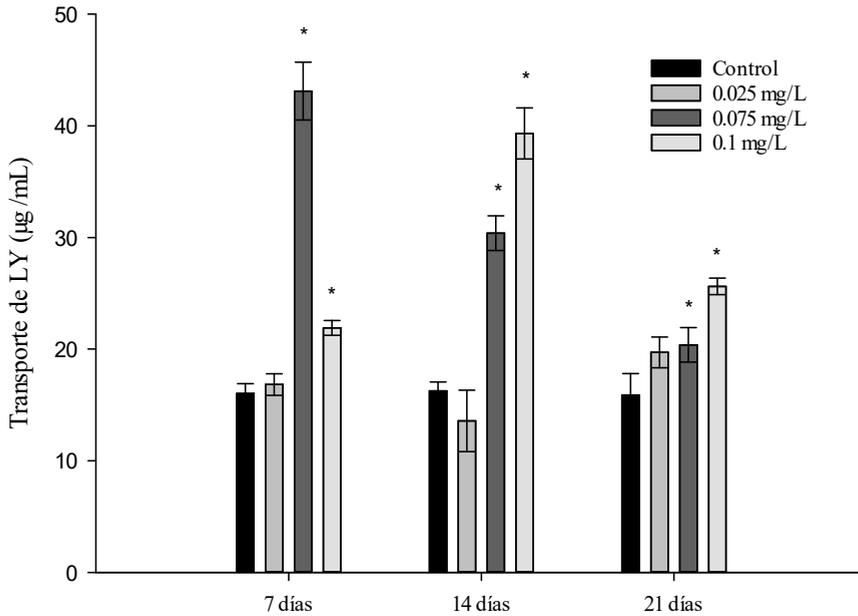


Figura 18. Efecto de la exposición subcrónica a As(III) sobre la permeabilidad de células Caco-2. Transporte de LY al lado basolateral en monocapas control y monocapas tratadas con As(III) (0.025, 0.075 y 0.1 mg/L) durante 7, 14 y 21 días. Valores expresados en µg/mL (media ± SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

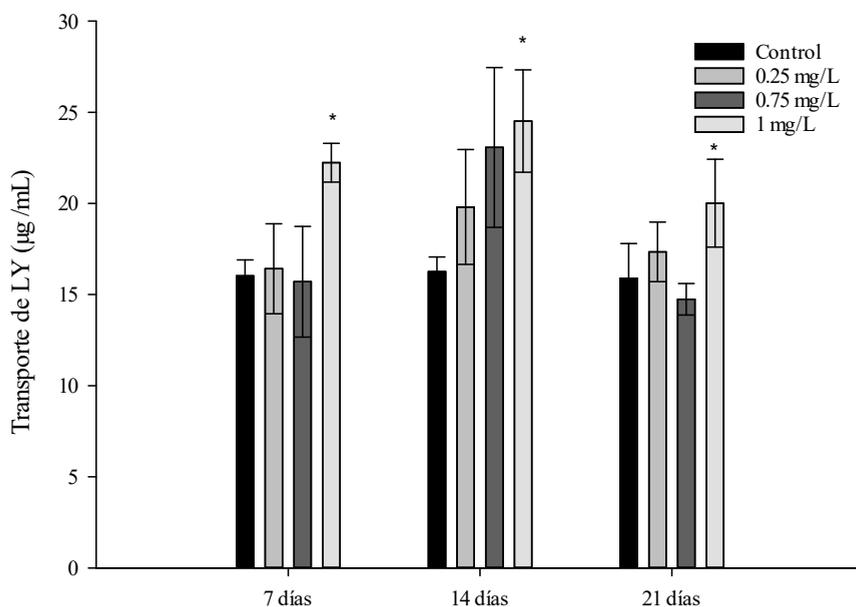


Figura 19. Efecto de la exposición subcrónica a As(V) sobre la permeabilidad de células Caco-2. Transporte de LY al lado basolateral en monocapas control y monocapas tratadas con As(V) (0.25, 0.75 y 1 mg/L) durante 7, 14 y 21 días. Valores expresados en $\mu\text{g/mL}$ (media \pm SD, $n=3$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) respecto a las células control.

Las concentraciones más altas de As(III) conllevan aumentos significativos del transporte de LY respecto a las células control (0.3-2 veces) a todos los tiempos ensayados. El efecto del As(V) es menos destacable (1.25-1.5 veces) y sólo se produce con la mayor concentración. Estos datos indican que el tratamiento subcrónico con las formas inorgánicas de As, especialmente As(III), aumenta el paso paracelular y, por tanto, produce monocapas intestinales más laxas. Esto supone un aumento de la permeabilidad y una pérdida de la función barrera del epitelio. Este fenómeno, una vez instaurado, se mantiene en el tiempo.

7. Efecto sobre la regeneración celular

La regeneración tisular es un proceso crucial para el adecuado funcionamiento de cualquier órgano. Se considera que el intestino, y en concreto el epitelio intestinal, es el tejido que presenta una mayor dinámica de regeneración. Después de una lesión, el epitelio sufre un proceso de cura de la herida que depende del equilibrio exacto entre la migración, proliferación, y diferenciación de las células epiteliales adyacentes a la área de la herida (Iizuka y Konno, 2011). Algunos de estos procesos pueden alterarse por la exposición a As-i, como ya se ha demostrado en este capítulo (apartados 3 y 4).

La observación del cierre de la herida a diferentes tiempos muestra que las células control y las células tratadas previamente durante 7 días con las concentraciones más bajas de As(III) y As(V) sellan el área de la herida más rápidamente (figuras 20A y 20B) que las células tratadas con las mayores concentraciones de estas formas arsenicales (figuras 20C y 20D).

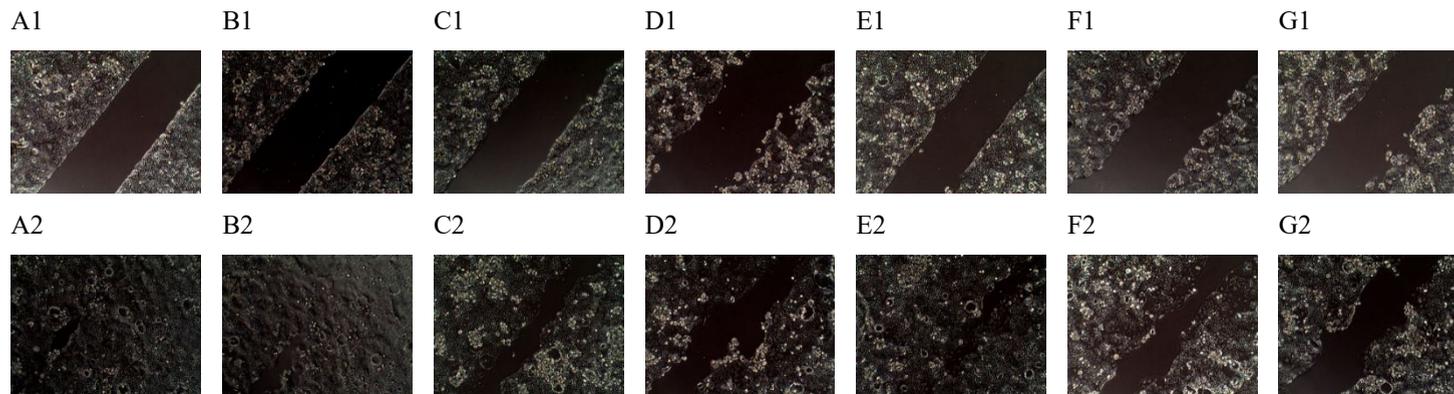


Figura 20. Imágenes del proceso de cierre de la herida en células Caco-2 tras una exposición subcrónica a As-i. Células control (A); células expuesta a As(III) (0.025 mg/L, B; 0.075 mg/L, C; 0.1 mg/L, D) y As(V) (0.25 mg/L, E; 0.75 mg/L, F; 1 mg/L, G) durante 7 días. Las imágenes A1-G1 se obtuvieron en el tiempo cero y las imágenes A2-G2 a las 24 h post-herida.

La figura 21 muestra el porcentaje de cierre de la herida a las 24 h de su generación [cierre: control, 94%; As(III) 0.025 mg/L, 94%; As(III) 0.075 mg/L, 68%; As(III) 0.1 mg/L, 48%; As(V) 0.25 mg/L, 82%; As(V) 0.75 mg/L, 61%; As(V) 1 mg/L, 50%].

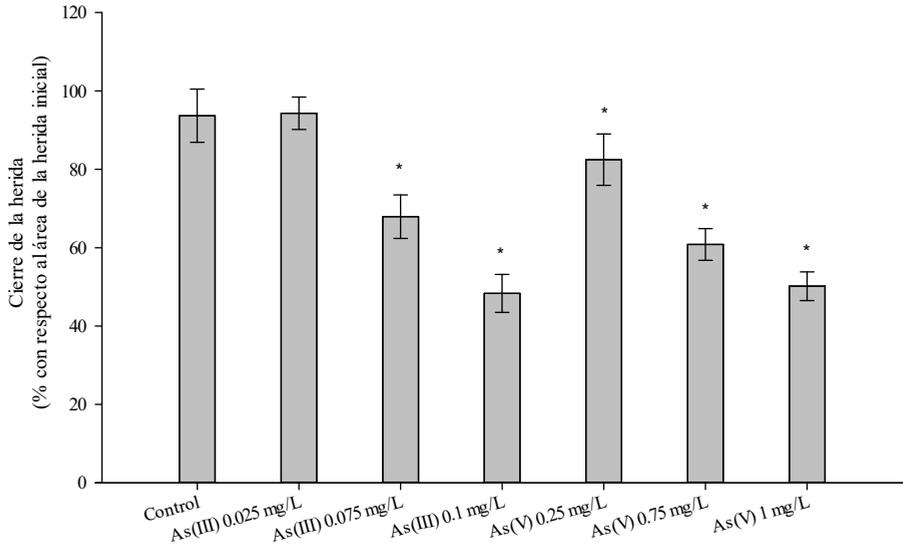


Figura 21. Efecto de una exposición subcrónica a As-i sobre la regeneración celular. Porcentaje de cierre de la herida a las 24 h en células control y células tratadas con varias concentraciones de As(III) y As(V) durante 7 días. Valores expresados como porcentajes respecto al área de la herida inicial (tiempo cero) (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

DISCUSIÓN

La mayoría de estudios *in vitro* para evidenciar los efectos tóxicos de una sustancia o dilucidar sus mecanismos de acción se realizan empleando exposiciones agudas a dosis relativamente altas. Esta primera aproximación puede dar una idea de si hay o no efecto tóxico y el modo de acción del compuesto; sin embargo, siempre es necesario determinar si estos efectos también tienen lugar cuando las exposiciones se prolongan en el tiempo y se realizan a dosis más cercanas a la realidad. En el caso del As-i este tipo de estudio está especialmente justificado, ya que existen poblaciones que están expuestas crónicamente a este metaloide, a través del agua de bebida.

En este capítulo se ha evidenciado que la exposición subcrónica de las células intestinales a concentraciones de As-i un orden de magnitud inferiores a las empleadas en el capítulo 1, también incrementa la liberación de la citoquina IL-8 desde el inicio de la exposición (figura 15). Estos datos permiten concluir que la exposición subcrónica a As-i también tiene efecto inmunotóxico *in vitro*, con el agravante de que éste se mantiene durante el tiempo de exposición. Hay que resaltar que este efecto se pone de manifiesto a concentraciones de As-i encontradas habitualmente en aguas de países con arsenicismo crónico endémico. Este proceso pro-inflamatorio puede ser el responsable de todos los efectos citotóxicos observados en este capítulo: cambios en el programa de proliferación/diferenciación, defectos en el proceso de regeneración tisular, efectos sobre la estructura del epitelio y sobre la permeabilidad intestinal. Todos estos efectos se han relacionado en estudios previos con el aumento de la respuesta pro-inflamatoria.

Debido al continuo contacto con sustancias tóxicas y agentes patógenos, y a las respuestas que éstos generan (producción de ROS/RNS, liberación de citoquinas, etc), el epitelio intestinal requiere de un continuo proceso de

renovación/repación que permita el mantenimiento de su estructura y función. El proceso de renovaci3n de este epitelio depende de un adecuado progreso de la proliferaci3n de las c3lulas madres presentes en la base de la cripta y de la diferenciaci3n de las mismas en su camino desde la base a la punta de la vellosidad, donde finalmente experimentan un proceso de apoptosis y son eliminadas al lumen (Van Der Flier y Clevers, 2009). Los ensayos de cierre de herida llevados a cabo en este trabajo evidencian que el proceso de repaci3n del tejido daaado est3 afectado tras 7 d3as de exposici3n continuada a As-i (figuras 20 y 21).

Numerosos estudios evidencian que el As-i puede afectar la tasa de proliferaci3n celular, aumentando o disminuyendo la misma (Vega *et al.*, 2001; Chowdhury *et al.*, 2010). Tambi3n se ha puesto de manifiesto en c3lulas embrionarias de rat3n P19 que la exposici3n a As(III) afecta determinadas rutas de seaalizaci3n, reduciendo la diferenciaci3n celular (Bain *et al.*, 2016). Adem3s, las citoquinas pro-inflamatorias producidas por la exposici3n a As-i, tambi3n pueden afectar el proceso de diferenciaci3n celular (Langen *et al.*, 2001). Los datos obtenidos en el presente estudio evidencian que las c3lulas tratadas con las concentraciones m3s altas de As(III) y As(V) muestran una regulaci3n a la baja de enzimas marcadores de la diferenciaci3n intestinal (tabla 15) y, por tanto, afectan el proceso de diferenciaci3n de c3lulas epiteliales del intestino. Esto se refleja tambi3n en el ciclo celular; las c3lulas tratadas con As-i presentan una mayor tasa de proliferaci3n celular a los 7 d3as de exposici3n (figura 16), debido a que hay un mayor n3mero de c3lulas que no han entrado en el proceso de diferenciaci3n. Por tanto, podemos decir que las c3lulas expuestas subcr3nicamente a As(III) (≥ 0.075 mg/L) y As(V) (≥ 0.75 mg/L) presentan alteraciones en los procesos de proliferaci3n y diferenciaci3n, que posiblemente son los causantes de que el proceso de repaci3n celular est3 afectado. Estas alteraciones tambi3n pueden contribuir a la p3rdida de la funci3n barrera

observada en el presente estudio para las monocapas tratadas con las mayores concentraciones de As(III) y As(V).

Otro hecho destacable es el efecto del As-i sobre la ultraestructura de la monocapa intestinal. Además de afectar el espacio intercelular, evidenciado por la pérdida de la función barrera, la exposición subcrónica a As(III) y As(V) reduce las microvellosidades del epitelio. Estas microvellosidades incrementan el área de absorción de nutrientes en el intestino delgado y la de reabsorción de agua en el intestino grueso. Además de intervenir en los procesos de absorción, en la membrana de las microvellosidades se encuentran enzimas digestivos responsables de la digestión de disacáridos y polipéptidos. Bennett *et al.* (2014) también ponen de manifiesto un papel de las microvellosidades en la defensa frente a patógenos. Según este estudio, las células epiteliales con reducción de las microvellosidades interaccionan en mayor medida con partículas microbianas que aquellas que tienen las microvellosidades intactas. Los autores vinculan este hecho con un mecanismo de repulsión electrostática de las microvellosidades. Por tanto, la pérdida de estas estructuras conlleva una reducción de la capacidad absorbente, digestiva y de defensa de las células intestinales.

CONCLUSIONES

La exposición subcrónica a As-i a concentraciones habituales en aguas contaminadas y determinados alimentos puede afectar las principales funciones del epitelio intestinal (absorción, digestión y defensa) y comprometer sus mecanismos de reparación. Todos estos efectos tóxicos pueden deberse en parte a un proceso pro-inflamatorio que se mantiene durante todo el tratamiento. Se requieren estudios *in vivo* que confirmen la toxicidad intestinal del As-i en tratamientos prolongados. Este va a ser el objetivo del capítulo 4 de esta tesis doctoral.

Capítulo 3

Evaluación *in vitro* de los efectos de una exposición crónica a arsénico inorgánico sobre el epitelio intestinal

El aumento del riesgo de padecer cáncer observado en estudios epidemiológicos en poblaciones expuestas a As se atribuye principalmente a la presencia de As-i en el agua de bebida (Rossman, 2003); si bien los metabolitos, especialmente el MMA(III), parecen también jugar un papel relevante en este proceso.

Tal y como se ha comentado previamente, una inflamación continuada en el tiempo y la pérdida de la función barrera, efectos tóxicos observados en la exposición subcrónica a As-i (capítulo 2), pueden favorecer la instauración de patologías inflamatorias crónicas y pueden aumentar la incidencia de procesos cancerígenos (Rubin *et al.*, 2012). *In vitro* se ha estudiado la capacidad del As(III) para inducir transformaciones en varios tipos celulares humanos (Chen y Costa, 2017), sin embargo, no existen investigaciones en células intestinales. Los estudios apuntan a diversos modos de acción del As-i: estrés oxidativo, factores de crecimiento alterados, anormalidad cromosómica, desregulación inmune y regulaciones epigenéticas aberrantes (Lee *et al.*, 2010).

El objetivo de este capítulo de tesis es determinar si la exposición crónica a As(III) favorece la aparición en células epiteliales del intestino de características típicas de células transformadas, empleando las células NCM460 como modelo celular. Estas células se han seleccionado por su carácter no tumorogénico.

RESULTADOS

1. Efecto sobre la respuesta pro-inflamatoria

Varias citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y IL-18) han sido vinculadas con tumorogénesis (Aggarwal *et al.*, 2006). En este estudio, se ha evaluado la liberación de la citoquina IL-8 por las células NCM460 expuestas crónicamente a As(III) y As(V) (figuras 22 y 23, respectivamente). En la figura 22 se observa un aumento en la liberación de IL-8 desde la 4ª semana de exposición (primera

medida realizada) por las células tratadas con las concentraciones más altas de As(III) (0.1 y 0.2 mg/L). Este efecto se mantiene durante las 24 semanas de exposición (2.1-4.9 veces respecto a las células control). La exposición a As(III) 0.05 mg/L aumenta la liberación de IL-8 entre las semanas 20 y 24 (2.9 - 4.0 veces respecto a las células control). Con respecto a la exposición a As(V) (figura 23), se observa un aumento de la liberación de IL-8 en la semana 14 a la concentración más alta (2 veces respecto a las células control). El tratamiento con As(V) 0.5 mg/L sólo incrementa la respuesta pro-inflamatoria (1.5 veces respecto al control) en la última semana de exposición. En ambas concentraciones de As(V), la cantidad de IL-8 liberada es inferior a la observada en las células tratadas con As(III).

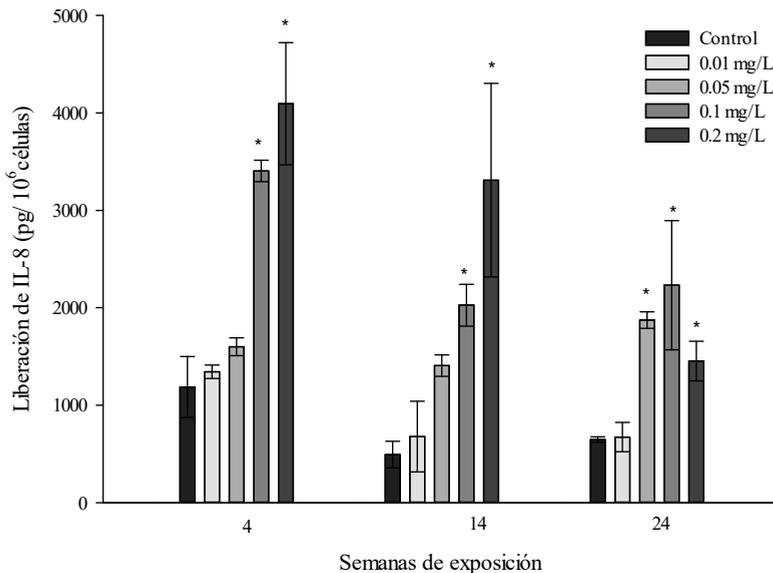


Figura 22. Respuesta pro-inflamatoria en células NCM460 crónicamente expuestas a As(III). Liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 al medio de cultivo en células control y células expuestas a As(III) (0.01, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L) durante 4, 14 y 24 semanas. Valores expresados como pg/10⁶ células (media ± SD, n=2). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a células control.

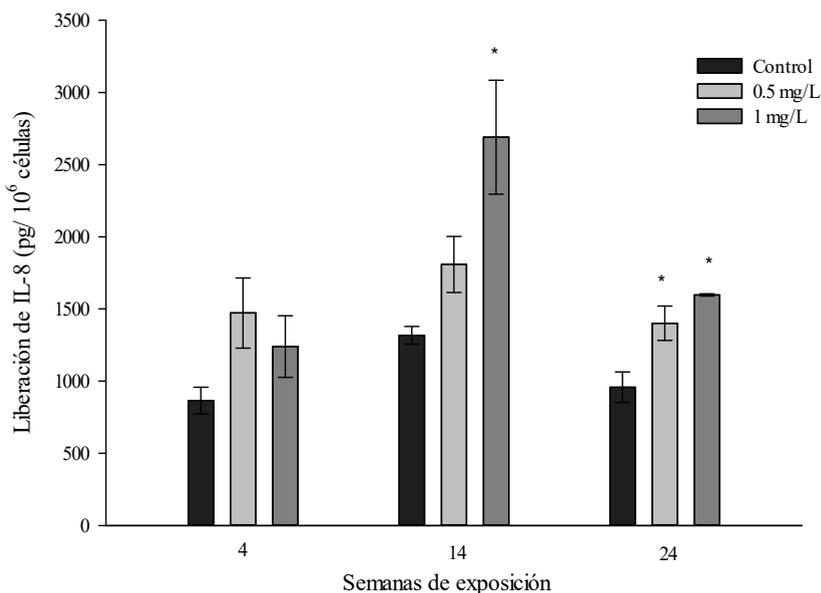


Figura 23. Respuesta pro-inflamatoria en células NCM460 crónicamente expuestas a As(V). Liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 al medio de cultivo en células control y células expuestas a As(V) (0.5 y 1 mg/L) durante 4, 14 y 24 semanas. Valores expresados como pg/10⁶ células (media \pm SD, n=2). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a células control.

2. Modificación de las histonas

Los cambios en los patrones de acetilación y metilación de las histonas se consideran un mecanismo epigenético implicado en la carcinogénesis del As-i (Roy *et al.*, 2015). La figura 24 muestra la acetilación de la histona H3 en células NCM460 crónicamente expuestas a As(III) (0.01, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L) durante 6, 18 y 20 semanas.

La exposición crónica a As(III) aumenta los niveles de la histona H3 modificada en la 20^a semana (3.2-3.7 veces), no observándose cambios

significativos en las semanas anteriores. La exposición crónica a As(V) no modifica los patrones de acetilación de la histona H3 (datos no mostrados).

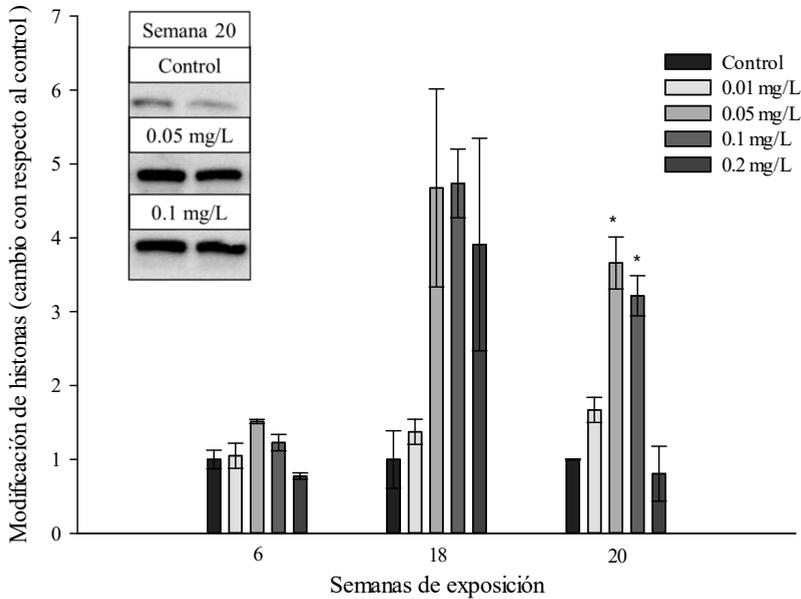


Figura 24. Modificación de las histonas en células NCM460 tratadas crónicamente con As(III). Cantidad de histona H3 acetilada en los residuos K9, K14, K18, K23 y/o K27 en células control y células expuestas a As(III) (0.01, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L) durante 6, 18 y 20 semanas. Valores expresados como nivel de acetilación de H3 respecto al control (media \pm SD, n=2). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

3. Cambios en la expresión de genes relacionados con cáncer colorrectal

La tabla 16 muestra la expresión de *CDX1*, *CDX2* y *CD133* en células NCM460 crónicamente expuestas a As(III) (0.01, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L) y As(V) (0.5 y 1 mg/L) durante 3, 13 y 19 semanas, con respecto a células control.

Tabla 16. Efecto de la exposición crónica a As-i sobre la expresión de genes relacionados con cáncer colorrectal. Expresión relativa de *CDX1*, *CDX2* y *CD133* en células NCM460 expuestas a (16a) As(III) (0.01, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L) y (16b) As(V) (0.5 y 1.0 mg/L) durante 3, 13 y 19 semanas. Valores expresados como cambios en el nivel de expresión respecto al control (media \pm SD, n=2). Los asteriscos indican regulaciones a la baja (en rojo) o regulaciones al alza (en azul) estadísticamente significativas con respecto a las células control ($p < 0.05$).

16a	Semana 3			Semana 13			Semana 19		
	<i>CDX1</i>	<i>CDX2</i>	<i>CD133</i>	<i>CDX1</i>	<i>CDX2</i>	<i>CD133</i>	<i>CDX1</i>	<i>CDX2</i>	<i>CD133</i>
As(III) 0.01 mg/L	0.24 \pm 0.07*	0.28 \pm 0.08*	0.37 \pm 0.01*	0.25 \pm 0.047*	0.52 \pm 0.095	6.20 \pm 2.09*	0.22 \pm 0.07*	0.258 \pm 0.084*	1.25 \pm 0.46
As(III) 0.05 mg/L	3.06 \pm 1.43	15.7 \pm 5.9*	2.87 \pm 1.07	0.04 \pm 0.012*	0.09 \pm 0.019*	15.0 \pm 7.3*	0.034 \pm 0.011*	0.044 \pm 0.015*	1.58 \pm 0.36
As(III) 0.1 mg/L	0.02 \pm 0.005*	0.10 \pm 0.02*	1.15 \pm 0.42	0.02 \pm 0.004*	0.01 \pm 0.003*	11.8 \pm 0.3*	0.023 \pm 0.007*	0.025 \pm 0.007*	1.43 \pm 0.47
As(III) 0.2 mg/L	0.01 \pm 0.003*	0.06 \pm 0.02*	1.30 \pm 0.28	0.01 \pm 0.004*	0.01 \pm 0.001*	0.77 \pm 0.29	0.019 \pm 0.004*	0.005 \pm 0.001*	1.02 \pm 0.24

16b	Semana 3			Semana 13			Semana 19		
	<i>CDX1</i>	<i>CDX2</i>	<i>CD133</i>	<i>CDX1</i>	<i>CDX2</i>	<i>CD133</i>	<i>CDX1</i>	<i>CDX2</i>	<i>CD133</i>
As(V) 0.5 mg/L	0.05 \pm 0.01*	0.04 \pm 0.01*	0.55 \pm 0.18	0.03 \pm 0.01*	0.06 \pm 0.02*	1.76 \pm 0.62	0.05 \pm 0.03*	0.285 \pm 0.151	1.50 \pm 0.40
As(V) 1 mg/L	0.02 \pm 0.005*	0.01 \pm 0.003*	0.30 \pm 0.04	0.03 \pm 0.007*	0.03 \pm 0.006*	1.02 \pm 0.30	0.01 \pm 0.006*	0.03 \pm 0.01*	0.87 \pm 0.40

Los genes CDX, cuya expresión disminuye en células tumorogénicas (Werling *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004), presentan una disminución de su expresión (3.6-103 veces) con todos los tratamientos. Esta regulación a la baja se observa a partir de la tercera semana de tratamiento y se mantiene durante todo el periodo de exposición.

El gen *CD133*, un marcador de superficie de células madre, está sobreexpresado en las células procedentes de cánceres colorectales (Ricci-Vitiani *et al.*, 2007) y ha sido identificado como un posible marcador para este tipo de cáncer (Ren *et al.*, 2013). Su expresión aumenta en todos los tratamientos con As(III) en la 13ª semana (6.2-11.8 veces), con excepción de la concentración 0.2 mg/L. Sin embargo, la expresión de *CD133* no se modifica en las células tratadas con As(V).

4. Proliferación celular en medio con baja concentración de suero

Las figuras 25 y 26 muestran la tasa de proliferación, en medio con baja concentración de suero (1%), de células control y células crónicamente expuestas a As(III) (0.01, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L) y As(V) (0.5 y 1 mg/L), respectivamente, durante 6, 10 y 18 semanas.

Los resultados muestran que las células tratadas con As-i crecen más fácilmente en medio con baja concentración de suero que las células control, incluso las expuestas a las concentraciones más bajas del tóxico. Las células tratadas con As(III) 0.1 mg/L y As(V) 0.5 y 1 mg/L durante 6 semanas presentan una tasa de proliferación más alta (1.5-3.4 veces) que las células control, y esa tasa se mantiene durante las 24 semanas de tratamiento. Esta alta tasa de proliferación en medio con baja concentración de suero se observa a partir de la 10ª semana en las células tratadas con 0.05 y 0.2 mg/L de As(III).

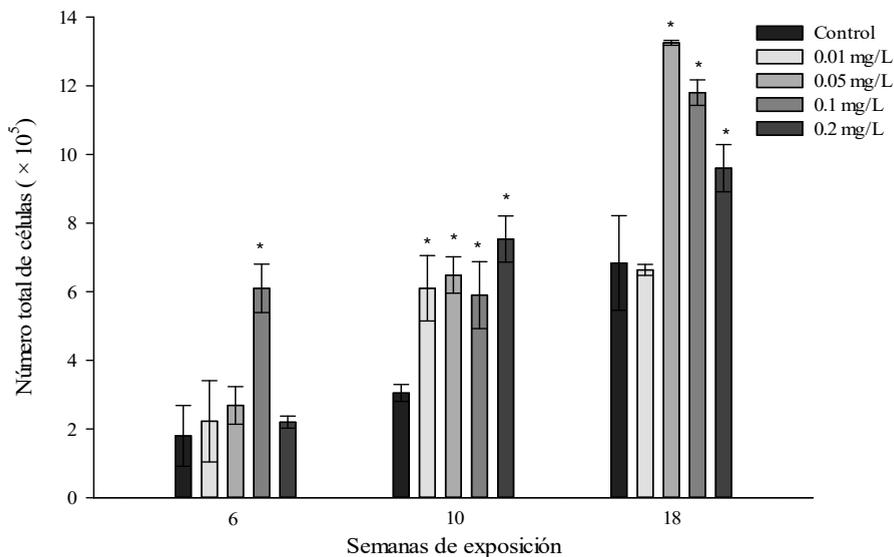


Figura 25. Tasa de proliferación de células NCM460 crónicamente expuestas a As(III) en medio con baja concentración de suero. Células control y células tratadas con As(III) (0.05, 0.01, 0.1 y 0.2 mg/L) durante 6, 10 y 18 semanas. Valores expresados como número total de células ($\times 10^5$) (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

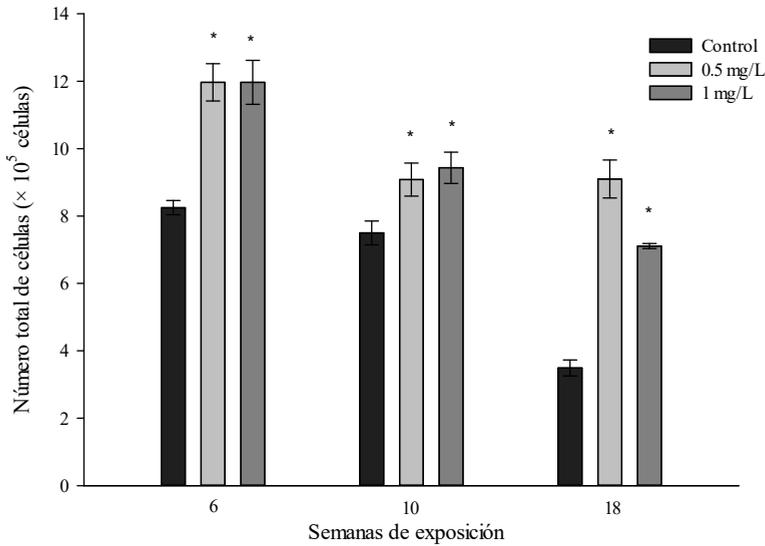


Figura 26. Tasa de proliferación de células NCM460 crónicamente expuestas a As(V) en medio con baja concentración de suero. Células control y células tratadas con As(V) (0.5 y 1 mg/L) durante 6, 10 y 18 semanas. Valores expresados como número total de células ($\times 10^5$) (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

5. Crecimiento independiente de anclaje en células intestinales

La exposición crónica a As(V) durante 24 semanas no produce un aumento en la formación de colonias independientes de anclaje en células NCM460 (figura 27). La figura 28 muestra la frecuencia de formación de colonias con un tamaño superior a 0.2 mm en células tratadas con As(III) respecto a células no tratadas. Para el As(III), sin embargo, las concentraciones 0.05 y 0.1 mg/L producen un mayor número de colonias independientes de anclaje (1.7 y 2.2 veces, respectivamente).

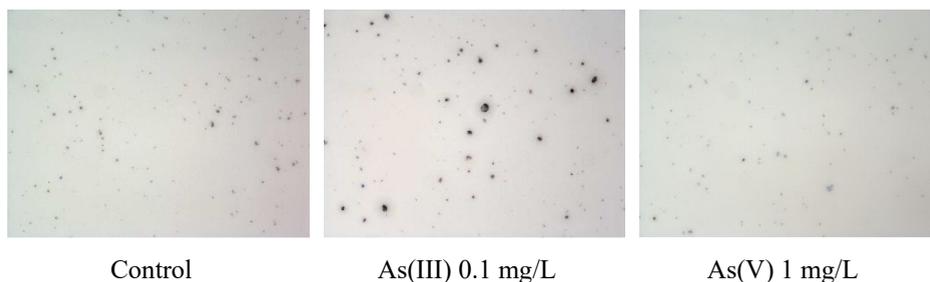


Figura 27. Imágenes de formación de colonias independientes de anclaje en células NCM460 expuestas crónicamente con As-i. Células control y células tratadas con As(III) 0.1 mg/L y As(V) 1 mg/L durante 24 semanas.

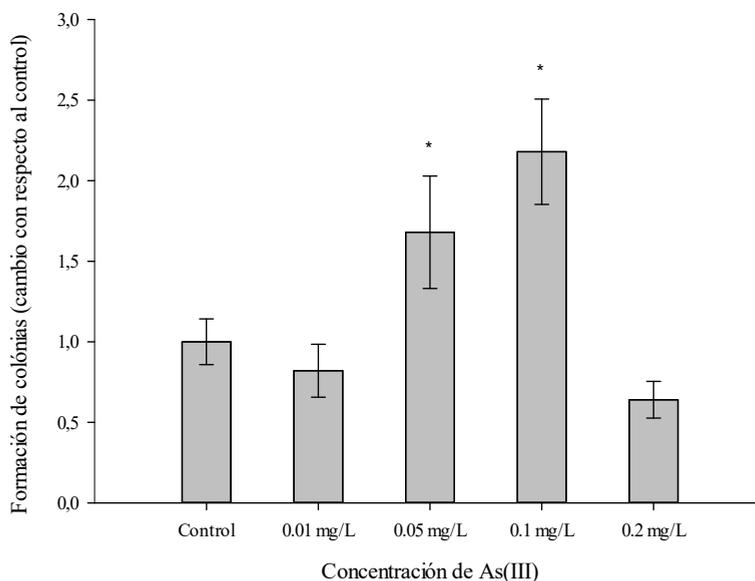


Figura 28. Formación de colonias independientes de anclaje en células NCM460 expuestas crónicamente a As(III). Células control y células tratadas con As(III) (0.01, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L) durante 24 semanas. Valores expresados como cantidad de colonias formadas respecto al control (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

6. Actividad de la MMP-2 y MMP-9

Las MMPs son endopeptidasas dependientes de zinc capaces de degradar la matriz extracelular. La desregulación de su actividad se ha vinculado a procesos cancerígenos (Kupai *et al.*, 2010; Herszenyi *et al.*, 2012). El estudio de la secreción de las MMPs se ha utilizado como marcador de la transformación celular inducida por el As-i en otros tipos celulares (Sun *et al.*, 2012b). En la figura 29 se representa la actividad MMP-2 y MMP-9 en el medio condicionado de células NCM460 crónicamente expuestas a As(III) (0.05 y 0.1 mg/L) durante 24 semanas.

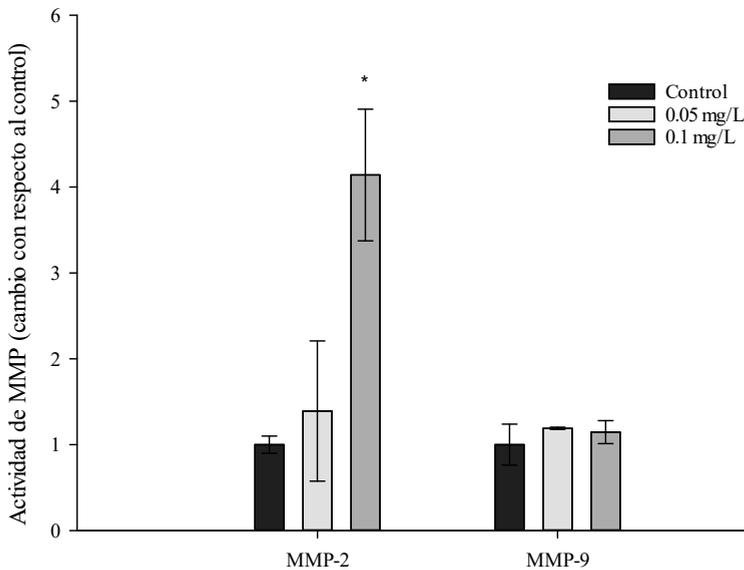


Figura 29. Actividad de MMP-2 y MMP-9 en células NCM460 crónicamente expuestas a As-i. Secreción de MMPs al medio de células control y células tratadas con As(III) (0.05 y 0.1 mg/L) durante 24 semanas. Valores expresados como nivel de actividad respecto al control (media \pm SD, n=2). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

La actividad de la MMP-2 aumenta en las células tratadas con As(III) 0.1 mg/L (4.1 veces) tras 24 semanas de exposición. En cambio, la actividad de la MMP-9 no se modifica tras la exposición crónica a As(III). El tratamiento crónico con As(V) no modifica la actividad de MMP-2 y MMP-9 en las células NCM460 (datos no mostrados).

7. Capacidad de formación de esferas flotantes

Con el objetivo de obtener esferas flotantes, las células NCM460 crónicamente expuestas a As(III) y As(V) durante 18 y 24 semanas se cultivaron en medio sin suero en condiciones de baja adherencia. La exposición a As(V) no aumenta la formación de esferas flotantes en ninguno de los tiempos ensayados (figura 30). Por lo que respecta al tratamiento con As(III) (figura 31), la exposición a 0.05 mg/L aumenta la producción de tumoroesferas tras 24 semanas de exposición (1.7 veces). Para los tratamientos con la concentración de 0.1 mg/L, el aumento se observa a partir de la semana 18 (1.9 veces, semana 18; 2.3 veces, semana 24).

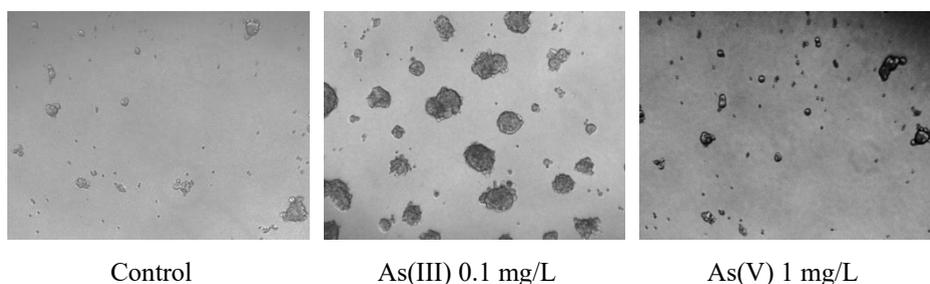


Figura 30. Imágenes de formación de tumoroesferas en células NCM460 crónicamente expuestas a As-i. Células control y células tratadas con As(III) 0.1 mg/L y As(V) 1 mg/L durante 24 semanas.

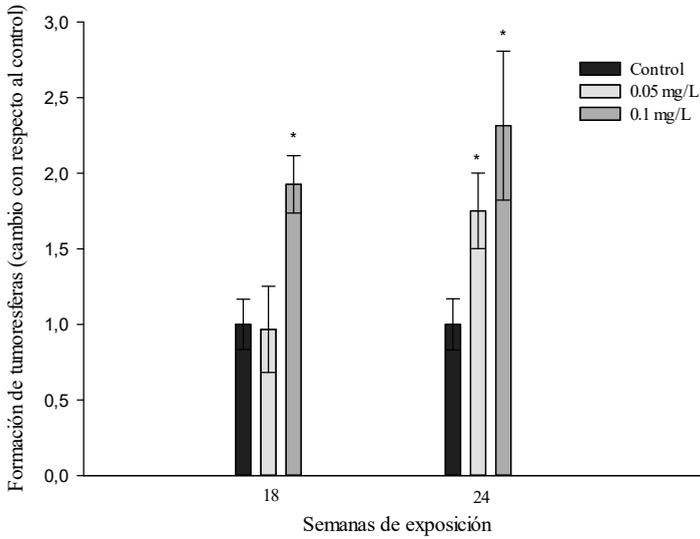


Figura 31. Formación de tumoresferas en células NCM460 expuestas crónicamente a As-i. Células control y células tratadas con As(III) (0.05 y 0.1 mg/L) durante 18 y 24 semanas. Valores expresados como cantidad de tumoresferas formadas respecto al control (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control.

DISCUSIÓN

Dentro de los estudios *in vitro* sobre la toxicidad de As-i en células epiteliales de colon, en el presente capítulo se ha evaluado la capacidad del As-i de generar células con características típicas de células tumorogénicas en exposiciones crónicas. Los resultados evidencian que tras 24 semanas de tratamiento con As(III) a concentraciones de 0.05 y 0.1 mg/L, las células epiteliales normales de origen colónico NCM460 presentan mayores ratios de hiperproliferación, crecimiento independiente de anclaje, y un aumento de los niveles de acetilación de la histona H3 y de la actividad de MMP-2. Adicionalmente, las células tratadas con As(III) presentan una mayor secreción de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 y una regulación a la baja de los genes *CDX1* y *CDX2* desde las primeras semanas de exposición, que se mantiene durante todo el tratamiento. Estos dos últimos efectos se observan también en células tratadas crónicamente con As(V); sin embargo, en este caso no aparecen ninguna de las características típicas de células transformadas.

En estos tres primeros capítulos se ha evidenciado la menor toxicidad de As(V) sobre las células epiteliales del intestino, al igual que ocurre en otros tipos celulares. Sin embargo, se observa en los tratamientos crónicos con As(V) una respuesta pro-inflamatoria mantenida en el tiempo, que podría dar lugar a efectos adversos a largo plazo. Posiblemente sean necesarios tiempos más largos de exposición para evidenciar estos desórdenes, tiempos que no pueden plantearse en estudios *in vitro*.

La inflamación crónica ha sido relacionada con varios estadios de la tumorogénesis, incluyendo la transformación celular, la progresión del tumor, la resistencia, la propagación, la invasión, la angiogénesis y la metástasis (Yasmin *et al.*, 2015). De hecho, la inflamación se considera un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal (Grivennikov *et al.*, 2010). Datos clínicos

demuestran que pacientes con cáncer colorrectal en estadio IV presentan un nivel de IL-8 en suero diez veces superior (1089 ± 311 pg/mL) al de personas sin evidencias de esta enfermedad (79 ± 56 pg/mL) (Ning *et al.*, 2011). *In vitro* se ha puesto de manifiesto que las células intestinales HCT116 y Caco-2 transfectadas con IL-8 generan tumores con mayor crecimiento y vascularización en implantes xenográficos (Ning *et al.*, 2011). De hecho, el tratamiento con SCH 527123, molécula antagonista del receptor de IL-8, reduce la proliferación celular, motilidad, invasividad, supervivencia y sensibilidad al oxaliplatino de estos xenoinjertos (Ning *et al.*, 2012).

Los resultados también evidencian un aumento de la actividad de MMP-2 en las células NCM460 expuestas a As(III) 0.1 mg/L durante 24 semanas. Estas proteínas, que son inducidas en procesos inflamatorios, pueden modular la inflamación, activando, inactivando o antagonizando las funciones biológicas de las citoquinas (Nissinen y Kähäri, 2014). En los últimos años se ha puesto de manifiesto que las MMPs median muchos de los cambios generados durante la progresión tumoral (Kessenbrock *et al.*, 2010). Además, en numerosos tipos de cáncer se ha reportado la regulación al alza de la expresión de varias MMPs, la cual está correlacionada con estadios avanzados y propiedades invasivas y de metástasis (Rundhaug, 2005). Parsons *et al.* (1998) demuestran que el ratio de MMP-2/proMMP-2 es veinte veces más alto en tejidos de cáncer colorrectal que en tejidos normales.

Este capítulo también pone de manifiesto que las células tratadas crónicamente con As-i presentan una regulación a la baja de los genes *CDX1* y *CDX2* desde la tercera semana de tratamiento. Los genes CDX modulan procesos como la proliferación, apoptosis, adhesión celular y morfología columnar en células intestinales, promoviendo la aparición de un fenotipo maduro (Guo *et al.*, 2004). Su regulación a la baja, sin embargo, está relacionada con procesos inflamatorios y cánceres colorrectales. Calon *et al.* (2007) han demostrado una

asociación de la expresión de *CDX2* con la inflamación en modelos experimentales de colitis. Además, Kim *et al.* (2012) evidencian que la expresión de *CDX2* está reprimida por la citoquina pro-inflamatoria TNF α . Varios estudios también han descrito una relación inversa entre la expresión de *CDX1* y *CDX2* y el grado de displasia y severidad del cáncer colorrectal, sugiriendo que una expresión alterada de estos genes está asociada con este tipo de proceso cancerígeno. Mallo *et al.* (1998) demuestran que ambos genes (*CDX1* y *CDX2*) deben estar expresados para reducir el potencial tumorigénico, aumentar la sensibilidad a la apoptosis, y reducir la migración celular en células HT29, células intestinales procedentes de un adenocarcinoma de colon.

En las células intestinales tratadas crónicamente con As(III) también se observa un aumento del nivel de histonas modificadas, en concreto una mayor acetilación de la histona H3, que se evidencia tras 20 semanas de tratamiento a las concentraciones de 0.05 y 0.1 mg/L. En células cancerígenas, la pérdida del equilibrio entre las actividades acetiltransferasas y desacetilasas de las histonas contribuyen a la inactivación transcripcional de genes supresores del tumor (Jia y Guo, 2013). Zhou *et al.* (2008) observan una alteración significativa de las modificaciones de las histonas inducidas por dosis bajas de As(III) (0.1 μ M) en células de pulmón, y sugieren que el As-i induce la carcinogénesis a través de alteraciones de los perfiles de metilación de histonas específicas. En cáncer colorrectal, también se han detectado patrones aberrantes de modificación de histonas (Gargalionis *et al.*, 2012; Karczmarski *et al.*, 2014). Así, Karczmarski *et al.* (2014) observan un aumento de la acetilación en el residuo K23 de la histona H3 en cáncer colorrectal, modificación que está asociada con elementos activadores de la expresión génica, sugiriendo un posible papel de esta acetilación en la regulación de genes cuya expresión se modifica en este tipo de cánceres.

Los eventos anteriormente descritos en células tratadas crónicamente con As(III) (respuesta pro-inflamatoria, modificación de histonas, liberación de

MMPs, desregulación de la expresión de *CDX1* y *CDX2*) se traducen en cambios importantes en el crecimiento celular, con un aumento de la proliferación, un mayor número de colonias cuyo crecimiento es independiente de anclaje y un incremento de la formación de tumoresferas *in vitro*. Todas estas características se asocian con la adquisición de un fenotipo tumorigénico.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente capítulo muestran que células normales de epitelio intestinal pueden presentar un incremento de los caracteres típicos de células transformadas cuando se exponen crónicamente a As(III), a concentraciones similares a las encontradas en el agua de bebida de áreas endémicas. Este incremento va acompañado de un proceso pro-inflamatorio que se inicia desde las primeras semanas de exposición y que podría ser en parte el responsable de la transformación celular. Al igual que en los otros estudios *in vitro* de esta tesis, se requieren evaluaciones *in vivo* para confirmar estas posibles transformaciones. En este caso, sería adecuado también realizar estudios epidemiológicos en zonas con exposiciones crónicas a As-i centrados en evaluar la incidencia de enfermedades inflamatorias intestinales crónicas y la prevalencia de cáncer colorrectal en las poblaciones expuestas.

Capítulo 4

Evaluación *in vivo* de los efectos de una exposición subcrónica a arsénico inorgánico en el epitelio intestinal

Los estudios *in vitro* realizados hasta el momento en esta tesis han evidenciado que exposiciones agudas a As-i, principalmente a la forma trivalente, generan estrés oxidativo y una respuesta pro-inflamatoria, así como una redistribución de las proteínas que forman las uniones intercelulares responsables del mantenimiento de la estructura del epitelio intestinal (capítulo 1). Asimismo, las exposiciones subcrónicas producen una respuesta pro-inflamatoria mantenida en el tiempo, que posiblemente es la causante de la pérdida de la función barrera de las monocapas intestinales y la desregulación del proceso de renovación celular observadas en células intestinales expuestas subcrónicamente a As(III) (capítulo 2). Esta respuesta inflamatoria se mantiene también en exposiciones crónicas *in vitro* y va acompañada de la adquisición de características típicas de células transformadas (capítulo 3).

La problemática que deriva de estos efectos ha sido ya descrita a lo largo de la tesis; por tanto, teniendo en cuenta el gran número de individuos expuestos crónicamente a la forma inorgánica de este metaloide, se considera necesario confirmar los efectos *in vivo*. El objetivo de este capítulo de tesis es evaluar *in vivo* si la exposición a As(III) afecta a la estructura y funcionalidad del epitelio intestinal.

RESULTADOS

De los animales tratados en el presente estudio, en el grupo expuesto a la dosis más elevada (80 mg/L) fue necesario el sacrificio de dos de ellos antes del término del ensayo, en concreto en la 4ª semana, al haber experimentado una pérdida de peso superior al 20% y presentar síntomas de dolor abdominal. El resto de animales no presentaron cambios físicos destacables, siendo los pesos a lo largo del estudio similares en todos los grupos (pesos al final del ensayo: control: 19-23 g; 20 mg/L: 18-22 g; 50 mg/L: 18-22 g; 80 mg/L: 16-21 g).

1. Acumulación de arsénico en el intestino

La figura 32 muestra la concentración de As acumulada en intestino grueso y delgado de ratones control y ratones tratados con As(III) durante dos meses. El análisis de varianza indica una diferencia estadísticamente significativa entre los contenidos hallados en ambas porciones, siendo superior la acumulación de As en el intestino grueso. Las acumulaciones tisulares son mayores a las concentraciones más altas, aunque teniendo en cuenta el tiempo de duración del tratamiento y las dosis empleadas, en ningún caso se trata de acumulaciones elevadas.

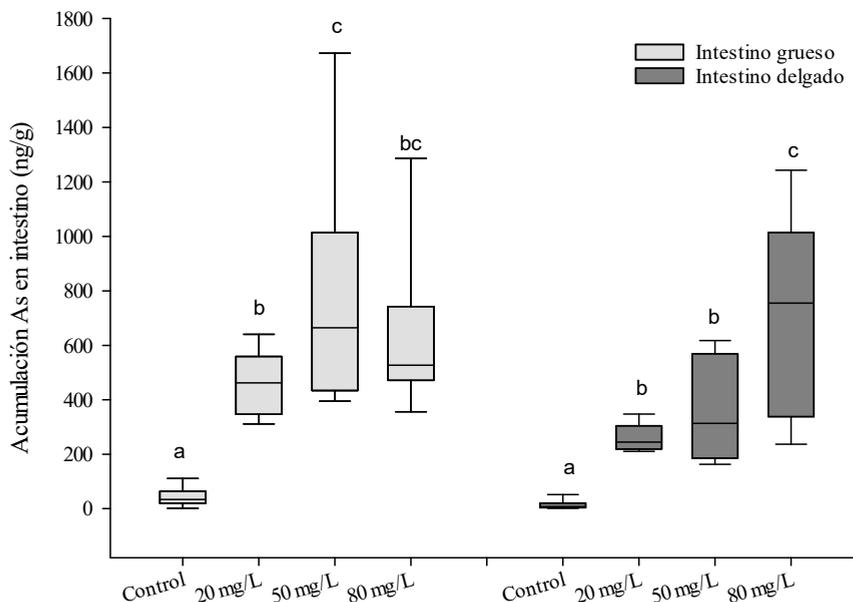


Figura 32. Acumulación de As en intestino grueso y delgado de ratones tratados con As(III). Animales control y animales tratados con As(III) (20, 50 y 80 mg/L) durante 2 meses. Valores expresados como ng As/g de intestino (n=7-9). La línea central de la caja representa las medianas y los límites inferiores y superiores de la caja muestran los percentiles 25 y 75 respectivamente. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo tramo de intestino ($p < 0.05$).

2. Evaluación del estrés oxidativo en el intestino

La figura 33 muestra la formación de DCF en muestras de intestino delgado y grueso de animales control y animales tratados con distintas dosis de As(III) durante 2 meses. Los tejidos procedentes del intestino delgado no muestran una mayor proporción de especies reactivas respecto al control. En el tejido procedente del intestino grueso, por el contrario, se observa un aumento de la generación de ROS y/o RNS a las dosis más altas (medianas: control, 205 UAF/mg tejido; 20 mg/L, 202 UAF/mg tejido; 50 mg/L, 350 UAF/mg tejido; 80 mg/L, 376 UAF/mg tejido). Estos datos evidencian un estrés oxidativo en intestino grueso como consecuencia de la exposición subcrónica a As(III).

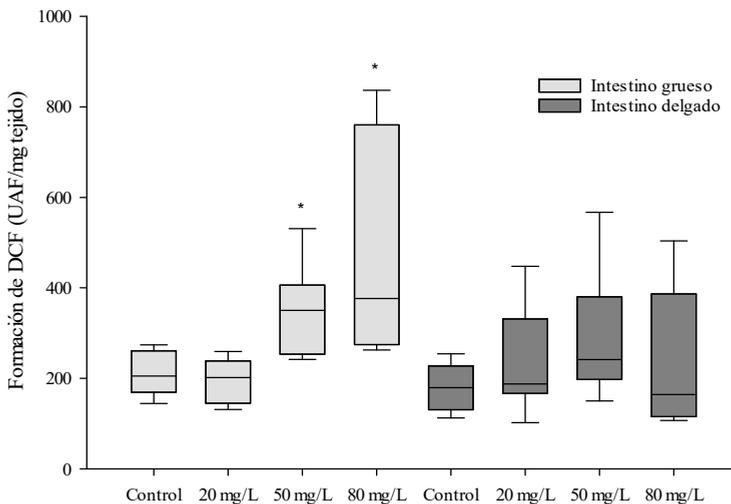


Figura 33. Generación de ROS y/o RNS en intestino grueso y delgado de ratones tratados con As(III). Formación de DCF en animales control y animales tratados con As(III) (20, 50 y 80 mg/L) durante 2 meses. Valores expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF)/mg tejido (n=7-9). La línea central de la caja representa las medianas y los límites inferiores y superiores de la caja muestran los percentiles 25 y 75 respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a los ratones control.

3. Evaluación de la respuesta pro-inflamatoria intestinal

3.1. Expresión génica de citoquinas

La tabla 17 muestra la expresión relativa de *Il-1β*, *Il-6*, *Il-2*, *Mip-2* y *Tnfa* en tejidos procedentes del intestino grueso. Los resultados indican una sobreexpresión de *Mip-2* e *Il-2* a todas las dosis ensayadas y de *Il-1β* e *Il-6* a las dosis más altas.

Sólo se ha evaluado la expresión relativa de los genes de interés en el intestino grueso porque el ARN procedente del intestino delgado mostraba signos de degradación. Heumüller-Klug *et al.* (2015) ponen de manifiesto la dificultad de la extracción de RNA de intestino delgado de humanos y ratones, indicando que se degrada más rápidamente que el del colon.

Tabla 17. Efecto de la exposición a As(III) sobre la expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias en el intestino grueso de ratones. Expresión relativa de *Il-1β*, *Il-6*, *Mip-2*, *Il-2* y *Tnfa* en animales tratados con As(III) (20, 50 y 80 mg/L) durante 2 meses. Valores expresados como nivel de cambio de la expresión (media ± SD, n = 7-9). Los asteriscos indican aumentos estadísticamente significativos con respecto al control (p<0.05).

	<i>Il1β</i>	<i>Il6</i>	<i>Mip2</i>	<i>Il2</i>	<i>Tnfa</i>
20 mg/L	0.93 ± 0.46	1.42 ± 0.49	1.50 ± 0.51*	2.40 ± 0.64*	1.32 ± 0.65
50 mg/L	8.77 ± 3.81*	2.15 ± 1.16	1.71 ± 0.70*	2.50 ± 0.68*	1.21 ± 0.63
80 mg/L	19.3 ± 19.4*	4.18 ± 2.92*	5.08 ± 2.95*	4.12 ± 1.80*	2.03 ± 1.14

3.2. Expresión proteica de citoquinas

Para aquellas citoquinas que presentaban una regulación al alza en el intestino grueso, determinada a través de la expresión génica (apartado 3.1), se evaluó la concentración proteica. Las figuras 34A y 34B muestran, respectivamente, la

cantidad de la citoquina pro-inflamatoria IL-2 e IL-6 en muestras de intestino grueso de ratones control y ratones tratados a diferentes dosis de As(III).

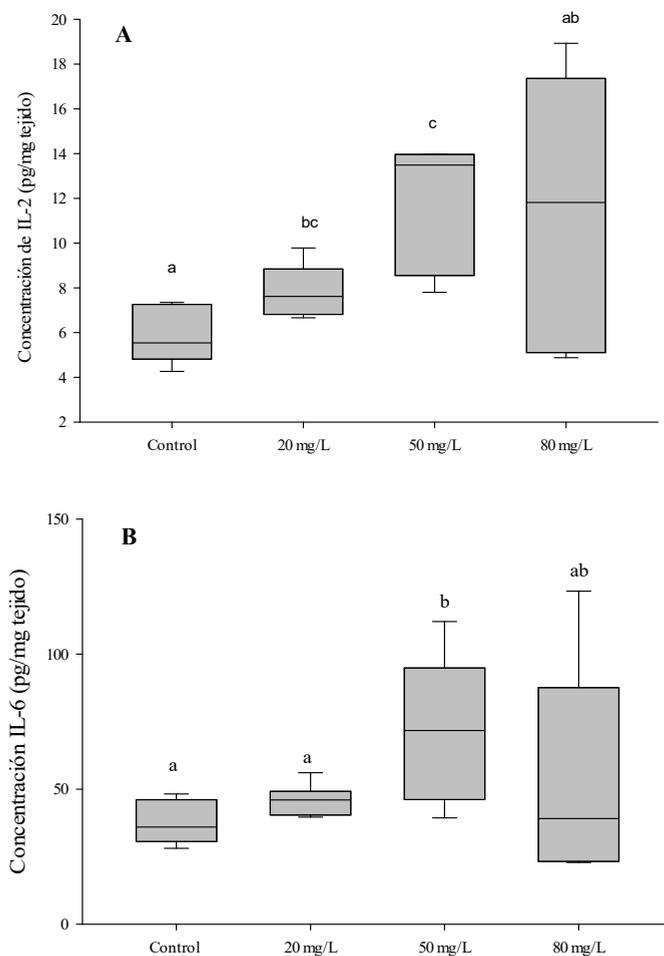


Figura 34. Concentración de citoquina pro-inflamatoria IL-2 (A) e IL-6 (B) en intestino grueso de ratones tratados con As(III). Animales control y animales tratados con As(III) (20, 50 y 80 mg/L) durante 2 meses. Valores expresados como pg/mg tejido (n=7-9). La línea central de la caja representa las medianas y los límites inferiores y superiores de la caja muestran los percentiles 25 y 75 respectivamente. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Para la IL-2, se observan aumentos significativos en los tratamientos con 20 mg/L (35%) y 50 mg/L (136%), mientras que la cantidad de IL-6 es estadísticamente superior al control sólo en los animales tratados con 50 mg/L (89%). A diferencia de lo observado a nivel transcripcional, la dosis más elevada de As(III) no conlleva aumentos significativos de la cantidad de ambas citoquinas, debido en parte a la elevada variabilidad interindividual.

Las concentraciones de citoquinas encontradas en el intestino delgado de los ratones control y tratados con As(III) están por debajo del límite de detección de la metodología empleada (datos no mostrados).

4. Evaluación del daño tisular intestinal

El daño tisular se determinó a través de la concentración sérica de la proteína intestinal de unión de ácido grasos (iFABP). La expresión de esta proteína varía a lo largo del eje duodeno-colon, siendo más abundante en el intestino delgado tanto en roedores como en humanos (Gordon *et al.*, 1985; Pelters *et al.*, 2003). La iFABP se libera rápidamente a la circulación si se produce un daño de la mucosa (Funaoka *et al.*, 2010), por lo que se considera un buen marcador sérico de daño intestinal.

La figura 35 muestra la concentración sérica de iFABP en los animales control y los tratados con As(III). A diferencia de lo esperado, los tratamientos con As(III) no incrementan significativamente la concentración de esta proteína en sangre. Una posible explicación a este hecho es la relacionada con su expresión diferencial según los segmentos intestinales. En el presente estudio la mayoría de parámetros evaluados indican una mayor afección del intestino grueso que del delgado. Según los estudios en roedores, la expresión de iFABP en colon es muy baja; por lo que el daño sobre esta porción intestinal podría no ser cuantificable mediante cambios séricos de iFABP.

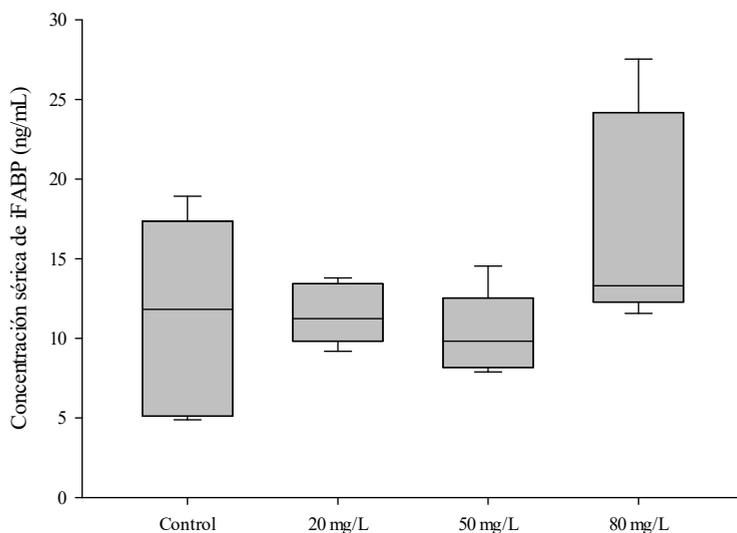


Figura 35. Concentración sérica de iFABP en ratones tratados con As(III). Animales control y animales tratados con As(III) (20, 50 y 80 mg/L) durante 2 meses. Valores expresados como ng/mL (n=7-9). La línea central de la caja representa las medianas y los límites inferiores y superiores de la caja muestran los percentiles 25 y 75 respectivamente.

5. Estudios estructurales del intestino

Los estudios histológicos muestran que el intestino delgado no presenta anomalías destacables en los animales tratados con As-i (datos no mostrados). Las observaciones del tejido procedente del intestino grueso muestran efectos adversos, especialmente en animales expuestos a las concentraciones más elevadas de As(III). De los siete animales tratados con 80 mg/L, cinco presentan una inflamación moderada de la mucosa, dos de los cuales también muestran una mínima inflamación de la submucosa e hiperplasia de las criptas. Esta hiperplasia se evidencia por la presencia de criptas alargadas debido al aumento de las células epiteliales (figura 36).

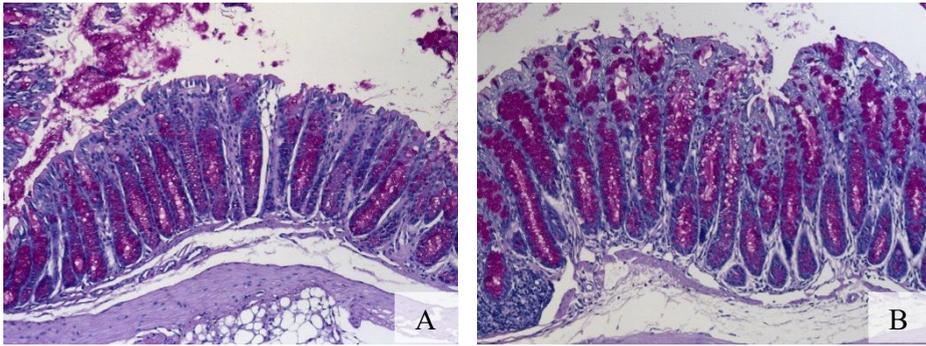


Figura 36. Estudio histológico del intestino grueso de ratones tratados con As(III). Sección del tejido, teñida con PAS, procedente de un animal control (A) y un animal tratado con 80 mg/L durante 2 meses (B). Amplificación 100 ×.

Por otro lado, la densidad de células caliciformes determinada mediante tinción PAS no varía significativamente entre tratamientos [células PAS⁺/cripta: control (12.6 ± 4.9); 20 mg/L (11.5 ± 4.4); 50 mg/L (12 ± 7.4); 80 mg/L (18 ± 3.3)]; sin embargo, la expresión de *MUC2* se reduce de forma considerable a medida que se incrementa la dosis de exposición (20 mg/L, 2.4 veces; 50 mg/L, 5.4 veces; 80 mg/L, 11.1 veces).

6. Evaluación de la permeabilidad intestinal

La permeabilidad intestinal se determinó a través del análisis de la concentración de albúmina fecal. La albúmina es una proteína globular producida por los hepatocitos, que representa aproximadamente el 50% del contenido proteico en sangre y cuyo almacenamiento intracelular es prácticamente nulo. Una barrera epitelial y endotelial intacta, previene el paso de la albúmina desde el torrente sanguíneo al lumen intestinal, mientras que situaciones donde la integridad de la barrera intestinal esté alterada pueden dar lugar a un aumento de la permeabilidad, favoreciendo el paso de la albúmina al lumen y su aparición en heces (Nicholson

et al., 2000). La figura 37 muestra la concentración de albúmina en las heces de ratones control y ratones tratados con las diferentes dosis de As(III).

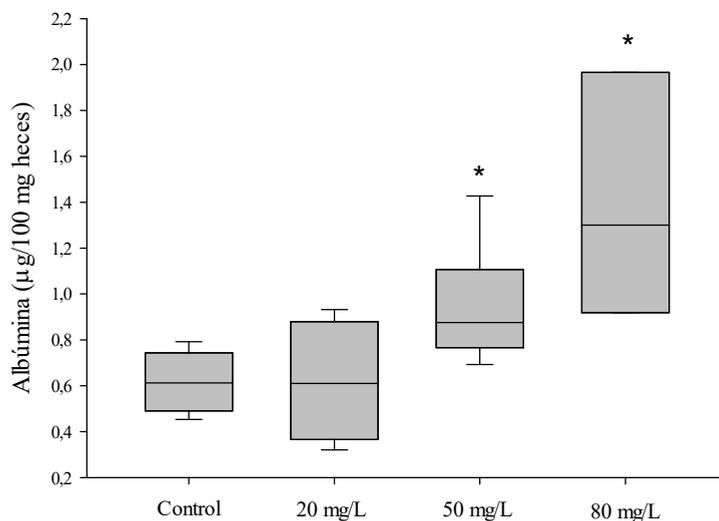


Figura 37. Efecto de la exposición crónica a As(III) sobre la permeabilidad intestinal en ratones. Concentración de albúmina en heces de animales control y animales tratados con As(III) (20, 50 y 80 mg/L) durante 2 meses. Valores expresados como $\mu\text{g}/100 \text{ mg heces}$ ($n=7-9$). La línea central de la caja representa las medianas y los límites inferiores y superiores de la caja muestran los percentiles 25 y 75 respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a los ratones control.

Los resultados muestran que existen aumentos estadísticamente significativos de la albúmina fecal en los ratones tratados con 50 mg/L (mediana: $0.85 \mu\text{g}/100 \text{ mg heces}$; porcentaje de aumento: 39%) y 80 mg/L (mediana: $1.3 \mu\text{g}/100 \text{ mg heces}$; porcentaje de aumento: 112%) respecto a los ratones control (mediana: $0.61 \mu\text{g}/100 \text{ mg heces}$).

7. Efecto sobre la expresión de las proteínas de las uniones intercelulares

La expresión de las proteínas de las uniones intercelulares está afectada en los estudios *in vitro* (capítulo 1, apartado 4) y se ha apuntado como una de las causas

del aumento de la permeabilidad observado en las células Caco-2. En este capítulo, se ha evaluado si los cambios de permeabilidad evidenciados en animales también están acompañados de cambios en la expresión de las proteínas de las uniones. La tabla 18 muestra la expresión relativa de *Cldn-1*, *-2* y *-4* y *Zo-1* en tejidos procedentes del intestino grueso. Los resultados indican que no hay cambios en la expresión de las proteínas de las uniones en ninguna de las dosis ensayadas.

Tabla 18. Efecto de la exposición a As(III) sobre la expresión génica de las proteínas de las uniones intercelulares en el intestino grueso de ratones. Expresión relativa de *Cldn-1*, *-2*, *-4* y *Zo-1* en animales control y animales tratados con As(III) (20, 50 y 80 mg/L) durante 2 meses. Valores expresados como nivel de cambio de expresión respecto a los animales control (media \pm SD, n=7-9).

	<i>Cldn-1</i>	<i>Cldn-2</i>	<i>Cldn-4</i>	<i>Zo-1</i>
20 mg/L	1.79 \pm 0.62	1.81 \pm 1.05	0.84 \pm 0.19	1.34 \pm 0.31
50 mg/L	1.19 \pm 0.46	0.93 \pm 0.46	0.78 \pm 0.18	1.22 \pm 0.28
80 mg/L	1.18 \pm 1.02	0.83 \pm 0.77	0.86 \pm 0.29	1.26 \pm 0.89

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente estudio evidencian un aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias en el intestino grueso de los animales tratados con concentraciones de As(III) iguales o mayores a 50 mg/L, confirmando los datos obtenidos *in vitro* en los capítulos anteriores de la tesis. Esta es la primera evidencia *in vivo* de que este proceso inflamatorio puede instaurarse en el intestino de ratones expuestos a As(III).

La mayor expresión génica (tabla 19) y proteica (figura 34) de citoquinas pro-inflamatorias en el intestino de animales tratados con As(III) puede ser debido a la producción de ROS/RNS, que tal y como se ha evidenciado está incrementada en el intestino grueso de animales tratados con concentraciones iguales o mayores a 50 mg/L (figura 33). Se conoce que la señalización redox modula estrechamente la respuesta pro-inflamatoria. El aumento de ROS/ RNS puede activar cascadas de transducción de señales, así como inducir cambios en factores de transcripción como NF- κ B, lo que conlleva la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento que pueden incrementar a su vez las respuestas redox y inflamatoria (Morgan y Liu, 2011; Lei *et al.*, 2015).

El aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como consecuencia de ambos estímulos (ROS y As-i) ha sido demostrado en poblaciones expuestas a través del agua de bebida. Ahmed *et al.* (2011) evalúan la causa del aumento de marcadores de inflamación en la placenta de mujeres expuestas durante el embarazo y muestran que la regulación al alza de la expresión de TNF α e IL-6 está asociada al estrés oxidativo, mientras que el aumento transcripcional de IL-1 β está vinculado al estrés, pero también a los niveles de ingesta de As.

Al igual que ocurre *in vitro*, la respuesta pro-oxidante y pro-inflamatoria va acompañada de alteraciones estructurales y funcionales del epitelio. La histología muestra hiperplasia de las criptas en algunos de los tejidos de los animales

tratados con la dosis más alta de As(III) e inflamación de la mucosa y en algunos casos de la submucosa. Adicionalmente, se evidencia una menor expresión de *MUC2* en los animales tratados con As(III). En condiciones fisiológicas, las células caliciformes producen continuamente mucinas para reponer y mantener la capa de mucus que rodea el epitelio intestinal; sin embargo, la función de la célula caliciforme puede verse alterada por varios factores, entre los que se encuentran las citoquinas pro-inflamatorias (Enss *et al.*, 2000). El tracto gastrointestinal tiene una gran superficie expuesta al contenido intestinal y es, como tal, un importante punto de entrada de patógenos y otras sustancias tóxicas. El sistema de defensa del organismo contra este desafío consta de varios niveles. El primer nivel es la capa de mucus estratificado que junto con el glicocáliz de las células epiteliales proporciona protección física. En ausencia de una capa de mucus, como ocurre en ratones *Muc2^{-/-}*, la colonización de patógenos entéricos ocurre en mayor medida y más fácilmente que en animales tipo salvaje (Bergstrom *et al.*, 2010). El hecho de que los animales tratados con As(III) presenten una menor expresión de *MUC2* puede suponer una pérdida de la integridad de la capa de mucus y por tanto una reducción de la efectividad de este primer nivel de defensa.

El segundo componente del sistema de defensa lo constituyen las células epiteliales que forman una monocapa celular continua interconectada por las uniones estrechas, que tal y como se ha comentado previamente, son las responsables del mantenimiento de la estructura y polarización del epitelio intestinal, y las que le proporcionan su permeabilidad selectiva. En el presente capítulo también se evidencia un aumento de la permeabilidad en los animales tratados con concentraciones iguales o mayores a 50 mg/L (figura 37), hecho que confirma los datos previamente reportados *in vitro* (capítulo 1 y 2). A diferencia de lo que ocurre *in vitro*, en la exposición *in vivo* no se observa una reducción de la expresión de las proteínas que conforman las uniones intercelulares (tabla 19).

En este caso el cambio de permeabilidad podría deberse a una modificación de los patrones de distribución de estas proteínas, hecho que también se ha evidenciado *in vitro*.

Estos datos sugieren que en exposiciones crónicas podría instaurarse un proceso inflamatorio intestinal crónico, desencadenante de posibles patologías crónicas a nivel intestinal e incluso sistémico (Arrieta *et al.*, 2006), debido en parte al aumento de la permeabilidad intestinal. La pérdida o déficit de la función barrera se considera un determinante crítico en la predisposición a presentar procesos inflamatorios a nivel intestinal, tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y las alergias alimentarias (apartado 6.3, introducción). Tal y como se ha comentado previamente, no existen estudios poblacionales donde se haya evaluado de forma detallada la existencia de este tipo de patologías. Por otro lado, el aumento de la permeabilidad parece estar asociado a otras patologías como la diabetes tipo II (Cox *et al.*, 2017) o ciertas enfermedades cardiovasculares (Rogler y Rosano, 2014; Li *et al.*, 2016a), que se sabe que presentan una mayor incidencia en poblaciones expuestas crónicamente a As-i.

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente capítulo permiten concluir que la exposición subcrónica a As-i en ratones afecta en mayor medida al intestino grueso que al delgado, aunque la acumulación tisular del metaloide en ambas porciones intestinales es semejante. La pérdida de la función barrera en animales tratados se debe a un mecanismo muy similar al evidenciado *in vitro*.

Este es el primer estudio que muestra la toxicidad a nivel intestinal del As-i *in vivo*. Se requieren más investigaciones, empleando dosis más bajas y tiempos más prolongados, para determinar si emulando las condiciones existentes en las

zonas de arsenicismo crónico endémico también se observan efectos tóxicos a nivel intestinal. Asimismo, sería de interés determinar, de existir este patrón de toxicidad en exposiciones a largo plazo, si éste puede estar relacionado con alguna de las patologías sistémicas asociadas a la exposición crónica a As-i.

Capítulo 5

**Evaluación del efecto protector de bacterias lácticas
y suplementos dietéticos sobre la toxicidad intestinal
del arsénico inorgánico**

Los estudios de capítulos previos de esta tesis han mostrado la toxicidad del As-i sobre el epitelio intestinal. Teniendo en cuenta las repercusiones de esta toxicidad, resulta de interés buscar estrategias que reduzcan estos efectos, que en el caso del As-i pueden agravarse en las zonas endémicas, donde existe una exposición crónica al metaloide.

La mayoría de estrategias empleadas para reducir la toxicidad de As-i tiene como principio modular la toxicocinética del metaloide, aumentando el metabolismo del As-i y su posterior excreción (apartado 5.3, introducción). El empleo de compuestos derivados de vegetales con carácter antioxidante también ha sido considerado; sin embargo, en pocos casos se han empleado suplementos vegetales existentes ya en el mercado, cuya seguridad está probada, o cepas de bacterias lácticas con status GRAS (*generally accepted as safe*).

El objetivo de este capítulo es la evaluación del efecto protector de diferentes suplementos alimentarios con carácter antioxidante y/o antiinflamatorio y varias cepas de bacterias lácticas [*L. acidophilus* (BL17), *L. casei* (BL23) y *L. brevis* (BL36)] sobre la toxicidad intestinal del As-i.

RESULTADOS

1. Efecto de las estrategias sobre el estrés oxidativo

De las cuatro dosis de exposición aguda a As-i empleadas en el capítulo 1 [As(III) 1 y 3 mg/L; As(V) 5 y 8 mg/L], las células Caco-2 presentan un aumento de la generación de ROS y/o RNS respecto a las células control solamente en el tratamiento con As(III) 3 mg/L. Esta ha sido la dosis ensayada en este apartado.

La figura 38 muestra el efecto de las cepas de bacterias lácticas y de sus medios condicionados sobre la generación de ROS y/o RNS en células Caco-2 expuestas a As(III) 3 mg/L. La pre-incubación con BL17 y BL23 y la

co-incubación con el medio condicionado de ambas cepas reducen la generación de ROS/RNS iniciada por el As(III) en células Caco-2 (porcentajes de reducción de las cepas: 13-17%; porcentajes de reducción de los medios: 12-15%); sin embargo, la cepa BL36 y su medio condicionado no son efectivos.

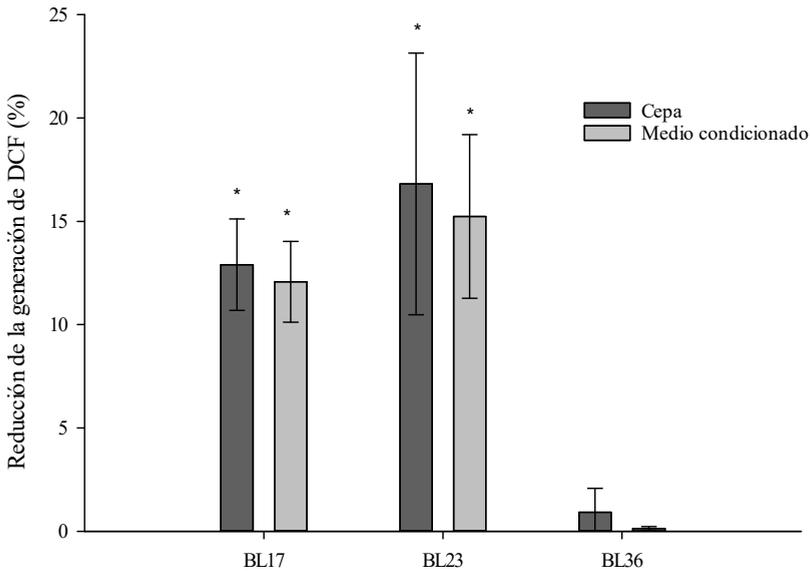


Figura 38. Efecto de bacterias lácticas y sus medios condicionados sobre la generación de ROS y/o RNS ocasionada por el As(III). Generación de DCF en células Caco-2 expuestas a As(III) 3 mg/L durante 24 h tras pre-incubación con bacterias lácticas (0.3 DO) durante 2 h, y en células co-expuestas con As(III) y medio condicionado durante 24 h. Valores expresados como porcentajes de reducción respecto a las células tratadas solamente con As(III) 3 mg/L (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células tratadas sólo con As(III).

En cuanto a los suplementos dietéticos ensayados (figura 39), sólo los extractos de cacao y de semilla de uva son capaces de reducir la generación de ROS/RNS (porcentajes de reducción del cacao: 31%; porcentajes de reducción de la semilla de uva: 13%).

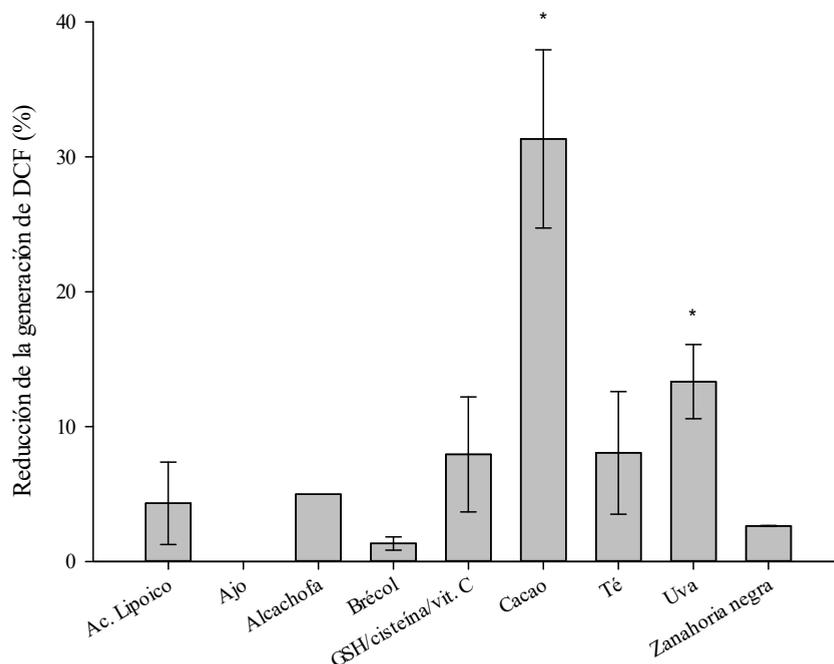


Figura 39. Efecto de los suplementos dietéticos sobre la generación de ROS y/o RNS ocasionada por el As(III). Generación de DCF en células Caco-2 expuestas a As(III) 3 mg/L y componentes alimentarios (100 mg/L) durante 24 h. Valores expresados como porcentajes de reducción respecto a las células tratadas solamente con As(III) 3 mg/L (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células tratadas sólo con As(III).

2. Efecto de las estrategias sobre la respuesta pro-inflamatoria

Las figuras 40 y 41 muestran el efecto sobre la liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 de la incubación con *Lactobacillus* previo a la exposición a As-i y de la co-exposición con el medio condicionado, respectivamente. Los ensayos se han realizado con los tratamientos que generaban una respuesta pro-inflamatoria en las exposiciones agudas (figura 10, capítulo 1).

La pre-incubación con las cepas de BL23 y BL17 (figura 40) no reduce la respuesta pro-inflamatoria causada por el As(III), mientras que la cepa BL36 disminuye significativamente la liberación de IL-8 (aproximadamente 40% de reducción en ambas concentraciones). Sin embargo, ninguna de las cepas protege frente a la respuesta generada por la exposición a As(V).

En algunos de los tratamientos con bacterias se observa un aumento de la liberación de IL-8 respecto al control positivo. Esto podría deberse a que algunas bacterias persisten en contacto con las células Caco-2 tras el lavado y producen una acidificación del medio durante las 24 h de tratamiento con As-i, tal y como evidencia el viraje del color del medio. En estas condiciones podría estar favoreciéndose el incremento de la liberación de proteínas pro-inflamatorias. Este hecho, resultado del tipo de diseño experimental, no debe suponer un hándicap a la hora de considerar como adecuada la estrategia basada en bacterias lácticas vivas, ya que no debe reproducirse *in vivo*.

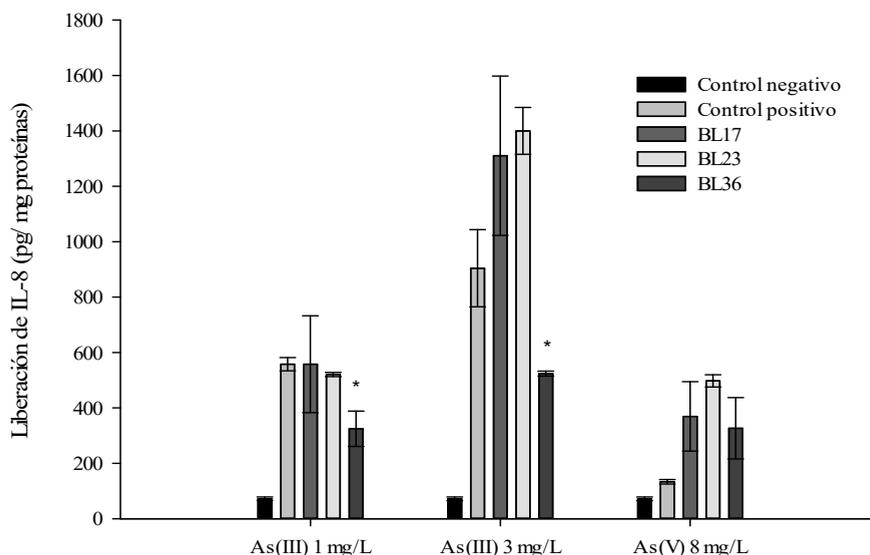


Figura 40. Efecto de bacterias lácticas sobre la respuesta pro-inflamatoria ocasionada por el As-i en células intestinales. Liberación de IL-8 al medio de cultivo en células Caco-2 control (negativo), células expuestas a As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) 8 mg/L durante 24 h (control positivo) y células incubadas con las bacterias lácticas BL17, BL23 y BL36 (0.3 DO) durante 2 h previo al tratamiento con As-i. Valores expresados como pg/mg de proteína (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican reducciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control positivo.

La co-exposición con el medio condicionado de las tres cepas de *Lactobacillus* (figura 41) produce reducciones similares en las células tratadas con As(III) (BL17: 34-48%; BL23: 29-44%; BL36: 29-44%). Tal y como ocurre con la pre-incubación con las cepas, la co-exposición con el medio condicionado no protege las células Caco-2 frente a la respuesta generada por la exposición a As(V). El uso del medio condicionado es más eficaz que el uso de bacterias vivas probablemente porque el empleo de medio condicionado no acidifica el medio de tratamiento celular.

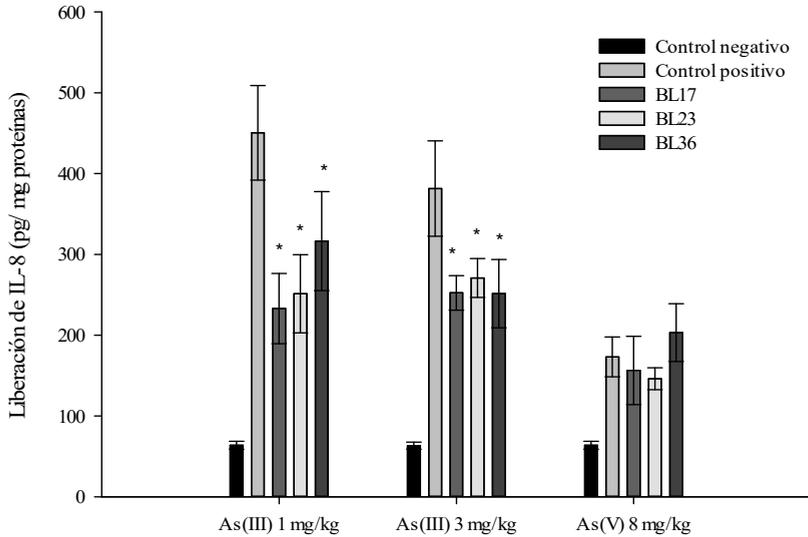


Figura 41. Efecto de los medios condicionados de bacterias lácticas sobre la respuesta pro-inflamatoria ocasionada por el As-i en células intestinales. Liberación de IL-8 al medio de cultivo en células Caco-2 control (negativo), células expuestas a As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) 8 mg/L durante 24 h (control positivo), y células co-expuestas a As-i y medio condicionado de las bacterias lácticas. Valores expresados como pg/mg de proteína (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control positivo.

En relación a los suplementos dietéticos (figura 42), el ácido lipoico es el suplemento que presenta una mayor capacidad antiinflamatoria, reduciendo en 28-41% la liberación de IL-8 ocasionada por los tratamientos con As(III). El suplemento de GSH/cisteína/vitamina C y los extractos de té verde y zanahoria negra también reducen la liberación de IL-8 en células expuestas a 3 mg/L de As(III) (porcentajes de reducción: 32, 25 y 38%, respectivamente). Ninguno de los suplementos ensayados es capaz de disminuir la liberación de IL-8 ocasionada por el As(V).

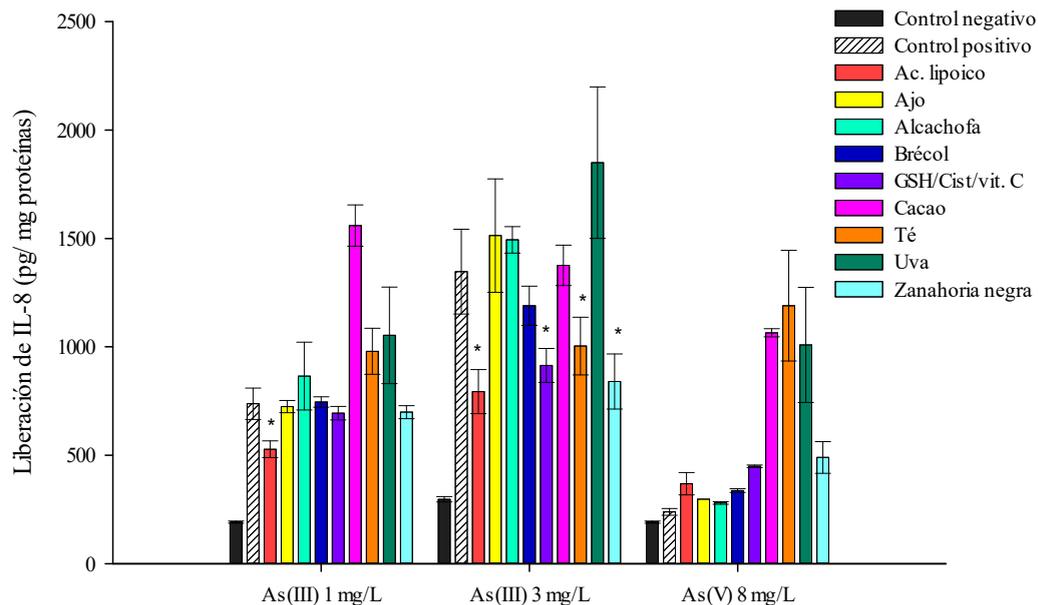


Figura 42. Efecto de los suplementos dietéticos sobre la respuesta pro-inflamatoria ocasionada por el As-i en células intestinales. Liberación de IL-8 al medio de cultivo en células Caco-2 control (negativo), células expuestas a As(III) (1 y 3 mg/L) y As(V) 8 mg/L durante 24 h (control positivo) y células expuestas a As(III) 3 mg/L y componentes alimentarios (100 mg/L). Valores expresados como pg/mg de proteína (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control positivo.

3. Efecto de las estrategias sobre la modificación de la distribución de ZO-1

La exposición con As(V) y 1 mg/L de As(III) no generan cambios importantes en la localización de ZO-1 y en la estructura de empedrado típica de las monocapas celulares generadas por la línea celular Caco-2 (apartado 4, capítulo 1). Sin embargo, las monocapas de las células tratadas con 3 mg/L de As(III) presentan zonas donde se evidencia un cambio en la expresión (no se observa fluorescencia) y/o en la localización (aparece fluorescencia en el citoplasma) de ZO-1. Por ese motivo las estrategias sólo se han ensayado con el tratamiento de 3 mg/L de As(III).

En la figura 43 se muestra el efecto de las bacterias lácticas y los medios condicionados sobre la distribución de ZO-1. El tratamiento con la cepa BL17 y su medio condicionado no modifican la distribución de ZO-1 (datos no mostrados). Por el contrario, las otras dos cepas, y especialmente la BL23 y su medio condicionado, disminuyen las zonas de la monocapa en las que no se detecta fluorescencia, observándose una mayor área en forma de empedrado, similar a la estructura de la monocapa control.

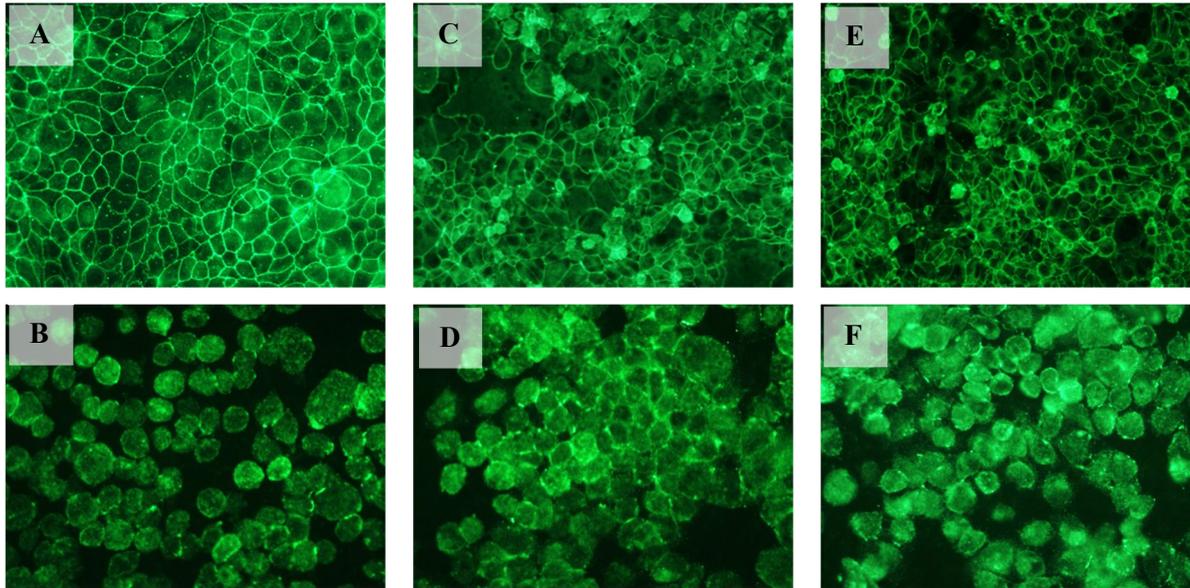


Figura 43. Efecto de las bacterias lácticas sobre la redistribución de ZO-1 causada por As(III) en células Caco-2. A representa células control no tratadas; B células tratadas con As(III); C células pre-incubadas con BL23 y tratadas con As(III); D células co-incubadas con medio condicionado de BL23 y As(III); E células pre-incubadas con BL36 y tratadas con As(III); F células co-incubadas con medio condicionado de BL36 y As(III). Todos los tratamientos se han realizado con 3 mg/L de As(III) durante 24 h. Amplificación 20 ×.

El efecto protector de los suplementos dietéticos sólo se evidencia con los suplementos de GSH/cisteína/vitamina C y de ácido lipoico (figura 44).

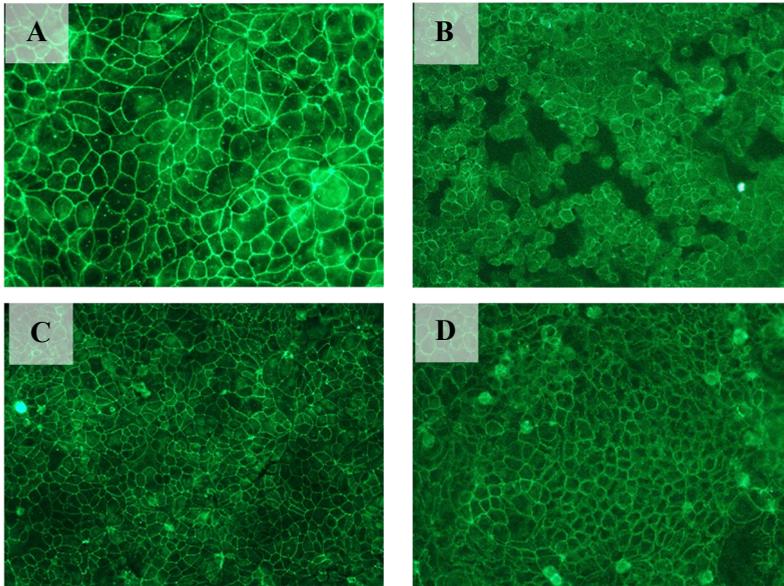


Figura 44. Efecto de los suplementos dietéticos sobre la redistribución de ZO-1 causada por As(III). Imágenes de: (A) células control no tratadas; (B) células tratadas con As(III) 3 mg/L 24 h; (C) células tratadas 2 h con suplemento de ácido lipoico 100 mg/L y posteriormente co-expuestas a As(III) 3 mg/L 24 h; (D) células tratadas 2 h con suplemento de GSH/cisteína/vitamina C 100 mg/L y posteriormente co-expuestas a As(III) 3 mg/L 24 h. Amplificación 20 \times .

4. Efecto de las estrategias sobre la modificación de la permeabilidad

El efecto sobre la permeabilidad se ha ensayado empleando una exposición subcrónica. En este tipo de exposición, la evaluación del efecto protector de las bacterias lácticas se ha realizado empleando únicamente medio condicionado, ya que la pre-incubación a tiempos largos con bacterias vivas acidifica el medio, dificultando el mantenimiento de la integridad de las monocapas celulares. Se

han testado los medios condicionados de las tres cepas ya que todas presentaban un efecto protector en la exposición aguda: BL23 y B17 reducen los niveles de ROS/RNS (apartado 1) y BL36 la liberación de IL-8 (apartado 2).

En los ensayos con los suplementos dietéticos, se han evaluado sólo aquellos que presentan un efecto protector frente al estrés oxidativo (uva, cacao, apartado 1), a la respuesta pro-inflamatoria (ácido lipoico, GSH/cisteína/vitamina C, extracto de té y zanahoria negra, apartado 2) o a la redistribución de la ZO-1 (ácido lipoico, GSH/cisteína/vitamina C, apartado 3).

En todos los ensayos se empleó como control positivo células expuestas a As(III) 0.1 mg/L por ser el tratamiento que producía los efectos tóxicos más notorios en los estudios *in vitro* de exposición subcrónica (capítulo 2).

En la figura 45 se muestra el transporte de LY en las células Caco-2 control, células expuestas a As(III) 0.1 mg/L y células co-expuestas con medio condicionado. Transcurrido 7 días, el As ejerce un efecto negativo en la permeabilidad, evidenciado por un aumento del transporte apical-basolateral del LY. La co-incubación con el medio condicionado procedente de las bacterias lácticas BL23 y BL36 tiene un efecto protector, disminuyendo significativamente el transporte de LY (21 y 47 %, respectivamente) respecto al transporte observado en las células tratadas sólo con As(III). El medio de la cepa BL17 no presenta este efecto protector.

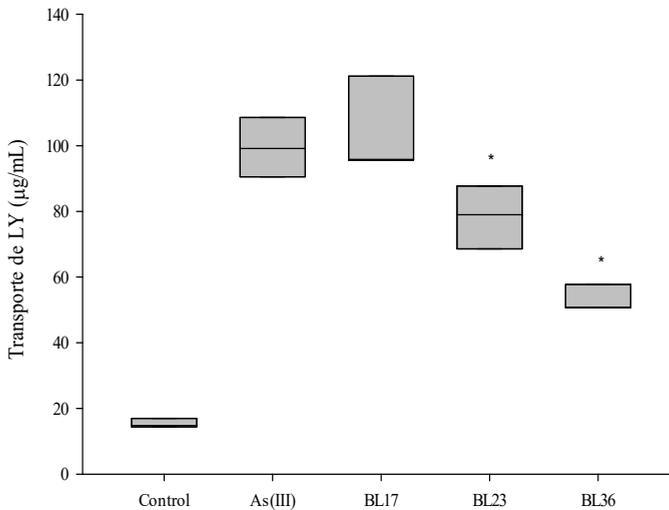


Figura 45. Efecto de los medios condicionados de cepas de bacterias lácticas sobre los cambios en la permeabilidad intestinal causados por As(III). Transporte de LY en células Caco-2 control, células expuestas a As(III) 0.1 mg/L y células co-expuestas con As(III) y medio condicionado de las bacterias lácticas durante 7 días. Valores expresados como µg/mL (n=3). La línea central de la caja representa las medianas y los límites inferiores y superiores de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células tratadas sólo con As(III).

Con respecto a los suplementos dietéticos ensayados (figura 46), sólo los suplementos de GSH/cisteína/vitamina C y de ácido lipoico presentan un efecto protector sobre la permeabilidad intestinal, disminuyendo significativamente el transporte de LY (11 y 28 %, respectivamente) respecto al transporte observado con las células tratadas sólo con As(III).

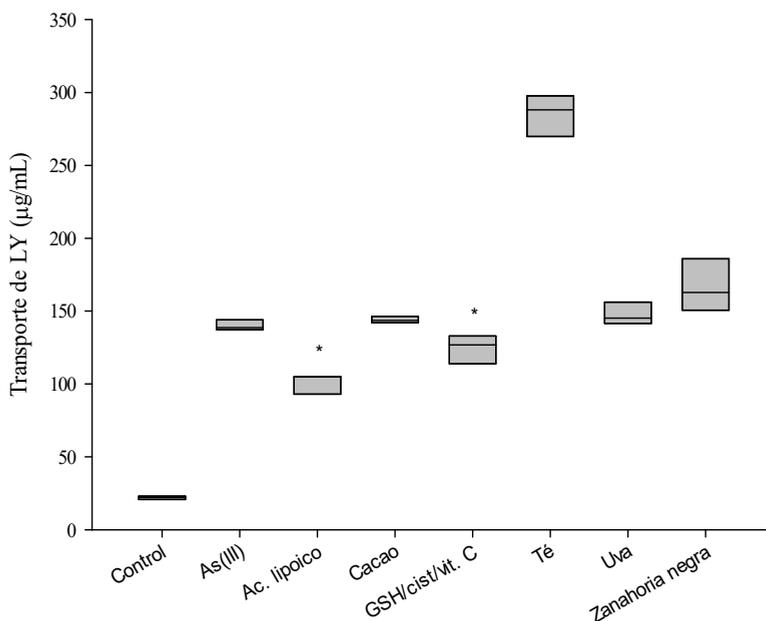


Figura 46. Efecto de los suplementos dietéticos sobre las modificaciones de la permeabilidad intestinal causados por el As(III). Transporte de LY en células Caco-2 control, células expuestas a As(III) 0.1 mg/L y células tratadas con As(III) y suplementos dietéticos durante 7 días. Valores expresados como $\mu\text{g/mL}$ ($n=3$). La línea central de la caja representa las medianas y los límites inferiores y superiores de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células tratadas sólo con As(III).

5. Efecto de las estrategias sobre las alteraciones en el proceso de regeneración celular

En el capítulo 2 (apartado 6) se evidenció que una exposición subcrónica a As-i afecta el proceso de reparación celular. Los medios condicionados de las bacterias lácticas no presentaron un efecto protector frente a este efecto tóxico del As-i (datos no mostrados). Sin embargo, el suplemento de GSH/cisteína/vitamina C y

el de ácido lipoico favorecen la recuperación de esta función. Tras la generación de la herida, las células control (figura 47A) y las células tratadas con los suplementos dietéticos mencionados (figuras 47C y 47D, respectivamente) sellan el área de la herida más rápidamente que las células tratadas sólo con As(III) (figura 47B). La figura 48 muestra el porcentaje de cierre de la herida a las 24 h de su generación [control: 94%; As(III) 0.1 mg/L: 77%; ácido lipoico: 89%; GSH/cisteína/vitamina C: 99%].

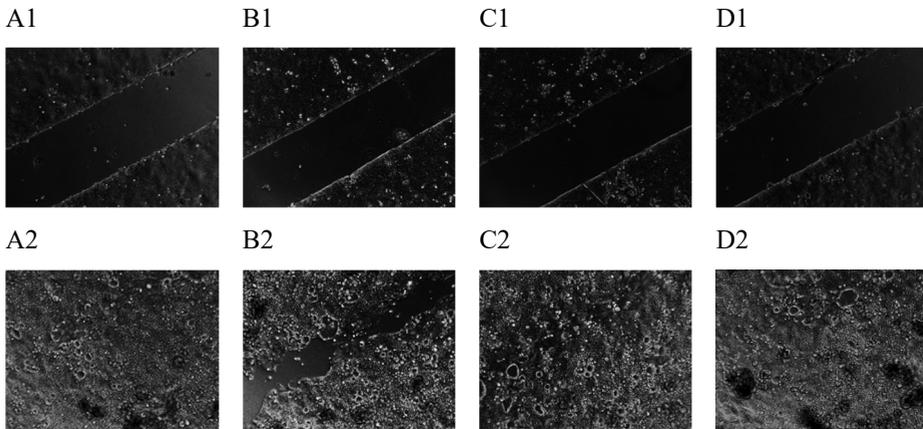


Figura 47. Imágenes del cierre de la herida en células Caco-2 tras una exposición subcrónica a As-i y suplementos dietéticos. (A) Células control; (B) células expuestas a As(III); (C) células co-expuestas con suplemento de ácido lipoico y As(III); (D) células co-expuestas con suplemento de GSH/cisteína/vitamina C y As(III). Todos los tratamientos se han realizado con 0.1 mg/L de As(III) durante 7 días. Las imágenes A1-D1 fueron obtenidas en el tiempo cero y las A2-D2 a las 24 h post-herida.

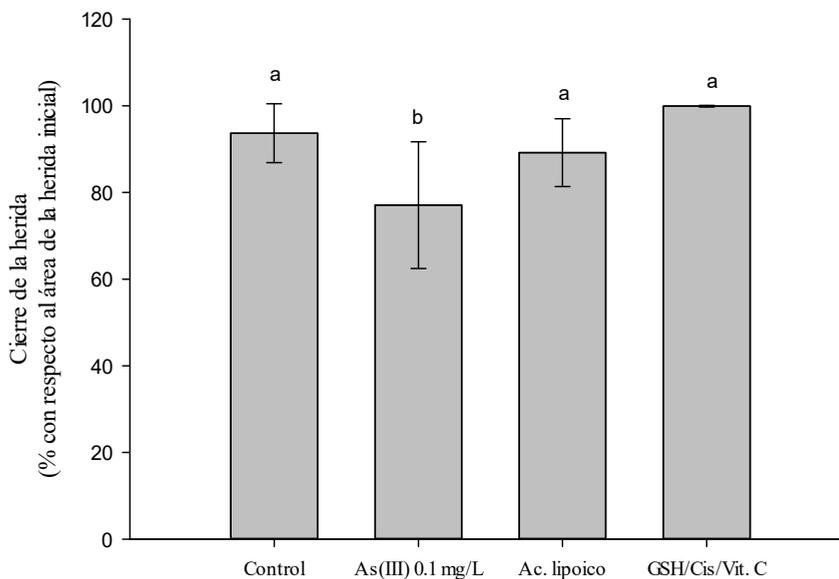


Figura 48. Cierre de la herida en células Caco-2 tratadas con As(III) y suplementos dietéticos. Porcentaje de área cerrada en células control, células tratadas con As(III) 0.1 mg/L y células co-expuestas con As(III) 0.1 mg/L y suplementos de ácido lipoico y de GSH/cisteína/vitamina C (10 mg/L) durante 7 días. Valores expresados como porcentaje de cierre de herida a las 24 h, respecto al área de la herida inicial (tiempo cero) (media \pm SD, n=3). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Estudios previos han puesto de manifiesto que determinadas bacterias lácticas pueden reducir la toxicidad generada por la exposición a diferentes contaminantes medioambientales y/o alimentarios, entre ellos algunos elementos traza tóxicos. Tian *et al.* (2012) evidencian el papel protector en ratones del *Lactobacillus plantarum* cuando éste se administra conjuntamente con plomo (Pb) a través del agua de bebida. Los autores evidencian una reducción de las alteraciones en los niveles de GSH, glutatión peroxidasa (GPx), malondialdehído (MDA), SOD y ROS causados por la exposición al metal. Zhai *et al.* (2014) también ponen de manifiesto que *L. plantarum* reduce el estrés oxidativo causado por la exposición subcrónica a cadmio (Cd) a través del agua de bebida. Esta protección no es sólo consecuencia de la capacidad de unión de Cd por la bacteria en el lumen intestinal, ya que cuando la exposición es vía intraperitoneal, *L. plantarum* también reduce el estrés oxidativo. Los autores sugieren que esta reducción es debida a la inducción de metaloteoneínas y cambios en la expresión génica de moléculas que intervienen en varias vías relacionadas con la toxicidad del Cd.

Este capítulo evidencia *in vitro* que algunas cepas de *Lactobacillus* y/o su medio condicionado tienen un efecto protector frente a la toxicidad intestinal del As(III). Se observa una reducción de la generación de ROS y/o RNS (figura 39) y de la secreción de IL-8 (figuras 40 y 41), una disminución de las alteraciones a nivel estructural (figura 43), y una mejora funcional de la barrera intestinal (figura 45). El efecto protector varía con la cepa, siendo el *L. casei* (BL23) la más eficaz. Un efecto similar se evidencia con los suplementos de ácido lipoico y de GSH/cisteína/vitamina C, que además de reducir los efectos mencionados para las bacterias lácticas, también favorecen la recuperación de la función de regeneración de las células intestinales.

El efecto protector de las cepas de bacterias lácticas probablemente no se debe a la captación del As-i, ya que algunos estudios evidencian la baja capacidad de captación de As-i por parte de *Lactobacillus*, cuya superficie presenta una carga neta negativa y por tanto una reducida interacción con aniones (Halttunen *et al.*, 2007). Por tanto, la reducción de la toxicidad del As-i es posiblemente debida a un efecto directo sobre el modo de acción del tóxico, gracias a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria.

La reducción de la respuesta pro-inflamatoria y pro-oxidante por parte de las bacterias lácticas ha sido puesta de manifiesto en estudios previos. Tao *et al.* (2006) sugieren que el medio condicionado de *Lactobacillus GG* protege las células epiteliales del intestino frente al estrés oxidativo a través de la activación de la ruta de señalización MAPK o de la inducción de la producción de proteínas de choque térmico. Asimismo, también se ha evidenciado en estudios *in vitro*, la habilidad de las cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* de proteger las células intestinales contra la inflamación, regulando el equilibrio entre las citoquinas pro- y anti-inflamatorias (O'Hara *et al.*, 2006; Tien *et al.*, 2006; Roselli *et al.*, 2007). Romero y Menchén (2013) afirman que determinadas bacterias lácticas inhiben la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células epiteliales intestinales, en un efecto probablemente mediado por la inhibición de la activación de NF κ B o por la estimulación de la actividad del receptor activado por el proliferador del peroxisoma gamma (PPAR γ).

La disminución del estrés y de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias pueden ser responsables de la reordenación de la proteína ZO-1 y de la recuperación de la estructura de las monocapas observadas tras el tratamiento con las bacterias o el medio condicionado. El efecto protector de las bacterias lácticas sobre las uniones intercelulares también se ha descrito previamente. Karczewski *et al.* (2010) evidencian que un pre-tratamiento con *L. plantarum* en las monocapas de células Caco-2 disminuye significativamente los efectos sobre la

organización de ZO-1 ocasionado por ésteres del forbol. Teniendo en cuenta que la permeabilidad de la monocapa depende de las uniones intercelulares, el efecto de los *Lactobacillus* sobre estas uniones podría redundar en la reducción de la permeabilidad aumentada por la exposición a As-i.

Los suplementos más efectivos (GSH/cisteína/vitamina C y ácido lipoico) también tienen una probada actividad antioxidante y antiinflamatoria. El carácter antioxidante del ácido lipoico se debe a su capacidad para aumentar la expresión de enzimas antioxidantes, participar en el reciclaje de las vitaminas C y E (Moura *et al.*, 2015) y eliminar e inactivar los radicales libres. La reducción de los radicales libres puede ser, en parte, lo que le confiere también un carácter antiinflamatorio (Odabasoglu *et al.*, 2011). La reducción de la respuesta pro-inflamatoria con ácido lipoico se ha evidenciado en diferentes situaciones (Uyar *et al.*, 2013; Ishii *et al.*, 2017; Sardu *et al.*, 2017). Ishii *et al.* (2017) muestran que el tratamiento con lipoico inhibe la activación del factor NFκβ y por tanto reduce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en células tratadas con lipopolisacárido.

Algunos estudios han confirmado la capacidad del ácido lipoico para reducir los efectos tóxicos generados por una exposición a As-i. Ghosh *et al.* (2017) muestran que la suplementación con ácido lipoico reduce las alteraciones hematológicas asociadas a la exposición a As-i. El papel protector del ácido lipoico frente al As-i puede deberse a las actividades antioxidante y antiinflamatoria anteriormente descritas, pero también puede ser resultado de su capacidad para unir elementos traza tóxicos (Tibullo *et al.*, 2017). De hecho, se ha evidenciado la reducción de la acumulación tisular de As en ratones co-administrados con ácido lipoico (Bhatt y Flora, 2009).

La suplementación con ácido lipoico no tiene contraindicaciones demostradas. En ratones no se observan efectos secundarios adversos relacionados con la

ganancia de peso, consumo de alimentos, conducta, parámetros hematológicos y bioquímicas e histología a dosis iguales o inferiores a 60 mg/kg pc (Cremer *et al.*, 2006). En humanos, dosis de 600 mg/día no muestran efectos secundarios durante un período de suplementación de 5 semanas (Ziegler *et al.*, 2006).

El suplemento GSH/cisteína/vitamina C también tiene un efecto protector. En este caso se combinan tres componentes que individualmente tiene un mostrado efecto antioxidante y/o antiinflamatorio. El carácter antioxidante de la vitamina C ha sido demostrado ampliamente en literatura. Su actividad antiinflamatoria genera más duda (Jialal y Singh, 2006). Ellulu *et al.* (2015) muestran que la administración de vitamina C (1000 mg/ día) reduce los niveles sanguíneos de la proteína C reactiva e IL-6 en pacientes obesos, hipertensos y/o diabéticos. En cualquier caso, el hecho de generar la reducción de los radicales libres, le puede conferir indirectamente una capacidad antiinflamatoria (Lugrin *et al.*, 2014).

En el caso del GSH y la cisteína, compuestos con grupos tiol, se ha evidenciado su unión a las formas inorgánicas de As (Rey *et al.*, 2004; Thomas, 2008); incluso estudios *in vitro* empleando células Caco-2, muestran que el transporte de As-i a través de la monocapa epitelial se reduce en presencia de estos compuestos (Clemente *et al.*, 2017). Así, en el caso de estos dos compuestos podría existir un efecto protector mediado por un mecanismo que dificulta la entrada del As-i al interior celular y por otro en el que intervienen la actividad antioxidante o anti-inflamatoria de estas moléculas. El estudio del efecto protector de la suplementación oral de GSH y cisteína es menos frecuente que el de la N-acetilcisteína (NAC), compuesto precursor de la cisteína y por tanto del GSH. Uraz *et al.* (2013) ponen de manifiesto que el empleo de NAC revierte el aumento de los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α , IL-1 β y IL-6, de la actividad mieloperoxidasa (MPO) y de los contenidos de MDA, y también impide la disminución de los niveles de GSH y SOD en ratas con colitis inducida

por ácido acético. Además se ha evidenciado su papel protector frente al aumento de la permeabilidad producido por radiaciones en ratones (Shukla *et al.*, 2016).

La seguridad alimentaria de los tres compuestos que forman parte de este suplemento está ampliamente probada. Están presentes en numerosos alimentos, incluso en el caso de la vitamina C se considera un micronutriente. Adicionalmente, el GSH y la cisteína están autorizados para su empleo como aditivos alimentarios o suplementos. El Comité Científico de Alimentos de la Unión Europea ha autorizado el uso de la cisteína en el tratamiento de la harina (SCF, 1991). También figura en la legislación de la Comunidad Europea como sustancia que puede utilizarse con fines nutricionales en alimentos elaborados a base de cereales y alimentos para lactantes y niños de corta edad (Directiva 96/5/CE) y en alimentos destinados a usos nutricionales particulares (Directiva 2001/15/CE). La seguridad de la cisteína ha sido evaluada por varios organismos expertos y no se ha expresado ninguna preocupación toxicológica en relación con su uso como aditivo alimentario (EFSA, 2006).

En cuanto al GSH, existen en la actualidad numerosos suplementos en el mercado que se han evidenciado beneficiosos en diferentes situaciones. La suplementación con GSH aumenta los niveles de GSH en tejidos y sangre, por tanto, aumenta los efectivos de la maquinaria antioxidante corporal (Sinha *et al.*, 2018). Un estudio de toxicidad aguda oral de GSH en ratones evidenció una LD₅₀ superior a 5 g/kg, concentración muy superior a la dosis de suplementación normal (250-500 mg/día). En ensayos clínicos, no se han observado reacciones adversas mencionables (Weschawalit *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

El estudio realizado en este capítulo es el primero que muestra que los *Lactobacillus* o suplementos dietéticos presentes en el mercado pueden modular la toxicidad que el As(III) ejerce sobre el epitelio intestinal, y que posiblemente tenga una repercusión a nivel sistémico. La recuperación de la función barrera tras los tratamientos evidencia que pueden emplearse compuestos de origen alimentario o de uso dietético, cuya seguridad está probada, para aminorar los efectos observados *in vitro* sobre la funcionalidad del intestino. Se requieren estudios *in vivo* para evaluar la idoneidad de la aplicación de estas estrategias dietéticas en poblaciones expuestas.

Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en la presente tesis han dado lugar a las siguientes conclusiones para cada uno de los objetivos parciales planteados.

1. Evaluación *in vitro* del efecto de una exposición aguda a As-i sobre el epitelio intestinal

- Las exposiciones de corta duración a As-i (2-24 h) generan un aumento de la liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 y un aumento de la generación de ROS y/o RNS en células Caco-2 y NCM460 expuestas a concentraciones de As(III) > 1 mg/L y de As(V) > 5 mg/L.
- Las exposiciones a As(III) generan modificaciones estructurales que cursan con cambios en los patrones de distribución de la ZO-1 y de expresión de la *CLDN-1*. Estos cambios pueden ser consecuencia de la respuesta pro-oxidante y pro-inflamatoria generada por el As-i.
- Se observa una pérdida de la función barrera de las monocapas intestinales, posiblemente relacionada con el efecto del As-i sobre las uniones intercelulares. Esta modificación de la permeabilidad podría explicar los efectos observados en intoxicaciones agudas en humanos (diarreas hemorragias, gastroenteritis).

2. Evaluación *in vitro* del efecto de una exposición subcrónica a As-i sobre el epitelio intestinal

- En las exposiciones subcrónicas (7-21 días), también se pone de manifiesto una respuesta pro-inflamatoria que se mantiene durante todo el tratamiento a concentraciones de As(III) > 0.025 mg/L y de As(V) > 0.250 mg/L.
- Esta respuesta viene acompañada de cambios en el programa de proliferación celular y diferenciación, lo que posiblemente sea la causa de la menor capacidad de regeneración celular de las monocapas tratadas con As-i.

- La exposición subcrónica afecta la estructura epitelial, causando la pérdida de microvellosidades, y a la función de barrera del epitelio intestinal, tal y como ocurría en la exposición aguda.
- Los resultados sugieren que la exposición subcrónica a As-i, a concentraciones similares a las presentes en el agua de bebida de países con arsenicismo crónico endémico, puede alterar la homeostasis intestinal, afectando la mucosa intestinal.

3. Evaluación *in vitro* del efecto de una exposición crónica a As-i sobre el epitelio intestinal

- Exposiciones prolongadas a As(III) (6 meses) favorecen la adquisición de características tumorigénicas en células NCM460, debido en parte al mantenimiento de la respuesta pro-inflamatoria.
- Se observa un aumento de la expresión de *CD133*, una disminución de la expresión de *CDX1* y *CDX2*, una mayor secreción de MMP-2, modificaciones en el perfil de acetilación de histonas, un aumento de la hiperproliferación y la formación de esferas flotantes en células expuestas a concentraciones de $\text{As(III)} \geq 0.05 \text{ mg/L}$.
- Los resultados sugieren que la exposición de células epiteliales de colon humano a As(III) podría conllevar un aumento de la incidencia de procesos cancerígenos intestinales. Estos efectos nuevamente se observan a concentraciones típicas de países con arsenicismo.

4. Estudio *in vivo* sobre el efecto de una exposición subcrónica a As-i sobre el epitelio intestinal

- Los resultados obtenidos en la exposición subcrónica *in vivo* confirman los datos obtenidos *in vitro*.
- Esta exposición genera estrés oxidativo y una respuesta pro-inflamatoria, evidenciada por una mayor expresión génica y proteica de las citoquinas

IL-1 β , IL-2 e IL-6, en el intestino de animales tratados con concentraciones de As(III) iguales o mayores a 50 mg/L.

- Se observa un efecto sobre la morfología del epitelio, con evidencias de hiperplasia en las criptas. Adicionalmente, los tratamientos con As(III) reducen la expresión de *MUC2* y posiblemente la formación de mucus, disminuyendo de esta forma la efectividad de la primera línea de defensa del epitelio intestinal.
- Estos efectos tóxicos pueden ser los causantes del aumento de permeabilidad observado en los animales tratados con As(III), indicativo de la pérdida de la barrera intestinal, que puede en cierta forma explicar algunos de los síntomas reportados a este nivel en poblaciones crónicamente expuestas.

5. Evaluación *in vitro* del efecto protector de bacterias lácticas y suplementos dietéticos sobre la toxicidad intestinal del As-i

- Determinadas cepas de *Lactobacillus* y ciertos suplementos dietéticos modulan la toxicidad que el As-i ejerce sobre el epitelio intestinal.
- La recuperación de la función barrera y/o capacidad de regeneración celular, conseguida con la incubación con los suplementos de ácido lipoico y GSH/cisteína/vitamina C y las bacterias lácticas *L. casei* (BL23) y *L. brevis* (BL36), indica que estas estrategias, cuya seguridad alimentaria está probada, podrían emplearse para aminorar los efectos que ejerce el As-i a nivel intestinal, y posiblemente sistémico, en poblaciones afectadas.

Bibliografía

Acharya, P., Beckel, J., Ruiz, W.G., Wang, E., Rojas, R., Birder, L., Apodaca, G. **2004**. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 287(2), F305-F318.

Ackerman, A.H., Creed, P.A., Parks, A.N., Fricke, M.W., Schwegel, C.A., Creed, J.T., Heitkemper, D.T., Vela, N.P. **2005**. 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.*, 39(14), 5241-5246.

Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sethi, G. **2006**. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem. Pharmacol.*, 72(11), 1605-1621.

Agrawal, T., Sharvani, V., Nair, D., Medigeshi, G.R. **2013**. Japanese encephalitis virus disrupts cell-cell junctions and affects the epithelial permeability barrier functions. *PLoS One*, 8(7), e69465.

Agusa, T., Kunito, T., Minh, T.B., Trang, P.T.K., Iwata, H., Viet, P.H., Tanabe, S. **2009**. Relationship of urinary arsenic metabolites to intake estimates in residents of the Red River Delta, Vietnam. *Environ. Pollut.*, 157(2), 396-403.

Ahmad, S., Kitchin, K.T., Cullen, W.R. **2000**. Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 382(2), 195-202.

Ahmed, S., Khoda, S.M.-e., Rekha, R.S., Gardner, R.M., Ameer, S.S., Moore, S., Ekström, E.-C., Vahter, M., Raqib, R. **2011**. Arsenic-associated oxidative stress, inflammation, and immune disruption in human placenta and cord blood. *Environ. Health Perspect.*, 119(2), 258-264.

Ahsan, H., Chen, Y., Parvez, F., Zablotska, L., Argos, M., Hussain, I., Momotaj, H., Levy, D., Cheng, Z., Slavkovich, V. **2006**. Arsenic exposure from drinking water and risk of premalignant skin lesions in Bangladesh: baseline results from the health effects of arsenic longitudinal study. *Am. J. Epidemiol.*, 163(12), 1138-1148.

Al-Damegh, M.A., M. Zeitoun, M., Abdel-Salam, A.M. **2014**. The role of fermented milk containing probiotic, dandelion as prebiotic or their combination on serum metabolites, enzymes, testosterone and testicular histopathology of arsenic-intoxicated male rats. *J. Basic Appl. Sci.*, 10, 492-503.

Alard, J.-E., Dueymes, M., Mageed, R.A., Saraux, A., Youinou, P., Jamin, C. **2009**. Mitochondrial heat shock protein (HSP) 70 synergizes with HSP60 in transducing endothelial cell apoptosis induced by anti-HSP60 autoantibody. *FASEB J.*, 23(8), 2772-2779.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. **2010**. Adhesión celular, uniones estrechas y matriz extracelular. En: B. Alberts (Ed), *Biología molecular de la célula*, Editorial Omega, Barcelona, pp. 1017-1031.

Alcarraz-Vizan, G., Sanchez-Tena, S., Moyer, M.P., Cascante, M. **2014**. Validation of NCM460 cell model as control in antitumor strategies targeting colon adenocarcinoma metabolic reprogramming: trichostatin A as a case study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840(6), 1634-1639.

Almela, C., Clemente, M.J., Velez, D., Montoro, R. **2006**. Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. *Food Chem. Toxicol.*, 44(11), 1901-1908.

Anderson, J.M., Van Itallie, C.M. **2009**. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 1(2), a002584.

Arnold, L.L., Eldan, M., van Gemert, M., Capen, C.C., Cohen, S.M. **2003**. Chronic studies evaluating the carcinogenicity of monomethylarsonic acid in rats and mice. *Toxicology*, 190(3), 197-219.

Arrieta, M., Bistriz, L., Meddings, J. **2006**. Alterations in intestinal permeability. *Gut*, 55(10), 1512-1520.

ATSDR. **2000**. Toxicological profile for arsenic. *U.S. Department of Health and Human Services*, Atlanta, 559.

Bae, M., Watanabe, C., Inaoka, T., Sekiyama, M., Sudo, N., Bokul, M.H., Ohtsuka, R. **2002**. Arsenic in cooked rice in Bangladesh. *Lancet*, 360(9348), 1839-1840.

Bain, L.J., Liu, J.T., League, R.E. **2016**. Arsenic inhibits stem cell differentiation by altering the interplay between the Wnt3a and Notch signaling pathways. *Toxicol. Rep.*, 3, 405-413.

Bamias, G., Corridoni, D., Pizarro, T.T., Cominelli, F. **2012**. New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine*, 59(3), 451-459.

- Banerjee, P., Bhattacharyya, S.S., Bhattacharjee, N., Pathak, S., Boujedaini, N., Belon, P., Khuda-Bukhsh, A.R. **2009**. Ascorbic acid combats arsenic-induced oxidative stress in mice liver. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72(2), 639-649.
- Barchowsky, A., Dudek, E.J., Treadwell, M.D., Wetterhahn, K.E. **1996**. Arsenic induces oxidant stress and NF- κ B activation in cultured aortic endothelial cells. *Free Radical Biol. Med.*, 21(6), 783-790.
- Barnes, J., Collins, B., Dix, D., Allen, J. **2002**. Effects of heat shock protein 70 (HSP70) on arsenite-induced genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.*, 40(4), 236-242.
- Bates, M.N., Rey, O.A., Biggs, M.L., Hopenhayn, C., Moore, L.E., Kalman, D., Steinmaus, C., Smith, A.H. **2004**. Case-control study of bladder cancer and exposure to arsenic in Argentina. *Am. J. Epidemiol.*, 159(4), 381-389.
- Bennett, K.M., Walker, S.L., Lo, D.D. **2014**. Epithelial microvilli establish an electrostatic barrier to microbial adhesion. *Infect. Immun.*, 82(7), 2860-2871.
- Bergmann, K.R., Liu, S.X., Tian, R., Kushnir, A., Turner, J.R., Li, H.-L., Chou, P.M., Weber, C.R., De Plaen, I.G. **2013**. Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. *Am. J. Pathol.*, 182(5), 1595-1606.
- Bergquist, E.R., Fischer, R.J., Sugden, K.D., Martin, B.D. **2009**. Inhibition by methylated organoarsenicals of the respiratory 2-oxo-acid dehydrogenases. *J. Organomet. Chem.*, 694(6), 973-980.
- Bergstrom, K.S., Kisson-Singh, V., Gibson, D.L., Ma, C., Montero, M., Sham, H.P., Ryz, N., Huang, T., Velcich, A., Finlay, B.B. **2010**. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog.*, 6(5), e1000902.
- Besada, V., Andrade, J.M., Schultze, F., González, J.J. **2009**. Heavy metals in edible seaweeds commercialised for human consumption. *J. Mar. Syst.*, 75(1-2), 305-313.
- Bhatt, K., Flora, S. **2009**. Oral co-administration of α -lipoic acid, quercetin and captopril prevents gallium arsenide toxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 28(1), 140-146.

Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S.E. **2014**. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.*, 94(2), 329-354.

Biswas, J., Sinha, D., Mukherjee, S., Roy, S., Siddiqi, M., Roy, M. **2010**. Curcumin protects DNA damage in a chronically arsenic-exposed population of West Bengal. *Hum. Exp. Toxicol.*, 29(6), 513-524.

Borges, O., Lebre, F., Bento, D., Borchard, G., Junginger, H.E. **2010**. Mucosal vaccines: recent progress in understanding the natural barriers. *Pharm. Res.*, 27(2), 211-223.

Borgoño, J.M., Vicent, P., Venturino, H., Infante, A. **1977**. Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: epidemiological and clinical study before and after the installation of a treatment plant. *Environ. Health Perspect.*, 19, 103-105.

Borthakur, A., Bhattacharyya, S., Kumar, A., Anbazhagan, A.N., Tobacman, J.K., Dudeja, P.K. **2013**. *Lactobacillus acidophilus* alleviates platelet-activating factor-induced inflammatory responses in human intestinal epithelial cells. *PLoS One*, 8(10), e75664.

Bundschuh, J., Litter, M.I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H.B., Jean, J.-S., Liu, C.-W., López, D., Armienta, M.A., Guilherme, L.R. **2012**. One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. *Sci. Total Environ.*, 429, 2-35.

Calatayud, M., Ruiz, A., Devesa, V., Villaamil, E., Montoro, R., Vélez, D. **2008**. Characterizing arsenic exposure of child populations in Northern Argentina. *2nd International Congress: Arsenic in the environment - arsenic from nature to humans*. 21-23 Mayo. Valencia. 455-456.

Calatayud, M., Gimeno, J., Vélez, D., Devesa, V., Montoro, R. **2010**. Characterization of the intestinal absorption of arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid using the Caco-2 cell line. *Chem. Res. Toxicol.*, 23(3), 547-556.

Calatayud, M., Devesa, V., Montoro, R., Velez, D. **2011**. *In vitro* study of intestinal transport of arsenite, monomethylarsonous acid, and dimethylarsinous acid by Caco-2 cell line. *Toxicol. Lett.*, 204(2-3), 127-133.

- Calatayud, M., Devesa, V., Velez, D. **2013**. Differential toxicity and gene expression in Caco-2 cells exposed to arsenic species. *Toxicol. Lett.*, 218(1), 70-80.
- Calatayud, M., Gimeno-Alcaniz, J.V., Velez, D., Devesa, V. **2014**. Trivalent arsenic species induce changes in expression and levels of proinflammatory cytokines in intestinal epithelial cells. *Toxicol. Lett.*, 224(1), 40-46.
- Calon, A., Gross, I., Lhermitte, B., Martin, E., Beck, F., Duclos, B., Kedinger, M., Duluc, I., Domon-Dell, C., Freund, J.-N. **2007**. Different effects of the Cdx1 and Cdx2 homeobox genes in a murine model of intestinal inflammation. *Gut*, 56(12), 1688-1695.
- Camilleri, M., Lasch, K., Zhou, W. **2012**. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 303(7), G775-785.
- Capaldo, C.T., Nusrat, A. **2009**. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788(4), 864-871.
- Cario, E., Rosenberg, I.M., Brandwein, S.L., Beck, P.L., Reinecker, H.-C., Podolsky, D.K. **2000**. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J. Immunol.*, 164(2), 966-972.
- Carrizales, L., Razo, I., Téllez-Hernández, J.I., Torres-Nerio, R., Torres, A., Batres, L.E., Cubillas, A.-C., Diaz-Barriga, F. **2006**. Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosí, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environ. Res.*, 101(1), 1-10.
- Castro de Esparza, M. **2008**. The presence of arsenic in drinking water in Latin America and its effect on public health. En: Jochen Bundschuh, M. A. Armienta, Peter Birkle, Prosun Bhattacharya, Jörg Matschullat y A.B. Mukherjee (Eds), *Natural Arsenic in Groundwater of Latin America, Arsenic in the Environment*, pp. 17-29.
- Cavigelli, M., Li, W.W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K., Karin, M. **1996**. The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J.*, 15(22), 6269-6279.
- Cesta, M.F. **2006**. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Pathol.*, 34(5), 599-608.

Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M.G., Zweibaum, A. **1988**. Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells- A Survey of Twenty Cell Lines. *Cancer Res.*, 48(7), 1936-1942,.

Chen, C.-J., Chuang, Y.-C., Lin, T.-M., Wu, H.-Y. **1985**. Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: high-arsenic artesian well water and cancers. *Cancer Res.*, 45(11), 5895-5899.

Chen, C.-J., Kuo, T.-L., Wu, M.-M. **1988**. Arsenic and cancers. *Lancet*, 331(8582), 414-415.

Chen, Q.Y., Costa, M. **2017**. A comprehensive review of metal-induced cellular transformation studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 331, 33-40.

Chen, Y., Hall, M., Graziano, J.H., Slavkovich, V., van Geen, A., Parvez, F., Ahsan, H. **2007**. A prospective study of blood selenium levels and the risk of arsenic-related premalignant skin lesions. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 16(2), 207-213.

Chi, L., Gao, B., Tu, P., Liu, C.-W., Xue, J., Lai, Y., Ru, H., Lu, K. **2018**. Individual susceptibility to arsenic-induced diseases: the role of host genetics, nutritional status, and the gut microbiome. *Mamm. Genome*, 29, 63-79.

Chou, W.-C., Jie, C., Kenedy, A.A., Jones, R.J., Trush, M.A., Dang, C.V. **2004**. Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(13), 4578-4583.

Chowdhury, R., Chatterjee, R., Giri, A.K., Mandal, C., Chaudhuri, K. **2010**. Arsenic-induced cell proliferation is associated with enhanced ROS generation, Erk signaling and CyclinA expression. *Toxicol. Lett.*, 198(2), 263-271.

Cieslik, K.A., Trial, J., Entman, M.L. **2015**. Mesenchymal stem cell-derived inflammatory fibroblasts promote monocyte transition into myeloid fibroblasts via an IL-6-dependent mechanism in the aging mouse heart. *FASEB J.*, 29(8), 3160-3170.

Circu, M.L., Moyer, M.P., Harrison, L., Aw, T.Y. **2009a**. Contribution of glutathione status to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in colonic epithelial cells. *Free Radical Biol. Med.*, 47(8), 1190-1198.

- Circu, M.L., Stringer, S., Rhoads, C.A., Moyer, M.P., Aw, T.Y. **2009b**. The role of GSH efflux in staurosporine-induced apoptosis in colonic epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.*, 77(1), 76-85.
- Clemente, M., Devesa, V., Vélez, D. **2017**. *In Vitro* reduction of arsenic bioavailability using dietary strategies. *J. Agric. Food. Chem.*, 65(19), 3956-3964.
- Comisión Europea. **2000**. Ambient air pollution by As, Cd and Ni compounds (Position paper - final). *Office for Official Publications of the European Communities*, Luxembourg, 315, 318.
- Copat, C., Arena, G., Fiore, M., Ledda, C., Fallico, R., Sciacca, S., Ferrante, M. **2013**. Heavy metals concentrations in fish and shellfish from eastern Mediterranean Sea: consumption advisories. *Food Chem. Toxicol.*, 53, 33-37.
- Corr, S.C., Gahan, C.C., Hill, C. **2007**. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 52(1), 2-12.
- Cox, A.J., Zhang, P., Bowden, D.W., Devereaux, B., Davoren, P.M., Cripps, A.W., West, N.P. **2017**. Increased intestinal permeability as a risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Metab. J.*, 43(2), 163-166.
- Cremer, D., Rabeler, R., Roberts, A., Lynch, B. **2006**. Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA). *Regul. Toxicol. Pharm.*, 46(1), 29-41.
- Cui, W., Li, L., Sun, C., Wen, Y., Zhou, Y., Dong, Y., Liu, P. **2010**. Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 43(4), 330-337.
- Das, R., Das, A., Roy, A., Kumari, U., Bhattacharya, S., Haldar, P.K. **2015**. β -Carotene ameliorates arsenic-induced toxicity in albino mice. *Biol. Trace Elem. Res.*, 164(2), 226-233.
- De Carlo, F., Witte, T.R., Hardman, W.E., Claudio, P.P. **2013**. Omega-3 eicosapentaenoic acid decreases CD133 colon cancer stem-like cell marker expression while increasing sensitivity to chemotherapy. *PLoS One*, 8(7), e69760.
- Devriese, S., Van den Bossche, L., Van Welden, S., Holvoet, T., Pinheiro, I., Hindryckx, P., De Vos, M., Laukens, D. **2017**. T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes. *Histochem. Cell Biol.*, 148(1), 85-93.

Directiva 96/5/CE de la Comisión. **1996**. Commission Directive 96/5/EC, Euratom of 16 February 1996 on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children. *Official Journal*, L49, 17-28.

Directiva 2001/15/CE de la Comisión. **2001**. Commission Directive 2001/15/EC of 15 February 2001 on substances that may be added for specific nutritional purposes in foods for particular nutritional uses. *Official Journal*, L52, 19-25.

dos Santos, L.M.G., Jacob, S.d.C., Vidal, N.C. **2009**. Avaliação da concentração de arsénico, cádmio e chumbo em amostras de atum enlatadas, comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Hig. Aliment.*, 23(172/173), 98-100.

Drobna, Z., Naranmandura, H., Kubachka, K.M., Edwards, B.C., Herbin-Davis, K., Styblo, M., Le, X.C., Creed, J.T., Maeda, N., Hughes, M.F. **2009**. Disruption of the arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase gene in the mouse alters the phenotype for methylation of arsenic and affects distribution and retention of orally administered arsenate. *Chem. Res. Toxicol.*, 22(10), 1713-1720.

Dröge, W. **2002**. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82, 47-95.

Eblin, K., Bowen, M., Crome, D., Bredfeldt, T., Mash, E., Lau, S., Gandolfi, A. **2006**. Arsenite and monomethylarsonous acid generate oxidative stress response in human bladder cell culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217(1), 7-14.

EFSA. **2006**. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. The use of L-cysteine in foods intended for infants and young children, Question n° EFSA Q-2005-083. *EFSA J.*, 390, 1-7.

EFSA. **2009**. Panel in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA J.*, 7(10), 1351.

Ellulu, M.S., Rahmat, A., Patimah, I., Khaza'ai, H., Abed, Y. **2015**. Effect of vitamin C on inflammation and metabolic markers in hypertensive and/or diabetic obese adults: a randomized controlled trial. *Drug Des. Devel. Ther.*, 9, 3405.

Enss, M.-L., Cornberg, M., Wagner, S., Gebert, A., Henrichs, M., Eisenblätter, R., Beil, W., Kownatzki, R., Hedrich, H. **2000**. Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. *Inflamm. Res.*, 49(4), 162-169.

U.S. EPA. **2009**. Toxicological review of inorganic Arsenic (CAS No. 7440-38-2) In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). *U.S. Environmental Protection Agency*, Washington, DC, 575.

Erben, U., Loddenkemper, C., Doerfel, K., Spieckermann, S., Haller, D., Heimesaat, M.M., Zeitz, M., Siegmund, B., Kühl, A.A. **2014**. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 7(8), 4557-4576.

Falcó, G., Llobet, J.M., Bocio, A., Domingo, J.L. **2006**. Daily intake of arsenic, cadmium, mercury, and lead by consumption of edible marine species. *J. Agric. Food. Chem.*, 54, 6106-6112.

FDA. **2016**. Arsenic in rice and rice products risk assessment report. Version revised for public comment. *Center for Food Safety and Applied Nutrition*, Revisado en marzo 2016, 269.

Ferreccio, C., González, C., Milosavjlevic, V., Marshall, G., Sancha, A.M., Smith, A.H. **2000**. Lung cancer and arsenic concentrations in drinking water in Chile. *Epidemiology*, 673-679.

Flora, S.J. **2011**. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biol. Med.*, 51(2), 257-281.

Fogh, J., Trempe, G. **1975**. New human tumor cell lines. En: J. Fogh (Ed), *Human tumor cells in vitro*, Springer, pp. 115-159.

Funaoka, H., Kanda, T., Fujii, H. **2010**. Intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) as a new biomarker for intestinal diseases. *Rinsho byori. Jap. J. Clin. Path.*, 58(2), 162-168.

Gamble, M.V., Liu, X., Ahsan, H., Pilsner, J.R., Ilievski, V., Slavkovich, V., Parvez, F., Levy, D., Factor-Litvak, P., Graziano, J.H. **2005**. Folate, homocysteine, and arsenic metabolism in arsenic-exposed individuals in Bangladesh. *Environ. Health Perspect.*, 113(12), 1683-1688.

Gargalionis, A.N., Piperi, C., Adamopoulos, C., Papavassiliou, A.G. **2012**. Histone modifications as a pathogenic mechanism of colorectal tumorigenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 44(8), 1276-1289.

GB 2762. **2014**. China's Maximum Levels for Contaminants in Foods. *China Ministry of Health*, I.

Genestra, M. **2007**. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.*, 19(9), 1807-1819.

George, C.M., Sima, L., Arias, M., Mihalic, J., Cabrera, L.Z., Danz, D., Checkley, W., Gilman, R.H. **2014**. Arsenic exposure in drinking water: an unrecognized health threat in Peru. *Bull. World Health Organ.*, 92, 565-572.

Ghosh, S., Mishra, R., Biswas, S., Bhadra, R.K., Mukhopadhyay, P.K. **2017**. α -Lipoic acid mitigates arsenic-induced hematological abnormalities in adult male rats. *Iran. J. Med. Sci.*, 42(3), 242-250.

Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., Jaramillo, B. **2003**. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 81(1), 1-44.

Gordon, J., Elshourbagy, N., Lowe, J., Liao, W., Alpers, D., Taylor, J. **1985**. Tissue specific expression and developmental regulation of two genes coding for rat fatty acid binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 260(4), 1995-1998.

Gregorieff, A., Clevers, H. **2005**. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.*, 19(8), 877-890.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M. **2010**. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.

Groschwitz, K.R., Hogan, S.P. **2009**. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 124(1), 3-20.

Guha Mazumder, D., Dasgupta, U.B. **2011**. Chronic arsenic toxicity: studies in West Bengal, India. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 27(9), 360-370.

Guo, R.-J., Suh, E.R., Lynch, J.P. **2004**. The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer Biol. Ther.*, 3(7), 593-601.

Guy-Grand, D., DiSanto, J.P., Henchoz, P., Malassis-Séris, M., Vassalli, P. **1998**. Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN- γ , TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur. J. Immunol.*, 28(2), 730-744.

Halttunen, T., Finell, M., Salminen, S. **2007**. Arsenic removal by native and chemically modified lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 120(1-2), 173-178.

Hartman, K.G., Bortner, J.D., Falk, G.W., Yu, J., Martín, M.G., Rustgi, A.K., Lynch, J.P. **2013**. Modeling inflammation and oxidative stress in gastrointestinal disease development using novel organotypic culture systems. *Stem Cell. Res. Ther.*, 4(1), S5.

Harvey, C.F., Swartz, C.H., Badruzzaman, A., Keon-Blute, N., Yu, W., Ali, M.A., Jay, J., Beckie, R., Niedan, V., Brabander, D. **2002**. Arsenic mobility and groundwater extraction in Bangladesh. *Science*, 298(5598), 1602-1606.

Hehner, S.P., Breikreutz, R., Shubinsky, G., Unsoeld, H., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, M.L., Droge, W. **2000**. Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J. Immunol.*, 165(8), 4319-4328.

Heitkemper, D.T., Vela, N.P., Stewart, K.R., Westphal, C.S. **2001**. Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 16(4), 299-306.

Hernández, A., Marcos, R. **2008**. Genetic variations associated with interindividual sensitivity in the response to arsenic exposure. *Pharmacogenomics*, 9(8), 1113-1132.

Herszenyi, L., Hritz, I., Lakatos, G., Varga, M.Z., Tulassay, Z. **2012**. The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(10), 13240-13263.

Heumüller-Klug, S., Sticht, C., Kaiser, K., Wink, E., Hagl, C., Wessel, L., Schäfer, K.-H. **2015**. Degradation of intestinal mRNA: a matter of treatment. *World J. Gastroenterol.*, 21(12), 3499.

Heywood, R., Sortwell, R.J. **1978**. Arsenic intoxication in the Rhesus monkey. *Toxicol. Lett.*, 3, 137-144.

Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T. **1989**. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96(3), 736-749.

Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Fuchs, A., Bergoglio, R., Tello, E.E., Nicolli, H., Smith, A.H. **1996**. Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina. *Epidemiology*, 7(2), 117-124.

Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Smith, A.H. **1998**. Lung and kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Cordoba, Argentina. *Int. J. Epidemiol.*, 27(4), 561-569.

Hu, X., Beeton, C. **2010**. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *J. Vis. Exp.*,(45), e2445.

Hubatsch, I., Ragnarsson, E.G., Artursson, P. **2007**. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat. Protoc.*, 2(9), 2111-2119.

Hughes, M.F. **2002**. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.*, 133(1), 1-16.

Hughes, M.F., Kenyon, E.M., Edwards, B.C., Mitchell, C.T., Del Razo, L.M., Thomas, D.J. **2003**. Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 191(3), 202-210.

Hughes, M.F., Beck, B.D., Chen, Y., Lewis, A.S., Thomas, D.J. **2011**. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol. Sci.*, 123(2), 305-332.

Hwang, Y.-H., Bornschein, R.L., Grote, J., Menrath, W., Roda, S. **1997**. Environmental arsenic exposure of children around a former copper smelter site. *Environ. Res.*, 72(1), 72-81.

IARC. **1987**. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Supplement 7, overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs, Volumes 1-42, *IARC Press*, Lyon.

IARC. **2004**. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic, Volume 84, *IARC Press*, Lyon.

IARC. **2012**. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts, Volume 100C, *IARC Press*, Lyon.

Iizuka, M., Konno, S. **2011**. Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J. Gastroenterol.*, 17(17), 2161-2171.

Inokuma, T., Haraguchi, M., Fujita, F., Tajima, Y., Kanematsu, T. **2009**. Oxidative stress and tumor progression in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 56, 343-347.

- Ishii, H.M., Murakashi, E., Igarashi-Takeuchi, H., Shoji, H., Numabe, Y. **2017**. Alpha-lipoic acid inhibits NF- κ B signal transduced inflammatory cytokines secretion in LPS-induced human gingival fibroblasts. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaish*, 59(1), 28-38.
- Jadán-Piedra, C., Chiocchetti, G.M., Clemente, M.J., Vélez, D., Devesa, V. **2018**. Dietary compounds as modulators of metals and metalloids toxicity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 58(12), 2055-2067.
- JECFA. **2010**. Summary report of the seventy-second meeting of JECFA. *JECFA/72/SC*, Roma, 16.
- Jia, Y., Guo, M. **2013**. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Chin. J. Cancer*, 32(1), 21-30.
- Jialal, I., Singh, U. **2006**. Is vitamin C an antiinflammatory agent? *Am. J. Clin. Nutr.*, 83, 525-526.
- Jiminez, J.A., Uwiera, T.C., Inglis, G.D., Uwiera, R.R. **2015**. Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut Pathog.*, 7(1), 29.
- Johnson, S., Chen, H., Lo, P. **2013**. *In vitro* tumorsphere formation assays. *Bio protoc.*, 3(3), e325.
- Juhasz, A.L., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sansom, L., Naidu, R. **2006**. *In vivo* assessment of arsenic bioavailability in rice and its significance for human health risk assessment. *Environ. Health Perspect.*, 114(12), 1826-1831.
- Julshamn, K., Nilsen, B.M., Frantzen, S., Valdersnes, S., Maage, A., Nedreaas, K., Sloth, J.J. **2012**. Total and inorganic arsenic in fish samples from Norwegian waters. *Food Addit. Contam. B*, 5(4), 229-235.
- Kaarteenaho, R., Merikallio, H., Lehtonen, S., Harju, T., Soini, Y. **2010**. Divergent expression of claudin-1,-3,-4,-5 and-7 in developing human lung. *Respir. Res.*, 11(1), 59.
- Kadirvel, R., Sundaram, K., Mani, S., Samuel, S., Elango, N., Panneerselvam, C. **2007**. Supplementation of ascorbic acid and α -tocopherol prevents arsenic-induced protein oxidation and DNA damage induced by arsenic in rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 26(12), 939-946.

Karagas, M.R., Stukel, T.A., Morris, J.S., Tosteson, T.D., Weiss, J.E., Spencer, S.K., Greenberg, E.R. **2001**. Skin cancer risk in relation to toenail arsenic concentrations in a U.S. population-based case-control study. *Am. J. Epidemiol.*, 153(6), 559-565.

Karczewski, J., Troost, F.J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R.J., Wells, J.M. **2010**. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* *in vivo* and protective effects on the epithelial barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 298(6), G851-859.

Karczmariski, J., Rubel, T., Paziewska, A., Mikula, M., Bujko, M., Kober, P., Dadlez, M., Ostrowski, J. **2014**. Histone H3 lysine 27 acetylation is altered in colon cancer. *Clin. Proteomics*, 11, 24.

Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y.-i., Noda, T. **2008**. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol. Biol. Cell*, 19(6), 2465-2475.

Kenyon, E., Del Razo, L., Hughes, M. **2005**. Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in mice following acute oral administration of arsenate. *Toxicol. Sci.*, 85(1), 468-475.

Keshavarzian, A., Farhadi, A., Forsyth, C.B., Rangan, J., Jakate, S., Shaikh, M., Banan, A., Fields, J.Z. **2009**. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J. Hepatol.*, 50(3), 538-547.

Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z. **2010**. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52-67.

Khan, N., Ryu, K.Y., Choi, J.Y., Nho, E.Y., Habte, G., Choi, H., Kim, M.H., Park, K.S., Kim, K.S. **2015**. Determination of toxic heavy metals and speciation of arsenic in seaweeds from South Korea. *Food Chem.*, 169, 464-470.

Kim, J.J., Shajib, M.S., Manocha, M.M., Khan, W.I. **2012**. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J. Vis. Exp.*, (60), e3678.

Kim, Y.-H., Park, E.-J., Han, S.T., Park, J.-W., Kwon, T.K. **2005**. Arsenic trioxide induces Hsp70 expression via reactive oxygen species and JNK pathway in MDA231 cells. *Life Sci.*, 77(22), 2783-2793.

- Kim, Y.S., Ho, S.B. **2010**. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 12(5), 319-330.
- Ko, R.J. **1999**. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 37(6), 697-708.
- Kraiczky, J., Nayak, K.M., Howell, K.J., Ross, A., Forbester, J., Salvestrini, C., Mustata, R., Perkins, S., Andersson-Rolf, A., Leenen, E. **2017**. DNA methylation defines regional identity of human intestinal epithelial organoids and undergoes dynamic changes during development. *Gut*, gutjnl-2017-314817.
- Krohn, R.M., Lemaire, M., Silva, L.F.N., Lemarié, C., Bolt, A., Mann, K.K., Smits, J.E. **2016**. High-selenium lentil diet protects against arsenic-induced atherosclerosis in a mouse model. *J. Nutr. Biochem.*, 27, 9-15.
- Kumar, J.S., Subramanian, V.S., Kapadia, R., Kashyap, M.L., Said, H.M. **2013**. Mammalian colonocytes possess a carrier-mediated mechanism for uptake of vitamin B3 (niacin): studies utilizing human and mouse colonic preparations. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 305(3), G207-213.
- Kumari, M.R., Hiramatsu, M., Ebadi, M. **1998**. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radical Res.*, 29(2), 93-101.
- Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T., Ferdinandy, P. **2010**. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 61(2), 205-209.
- Lai, M.-S., Hsueh, Y.-M., Chen, C.-J., Shyu, M.-P., Chen, S.-Y., Kuo, T.-L., Wu, M.-M., Tai, T.-Y. **1994**. Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus. *Am. J. Epidemiol.*, 139(5), 484-492.
- Lai, V.W.M., Cullen, W.R., Harrington, C.F., Reimer, K.J. **1997**. The characterization of arsenosugars in commercially available algal products including a Nostoc species of terrestrial origin. *Appl. Organomet. Chem.*, 11(10-11), 797-803.
- Langen, R.C.J., Schols, A.M.W.J., Kelders, M.C.J.M., Wouters, E.F.M., Janssen-Heininger, Y.M.W. **2001**. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kB. *FASEB J.*, 15(7), 1169-1180.

Laparra, J., Vélez, D., Barberá, R., Farré, R., Montoro, R. **2008**. As₂O₃-induced oxidative stress and cycle progression in a human intestinal epithelial cell line (Caco-2). *Toxicol. In Vitro*, 22(2), 444-449.

Laukoetter, M.G., Nava, P., Nusrat, A. **2008**. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 14(3), 401-407.

Lee, C.-H., Liao, W.-T., Yu, H.-S. **2010**. Mechanisms and immune dysregulation in arsenic skin carcinogenesis. *J. Cancer Ther.*, 1(02), 76-86.

Lei, Y., Wang, K., Deng, L., Chen, Y., Nice, E.C., Huang, C. **2015**. Redox regulation of inflammation: old elements, a new story. *Med. Res. Rev.*, 35(2), 306-340.

Leoni, B.D., Natoli, M., Nardella, M., Bucci, B., Zucco, F., D'Agnano, I., Felsani, A. **2012**. Differentiation of Caco-2 cells requires both transcriptional and post-translational down-regulation of Myc. *Differentiation*, 83(3), 116-127.

Li, C., Gao, M., Zhang, W., Chen, C., Zhou, F., Hu, Z., Zeng, C. **2016a**. Zonulin Regulates Intestinal Permeability and Facilitates Enteric Bacteria Permeation in Coronary Artery Disease. *Sci. Rep.*, 6, 29142.

Li, M., Cai, J.F., Chiu, J.F. **2002**. Arsenic induces oxidative stress and activates stress gene expressions in cultured lung epithelial cells. *J. Cell. Biochem.*, 87(1), 29-38.

Li, Y., Huang, J., Foley, N.M., Xu, Y., Li, Y.P., Pan, J., Redmond, H.P., Wang, J.H., Wang, J. **2016b**. B7H3 ameliorates LPS-induced acute lung injury via attenuation of neutrophil migration and infiltration. *Sci. Rep.*, 6, 31284.

List, A., Beran, M., DiPersio, J., Slack, J., Vey, N., Rosenfeld, C., Greenberg, P. **2003**. Opportunities for Trisenox® (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 17(8), 1499-1507.

Liu, T., Shi, Y., Du, J., Ge, X., Teng, X., Liu, L., Wang, E., Zhao, Q. **2016**. Vitamin D treatment attenuates 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis but not oxazolone-induced colitis. *Sci. Rep.*, 6, 32889.

Liu, T., Zhang, Q., Mo, W., Yu, Q., Xu, S., Li, J., Li, S., Feng, J., Wu, L., Lu, X. **2017**. The protective effects of shikonin on hepatic ischemia/reperfusion injury are mediated by the activation of the PI3K/Akt pathway. *Sci. Rep.*, 7, 44785.

- Llorente-Mirandes, T., Barbero, M., Rubio, R., López-Sánchez, J.F. **2014**. Occurrence of inorganic arsenic in edible Shiitake (*Lentinula edodes*) products. *Food Chem.*, 158, 207-215.
- Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R., Liaudet, L. **2014**. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol. Chem.*, 395(2), 203-230.
- Mahler, G.J., Esch, M.B., Glahn, R.P., Shuler, M.L. **2009**. Characterization of a gastrointestinal tract microscale cell culture analog used to predict drug toxicity. *Biotechnol. Bioeng.*, 104(1), 193-205.
- Majumdar, K.K., Guha Mazumder, D.N., Ghose, N., Ghose, A., Lahiri, S. **2009**. Systemic manifestations in chronic arsenic toxicity in absence of skin lesions in West Bengal. *Indian J. Med. Res.*, 129, 75-82.
- Mallo, G.V., Soubeyran, P., Lissitzky, J.-C., André, F., Farnarier, C., Marvaldi, J., Dagorn, J.-C., Iovanna, J.L. **1998**. Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *J. Biol. Chem.*, 273(22), 14030-14036.
- Martena, M.J., Van Der Wielen, J.C., Rietjens, I.M., Klerx, W.N., De Groot, H.N., Konings, E.J. **2010**. Monitoring of mercury, arsenic, and lead in traditional Asian herbal preparations on the Dutch market and estimation of associated risks. *Food Addit. Contam.*, 27(2), 190-205.
- Mathews, V., George, B., Chendamarai, E., Lakshmi, K.M., Desire, S., Balasubramanian, P., Viswabandya, A., Thirugnanam, R., Abraham, A., Shaji, R.V. **2010**. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term follow-up data. *J. Clin. Oncol.*, 28(24), 3866-3871.
- Mazé, A., Boël, G., Zúniga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M.J., Monedero, V., Correia, K., Jacques, N., Beaufiles, S. **2010**. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J. Bacteriol.*, 192(10), 2647-2648.
- Mazumder, D.N.G., Haque, R., Ghosh, N., De, B.K., Santra, A., Chakraborti, D., Smith, A.H. **2000**. Arsenic in drinking water and the prevalence of respiratory effects in West Bengal, India. *Int. J. Epidemiol.*, 29(6), 1047-1052.
- Michael, H., Li, Y., Wang, Y., Xue, D., Shan, J., Mazer, B., McCusker, C. **2015**. TGF- β -mediated airway tolerance to allergens induced by peptide-based immunomodulatory mucosal vaccination. *Mucosal Immunol.*, 8(6), 1248-1261.

- Mihucz, V.G., Virág, I., Zang, C., Jao, Y., Záray, G. **2007**. Arsenic removal from rice by washing and cooking with water. *Food Chem.*, 105(4), 1718-1725.
- Miller, W.H., Schipper, H.M., Lee, J.S., Singer, J., Waxman, S. **2002**. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.*, 62(14), 3893-3903.
- Mitra, S.R., Mazumder, D.G., Basu, A., Block, G., Haque, R., Samanta, S., Ghosh, N., Smith, M.M.H., von Ehrenstein, O.S., Smith, A.H. **2004**. Nutritional factors and susceptibility to arsenic-caused skin lesions in West Bengal, India. *Environ. Health Perspect.*, 112(10), 1104-1109.
- Moore, P.D., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B. **2010**. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ. Toxicol.*, 25(3), 221-226.
- Morgan, M.J., Liu, Z.G. **2011**. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res.*, 21(1), 103-115.
- Moura, F.A., de Andrade, K.Q., dos Santos, J.C.F., Goulart, M.O.F. **2015**. Lipoic acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. *Curr. Top. Med. Chem.*, 15(5), 458-483.
- Moyer, M.P., Manzano, L.A., Merriman, R.L., Stauffer, J.S., Tanzer, L.R. **1996**. NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 32(6), 315-317.
- Mumford, J.L., Wu, K., Xia, Y., Kwok, R., Yang, Z., Foster, J., Sanders Jr, W.E. **2007**. Chronic arsenic exposure and cardiac repolarization abnormalities with QT interval prolongation in a population-based study. *Environ. Health Perspect.*, 115(5), 690.
- Muñoz, O., Devesa, V., Suñer, M.A., Vélez, D., Montoro, R., Urieta, I., Macho, M.L., Jalón, M. **2000**. Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products. *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 4369-4376.
- Mutoh, H., Naya, F.J., Tsai, M.-J., Leiter, A.B. **1998**. The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Dev.*, 12(6), 820-830.
- Naik, E., Dixit, V.M. **2011**. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J. Exp. Med.*, 208(3), 417-420.

- Nakagawa, Y., Akao, Y., Morikawa, H., Hirata, I., Katsu, K., Naoe, T., Ohishi, N., Yagi, K. **2002**. Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. *Life Sci.*, 70(19), 2253-2269.
- Nearing, M.M., Koch, I., Reimer, K.J. **2014**. Arsenic speciation in edible mushrooms. *Environ. Sci. Technol.*, 48(24), 14203-14210.
- Nicholson, J., Wolmarans, M., Park, G. **2000**. The role of albumin in critical illness. *Br. J. Anaesth.*, 85(4), 599-610.
- Ning, Y., Manegold, P.C., Hong, Y.K., Zhang, W., Pohl, A., Lurje, G., Winder, T., Yang, D., LaBonte, M.J., Wilson, P.M. **2011**. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity *in vitro* and *in vivo* in colon cancer cell line models. *Int. J. Cancer*, 128(9), 2038-2049.
- Ning, Y., Labonte, M.J., Zhang, W., Bohanes, P.O., Gerger, A., Yang, D., Benhaim, L., Paez, D., Rosenberg, D.O., Venkata, K.C.N. **2012**. The CXCR2 antagonist, SCH-527123, shows antitumor activity and sensitizes cells to oxaliplatin in preclinical colon cancer models. *Mol. Cancer Ther.*, 11(6), 1353-1364.
- Nissinen, L., Kähäri, V.-M. **2014**. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840(8), 2571-2580.
- Noben, M., Vanhove, W., Arnauts, K., Santo Ramalho, A., Van Assche, G., Vermeire, S., Verfaillie, C., Ferrante, M. **2017**. Human intestinal epithelium in a dish: Current models for research into gastrointestinal pathophysiology. *United European Gastroenterol. J.*, 5(8), 1073-1081.
- Nordstrom, D.K. **2002**. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science*, 296(5576), 2143-2145.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. **2000**. Investigation of the almar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*, 267, 5421-5426.
- O'Hara, A.M., O'Regan, P., Fanning, A., O'Mahony, C., Macsharry, J., Lyons, A., Bienenstock, J., O'Mahony, L., Shanahan, F. **2006**. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology*, 118(2), 202-215.
- Odabasoglu, F., Halici, Z., Aygun, H., Halici, M., Atalay, F., Cakir, A., Cadirci, E., Bayir, Y., Suleyman, H. **2011**. α -Lipoic acid has anti-inflammatory and anti-

oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced acute and cotton pellet-induced chronic inflammations. *Br. J. Nutr.*, 105(1), 31-43.

Oguri, T., Yoshinaga, J., Tao, H., Nakazato, T. **2014**. Inorganic arsenic in the Japanese diet: daily intake and source. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 66(1), 100-112.

Olguín, J.E., Medina-Andrade, I., Molina, E., Vázquez, A., Pacheco-Fernández, T., Saavedra, R., Pérez-Plasencia, C., Chirino, Y.I., Vaca-Paniagua, F., Arias-Romero, L.E. **2018**. Early and partial reduction in CD4⁺ foxp3⁺ regulatory T cells during colitis-associated colon cancer induces CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation inhibiting tumorigenesis. *J. Cancer*, 9(2), 239.

Olmedo, P., Pla, A., Hernandez, A.F., Barbier, F., Ayouni, L., Gil, F. **2013**. Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. *Environ. Int.*, 59, 63-72.

OMS. **2017**. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. *World Health Organization*, Genova, 4th edition, 631.

Orbach, S.M., Less, R.R., Kothari, A., Rajagopalan, P. **2017**. *In Vitro* Intestinal and Liver Models for Toxicity Testing. *ACS Biomater Sci. Eng.*, 3(9), 1898-1910.

Parsons, S., Watson, S., Collins, H., Griffin, N., Clarke, P., Steele, R. **1998**. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy. *Br. J. Cancer*, 78(11), 1495-1502.

Pastorelli, L., De Salvo, C., Mercado, J.R., Vecchi, M., Pizarro, T.T. **2013**. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. *Front. Immunol.*, 4, 280.

Pelsers, M.M., Namiot, Z., Kisielewski, W., Namiot, A., Januszkiewicz, M., Hermens, W.T., Glatz, J.F. **2003**. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin. Biochem.*, 36(7), 529-535.

Peng, L., He, Z., Chen, W., Holzman, I.R., Lin, J. **2007**. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr. Res.*, 61(1), 37-41.

- Person, R.J., Ngalame, N.N.O., Makia, N.L., Bell, M.W., Waalkes, M.P., Tokar, E.J. **2015**. Chronic inorganic arsenic exposure *in vitro* induces a cancer cell phenotype in human peripheral lung epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 286(1), 36-43.
- Pimparkar, B., Bhave, A. **2010**. Arsenicosis: review of recent advances. *J. Assoc. Physicians India*, 58, 617-624.
- Pisal, D.S., Yellepeddi, V.K., Kumar, A., Kaushik, R.S., Hildreth, M.B., Guan, X., Palakurthi, S. **2008**. Permeability of surface-modified polyamidoamine (PAMAM) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.*, 350(1-2), 113-121.
- Pitman, R.S., Blumberg, R.S. **2000**. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. *J. Gastroenterol.*, 35(11), 805-814.
- Polya, D., Gault, A., Diebe, N., Feldman, P., Rosenboom, J., Gilligan, E., Fredericks, D., Milton, A., Sampson, M., Rowland, H. **2005**. Arsenic hazard in shallow Cambodian groundwaters. *Mineral. Mag.*, 69(5), 807-823.
- Porter, E., Bevins, C., Ghosh, D., Ganz, T. **2002**. The multifaceted Paneth cell. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59(1), 156-170.
- Qu, W., Waalkes, M.P. **2015**. Metallothionein blocks oxidative DNA damage induced by acute inorganic arsenic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 282(3), 267-274.
- Rahman, M.M., Owens, G., Naidu, R. **2009**. 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. Health*, 31(1), 179-187.
- Raihan, S.Z., Chowdhury, A., Rabbani, G.H., Marni, F., Ali, M.S., Nahar, L., Sarker, S.D. **2009**. Effect of aqueous extracts of black and green teas in arsenic-induced toxicity in rabbits. *Phytother. Res.*, 23(11), 1603-1608.
- Rangkadilok, N., Siripriwon, P., Nookabkaew, S., Suriyo, T., Satayavivad, J. **2015**. Arsenic, cadmium, and manganese levels in shellfish from Map Ta Phut, an industrial area in Thailand, and the potential toxic effects on human cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 68(1), 169-180.

Razo, I., Carrizales, L., Castro, J., Díaz-Barriga, F., Monroy, M. **2004**. Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water Air Soil Pollut.*, 152(1-4), 129-152.

Real Decreto 53. **2013**. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, 34, volume I, 11370-11421.

Reddy, M.V.B., Sasikala, P., Karthik, A., Sudheer, S., Murthy, L. **2012**. Protective role of curcumin against arsenic trioxide toxicity during gestation and lactational periods. *Chemotherapy*, 2(3), 270-276.

Reglamento C.E. 1006. **2015**. Reglamento (UE) 2015/1006 de la Comisión de 25 de junio por el que se modifica el Regulation (CE) No 1881/2006 en cuanto al contenido máximo de arsénico inorgánico en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 161/114-116.

Ren, F., Sheng, W.-Q., Du, X. **2013**. CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J. Gastroenterol.*, 19(17), 2603-2611.

Rey, N.A., Howarth, O.W., Pereira-Maia, E.C. **2004**. Equilibrium characterization of the As(III)–cysteine and the As(III)–glutathione systems in aqueous solution. *J. Inorg. Biochem.*, 98(6), 1151-1159.

Ricchi, P., Pignata, S., Di Popolo, A., Memoli, A., Apicella, A., Zarrilli, R., Acquaviva, A.M. **1997**. Effect of aspirin on cell proliferation and differentiation of colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Int. J. Cancer*, 73(6), 880-884.

Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., De Maria, R. **2007**. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111-115.

Rigby Duncan, K.E., Kirby, C.W., Stillman, M.J. **2008**. Metal exchange in metallothioneins: a novel structurally significant Cd(5) species in the alpha domain of human metallothionein 1a. *FEBS J.*, 275(9), 2227-2239.

Riverón Corteguera, R.L. **1999**. Fisiopatología de la diarrea aguda. *Rev. Cubana Pediatr.*, 71(2), 86-115.

Roberts, S.M., Weimar, W.R., Vinson, J., Munson, J.W., Bergeron, R.J. **2002**. Measurement of arsenic bioavailability in soil using a primate model. *Toxicol. Sci.*, 67(2), 303-310.

- Rogler, G., Rosano, G. **2014**. The heart and the gut. *Eur. Heart J.*, 35(7), 426-430.
- Romero, M., Menchén, L. **2013**. Probióticos: nuevas líneas de investigación y aplicaciones terapéuticas en patología digestiva. *Nutr. Hosp.*, 28, 46-48.
- Rose, M., Lewis, J., Langford, N., Baxter, M., Origgi, S., Barber, M., MacBain, H., Thomas, K. **2007**. Arsenic in seaweed - forms, concentration and dietary exposure. *Food Chem. Toxicol.*, 45(7), 1263-1267.
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M.S., Mengheri, E. **2007**. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br. J. Nutr.*, 95(06), 1177-1184.
- Rossmann, T.G. **2003**. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat. Res.*, 533(1), 37-65.
- Rousset, M. **1986**. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, 68(9), 1035-1040.
- Roy, A., Das, A., Das, R., Haldar, S., Bhattacharya, S., Haldar, P.K. **2014**. Naringenin, a citrus flavonoid, ameliorates arsenic-induced toxicity in Swiss albino mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 33(3), 195-204.
- Roy, R.V., Son, Y.-O., Pratheeshkumar, P., Wang, L., Hitron, J.A., Divya, S.P., Rakesh, D., Kim, D., Yin, Y., Zhang, Z. **2015**. Epigenetic targets of arsenic: emphasis on epigenetic modifications during carcinogenesis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 34(1), 63-84.
- Roychowdhury, T., Tokunaga, H., Ando, M. **2003**. Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villagers from an arsenic-affected area of West Bengal, India. *Sci. Total Environ.*, 308(1-3), 15-35.
- Rubin, D.C., Shaker, A., Levin, M.S. **2012**. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front. Immunol.*, 3, 107.
- Rundhaug, J.E. **2005**. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.*, 9(2), 267-285.

Ruttens, A., Blanpain, A.C., De Temmerman, L., Waegeneers, N. **2012**. Arsenic speciation in food in Belgium. *J. Geomechem. Explor.*, 121, 55-61.

Sah, S., Vandenberg, A., Smits, J. **2013**. Treating chronic arsenic toxicity with high selenium lentil diets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 272(1), 256-262.

Said, H.M., Ortiz, A., Moyer, M.P., Yanagawa, N. **2000**. Riboflavin uptake by human-derived colonic epithelial NCM460 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 278(2), C270-C276.

Said, H.M., Ortiz, A., Subramanian, V.S., Neufeld, E.J., Moyer, M.P., Dudeja, P.K. **2001**. Mechanism of thiamine uptake by human colonocytes: studies with cultured colonic epithelial cell line NCM460. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 281(1), G144-G150.

Sambuy, Y., Angelis, I.D., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Zucco, A.S., F. **2005**. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cells functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.*, 21, 1-26.

Sancho, E., Batlle, E., Clevers, H. **2003**. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15(6), 763-770.

Sardu, C., Santulli, G., Santamaria, M., Barbieri, M., Sacra, C., Paolisso, P., D'Amico, F., Testa, N., Caporaso, I., Paolisso, G. **2017**. Effects of alpha lipoic acid on multiple cytokines and biomarkers and recurrence of atrial fibrillation within 1 year of catheter ablation. *Am. J. Cardiol.*, 119(9), 1382-1386.

Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G., Van Es, J.H., Van Den Brink, S., Van Houdt, W.J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P.D. **2011**. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141(5), 1762-1772.

SCF. **1991**. First addendum to the Reports of the Scientific Committee on Food concerning the essential requirements of infant formulae and follow-up milks based on cow's milk proteins and the minimum requirements for soya-based infant formulae and follow-up milks. Reports of the Scientific Committee for Food. *European Commission*, Luxembourg, 24th series.

Serras, F. **2016**. The benefits of oxidative stress for tissue repair and regeneration. *FLY*, 10(3), 128-133.

- Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D., Hake, S.B. **2007**. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat. Protoc.*, 2(6), 1445-1457.
- Shen, L., Turner, J.R. **2006**. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 290(4), G577-G582.
- Sherwood, C.L., Liguori, A.E., Olsen, C.E., Lantz, R.C., Burgess, J.L., Boitano, S. **2013**. Arsenic compromises conducting airway epithelial barrier properties in primary mouse and immortalized human cell cultures. *PLoS One*, 8(12), e82970.
- Shi, H., Shi, X., Liu, K.J. **2004**. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.*, 255(1-2), 67-78.
- Shin, K., Fogg, V.C., Margolis, B. **2006**. Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 207-235.
- Shukla, P.K., Gangwar, R., Manda, B., Meena, A.S., Yadav, N., Szabo, E., Balogh, A., Lee, S.C., Tigyi, G., Rao, R. **2016**. Rapid disruption of intestinal epithelial tight junction and barrier dysfunction by ionizing radiation in mouse colon in vivo: protection by N-acetyl-l-cysteine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 310(9), G705-G715.
- Signes-Pastor, A.J., Deacon, C., Jenkins, R.O., Haris, P.I., Carbonell-Barrachina, Á.A., Meharg, A.A. **2009**. Arsenic speciation in Japanese rice drinks and condiments. *J. Environ. Monit.*, 11(11), 1930-1934.
- Silva, L.G. **2013**. Arsénico, el elemento inclasificable. *Educación Química*, 24, 495-500.
- Sinha, R., Sinha, I., Calcagnotto, A., Trushin, N., Haley, J., Schell, T., Richie Jr, J. **2018**. Oral supplementation with liposomal glutathione elevates body stores of glutathione and markers of immune function. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 72(1), 105-111.
- Slekovec, M., Irgolic, K.J. **1996**. Uptake of arsenic by mushrooms from soil. *Chem. Spec. Bioavailab.*, 8(3-4), 67-73.
- Sloth, J.J., Julshman, K. **2008**. Survey of total and inorganic arsenic content in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from Norwegian Fiords: revelation of unusual high levels of inorganic arsenic. *J. Agric. Food. Chem.*, 56, 1269-1273.

Smith, K.R., Klei, L.R., Barchowsky, A. **2001**. Arsenite stimulates plasma membrane NADPH oxidase in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 280(3), L442-L449.

Song, M.O., Freedman, J.H. **2005**. Expression of copper-responsive genes in HepG2 cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 279(1-2), 141-147.

Soto-Peña, G.A., Luna, A.L., Acosta-Saavedra, L., Conde, P., López-Carrillo, L., Cebrián, M.E., Bastida, M., Calderón-Aranda, E.S., Vega, L. **2006**. Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *FASEB J.*, 20(6), 779-781.

Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M. **2011**. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature*, 470(7332), 105-110.

Stelzner, M., Helmrath, M., Dunn, J.C., Henning, S.J., Houchen, C.W., Kuo, C., Lynch, J., Li, L., Magness, S.T., Martin, M.G. **2012**. A nomenclature for intestinal *in vitro* cultures. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 302(12), G1359-G1363.

Styblo, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R., Thomas, D.J. **2000**. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch. Toxicol.*, 74(6), 289-299.

Sun, G.-X., Williams, P.N., Zhu, Y.-G., Deacon, C., Carey, A.-M., Raab, A., Feldmann, J., Meharg, A.A. **2009**. Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments. *Environ. Int.*, 35(3), 473-475.

Sun, H., Chow, E.C., Liu, S., Du, Y., Pang, K.S. **2008**. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 4(4), 395-411.

Sun, S., Xia, S., Ji, Y., Kersten, S., Qi, L. **2012a**. The ATP-P2X7 signaling axis is dispensable for obesity-associated inflammasome activation in adipose tissue. *Diabetes*, 61, 1471-1478.

Sun, Y., Tokar, E.J., Waalkes, M.P. **2012b**. Overabundance of putative cancer stem cells in human skin keratinocyte cells malignantly transformed by arsenic. *Toxicol. Sci.*, 125(1), 20-29.

- Suzuki, T. **2013**. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 70(4), 631-659.
- Takahashi, O., Hamada, J.-i., Abe, M., Hata, S., Asano, T., Takahashi, Y., Tada, M., Miyamoto, M., Kondo, S., Moriuchi, T. **2007**. Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.*, 17(4), 753-760.
- Tao, Y., Drabik, K.A., Waypa, T.S., Musch, M.W., Alverdy, J.C., Schneewind, O., Chang, E.B., Petrof, E.O. **2006**. Soluble factors from *Lactobacillus GG* activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 290(4), C1018-1030.
- Tchounwou, P.B., Patlolla, A.K., Centeno, J.A. **2003**. Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure - a critical review. *Toxicol. Pathol.*, 31(6), 575-588.
- Thomas, D.J., Li, J., Waters, S.B., Xing, W., Adair, B.M., Drobna, Z., Devesa, V., Styblo, M. **2007**. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Exp. Biol. Med.*, 232(1), 3-13.
- Thomas, D.J. **2008**. Unraveling arsenic - glutathione connections. *Toxicol. Sci.*, 107(2), 309-311.
- Tian, F., Zhai, Q., Zhao, J., Liu, X., Wang, G., Zhang, H., Zhang, H., Chen, W. **2012**. *Lactobacillus plantarum CCFM8661* alleviates lead toxicity in mice. *Biol. Trace Elem. Res.*, 150(1-3), 264-271.
- Tian, T., Wang, Z., Zhang, J. **2017**. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017, 4535194.
- Tibullo, D., Volti, G.L., Giallongo, C., Grasso, S., Tomassoni, D., Anfuso, C.D., Lupo, G., Amenta, F., Avola, R., Bramanti, V. **2017**. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflamm. Res.*, 66(11), 947-959.
- Tien, M.T., Girardin, S.E., Regnault, B., Le Bourhis, L., Dillies, M.A., Coppee, J.Y., Bourdet-Sicard, R., Sansonetti, P.J., Pedron, T. **2006**. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on Shigella-infected human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.*, 176(2), 1228-1237.

Tokar, E.J., Diwan, B.A., Waalkes, M.P. **2010**. Arsenic exposure transforms human epithelial stem/progenitor cells into a cancer stem-like phenotype. *Environ. Health Perspect.*, 118(1), 108-115.

Torres-Escribano, S., Leal, M., Vélez, D., Montoro, R. **2008**. Total and inorganic arsenic concentrations in rice sold in Spain, effect of cooking, and risk assessments. *Environ. Sci. Technol.*, 42(10), 3867-3872.

Tyedmers, J., Mogk, A., Bukau, B. **2010**. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11(11), 777-788.

Tyler, C.R., Allan, A.M. **2014**. The effects of arsenic exposure on neurological and cognitive dysfunction in human and rodent studies: a review. *Curr. Environ. Health Rep.*, 1(2), 132-147.

Ude, V.C., Brown, D.M., Viale, L., Kanase, N., Stone, V., Johnston, H.J. **2017**. Impact of copper oxide nanomaterials on differentiated and undifferentiated Caco-2 intestinal epithelial cells; assessment of cytotoxicity, barrier integrity, cytokine production and nanomaterial penetration. *Part. Fibre Toxicol.*, 14(1), 31.

Uede, K., Furukawa, F. **2003**. Skin manifestations in acute arsenic poisoning from the Wakayama curry-poisoning incident. *Br. J. Dermatol.*, 149(4), 757-762.

Uneyama, C., Toda, M., Yamamoto, M., Morikawa, K. **2007**. Arsenic in various foods: cumulative data. *Food Addit. Contam.*, 24(5), 447-534.

Uraz, S., Tahan, G., Aytakin, H., Tahan, V. **2013**. N-acetylcysteine expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 73(1), 61-66.

Uyar, I.S., Akpınar, M.B., Sahin, V. **2013**. Alpha lipoic acid attenuates inflammatory response during extracorporeal circulation. *Cardiovasc. J. Afr.*, 24(8), 322-326.

Vahter, M. **1994**. Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Appl. Organomet. Chem.*, 8(3), 175-182.

Vahter, M., Concha, G., Nermell, B., Nilsson, R., Dulout, F., Natarajan, A. **1995**. A unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women. *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 293(4), 455-462.

- Vahter, M. **2002**. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181, 211-217.
- Van De Walle, J., Hendrickx, A., Romier, B., Larondelle, Y., Schneider, Y.-J. **2010**. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicol. In Vitro*, 24(5), 1441-1449.
- Van Der Flier, L.G., Clevers, H. **2009**. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.*, 71, 241-260.
- Van Eden, W., Van der Zee, R., Prakken, B. **2005**. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 5(4), 318-330.
- Varona, A., Blanco, L., Perez, I., Gil, J., Irazusta, J., López, J.I., Candenás, M.L., Pinto, F.M., Larrinaga, G. **2010**. Expression and activity profiles of DPP IV/CD26 and NEP/CD10 glycoproteins in the human renal cancer are tumor-type dependent. *BMC Cancer*, 10(1), 193.
- Vega, L., Styblo, M., Patterson, R., Cullen, W., Wang, C., Germolec, D. **2001**. Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 172(3), 225-232.
- Vega, L. **2009**. Effects of arsenic exposure on the immune system and mechanism of action. En: J.D. Gosselin y I.M. Fancher (Eds), *Environmental health risks: Lead poisoning and arsenic exposure*, Nova Science Publishers, USA, pp. 155-166.
- Vetter, J. **2004**. Arsenic content of some edible mushroom species. *Eur. Food Res. Technol.*, 219(1), 71-74.
- Waeytens, A., De Vos, M., Laukens, D. **2009**. Evidence for a potential role of metallothioneins in inflammatory bowel diseases. *Mediators Inflamm.*, 2009, ID729172.
- Wang, X., Spandidos, A., Wang, H., Seed, B. **2011**. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res.*, 40(D1), D1144-D1149.
- Wang, Y., Zhao, F. **2009**. Effects of exogenous glutathione on arsenic distribution and NO metabolism in brain of female mice exposed to sodium arsenite through drinking water. *J. Environ. Health*, 26(12), 1046-1048.

Werling, R.W., Yaziji, H., Bacchi, C.E., Gown, A.M. **2003**. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.*, 27(3), 303-310.

Weschawalit, S., Thongthip, S., Phutrakool, P., Asawanonda, P. **2017**. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 10, 147-153.

Williams, P., Price, A., Raab, A., Hossain, S., Feldmann, J., Meharg, A.A. **2005**. Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environ. Sci. Technol.*, 39(15), 5531-5540.

Williams, T., Rawlins, B., Smith, B., Breward, M. **1998**. *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. Health*, 20(4), 169-177.

Wong, N., Britton, M., Choi, G., Stanton, T., Bicknell, D., Wilding, J., Bodmer, W. **2004**. Loss of CDX1 expression in colorectal carcinoma: promoter methylation, mutation, and loss of heterozygosity analyses of 37 cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(2), 574-579.

Wu, M.-M., Chiou, H.-Y., Wang, T.-W., Hsueh, Y.-M., Wang, I.-H., Chen, C.-J., Lee, T.-C. **2001**. Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan. *Environ. Health Perspect.*, 109(10), 1011-1017.

Xie, Z.M., Huang, C.Y. **1998**. Control of arsenic toxicity in rice plants grown on an arsenic-polluted paddy soil. *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.*, 29(15-16), 2471-2477.

Yamauchi, H., Yamamura, Y. **1985**. Metabolism and excretion of orally administered arsenic trioxide in the hamster. *Toxicology*, 34(2), 113-121.

Yan, Z., Xiaoyu, Z., Zhixin, S., Di, Q., Xinyu, D., Jing, X., Jing, H., Wang, D., Xi, Z., Chunrong, Z. **2016**. Rapamycin attenuates acute lung injury induced by LPS through inhibition of Th17 cell proliferation in mice. *Sci. Rep.*, 6, 20156.

Yasmin, R., Siraj, S., Hassan, A., Khan, A.R., Abbasi, R., Ahmad, N. **2015**. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. *Mediators Inflamm.*, 2015, ID201703.

- Yoshida, K., Kuroda, K., Inoue, Y., Chen, H., Date, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S., Endo, G. **2001**. Metabolism of dimethylarsinic acid in rats: production of unidentified metabolites in vivo. *Appl. Organomet. Chem.*, 15(6), 539-547.
- Yost, L., Schoof, R., Aucoin, R. **1998**. Intake of inorganic arsenic in the North American diet. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 4(1), 137-152.
- Yunus, F.M., Khan, S., Chowdhury, P., Milton, A.H., Hussain, S., Rahman, M. **2016**. A review of groundwater arsenic contamination in Bangladesh: the millennium development goal era and beyond. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13(2), 215.
- Zavala, Y.J., Gerads, R., Gürleyük, H., Duxbury, J.M. **2008**. Arsenic in rice: II. Arsenic speciation in USA grain and implications for human health. *Environ. Sci. Technol.*, 42(10), 3861-3866.
- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Narbad, A., Chen, Y.Q., Zhang, H., Tian, F., Chen, W. **2014**. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(13), 4063-4071.
- Zhang, J., Li, T., Yang, Y.-L., Liu, H.-G., Wang, Y.-Z. **2015**. Arsenic concentrations and associated health risks in *Laccaria* mushrooms from Yunnan (SW China). *Biol. Trace Elem. Res.*, 164(2), 261-266.
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W. **2016**. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, ID4350965.
- Zhao, Y., Toselli, P., Li, W. **2012**. Microtubules as a critical target for arsenic toxicity in lung cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9(2), 474-495.
- Zhou, X., Sun, H., Ellen, T.P., Chen, H., Costa, M. **2008**. Arsenite alters global histone H3 methylation. *Carcinogenesis*, 29(9), 1831-1836.
- Ziegler, D., Ametov, A., Barinov, A., Dyck, P.J., Gurieva, I., Low, P.A., Munzel, U., Yakhno, N., Raz, I., Novosadova, M. **2006**. Oral treatment with α -lipoic acid improves symptomatic diabetic polyneuropathy: the SYDNEY 2 trial. *Diabetes Care*, 29(11), 2365-2370.

Zou, K., Lu, X., Ye, K., Wang, C., You, T., Chen, J. **2016**. Krüppel-like factor 2 promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma through up-regulation of c-myc. *Cancer Biol. Ther.*, 17(1), 20-26.

Zucco, F., Batto, A.-F., Bises, G., Chambaz, J., Chiusolo, A., Consalvo, R., Cross, H., Negro, G.D., de Angelis, I., Fabre, G., Guillou, F., Hoffman, S., Laplanche, L., Morel, E., Pinçon-Raymond, M., Prieto, P., Turco, L., Ranaldi, G., Rousset, M., Sambuy, Y., Scarino, M.L., Torreilles, F., Stamatii, A. **2005**. An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *ATLA*, 603-618.

Anexo

Listado de publicaciones

La presente tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones en congresos.

Publicaciones

Chiocchetti, G.M., Vélez, D., Devesa, V. 2018. Effect of subchronic exposure to inorganic arsenic on the structure and function of the intestinal epithelium.

Toxicol. Lett. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.01.011.

Chiocchetti, G.M., Piedra, C.J., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V. 2018. Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity.

Crit. Rev. Food Sci. Nutr. DOI: 10.1080/10408398.2017.1421521.

Piedra, C.J., Chiocchetti, G.M., Clemente, M.J., Vélez, D., Devesa, V. 2017. Dietary compounds as modulators of metals and metalloids toxicity.

Crit. Rev. Food Sci. Nutr. DOI: 10.1080/10408398.2017.1302407.

Chiocchetti, G.M., Vélez, D., Devesa, V. Mechanisms of inorganic arsenic toxicity on the intestinal epithelium. *En vías de publicación.*

Chiocchetti, G.M., Vélez, D., Devesa, V. Effect of chronic exposure to inorganic arsenic on intestinal cells. *En vías de publicación.*

Chiocchetti, G.M., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V. Lactobacillus strains reduce the toxic effect of inorganic arsenic on the intestinal epithelium. *En vías de publicación.*

Contribuciones a congresos

Chiocchetti, G.M., Vélez, D., Devesa, V. Intestinal toxicity of a subchronic exposure to inorganic arsenic. Póster presentado en el congreso **EUROTOX 2017**, celebrado en Bratislava (Eslovaquia), en septiembre de 2017.

Chiocchetti, G.M., Puig, S., Vélez, D., Devesa, V. Protective role of *S. cerevisiae* on inorganic arsenic toxicity upon the intestinal epithelium. Póster presentado en el congreso **EUROTOX 2017**, celebrado en Bratislava (Eslovaquia), en septiembre de 2017.

Chiocchetti, G.M., Vélez, D., Devesa, V. *In vitro* chronic exposure to arsenite induces tumor cell characteristics in colon epithelial cells. Póster presentado en el congreso **EUROTOX 2016**, celebrado en Sevilla (España), en septiembre de 2016.

Chiocchetti, G.M., Alonso-Garrido, M., Vélez, D., Devesa, V. *In vitro* evaluation of the effect to a continued exposure to inorganic arsenic upon intestinal epithelium. Presentación oral en el congreso **6th FESTEM**, celebrado en Catania (Italia), en mayo de 2016.

Chiocchetti, G.M., Alcántara, C., Monedero, V., Zúniga, M., Vélez, D., Devesa, V. Effect of inorganic arsenic on the intestinal epithelium and possible role of probiotics. Póster presentado en el congreso **EUROTOX 2015**, celebrado en Oporto (Portugal), en septiembre de 2015.

